

**Untersuchung zur Pathophysiologie der experimentellen
Pneumokokkenmeningitis an der Ratte:
Bedeutung von Granulozyten und mononukleären Zellen**

vorgelegt von
Michaela Ramersdorfer
aus Beilngries
2002

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Th. Brandt, FRCP)

**Untersuchung zur Pathophysiologie der experimentellen
Pneumokokkenmeningitis an der Ratte:
Bedeutung von Granulozyten und mononukleären Zellen**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Michaela Ramersdorfer
aus Beilngries
2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H.-W. Pfister

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Aepfelbacher
Prof. Dr. Ch. Bender-Götze

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. U. Ködel
Dr. R. Paul

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2002

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Epidemiologie und Klinik der Pneumokokkenmeningitis	1
1.1.1. Komplikationen der bakteriellen Meningitis	2
1.2. Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis	3
1.2.1. Das Konzept der Pathogenese	3
1.2.2. Virulente mikrobielle Faktoren	5
1.3. Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis	5
1.3.1. Die Frühphase und die fortgeschrittene Phase der bakteriellen Meningitis	5
1.3.2. Veränderungen im intrakraniellen Druck und die Entstehung des Hirnödems	6
1.4. Regulierung der Leukozytenimmigration in den Liquor	8
1.4.1. Chemokine und Chemotaxie	9
1.4.2. Adhäsionsmoleküle	11
1.4.3. Die Leukozyten-Adhäsionskaskade	14
2. Fragestellung	16
3. Material und Methoden	18
3.1. Tiermodelle	18
3.2. Versuchsdurchführung	19
3.2.1. Tierpräparation	19
3.2.2. Induktion der Meningitis	20
3.2.3. Induktion der Neutropenie	21
3.2.4. Durchführung der Monozyten/ Makrophagen-Depletion	21
3.2.5. Versuchsgruppen	22
3.2.6. Liquorzellzahl	23
3.2.7. Quantifizierung der Blut-Hirnschranken-Permeabilität	23
3.3. Bakteriensuspensionen	24
3.3.1. Hitze-abgetötete Pneumokokken (HKP)	24
3.3.2. Pneumokokken	25

3.4.	Eingesetzte Substanzen und Statistik	25
3.4.1.	Granulozyten-Antikörper (PMN-Antikörper)	25
3.4.2.	Λ -Carrageenan	26
3.4.3.	Statistische Methoden	26
3.4.4.	Bildmaterial	27
4.	Ergebnisse	28
4.1.	Pathophysiologische Veränderungen in der Frühphase der experimentellen Meningitis	28
4.1.1.	Physiologische Parameter	28
4.1.2.	Differentialblutbild zur Überprüfung der Depletion	31
4.1.3.	Liquorzellzahl	32
4.1.4.	Intrakranieller Druck (ICP)	34
4.1.5.	Veränderungen der Blut-Hirnschranke	36
4.2.	Pathophysiologische Veränderungen in der fortgeschrittenen Phase der experimentellen Meningitis	39
4.2.1.	Physiologische Parameter	39
4.2.2.	Differentialblutbild	40
4.2.3.	Liquorzellzahl	41
4.2.4.	Intrakranieller Druck	42
4.2.5.	Veränderungen der Blut-Hirnschranke	43
5.	Diskussion	46
5.1.	Effekte in der Frühphase der bakteriellen Meningitis	46
5.1.1.	Auswirkungen einer PMN-Depletion auf die Frühphase der Pneumokokkenmeningitis	46
5.1.1.1.	Kontroverse Ansichten über die Bedeutung der Leukozyten während der bakteriellen Meningitis	46
5.1.1.2.	Blockade der Endothel-Leukozyten-Interaktion	48
5.1.1.3.	Neutrophile als Produzenten gewebezerstörender Faktoren	49
5.1.1.4.	Neutrophile und Monozyten bei anderen akuten oder chronisch entzündlichen Erkrankungen	55

5.1.1.5. Antiinflammatorische Substanzen vermindern pathophysiologische Veränderungen im Verlauf der Meningitis	56
5.1.2. Effekte der Makrophagen- Depletion auf die Frühphase der Pneumokokkenmeningitis	59
5.1.3. Effekte der kombinierten Depletion auf die Frühphase der Pneumokokkenmeningitis	62
5.2. Auswirkungen der PMN-Depletion auf die Spätphase der Pneumokokkenmeningitis	64
<u>6. Zusammenfassung</u>	<u>66</u>
<u>7. Literaturverzeichnis</u>	<u>69</u>

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Klinik der Pneumokokkenmeningitis

Die bakterielle Meningitis wurde aus klinischer und pathologischer Sicht erstmals zu Beginn des 19. Jahrhunderts beschrieben. Über ein Jahrhundert lang – vor der Einführung der Antibiotika – zeichnete sich die Erkrankung vor allem durch ihren überwiegend tödlichen Verlauf aus (Toomey und Roach, 1939). Mit dem Anbrechen des Zeitalters der Antibiose sanken die Mortalitätsraten von Patienten mit bakterieller Meningitis rapide, blieben aber nichtsdestotrotz auf einem zu hohem Grad von 20-25% bestehen (Schuchat et al., 1997).

Folgende fünf Erreger gelten als die Hauptverursacher der bakteriellen Meningitis: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus Gruppe B* und *Listeria monocytogenes* (Schuchat et al., 1997).

Über viele Jahre hinweg war *Haemophilus influenzae* der Hauptverursacher dieser Erkrankung, die vor allem Kinder im Alter zwischen 1 und 5 Jahren befiel. 70% aller bakteriellen Meningitiden in diesem Lebensalter wurden *Haemophilus* zugeschrieben (Schuchat et al., 1995). Mit Einführung des Impfstoffes gegen *Haemophilus influenzae* Typ B (HIB) 1989/1990 kam es zu einer dramatischen Reduktion der HIB-Meningitis-Fälle bei Kindern innerhalb der ersten fünf Lebensjahre. Während 1991 98 Fälle *Haemophilus influenzae* bedingter Meningitiden bei Kindern von 0-5 Jahren in den neuen Bundesländern und Berlin registriert wurden, kamen 1999 im gleichen Gebiet nur noch vier Erkrankungsfälle zur Meldung (Robert Koch Institut, 2000). Mit der Elimination von *Haemophilus influenzae* wandelte sich nicht nur das Erregerspektrum, sondern die Meningitis verlor auch ihren Ruf als Erkrankung, die primär kleine Kinder befiel.

Streptococcus pneumoniae gilt als der zur Zeit häufigste Erreger der ambulant erworbenen Meningitis. In einer Studie von Schuchat et al. 1995 betrug sein Anteil 47% bei einer Gesamtzahl von 248 untersuchten Fällen bakterieller Meningitis.

Die jährliche Inzidenz der Pneumokokkenmeningitis in den USA schwankt zwischen 1,1 bis 1,5 Krankheitsfälle pro 100.000 Einwohner. Betroffen sind vor allem Säuglinge im Alter von 1 bis 23 Monaten und Erwachsene jenseits des 29. Lebensjahres. Die allgemeine Letalitätsrate liegt bei 20-25%, wobei Patienten über 60 Jahren eine deutlich höhere Sterblichkeit aufweisen als Jüngere (Durand et al., 1993; Schuchat et al., 1997). Zudem zeichnet sich ein epidemiologischer Trend in der Zunahme antibiotika-resistenter Stämme von *S. pneumoniae*

ab, der immer häufiger das Ausweichen auf Reserveantibiotika notwendig macht (Collignon und Turnidge, 2000). Bis zu 30% der Überlebenden erleiden schwere neurologische Folgeschäden in Form von Hörschäden, Visusminderung, Sprachstörungen, motorischen Störungen, Krampfanfällen und intellektueller Leistungsminderung (Dodge et al., 1984; Grimwood et al., 1995; Kirkpatrick et al., 1994).

1.1.1 Komplikationen der bakteriellen Meningitis

Nahezu 50% der Patienten mit Pneumokokkenmeningitis weisen einen ungünstigen Verlauf auf, 70% dieser Patienten versterben oder erleiden neurologische Folgeschäden (Pfister et al., 1993).

Das Spektrum der Komplikationen umfaßt Störungen des Zentralnervensystems (ZNS) und systemische Komplikationen wie septischer Schock, disseminierte intravasale Gerinnung und akutes Lungenversagen (Pfister et al., 1993).

Hauptverantwortlich für das Auftreten von Folgeschäden und die hohe Letalität der Pneumokokkenmeningitis sind vor allem ZNS-Komplikationen. Bei 24% der Patienten kommt es zu Krampfanfällen im Verlaufe der Erkrankung, 4% entwickelten isolierte Hirnnervenpareesen (Durand et al., 1993). Von entscheidender Bedeutung für die Prognose der Meningitis scheinen das Auftreten eines Hirnödems, eines Hydrozephalus, zerebrovaskulärer Komplikationen und seltenerer Ereignisse wie Hirnabszeß, subdurales Empyem und Hämatom zu sein (Swartz, 1984; Pfister, 1989; Pfister et al., 1993). Ein besonderes Gewicht fällt dabei auf die Veränderungen an den Hirngefäßen.

Die von Pfister et al. im Jahre 1992 in Angiographien beschriebenen Gefäßveränderungen bei bakterieller Meningitis im Erwachsenenalter umfassen Wandunregelmäßigkeiten, Ektasien, Thrombosen, Verschlüsse und Stenosierungen. Letztere können durch Entzündungsgeschehen in der Gefäßwand (Cairns und Russel, 1946; Doge und Swartz, 1965) und Vasospasmen (Igarashi et al., 1984) verursacht werden. Zerebrovaskuläre Komplikationen dieser Art können Infarzierungen mit schweren irreversiblen Schäden wie Hemiparesen, Spastik, Ataxie, Aphasie und fokale epileptische Anfälle nach sich ziehen (Cabral et al., 1987). Des Weiteren sind Herniationen und Ischämien im Rahmen des hierbei entstehenden vasogenen und zytotoxischen Hirnödems (Pfister, 1989) oder durch hydrozephale Erweiterungen des Ventrikelsystems möglich (Pfister et al., 1993).

1.2 Pathogenese der Pneumokokkenmeningitis

1.2.1 Das Konzept der Pathogenese

Das Eindringen der Bakterien in das Zentralnervensystem erfolgt vorwiegend auf zwei Wegen:

1. Per continuitatem

Zu den Faktoren, die auf diesem Wege eine Meningitis auslösen können, zählen insbesondere Otitis media, Sinusitis, Schädel-Hirntraumata, neurochirurgische Eingriffe und Durazerreißung mit Liquoraustritt. In 19-22% aller Meningitisfälle besteht eine Assoziation mit akuter Otitis media (Durand et al., 1993; Friedel, 1998).

2. Auf hämatogenem Weg

Hierfür müssen die Erreger die Schleimhaut besiedeln, in den Blutkreislauf eindringen, sich dabei den Abwehrmechanismen entziehen und schließlich die Blut-Hirnschranke überqueren. Um sich auf der Schleimhaut ansiedeln zu können, setzen *S. pneumoniae* IgA-Proteasen frei, die das sekretorische IgA funktionslos machen und damit die Anbindung der Pathogene an das Epithel erleichtern (Plaut, 1983). Zur Überwindung des Mucosaepithels sind verschiedene Mechanismen denkbar. Theoretisch könnten die Bakterien zwischen den Endothelzellen ins Blut penetrieren oder mittels Transzytose über membrangebundene Vakuolen in die Strombahn transferiert werden (Spellerberg und Tuomanen, 1994; Stephens und Farley, 1991). *In vitro* Studien von Cundell et al. (1995) ergaben, daß Pneumokokken das Gefäßendothel wie das der Lunge beispielsweise mittels rezeptor-gebundener Transzytose überwinden können. Auf dem Weg zum ZNS dient den Pneumokokken ihre Polysaccharidkapsel als Schutz gegen wirtsspezifische Abwehrfaktoren – insbesondere gegen die Komplement-vermittelte Phagozytose durch Granulozyten (Brown et al., 1983).

Der Weg vom Blut über die Blut-Hirnschranke in den Subarachnoidalraum gilt immer noch als wenig verstanden. Die Blut-Hirnschranke findet sich an drei Stellen: am Epithel des Plexus choroideus, der Arachnoidmembran und v.a. am Endothel der Zerebralkapillaren. Der Transit von Bakterien ist sowohl trans- als auch parazellulär denkbar.

Ring et al. (1998) und Tuomanen (1996) verfolgten die Theorie der rezeptor-vermittelten Transzytose als Möglichkeit der Penetration von Pneumokokken. Hierbei haften sich *S. pneumoniae* zunächst an ruhende Epithelzellen über Glykogenverbindungen. Eine anschließende Aktivierung der Zelle durch Thrombin oder Zytokine resultiert in der Expression des Plättchen-aktivierenden Faktor(PAF)-Rezeptors. Von entscheidender Bedeutung für die Invasion scheint eine Phasenvariation der Pneumokokken zu sein, die

durch einen Wechsel ihrer Morphologie von undurchsichtig zu transparent gekennzeichnet ist. Während die undurchsichtige Variante besser im Blutstrom überleben kann, zeichnet sich die transparente Form durch eine größere Fähigkeit zur Invasion aus. Sie besitzt weniger Kapselproteine, mehr Phosphorylcholin, dem natürlichen Liganden des PAF-Rezeptors, und eine größere Menge des cholin-bindenden Proteins A (CbpA) – ein Protein, welches die Bindung von Pneumokokken an aktivierte Zellen zu fördern scheint. Über diese Kombination, gelingt es wohl den Bakterien, sich an den Rezeptor zu binden. Die Pneumokokken könnten daraufhin zusammen mit dem PAF-Rezeptor in die Zelle aufgenommen und im Inneren von Vakuolen zur gegenüberliegenden Seite transportiert werden.

Im Kontrast dazu stehen die von Zysk et al. (2001) kürzlich erhobenen Daten. Zysk et al. konnten nachweisen, daß das von Pneumokokken sezernierte Pneumolysin an der Endothelzellschicht, gebildet aus menschlicher bzw. Rinderhirnschicht (*bovine* und *human brain microvascular endothelial cells*; BBMEC/HBMEC) – *in vitro* Modelle der Blut-Hirnschranke – zur Nekrose der Endothelzellen und Zerstörung der Zellschichtintegrität führt, während Pneumolysin-defiziente Mutanten oder reine Zellwandbestandteile keine Zellzerstörung verursachen. Damit stände den Pneumokokken auch der Weg durch direkte Schwächung der Blut-Hirnschranke mittels Pneumolysin zum Eintritt in den Subarachnoidalraum offen.

Sind die Pneumokokken erst einmal in den Subarachnoidalraum eingedrungen, treffen sie auf ideale Wachstumsbedingungen und können sich praktisch ungehindert vermehren, da humorale und zelluläre Abwehrmechanismen im Liquor insuffizient zu sein scheinen. Ernst et al. zeigten 1983 in einem Tiermodell der Pneumokokkenmeningitis an mit Zyklophosphamid behandelten leukopenischen Kaninchen, daß das Wachstum der Bakterien im Liquor unabhängig von der Anwesenheit der Leukozyten stattfindet. Ähnliche Ergebnisse erzielten Tuomanen et al. 1989 in ihrer Versuchsreihe. Eine funktionelle Neutropenie durch die Blockade des CD18-Komplexes ließ auch hierbei das Pneumokokkenwachstum im Liquor unbeeinflusst.

Überschreitet das Bakterienwachstum im Liquorraum eine Grenze von mehr als 10^5 Kolonie bildende Einheiten (KBE)/ml, wird eine von einem Leukozyteneinstrom gefolgte Entzündungskaskade in Gang gesetzt (Tuomanen et al., 1985), die einen erheblichen Schaden am Nervengewebe mit sich bringen kann.

1.2.2 Virulente mikrobielle Faktoren

Bei *S. pneumoniae* handelt es sich um einen Gram-positiven, nicht-sporenbildenden, bekapselten Diplokokkus. Das Fehlen oder Vorhandensein der Bakterienkapsel beeinflusst nicht die Stärke der Entzündungsreaktion. Die Injektion von kapsulären Polysacchariden oder bekapselten Hitze-abgetöteten Bakterien in den Liquor löste keine signifikante Immunantwort aus (Tuomanen et al., 1985; Spellerberg und Tuomanen, 1994). Unbekapselte lebende, aber auch Hitze-abgetötete Bakterien dagegen führen bei Applikation in angemessener Dosierung zu einer bemerkenswerten Entzündungsantwort, was darauf schließen läßt, daß andere Komponenten als Kapselbestandteile die Immunantwort provozieren (Tuomanen et al., 1985). Die höchste spezifische Entzündungsaktivität im Liquor besitzt die Zellwand. Sie besteht aus einem Netzwerk von Peptidoglykanen und Teichonsäure. β -Lactamantibiotika triggern die Autolyse der Zellwand und verursachen damit die Freisetzung extrem hoher Konzentrationen entzündlicher Zellwandkomponenten (Spellerberg und Tuomanen, 1994).

Ein bis drei Stunden nach Injektion von lebenden Bakterien oder Zellwandbestandteilen in den Subarachnoidalraum wird eine Entzündungskaskade in Gang gesetzt, die über weiter unten ausführlich beschriebene Mechanismen zum Einstrom von Abwehrzellen aus dem Blut führt (s. Abschnitt 1.3).

1.3 Pathophysiologie der Pneumokokkenmeningitis

1.3.1 Die Frühphase und die fortgeschrittene Phase der bakteriellen Meningitis

Versucht man die pathophysiologischen Veränderungen während der Pneumokokkenmeningitis in eine Früh- und fortgeschrittene Phase zu untergliedern, so gelten als Charakteristika für die Frühphase die Hyperämie, der Beginn des intrakraniellen Druckanstieges und der Blut-Hirnschrankenstörung, sowie die Induktion der Leukozytenrekrutierung (Pfister et al., 1990a, 1992b).

Unter der fortgeschrittenen Phase dagegen versteht man die etablierte meningeale Inflammation bei erhöhtem intrakraniellen Druck und Hirnödem mit zusätzlicher Störung der Autoregulation und der dadurch möglichen Gefahr der Hypo- oder Hyperperfusion (Tureen et al., 1990; Koedel und Pfister, 1997).

1.3.2 Veränderungen im intrakraniellen Druck und die Entstehung des Hirnödems

Die Pathophysiologie der bakteriellen Meningitis und besonders die daraus resultierenden Komplikationen sind insgesamt ein komplexer Mechanismus aus zahlreichen miteinander verwobenen Aktionen und Reaktionen, von denen bis heute bei weitem noch nicht alle vollständig geklärt sind.

Die folgenden Abbildungen 1.1 und 1.2 sollen einen groben Überblick über die Mechanismen der Entstehung zerebraler Sekundärschäden bei der eitrigen Meningitis geben:

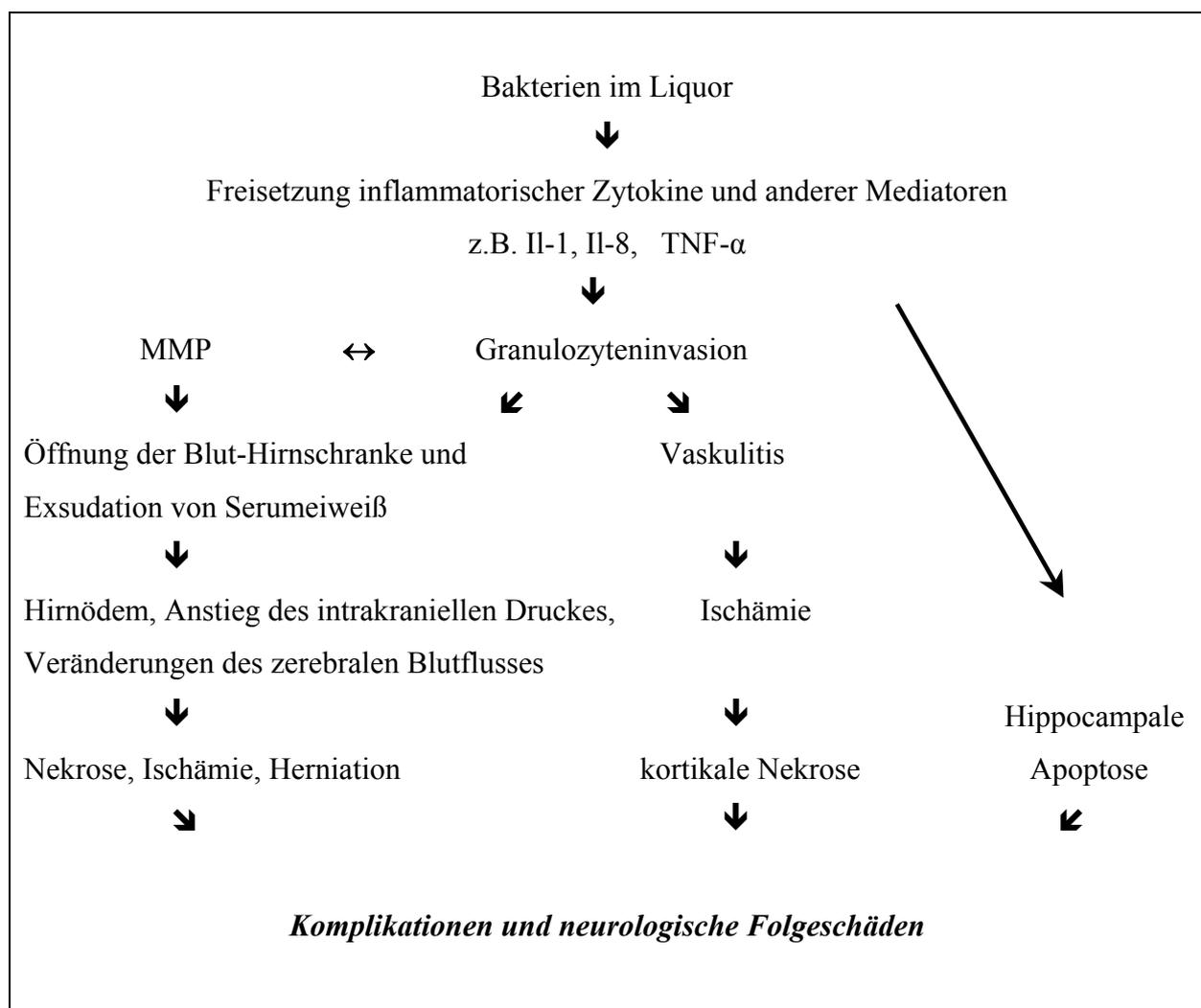


Abb.1.1: Hypothetische Kaskade der pathophysiologischen Abläufe, die zu neurologischem Schaden als Folge der bakteriellen Meningitis führen (nach Quagliariello und Scheld, 1993; Leib und Täuber, 2000; modifiziert)

Die Öffnung der *tight junctions*, der damit bedingte parazelluläre Übertritt des Albumin und die Ausbildung des vasogenen Hirnödems könnten zum großen Teil durch die Freisetzung schädigender Produkte wie Proteasen, Sauerstoffradikale, Glutamat und Stickstoffmonoxid (NO) aus eingewanderten Leukozyten bedingt sein (Fishman, 1975; Weiss, 1989; Koedel et al., 1994; Dallegri und Ottonello, 1997). Die Entwicklung des Hirnödems kann aber auch auf zytotoxischem (durch metabolische Störungen im Energiestoffwechsel oder durch Toxine von Bakterien und Neutrophilen) und interstitiellem Weg (durch Schwächung der Liquorresorption) zustande kommen. Alle drei Mechanismen können einen Anstieg des intrakraniellen Druckes bewirken (Quagliarello und Scheld, 1993).

Neben dem Hirnödem sind auch Veränderungen des zerebralen Blutvolumens verantwortlich für die Steigerung des intrakraniellen Druckes im Verlaufe der Meningitis (Quagliarello und Scheld, 1992, 1993; Tureen et al., 1990). Beim Gesunden sorgt eine Autoregulation durch Dilatation und Konstriktion zerebraler Gefäße bei Schwankungen des systemischen Blutdrucks für eine konstante zerebrale Perfusion. Tureen et al. (1990) beobachteten einen Verlust der zerebrovaskulären Autoregulation in der fortgeschrittenen Phase der experimentellen Pneumokokkenmeningitis. Als Folge hiervon zeigten die Versuchstiere eine direkte Fluktuation des zerebralen Blutflusses und intrakraniellen Druckes zum mittleren systemischen Blutdruck – unabhängig von der arteriellen CO₂-Konzentration. Ein Blutdruckanstieg kann hierbei über die Zunahme des zerebralen Blutvolumens zu einer intrakraniellen Drucksteigerung und einer daraus folgenden Abnahme des Perfusionsdruckes führen. Eine Reduktion des Perfusionsdruckes kann bei fehlender Autoregulation jedoch ebenso durch den Abfall des systemischen Blutdruckes mit parallelem Rückgang der Hirndurchblutung gegeben sein (Pfister, 1989). Durch die Minderperfusion entsteht eine Unterversorgung des Gehirns mit Sauerstoff und Glukose. Die daraus resultierende metabolische Störung bewirkt eine weitere Zunahme des Ödems und des zerebralen Blutvolumens mit Gefahr der Ischämie (Baethmann et al., 1997) (s. Abb.1.2).

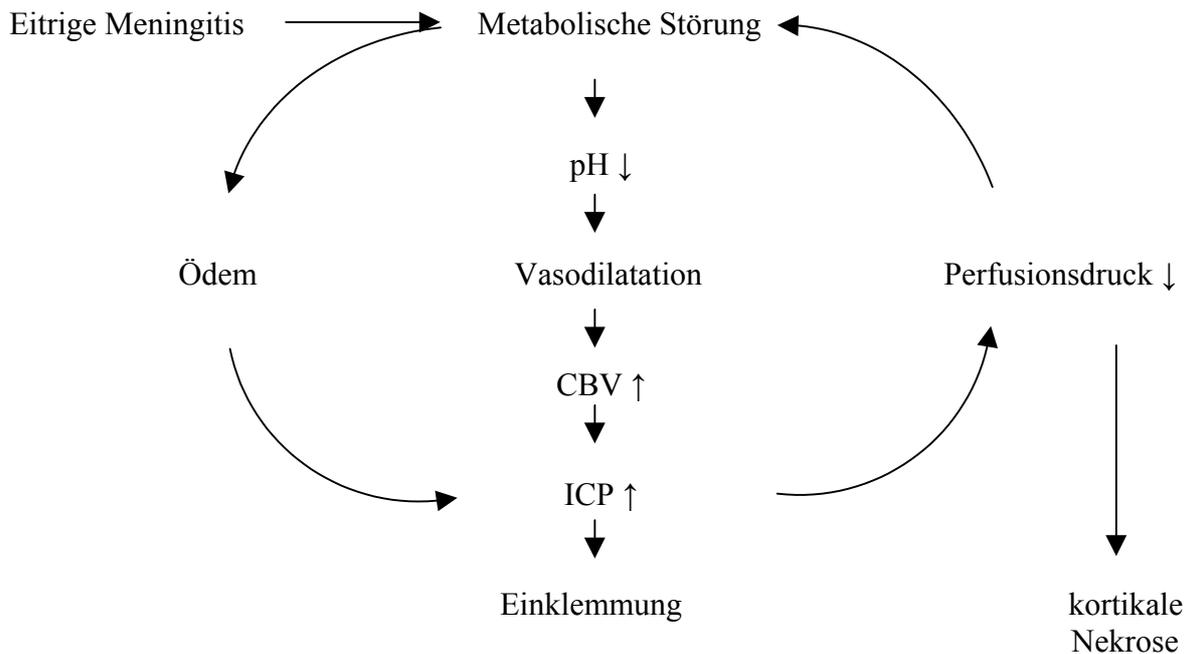


Abb. 1.2: Mechanismen der Entstehung zerebraler Sekundärschäden bei der bakteriellen Meningitis. CBV: cerebrales Blutvolumen; ICP: intrakranieller Druck (auf der Grundlage von Pfister, 1989)

1.4 Regulierung der Leukozytenimmigration in den Liquorraum

Um den Körper effektiv nach Eindringlingen absuchen zu können, müssen die Zellen des Immunsystems nicht nur die Fähigkeit besitzen, im Blut zu zirkulieren, sondern auch Gewebe penetrieren zu können, um an den Ort der Infektion zu gelangen. Die Lokalisation der Zellen kann durch das Wechselspiel von Interaktionen mit Zelloberflächenmolekülen, die die Adhäsion regulieren, und Chemokinen, die die Zellwanderung dirigieren, verändert werden. Die Akkumulation der Leukozyten im Liquor ist ein wichtiger Teil der Immunantwort auf die Erreger. Das Zellbild im Liquor bei bakterieller Meningitis weist zu 90-95% polymorphkernige Neutrophile (PMN) auf.

1.4.1 Chemokine und Chemotaxie

Chemokine gehören einer großen Familie chemotaktischer Zytokine an, die bei der Rekrutierung und Aktivierung einer Vielzahl von Leukozyten eine bedeutende Rolle spielen.

Basierend auf der Position ihrer Cysteinbausteine werden sie in drei Familien unterteilt:

Die CXC-Familie enthält vier Cysteine, wovon die ersten beiden durch eine Aminosäure getrennt sind. Mitglieder sind u.a. Interleukin-8 (IL-8), GRO α (*growth related oncogene*), und IP-10 (*interferon- γ -inducible protein-10*) (Lahrtz et al., 1998). IL-8 und GRO α üben ihre chemotaktische Wirkung hauptsächlich auf Neutrophile aus (Spanaus et al., 1997).

In der CC-Familie sind die ersten zwei Cysteinsteine miteinander verbunden. Zu ihr zählen MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*), MIP-1 α , MIP-1 β (*macrophage inflammatory protein*) und RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*). CC-Chemokine ziehen vor allem mononukleäre Zellen an (Spanaus et al., 1997; Lahrtz et al., 1998).

Eine kürzlich neu identifizierte Gruppe ist die CX₃C-Familie, in der die ersten beiden Cysteine durch drei Aminosäuren voneinander getrennt sind (Bazan et al., 1997).

Die stärkste chemotaktische Wirkung besitzen IL-8 und MCP-1. Stimulierend auf ihre Produktion und Freisetzung wirken Zytokine wie IL-1 und Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) (Spanaus et al., 1997) aber auch LPS (Baggiolini et al., 1995). Tabelle 1 und 2 zeigen eine Übersicht über verschiedene Chemokine, ihre Rezeptoren und Zielzellen.

*Tabelle 1: CXC Chemokine, ihre Rezeptoren und Zielzellen
(nach Lahrtz et al., 1998)*

Chemokine	Rezeptoren	Zielzellen
Mensch		
IL-8	CXCR1, 2	PMN
GRO α	CXCR2	PMN
GRO β	CXCR2	PMN
GRO γ	CXCR2	PMN
ENA 78	CXCR2	PMN
IP-10	CXCR3	aktivierte T-Zellen
SDF-1	CXCR4	Neutrophile, Monozyten
NAP-2	CXCR2	PMN

Anmerkungen: IL-8, Interleukin-8; GRO, growth related oncogene; ENA, epithelial cell-derived neutrophil activating peptide; IP-10, interferon- γ -inducible protein-10; SDF-1, stromal cell-derived factor-1; NAP-2, neutrophil activating peptide-2; PMN, polymorphkernige Granulozyten.

*Tabelle2: CC Chemokine, ihre Rezeptoren und Zielzellen
(nach Lahrtz et al., 1998)*

Chemokine	Rezeptoren	Zielzellen
Mensch		
MCP-1	CCR2	aktivierte T-Zellen, Monozyten, Basophile
MCP-2	CCR1, 2	aktivierte T-Zellen, Monozyten, Basophile
MCP-3	CCR1, 2, 3	aktivierte T-Zellen, Monozyten, Basophile, Eosinophile
MCP-4	CCR2, 3	aktivierte T-Zellen, Monozyten, Basophile, Eosinophile
MCP-5	CCR2	Monozyten, T-Zellen, Eosinophile
	CCR1, 3, 4, 5	aktivierte T-Zellen, Monozyten, Basophile, Eosinophile
RANTES		
MIP-1 α	CCR1, 4, 5	aktivierte T-Zellen, Monozyten, Basophile
MIP-1 β	CCR5	aktivierte T-Zellen, Monozyten
MIP-3 α	CCR6	dendritische Zellen
Eotaxin	CCR3	Eosinophile, Basophile
TARC	CCR4	T-Zellen

Anmerkungen: MCP, monocyte chemoattractant protein; RANTES, regulated upon activation in normal T cells expressed and secreted; MIP, macrophage inflammatory protein; TARC, thymus and activation-regulated chemokine.

Welche Zellen im Subarachnoidalraum für die Produktion von Chemokinen während der Meningitis zuständig sind, ist nicht genau bekannt. Mononukleäre Zellen, die sich in geringer Zahl im Liquor befinden, könnten MCP-1, IL-8 und IP-10 sezernieren (Lahrtz et al., 1998). Mikroglia, gewebetypische Makrophagen, scheinen vor allem an der Produktion von IL-8 beteiligt zu sein (Ehrlich et al., 1998). Daneben stellen auch Endothelzellen (Sica et al., 1990) und Astrozyten (Aloisi et al., 1992) eine mögliche Quelle für Chemokine dar.

Chemokine unterstützen auf zwei Arten die Leukozytenimmigration. Erstens binden sie von der Endothelzellmembran aus an Rezeptoren auf der Oberfläche der Leukozyten und aktivieren dadurch deren Integrine - Adhäsionsmoleküle, die es den Leukozyten ermöglichen, eine feste Bindung mit der Gefäßwand einzugehen. Zweitens nimmt man an, daß Leukozyten entlang eines Gradienten aus Chemokinen und anderen chemotaktischen Faktoren das Endothel und die extrazelluläre Matrix durchwandern (Springer, 1994; Adams und Lloyd, 1997; Lahrtz et al., 1998).

Es ist davon auszugehen, daß Chemokine auch bei der bakteriellen Meningitis ähnliche Funktionen ausüben.

In Liquorproben von Patienten mit bakterieller Meningitis fanden sich erhöhte Konzentrationen an IL-8, GRO α , MCP-1, MIP-1 α und β . Die höchsten Werte wurden für IL-

8 und MCP-1 festgestellt (Spanaus et al., 1997). IL-8 und GRO- α -Konzentrationen korrelierten mit der Anzahl immigrierter Granulozyten im Liquor. Eine ähnliche Korrelation fand sich auch zwischen MCP-1-Werten und der Zahl mononukleärer Zellen im Liquor (Sprenger et al., 1996). Ostergaard et al. (2000a) entdeckten, daß durch Blockade von IL-8 die Liquorpleozytose während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis deutlich reduziert werden kann. Lopez-Cortes et al. (1995) stellten ebenfalls bei Patienten mit Meningitis eine direkte Korrelation zwischen der IL-8-Konzentration und der Zahl granulozytärer Zellen im Liquor fest.

Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, daß Chemokine eine bedeutende Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten während der bakteriellen Meningitis spielen.

1.4.2 Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle, die in den Entzündungsprozeß involviert sind, gehören insbesondere folgenden Familien an:

- Selektine
- Integrine
- Immunglobulin-Superfamilie

Selektine sind spezialisiert auf die Errichtung von Zellkontakten. Ihre Verteilung ist auf das Leukozyten-Gefäßsystem beschränkt. Die einzelnen Mitglieder der Selektinfamilie sind durch Präfixe gekennzeichnet, die nach dem Zelltyp ausgewählt wurden, auf dem die Moleküle ursprünglich identifiziert wurden.

L-Selektine: kontinuierlich exprimiert auf den meisten Leukozytenarten; nach Aktivierung der Zelle kommt es zu einer Herabregulierung dieser Selektine (Jung et al., 1988).

E-Selektine: finden sich auf Zytokin-aktiviertem Endothel (Bevilacqua et al., 1987)

P-Selektine: sie werden intrazellulär in Thrombozyten (*platelets*) und Endothelzellen gespeichert und nach Aktivierung rasch an die Zelloberfläche transportiert (Mc Ever et al., 1989).

Aktivierung der genannten Zellen beispielsweise durch Zytokine, Chemokine oder LPS führt zu einer Zunahme der Expression von P- und E-Selektinen, aber zu einer Abnahme von L-Selektinen auf der Zelloberfläche (Carlos und Harlan, 1994).

Der extrazelluläre Anteil der Selektine besteht aus drei verschiedenen Domänen. Das äußere Ende bildet eine lectin-ähnliche Komponente aus 120 Aminosäuren und einem NH₂-Terminus (Drickamer, 1988). Dieser folgt eine dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ähnliche Struktur (Graves et al., 1994) und schließlich die CB-Domäne (*complement-binding*) aus einer variierenden Anzahl sich wiederholender Aminosäureketten (Bevilacqua und Nelson, 1993). Zahlreiche Studien bekräftigen, daß alle drei Selektine von Bedeutung sind für das Rollen der Leukozyten entlang der Gefäßwand – einem Prozeß, der essentiell ist für die feste Anbindung der weißen Blutzellen an das Endothel und ihre Infiltration in entzündlich verändertes Gewebe (Lewinsohn et al., 1987; Lawrence und Springer, 1991). Um das Leukozytenrollen zu ermöglichen, nimmt man an, daß während des Rollens Bandverbindungen von einzigartiger Dehnbarkeit am führenden Ende der rollenden Zelle ausgebildet und am Schwanzende zerrissen werden (Hammer und Apte, 1992). Auch der Blutstrom ist notwendig, um das Rollen voranzutreiben und zu erhalten (Lawrence et al., 1997). Nach neueren Erkenntnissen könnten Selektine auch in Zusammenarbeit mit Chemokinen an der Aktivierung von Integrinen beteiligt sein (Vestweber und Blanks, 1999). Gegenrezeptoren der Selektine sind Kohlehydratverbindungen. Über die genaue Struktur dieser Liganden ist bisher wenig bekannt. Als Hauptgegenrezeptoren wurden GlyCAM-1 (*glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1*), E-Selektin Ligand 1 (ESL-1) und P-Selektin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL-1) identifiziert. PSGL-1 könnte als Gegenrezeptor für alle drei Selektine dienen (Vestweber und Blanks, 1999).

Integrine sind eine große Familie von Zelladhäsionsrezeptoren, die neben einer Vielzahl zellulärer Funktionen wie Wundheilung, Zelldifferenzierung und Apoptose eine bedeutende Rolle bei Zell-Matrix und Zell-Zell Interaktionen spielen. Funktionelle Integrine bestehen aus zwei transmembranösen Glykoproteinuntereinheiten, genannt α und β , die nicht-kovalent gebunden sind. Die Rezeptoren enthalten immer eine α und eine β -Kette. Bisher wurden 18 α - und 8 β -Untereinheiten identifiziert. Die große extrazelluläre Domäne ist zuständig für die Ligandenerkennung, während der kurze zytoplasmatische Schwanz direkt oder indirekt mit dem Zytoskelett-Signalnetzwerk verankert ist (Petit und Thiery, 2000).

Integrine, die in Leukozyten-Matrix Wechselbeziehungen und Entzündungsprozesse involviert sind, gehören hauptsächlich der β_1 - und β_2 -Untereinheit an.

β_1 -Integrine finden sich in Rezeptoren, die an extrazelluläre Matrixkomponenten wie Fibronectin, Laminin und Kollagen binden. Sie dienen der Gewebeorganisation und werden

auf vielen nicht hämatopoetischen Zellen und Leukozyten exprimiert (Ruoslahti und Pierschbacher, 1987; Hynes, 1987).

Die bekanntesten Mitglieder der β 2-Integrinfamilie sind MAC-1 (*Macrophage antigen 1* oder CD11b/CD18) und LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen 1* oder CD11a/CD18). Ihre Expression ist auf weiße Blutzellen beschränkt (Springer, 1990).

MAC-1, das an ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) bindet, wird in intrazellulären Granulas von PMN gelagert und nach Aktivierung an die Oberfläche transportiert. LFA-1 ist auf allen Leukozyten exprimiert und interagiert mit ICAM-1, -2 und -3 (Corbi, 1996). Im ruhenden Zustand ist LFA-1 an das Zytoskelett gebunden. Durch so genannte inside-out Signale, die extern durch Zytokine, Chemokine und T-Zellrezeptoren stimuliert werden, wird LFA-1 aktiviert (Kooyk et al., 1989). Bei diesen Signalen handelt es sich u.a. um die Aktivierung von Proteinkinase C, Phosphatidylinositol-3-OH Kinase und GTPase Rap1 (Katagiri et al., 2000) und den Anstieg des intrazellulären Calciums. Über sie kommt es zur Freigabe LFA-1 vom Zytoskelett. Die Dissoziation vom Zytoskelett erlaubt LFA-1, sich zu vervielfachen, auf der Zellmembran neu zu verteilen und extrem kontaktfreudige Bündel auszubilden, die notwendig sind, um die Bindung an seinen Liganden ICAM-1 zu verstärken (Kooyk und Figdor, 2000). Durch diese Bindung kommt es zu einer festen Adhäsion zwischen Leukozyt und Endothel (Adams und Lloyd, 1997), ein Vorgang, der für die nachfolgende Migration notwendig ist.

Die Bedeutsamkeit der Integrine wird an Personen mit einem angeborenen Leukozytenadhäsionsdefizit sichtbar. Sie unterliegen wiederholt infektiösen Erkrankungen mit zum Teil tödlichem Verlauf im Kindesalter. Ihre Neutrophilen sind unfähig, an Endothel zu binden und auf die Seite der Entzündung zu gelangen (Anderson und Springer, 1987).

Die Gegenrezeptoren der Integrine werden von der Immunglobulin-Familie gebildet. Sie werden entweder auf Endothelzellen (*vascular cell adhesion molecule-1*; VCAM-1) oder auf Endothelzellen und Leukozyten (ICAM) exprimiert. ICAM-1 und VCAM-1 finden sich nur auf aktiviertem Endothel, während ICAM-2 von ruhendem als auch aktiviertem Endothel exprimiert wird (Carlos und Harlan, 1994).

Einzelne Studien in den letzten Jahren versuchten die Bedeutung der Adhäsionsmoleküle in Bezug auf die bakterielle Meningitis zu charakterisieren. Die Blockade von Integrinen (Tuomanen et al., 1989), ICAM-1 (Weber et al., 1995) und Selectinen (Angstwurm et al., 1995) im Rahmen tierexperimenteller Untersuchungen brachten nicht nur eine Reduktion des Leukozyteneinstroms in den Liquor, sondern auch massive Verbesserungen der pathophysiologischen Veränderungen während der bakteriellen Meningitis mit sich.

Diese Studien gaben somit einen Hinweis auf eine möglicherweise wichtige Rolle von Leukozyten bei der Entstehung der Meningitis-assoziierten ZNS-Komplikationen.

Eine detailliertere Beschreibung dieser Studien erfolgt im Abschnitt 5.1.1.2.

1.4.3 Die Leukozyten-Adhäsionskaskade

Der Austritt der Leukozyten aus dem Blutgefäßsystem in Richtung entzündetes Gewebe ist ein Phänomen aus mehreren aufeinanderfolgenden Schritten. Diesen vorausgehend ist die Aktivierung der Endothelzellen durch Zytokine (siehe Abb.1.3).

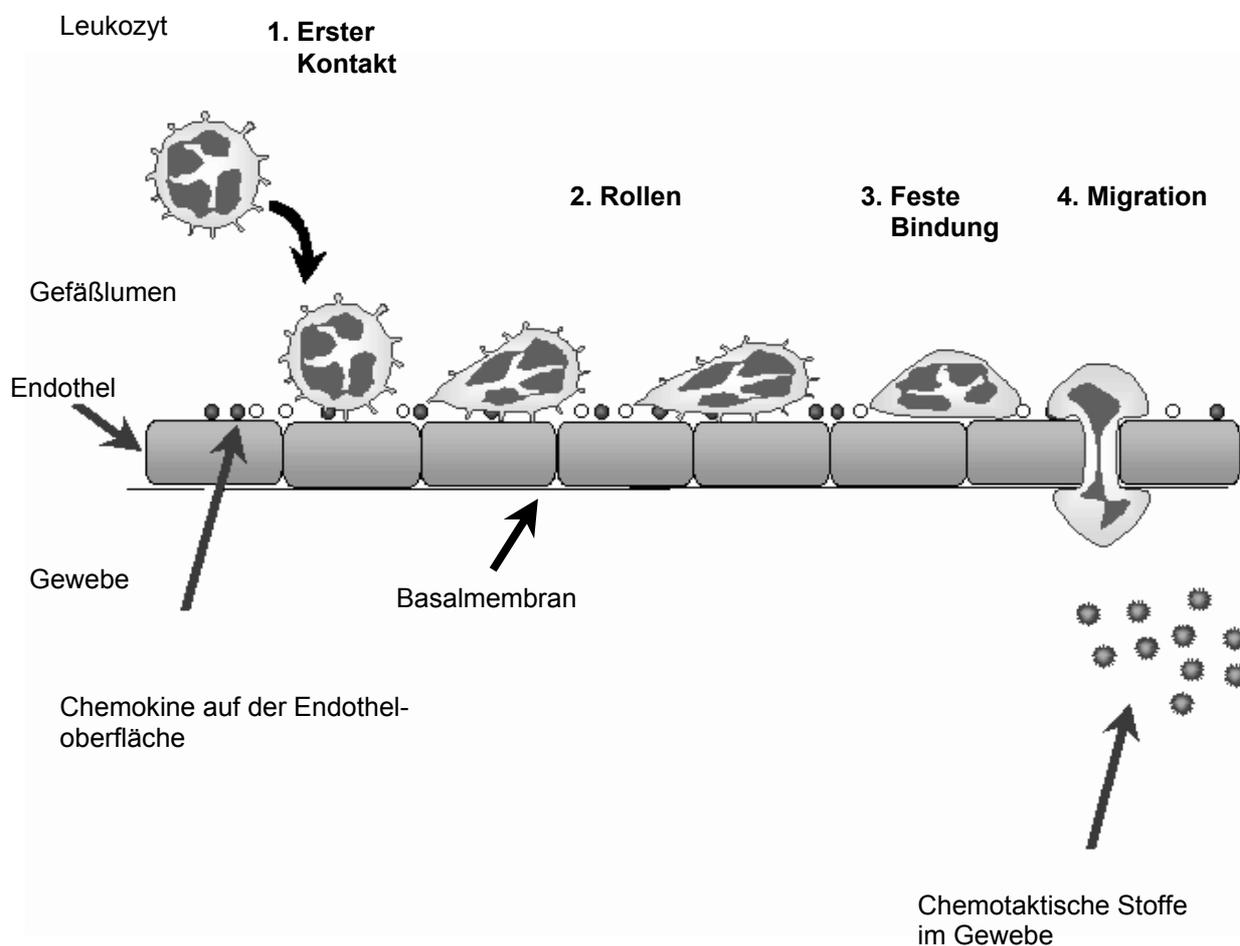


Abb.1.3: Aufeinanderfolgende Schritte bei der Bindung von Leukozyten an das Endothel (auf der Grundlage von Ley und Brooke, University of Virginia, Department of Biomedical Engineering;

<http://www.med.virginia.edu/medicine/basic-sci/biomed/ley/index.html>; Juni, 2001)

1. Schritt: Erster Kontakt – Einfangen

Nach Zytokinaktivierung exprimiert das Endothel Selektine, die passierende Leukozyten mit entsprechenden Gegenrezeptoren abfangen. P-Selektine spielen hierbei eine wichtige Rolle (Adams und Shaw, 1994).

2. Schritt: Rollen

Haben die Leukozyten Kontakt zum Endothel gefunden, beginnen sie zu rollen. Auch dieser Vorgang wird von den Selektinen vermittelt (Lawrence und Springer, 1991). Während des Rollens werden wahrscheinlich durch chemotaktische Botenstoffe, die an der Oberfläche des Endothels gebunden sind, die Integrine der Leukozyten aktiviert (Jung et al., 1998; Kunkel et al., 2000). Bei Zytokin-induzierten Entzündungen stoppen rollende Leukozyten nicht abrupt, sondern zeigen eine allmähliche Abnahme ihrer Geschwindigkeit, bevor sie fest anbinden (Kunkel und Ley, 1996; Kunkel et al., 2000).

3. Schritt: Feste Adhäsion

Dieser dritte Schritt wird durch Integrine und ihre Gegenrezeptoren am Endothel, den ICAM (*intercellular adhesion molecule*) und VCAM (*vascular adhesion molecule*), vermittelt. Die feste Bindung bringt die Zelle zum Stillstand (Adams und Lloyd, 1997).

4. Schritt: Migration

Mitwirkende bei der Transmigration sind Chemokine, Adhäsionsmoleküle, Entzündungsmediatoren und vom Endothel sezernierte Botenstoffe. Dem chemotaktischen Gradienten folgend durchwandern die Leukozyten die Gefäßwand zwischen den Endothelzellen (Furie et al., 1991).

2 Fragestellung

Über die Bedeutung der Leukozyten bei der bakteriellen Meningitis existieren bisher nur wenige Daten, die noch dazu kontroverse Ansichten liefern.

Studien, die Cyclophosphamid oder eine Ganzkörperbestrahlung zur Induktion einer Neutropenie verwendeten, erbrachten Anhaltspunkte gegen (Ernst et al., 1983; Täuber et al., 1988) und für (Petersdorf und Luttrell, 1962) die Bedeutung eines Leukozyten-vermittelten Gewebeschadens.

Täuber und seine Mitarbeiter (1988) versetzten Kaninchen in einem Tiermodell der experimentellen Pneumokokkenmeningitis durch die Gabe von Cyclophosphamid in einen neutropenischen Zustand und untersuchten dessen Effekt auf den intrakraniellen Druck, den Hirnwassergehalt und die Liquorkonzentrationen von Lactat und Protein über 24 Stunden. Die neutropenischen Tiere wiesen im Vergleich zu den nicht-neutropenischen infizierten Tieren keinen signifikanten Unterschied in den genannten Parametern auf.

In ähnlicher Weise untersuchten Ernst u.a. (1983) in einem Kaninchenmodell der Pneumokokkenmeningitis die Auswirkungen der Leukozyten auf das Bakterienwachstum im Liquor und Blut, sowie auf chemische Veränderungen im Liquor während des Verlaufes der Infektion. Leukopenische Tiere verhielten sich bzgl. des Bakterienwachstums und der Konzentration von Glukose und Lactat im Liquor ähnlich wie nicht-leukopenische Kaninchen. Selbst das Ausmaß der Blut-Hirnschranken-Permeabilität – gemessen am Proteingehalt im Liquor – war bei leukopenischen und normalen Tieren vergleichbar.

Petersdorf und Lutrell (1962) untersuchten an Hunden, bei denen sie mittels Ganzkörperbestrahlung eine Neutropenie induzierten, die mittlere Überlebenszeit nach Induktion einer Pneumokokkenmeningitis. Neutropenische Tiere wiesen dabei im Durchschnitt eine längere Überlebenszeit auf als Kontrolltiere.

Die Gabe von Cyclophosphamid oder eine Ganzkörperbestrahlung bedeuten jedoch einen massiven Eingriff in das Immunsystem mit weitreichenden Nebenwirkungen. Die Validität der beiden Studien dürfte hierdurch erheblich beschränkt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun die Rolle von Granulozyten und Monozyten/Makrophagen bei der Pneumokokkenmeningitis untersucht werden.

Im Detail sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Welche Rolle spielen Granulozyten bei der Induktion pathophysiologischer Veränderungen wie z.B. Anstieg des intrakraniellen Druckes bei der experimentellen Pneumokokkenmeningitis? Um die Frage beantworten zu können, führten wir eine Granulozyten-Depletion durch. Im Gegensatz zu früheren Studien, in denen toxische Substanzen oder Strahlen zur Anwendung kamen, verwendeten wir einen gegen polymorphkernige Leukozyten gerichteten Antikörper.
2. Monozyten/ Makrophagen können als Quelle von Entzündungsmediatoren wie z.B. IL-1 und TNF α (Schindler et al., 1990; Männel et al., 1980; Heumann et al., 1994) und schädlicher Substanzen in Frage kommen. Auf diese Weise könnten sie direkt oder über die Rekrutierung von Granulozyten auf den Verlauf der bakteriellen Meningitis Einfluß nehmen.
Durch die Depletierung mononukleärer Zellen mittels λ -Carrageenan untersuchten wir ihren Einfluß auf die Induktion der pathophysiologischen Veränderungen während der Pneumokokkenmeningitis.
3. Da sowohl die Depletion granulozytärer als auch mononukleärer Zellen einen partiell protektiven Effekt auf die Veränderungen während der Induktionsphase zeigten, untersuchten wir, wie sich eine kombinierte Depletion beider Zellarten auf diese Phase auswirken würde.

Bei den Fragen 1-3 wurde die Meningitis durch Hitze-abgetötete Pneumokokken induziert. Der Beobachtungszeitraum umfaßte sechs Stunden. Meßparameter waren, wie folgt: intrakranieller Druck, Liquorzellzahl und Blut-Hirnschrankenstörung.

4. Da sich aus den Untersuchungen der vorangegangenen Fragestellungen abzeichnete, daß Granulozyten von großer Bedeutung für die Frühphase der Pneumokokkenmeningitis zu sein scheinen, untersuchten wir, inwiefern Granulozyten auch für den weiteren Krankheitsverlauf eine Rolle spielen. Der Beobachtungszeitraum umfaßte hierbei 24 Stunden und zur Induktion der Meningitis wurden lebende Pneumokokken verwendet. Meßparameter wurden analog zu Frage 1-3 gewählt.

3 Material und Methoden

3.1 Tiermodelle

Grundlage der hier dargestellten Versuche ist ein von Pfister et al. (1990) entwickeltes Tiermodell der Pneumokokkenmeningitis an der Ratte (Kurzzeitversuch mit sechs-stündiger Dauer), sowie eine Modifikation dieses Modells mit einer Versuchsdauer von 24 Stunden (Langzeitversuch; Koedel und Pfister, 1997).

Kurzzeitversuch: Hierbei wird narkotisierten Ratten durch intrazisternale Gabe von 100 μ l 10^9 Kolonie-bildender-Einheiten (KBE)/ml Hitze-abgetöteter Pneumokokken (HKP) eine Meningitis induziert. Während des gesamten direkt daran anschließenden Beobachtungszeitraumes von sechs Stunden werden regelmäßig Blutdruck, Temperatur und Blutgase kontrolliert, sowie Veränderungen des intrakraniellen Druckes registriert. Eine Stunde vor Versuchsende erfolgt die intravenöse Applikation von 1 ml Evans-blau.

Langzeitversuch: In diesem Modell wird die Meningitis mittels transkutaner Injektion von 150 μ l 10^7 KBE/ml *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 3 in die Cisterna magna ausgelöst. Anschließend wird jede Ratte zum Aufwachen in einen eigenen Käfig gesetzt und mit ausreichend Futter und Wasser versorgt. 24 Stunden nach der Infektion werden die Tiere erneut anästhesiert und ebenso wie die Tiere des oben erwähnten Modells auf eine im Folgenden beschriebene Weise präpariert. Nach Durchführung der Präparation wird der Hirndruck gemessen und die Ratten erhalten 1 ml Evans-blau intravenös. Eine Stunde im Anschluß daran wird der Versuch beendet.

In beiden Modellen wird nach Versuchsende der Evans-blau-Gehalt im Liquor zur Quantifizierung der Blut-Hirnschrankenstörung und die Zellzahl bestimmt.

3.2 Versuchsdurchführung

3.2.1 Tierpräparation

Männliche erwachsene Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 330 und 450 g wurden mittels Halothan (Hoechst AG, Frankfurt/Main, Deutschland) und anschließender intraperitonealer Injektion von 100 mg/kg Thiopental narkotisiert. Die Tiefe der Narkose wurde regelmäßig durch das Setzen von Schmerzreizen kontrolliert und bei Bedarf vertieft. Die anästhesierten Tiere wurden tracheotomiert und über einen PE-Schlauch (PE 240) als Endotrachealtubus künstlich beatmet. Frequenz und Volumen wurden entsprechend der Blutgase am Respirator (Effenberger, Pfaffing) eingestellt, der die Tiere mit Sauerstoffangereicherter Raumluft versorgte.

Zur kontinuierlichen Überwachung des arteriellen Blutdruckes und der Blutgase wurde ein Katheter in Form eines Polyäthylenschlauches (0,58mm ID) in der linken Arteria femoralis platziert und mit einem Druckwandler (Statham P23, Viggo-Spectramed, Oxnard, CA, USA) verbunden. Für eine intravenöse Flüssigkeitszufuhr und Verabreichung von Evans-blau eine Stunde vor Versuchsende wurde die linke Vena femoralis ebenfalls kanüliert. Während der gesamten Versuchszeit wurden beide Gefäße mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Ein Thermometer-kontrolliertes Heizkissen ermöglichte die Körpertemperatur über die Zeit des Experimentes zwischen 36,5 und 37,5 °C zu halten.

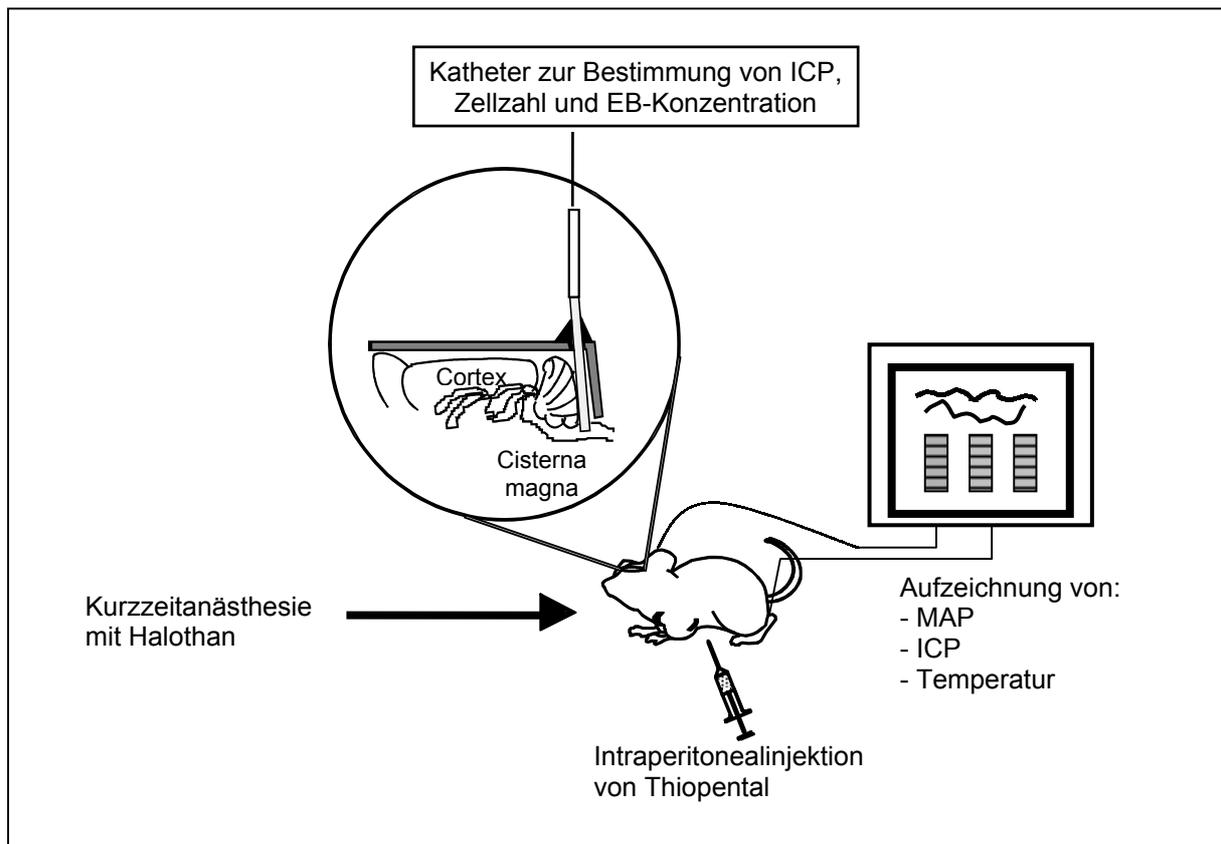
Die Induktion der Meningitis bei Kurzzeitversuchen, die intrakranielle Druckmessung und die Liquorentnahmen erfolgten über einen in der Cisterna magna liegenden Katheter. Hierfür wurde das Tier in einem stereotaktischen Rahmen fixiert und die Schädelkalotte über beiden Parietalknochen bis zur Okzipitalschuppe freipräpariert. In der Verlängerung der Sutura sagittalis unmittelbar vor der Sutura occipitalis wurde ein Bohrloch zur Punktion der Cisterna magna angelegt. Für die Punktion wurde eine Stahlkanüle (Gage 22) abgesägt, ihre Spitze abgerundet und dem freien Ende ein Stück Polyäthylenschlauch aufgesetzt. Anschließend wurde dieser Katheter mit Hilfe eines Mandrin in der Cisterna magna platziert, dort mit Sekundenkleber und Paladur-Akrylmasse befestigt und zur kontinuierlichen Druckmessung an einen Druckwandler (Statham P 23) angeschlossen.

Blutdruck, intrakranieller Druck und Temperatur wurden fortlaufend überwacht und die jeweiligen Werte stündlich bzw. die Blutgase zweistündlich notiert.

Eine Stunde vor Versuchsende erhielten die Ratten 1 ml 1%iges Evans-blau zur späteren Quantifizierung der Blut-Hirnschrankenstörung. Nach Ablauf dieser Stunde wurde der Liquor über den in der Cisterna magna liegenden Katheter entnommen, die Ratten tiefer sediert und

durch intravenöse Injektion einer KCL-Lösung getötet. Tiere, deren Gehirn für histochemische Untersuchungen entnommen wurde, wurden nach maximaler Sedierung transkardial mit 150 ml eisgekühlter Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) perfundiert, die Gehirne rasch extrahiert und in Tissue Tek Medium (Leica Instruments GmbH, Deutschland) bei -80 °C tief gefroren.

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues (Abb. 2.1)



Anmerkungen: MAP, mittlerer arterieller Druck; ICP, intrakranieller Druck; EB, Evans-blau

3.2.2 Induktion der Meningitis

Bei Versuchen mit einer Dauer von sechs Stunden (Gruppen 2-5; s. Abschnitt 3.2.5) wurden über den Cisterna magna-Katheter 100 μ l 10^9 KBE/ml Hitze-abgetöteter Pneumokokken (HKP) gegeben.

Bei den sogenannten Langzeitversuchen mit einer Versuchsdauer von 24 Stunden (Gruppen 7 und 8, siehe Abschnitt 3.2.5) wurden $150 \mu\text{l } 10^7$ KBE/ml lebender Pneumokokken Serotyp 3 durch transkutane Injektion in die Cisterna magna appliziert.

Den Kontrolltieren (Gruppe 1, 6) wurde anstelle von HKP bzw. lebenden Pneumokokken $100 \mu\text{l}$ Phosphat-gepufferte, physiologische Kochsalzlösung (PBS) verabreicht.

Die Präparation lebender Pneumokokken und HKPs wird im Abschnitt 3.3 beschrieben.

3.2.3 Induktion der Neutropenie

Zur Depletion der neutrophilen Granulozyten erhielten Ratten der Versuchsgruppen 3, 5 und 7 24 Stunden vor Gabe von HKP oder Pneumokokken $0,5 \text{ ml}$ *Adsorbed Rabbit Anti-Rat PMN*-Antikörper (Accurate Chemical and Scientific Corporation Westbury NY). Der Antikörper wurde durch intraperitonealer Injektion unter Halothannarkose verabreicht. Anschließend wurden die Tiere zum Aufwachen in einen Käfig gesetzt und bis zur Versuchsdurchführung mit Futter und Wasser versorgt. Um die Qualität der Depletion zu überprüfen, wurde den Tieren nach Abschluß der Präparation 1 ml EDTA-Blut abgenommen, Blutaussstriche angefertigt, mit einem Schnelltest (Dade Diff-Quick; Dade Diagnostik GmbH München) gefärbt und unter einem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung der Anteil der Segmentkernigen bestimmt.

3.2.4 Durchführung der Monozyten/ Makrophagen-Depletion

Um die Zahl der mononukleären Zellen zu verringern, erhielten Tiere der Versuchsgruppen 4 und 5 30 Minuten vor HKP-Inokulation intraperitoneal 25 mg/kg Typ IV λ -Carrageenan, gelöst in $50 \mu\text{l}$ 70%igem Ethanol und $950 \mu\text{l}$ PBS. Um eine sichere Applikation in die Peritonealhöhle zu gewährleisten, wurde über einen seitlich angelegten, ca. $0,5 \text{ cm}$ messenden Schnitt durch die schräge Bauchmuskulatur ein Zugang zur Peritonealhöhle geschaffen, über den ein Katheter (Polyäthylenschlauch, $0,58 \text{ mm ID}$) ungefähr 3 cm tief eingeführt wurde. Drei Stunden nach Versuchsbeginn erfolgte die Kontrolle der Depletierung in analoger Weise wie bei den neutropenischen Tieren.

3.2.5 Versuchsgruppen

Gruppe 1-5: Kurzzeitversuche (n = Anzahl der Versuche); Versuchsdauer sechs Stunden

Gruppe 1: unbehandelte Tiere, die intrazisternal 100 µl PBS erhielten (Kontrollen; n = 10)

Gruppe 2: unbehandelte Ratten, denen 100 µl 10⁹ KBE/ml HKP intrazisternal appliziert wurde (Unbehandelte; n = 12)

Gruppe 3: mit HKP injizierte Tiere, die mit 0,5ml PMN-Antikörper intraperitoneal (i.p.) vorbehandelt worden waren (Granulozytendepletion; n = 5)

Gruppe 4: mit HKP injizierte Tiere, die vor Applikation der Hitze-abgetöteten Pneumokokken 25 mg/kg Carrageenan i.p. erhalten hatten (Monozyten/ Makrophagendepletion; n = 6)

Gruppe 5: mit HKP injizierte und mit PMN-Antikörper und Carrageenan vorbehandelte Ratten (Zweifachdepletion; n = 3)

Gruppe 6-8: Langzeitversuche; Versuchsdauer 24 Stunden

Gruppe 6: unbehandelte Tiere, denen transkutan 150 µl PBS intrazisternal appliziert worden war (Kontrollen; n = 5)

Gruppe 7: unbehandelte, mit 150 µl lebenden Pneumokokken infizierte Ratten (n = 6)

Gruppe 8: mit 0,5 ml PMN-Antikörper vorbehandelte infizierte Tiere (Granulozytendepletion; n = 5)

3.2.6 Liquorzellzahl

Zum Abschluß des Versuches wurde mittels einer Glaskapillare über den ICP-Katheter der Liquor gewonnen - eine Menge von 100 µl sollte dabei nicht unterschritten werden - und davon 10 µl in der Fuchs-Rosenthal-Zellkammer zur Auszählung verwendet. Um eventuell vorhandene Erythrozyten zu zerstören, wurde der Liquor mit Essigsäure im Verhältnis Liquor : Essigsäure = 2 : 1 vermischt. Die Zellzahl pro Mikroliter errechnete sich wie folgt:

$$\text{Zellzahl}/\mu\text{l} = (Z \times V) / K$$

Mit Z: ausgezählte Zellzahl in der Kammer

V: Verdünnungsfaktor (= 1,5)

K: Kammervolumen (= 1,25 µl)

3.2.7 Quantifizierung der Blut-Hirnschranken-Permeabilität

Um die Permeabilität der Blut-Hirnschranke zu quantifizieren, wurde den Versuchstieren 1 ml 1%iges Evans-blau intravenös injiziert. Evans-blau bindet nach intravenöser Gabe an Serum-Albumin und dient diesem als Transportmittel. Evans-blau durchdringt an geschädigten Stellen die Blut-Hirnschranke und färbt den Liquor und die leck gewordenen Bereiche bläulich (Wolman et al., 1981). Eine Stunde danach wurde der Liquor über den intrazisternalen Katheter abgenommen und (nach Bestimmung der Zellzahl; s.o.) bei 3000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die EB-Konzentration im Liquor konnte über eine Messung der Absorption bei 620nm spektrophotometrisch bestimmt werden, wobei eine Verdünnungsreihe von Evans-blau in PBS als Standard diente (s. Abbildung 2.2).

Eichkurve: Evans blue in PBS

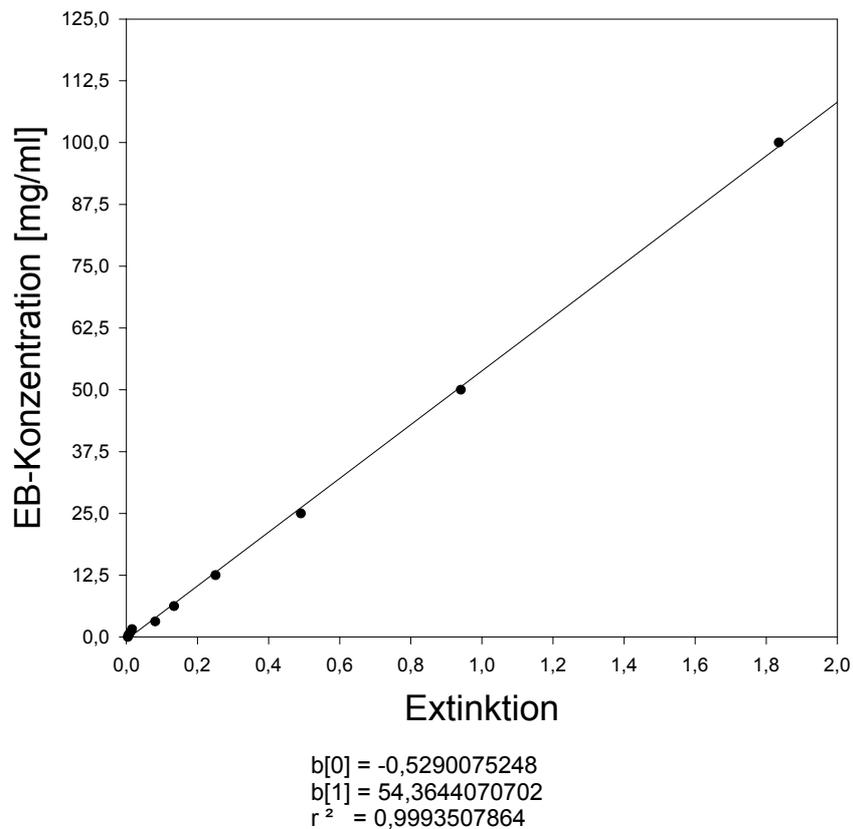


Abb. 2.2: Eichkurve Evans-blau in PBS; Anmerkung: Evans blue entspricht Evans blau.

3.3 Bakteriensuspensionen

3.3.1 Hitze-abgetötete Pneumokokken (HKP)

Zur Herstellung der Suspension mit Hitze-abgetöteten Pneumokokken wurde eine unbekapselte isogene Mutante vom Serotyp 3 für vier Stunden in einem Wasserbad bei 60°C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung bei 3000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in PBS auf eine Konzentration von 10⁹ KBE/ml resuspendiert.

3.3.2 Pneumokokken

Zur Induktion der Meningitis bei den Langzeitversuchen wurde eine vom bakteriologischen Labor des 'Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der LMU München' hergestellte Pneumokokken-Suspension verwendet. Dabei handelte es sich um lebende bekapselte *Streptococci pneumoniae* Serotyp 3 in einer Konzentration von 10^7 KBE/ml Phosphat-gepufferter, physiologischer Kochsalzlösung (PBS).

3.4 Eingesetzte Substanzen und Statistik

3.4.1 Granulozyten-Antikörper (PMN-Antikörper)

Der Rabbit Anti-Rat-PMN-Antikörper (hergestellt von Accurate Chemical and Scientific Corporation Westbury NY, vertrieben von Diagnostic International Germany) führt in einer Verdünnung von 1 : 20 in RPMI-1640 zu einer Agglutination der segmentkernigen Granulozyten bei Ratten. Die Agglutination war mikroskopisch durch den Hersteller überprüft worden.

Der Granulozyten-Antikörper war bereits in tierexperimentellen Untersuchungen erfolgreich zur Depletion Neutrophiler eingesetzt worden (Steimle et al., 1992; Meldrum et al., 1996). In beiden Studien war 24 Stunden nach Injektion des Antikörpers eine Neutropenie mit < 200 PMNs/ μ l - bei einem Ausgangswert von > 2000 PMNs/ μ l – festgestellt worden.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit des Antikörpers wurden in der hier vorliegenden Arbeit Differentialblutbild-Kontrollen durchgeführt. Innerhalb der ersten 48 Stunden ließ sich eine deutliche Reduktion der Neutrophilen auf unter 5% (Kontrollen: 70%) nachweisen. Nach 72 Stunden zeigte sich ein Nachlassen der Wirkung. Der bei zwei Tieren gemessene Anteil an neutrophilen Granulozyten lag bei 12 und 47%.

3.4.2 Λ -Carrageenan

Carrageenan besitzt einen zytotoxischen Effekt auf mononukleäre Zellen. Nach intraperitonealer Injektion von 25 mg/kg (Bauer, 1993) kommt es zu einer Aufnahme von Carrageenan in die sekundären Lysosomen von Makrophagen. Daraufhin treten entweder bedingt durch die Zytotoxizität der Substanz selbst oder durch Zunahme des osmotischen Druckes Brüche in der lysosomalen Membran auf, welche die Carrageenan enthaltenden Phagolysosomen umgibt; dies führt zur Freisetzung hydrolytischer Enzyme ins Zytosol und somit zur Zytolyse und zum Austritt der Enzyme ins umgebende Medium (Thompson et al. 1981 und 1979). Quan und Burtin (1978) beobachteten, daß Monozyten nach Inkubation mit Carrageenan ihre Fähigkeit zur Adhäsion und Phagozytose verlieren.

Einige tierexperimentelle Studien verwendeten λ -Carrageenan zum Zwecke der Makrophagen-Depletion, um die Funktion dieser Zellen bspw. im Rahmen tumoröser Erkrankungen zu klären (Morikawa et al., 1986; Fujii et al., 1987).

3.4.3 Statistische Methoden

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben.

Die Angaben zu den Zellreihen im Differentialblutbild sind als prozentualer Anteil - bezogen auf das gesamte weiße Blutbild - aufgeführt. Alle anderen Meßwerte sind Absolutwerte.

Die Daten von mittlerem arteriellen Blutdruck (MAP), intrakraniellm Druckanstieg, Liquorzellzahl und Evans-blau-Konzentration im Liquor in den Kurzzeitversuchen wurden unter Verwendung des Student-Newman-Keuls-Test miteinander verglichen.

Der Zweistichproben t-Test unterschiedlicher Varianzen wurde angewandt, um Hirndruck-, Liquorzellzahl- und MAP-Werte in den Gruppen 7 und 8 (Langzeitversuche) zu vergleichen.

Des Weiteren wurden die Differentialblutbilder depletierter Tiere auf signifikante Veränderungen zu dem Blutbild unbehandelter Tiere unter Anwendung des t-Test unterschiedlicher Varianzen überprüft.

Als signifikant galten Veränderungen mit einem p-Wert $< 0,05$.

3.4.4 Bildmaterial

Zur Anfertigung kryostatischer Schnitte wurden die Tiere getötet, das Gehirn entnommen, in Tissue-Tek Medium eingelegt und bei -80° tief gefroren. Koronare Schnitte mit einer Dicke von $10\mu\text{m}$ wurden auf Objektträger aufgezogen und unter fluoreszierendem Licht betrachtet. Die Aufnahmen erfolgten mit einer Kamera vom Typ Vario Cam (S/ N: 303 CG 0320) in Verbindung mit einem Lichtmikroskop des Typs Leitz DM IL.

4 Ergebnisse

4.1 Pathophysiologische Veränderungen in der Frühphase der experimentellen Meningitis

4.1.1 Physiologische Parameter

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), PaO₂, PaCO₂, pH und Körpertemperatur lagen in allen Gruppen während des gesamten Experiments im Normbereich. Bezüglich des mittleren arteriellen Druckes zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den verschiedenen Gruppen. Die physiologischen Parameter der einzelnen Versuchsgruppen 0, 2, 4 und 6 Stunden nach intrazisternaler Gabe Hitze-abgetöteter Pneumokokken bzw. PBS sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1: Mittlerer arterieller Druck und PaO₂ 0, 2, 4 und 6 Stunden nach intrazisternaler Gabe Hitze-abgetöteter Pneumokokken bzw. PBS (Kontrollen)

Gruppen (n)	MAP (mmHg)				
	0 h	2 h	4 h	6 h	
HKP					
Unbehandelt (12)	114 ± 15	108 ± 10	97 ± 11	95 ± 20	
PMN-Antikörper (5)	121 ± 12	115 ± 15	103 ± 16	100 ± 12	
Carrageenan (6)	107 ± 16	104 ± 10	98 ± 17	85 ± 5	
komb. Depl. (3)	100 ± 27	112 ± 14	103 ± 28	88 ± 34	
Kontrollen					
Unbehandelt (10)	105 ± 17	99 ± 37	98 ± 18	98 ± 14	
PMN-Antikörper (2) ¹	1 90	124	112	108	
	2 82	83	87	86	
Carrageenan (1) ¹	98	95	96	80	

Anmerkungen: siehe unten

Gruppen (n)	$p_a O_2$ (mmHg)			
	0 h	2 h	4 h	6 h
HKP				
Unbehandelt (12)	116 ± 20	114 ± 20	131 ± 30	111 ± 18
PMN-Antikörper (5)	103 ± 27	115 ± 16	127 ± 29	112 ± 17
Carrageenan (6)	117 ± 19	116 ± 7	127 ± 37	150 ± 38
komb. Depl. (3)	111 118	111 129	195	103
Kontrollen				
Unbehandelt (10)	109 ± 22	127 ± 38	111 ± 22	114 ± 22
PMN-Antikörper (2) ¹	1 108 2 131	139 92	110 110	110
Carrageenan (1) ¹	105	90	82	90

n, Anzahl der untersuchten Tiere; MAP, mittlerer arterieller Blutdruck; PMN, polymorphnukleäre Granulozyten; komb. Depl., kombinierte Depletion; Angaben als Mittelwert ± SD; ¹ Absolutwerte

Tabelle 2: P_a CO₂ und pH 0, 2, 4 und 6 Stunden nach intrazisternaler Gabe
Hitze-abgetöteter Pneumokokken bzw. PBS (Kontrollen)

Gruppen (n)	p_a CO ₂ (mmHg)			
	0 h	2 h	4 h	6 h
HKP				
Unbehandelt (12)	37,3 ± 7,3	36,9 ± 5,3	35,3 ± 7,0	36,8 ± 6,8
PMN-Antikörper (5)	36,0 ± 3,5	34,1 ± 3,5	34,4 ± 2,7	36,8 ± 2,5
Carrageenan (6)	33,4 ± 1,8	31,6 ± 1,2	31,6 ± 1,9	29,8 ± 4,6
komb. Depl. (3)	29,2	33,9	34,1	37,3
Kontrollen				
unbehandelt (10)	31,8 ± 3,6	32,7 ± 3,7	32,7 ± 4,2	33,1 ± 5,6
PMN-Antikörper (2) ¹	42,5	37,7	38,5	39,1
	2 34,6	34,3	42,3	
Carrageenan (1) ¹	40,9	43,2	44,6	44,2

Gruppen (n)	pH (mmHg)			
	0 h	2 h	4 h	6 h
HKP				
unbehandelt (12)	7,44 ± 0,10	7,4 ± 0,04	7,45 ± 0,03	7,43 ± 0,04
PMN-Antikörper (5)	7,45 ± 0,04	7,44 ± 0,02	7,45 ± 0,10	7,43 ± 0,03
Carrageenan (6)	7,43 ± 0,02	7,41 ± 0,02	7,45 ± 0,20	7,42 ± 0,10
komb. Depl. (3)	7,42 ± 0,04	7,4	7,45 ± 0,30	7,38
Kontrollen				
unbehandelt (10)	7,42 ± 0,04	7,40 ± 0,03	7,4 ± 0,02	7,39 ± 0,03
PMN-Antikörper (2) ¹	7,44	7,38	7,4	7,4
	2 7,47	7,43	7,39	
Carrageenan (1) ¹	7,47	7,43	7,38	7,3

PMN, polymorphnukleäre Granulozyten; komb. Depl., kombinierte Depletion; Angaben als Mittelwerte ± SD; ¹ Absolutwerte.

4.1.2 Differentialblutbild zur Überprüfung der Depletion

Zur Kontrolle der Depletionen wurde bei allen Versuchstieren drei Stunden nach Gabe von HKP ein Differentialblutbild angefertigt.

24 Stunden nach intraperitonealer Gabe des PMN-Antikörpers wiesen alle Tiere aus der Gruppe der Granulozytendepletion einen prozentualen Anteil an segmentkernigen Granulozyten von unter 5% auf. Der Anteil der lymphozytären Zellen lag bei 92%, derjenige der monozytären zwischen 3 und 8%. Alle drei Zellreihen unterschieden sich in ihren prozentualen Anteilen signifikant von denen, die man bei den unbehandelten Tieren festgestellt hatte. Der gestiegene Anteil an monozytären Zellen ist als Folge der Granulozytenreduktion zu sehen.

Vor intraperitonealer Gabe von λ -Carrageenan lag der Anteil mononukleärer Zellen bei diesen Versuchstieren zwischen 1 und 4% (s. Normalbefunde). Bei einer Kontrolle drei Stunden nach Inokulation der Hitze abgetöteten Pneumokokken bzw. 3,5 Stunden nach Injektion von λ -Carrageenan war dieser Anteil auf 0 bis 1% vermindert. Eine Gegenüberstellung der mononukleären Anteile vor und nach Gabe von Carrageenan ergab eine signifikante Verminderung der Monozyten/ Makrophagen unter Carrageenan bei den betreffenden Versuchstieren. Auf Grund des natürlicherweise geringen prozentualen Anteils der Monozyten bzw. Makrophagen am Gesamtblutbild waren die Veränderungen nach Injektion von Carrageenan allerdings im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Tiere nicht signifikant.

Unter Depletion mononukleärer und gleichzeitig neutrophiler Zellen fand sich drei Stunden nach Versuchsbeginn ein überwiegend lymphozytäres Zellbild ($88 \pm 6\%$ Lymphozyten). Der Anteil der Segmentkernigen lag bei $10 \pm 4\%$, derjenige der Monozyten bei $2 \pm 3\%$. Bzgl. der Granulozyten und Lymphozyten waren die Unterschiede signifikant im Vergleich zu den unbehandelten Tieren.

In Tabelle 3 sind die Differentialblutbilder der einzelnen Gruppen im Vergleich dargestellt.

Tabelle 3: Differentialblutbilder 3 Stunden nach Applikation von HKP

Gruppen (n)		Granulozyten	Monozyten	Lymphozyten
unbehandelt	(4)	77 ± 10%	2 ± 1%	19 ± 7%
Granulozyten-Depletion	(5)	3 ± 2%*	6 ± 2%*	92 ± 1%*
Monozyten-Depletion	(6)	78 ± 3%	0 ± 1% ⁺	22 ± 3%
Zweifach Depletion	(3)	10 ± 4%*	2 ± 3%	88 ± 6%*

Normalbefund (vor Applikation von HKP; n = 8): 32 ± 9% Granulozyten, 3 ± 1% Monozyten, 65 ± 8% Lymphozyten.

Anmerkungen: Angaben als Mittelwerte ± SD.

*p < 0,05; signifikant zu unbehandelt

⁺p < 0,05; signifikant zu Granulozytendepletion und zum Normalbefund

4.1.3 Liquorzellzahl

Der Liquor der Kontrollen wies nach sechs Stunden eine Zellzahl von 33 ± 17 Zellen/µl auf. Diese Zahl ist am ehesten als geringe Reizpleozytose im Rahmen der Präparation anzusehen. Die intrazisternale Applikation von Hitze-abgetöteten Pneumokokken führte zu einem massiven Anstieg der Liquorzellzahl auf 7600 ± 4242 Zellen/µl (p < 0,05).

Unter der Neutropenie war die Liquorpleozytose (617 ± 850 Zellen/µl) gegenüber den unbehandelten Tieren signifikant vermindert. Die Zellzahl lag zwar über derjenigen der Kontrollen, unterschied sich von dieser jedoch nicht signifikant.

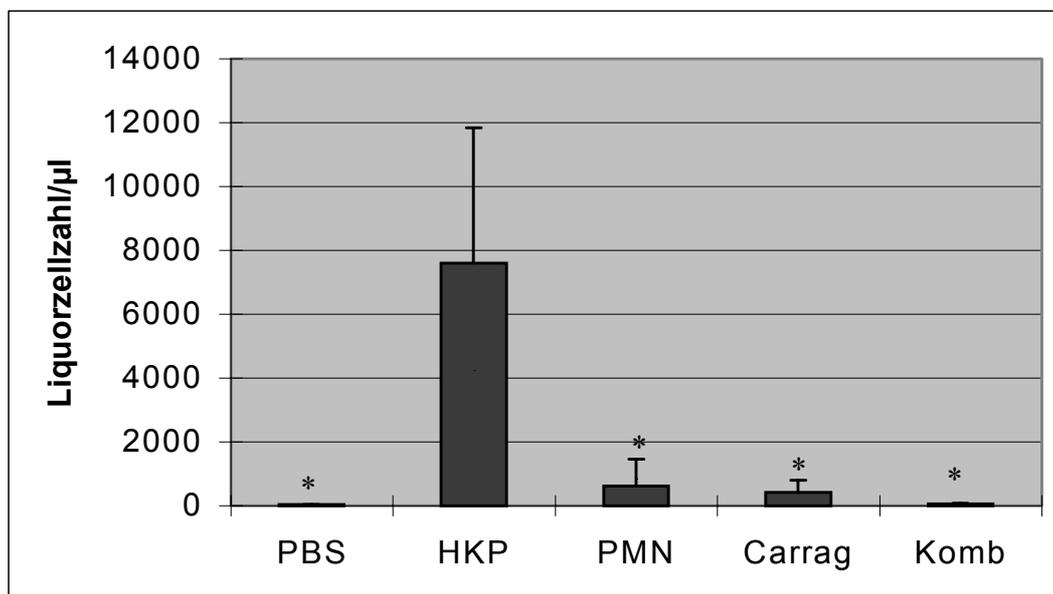
Neutropenische Versuchstiere wiesen unter Gabe von PBS ähnliche Werte wie Kontrolltiere (Gruppe 1) auf.

Bei den mit λ-Carrageenan behandelten Tieren zeigte sich nach Ablauf des Versuches im Liquor eine Zellzahl von 426 ± 380 Zellen/µl. Auf Grund der Schwankungsbreite konnten keine signifikanten Veränderungen gegenüber den Kontrollen bzw. den mit PMN-Antikörpern anbehandelten Tieren festgestellt werden. Im Vergleich zu den unbehandelten, Ratten war die Liquorpleozytose jedoch deutlich geringer ausgeprägt (p < 0,05).

Bei den zweifach-depletierten Tieren lag die nach Versuchsende festgestellte Liquorzellzahl bei 53 ± 36 Zellen/ μl und war bzgl. der Kontrollen und einfach-depletierten Ratten nicht signifikant verändert. Zu den letzteren bestand allerdings eine deutlichere Differenz als zu den Kontrolltieren. Lediglich die unbehandelten, mit HKP injizierten Tiere wiesen einen signifikanten Unterschied in der Liquorpleozytose gegenüber den kombiniert-vorbehandelten Ratten auf.

Diagramm 1 zeigt die Ergebnisse der einzelnen Gruppen im Vergleich.

Diagramm 1: Liquorpleozytose 6 Stunden nach Applikation von HKP/ PBS



Anmerkungen: PBS, Kontrollen; HKP, unbehandelte Ratten; PMN, mit PMN-Antikörper vorbehandelte Tiere; Carrag, vorbehandelt mit Carrageenan; Komb., mit PMN-Antikörper und Carrageenan vorbehandelte Tiere; außer der PBS-Gruppe wurde allen Tieren HKP injiziert; Angaben als Mittelwerte \pm SD.

* $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Gruppe

4.1.4 Intrakranieller Druck (ICP)

Die intrazisternale Gabe von PBS führte zu keiner signifikanten Veränderung des intrakraniellen Druckes (Δ ICP nach 6 h: $-0,6 \pm 1,7$ mmHg) gegenüber dem Ausgangswert.

Die Applikation von Hitze-abgetöteten Pneumokokken bewirkte innerhalb von 6 Stunden einen Anstieg des Druckes um $8,2 \pm 2,6$ mmHg ($p < 0,05$). Dieser Anstieg ereignete sich überwiegend zwischen der fünften und sechsten Stunde des Experiments.

Der intrakranielle Druck der mit PMN-Antikörper vorbehandelten Tiere stieg während des Beobachtungszeitraumes um $5,2 \pm 3,4$ mmHg. Dieser Wert unterschied sich signifikant von dem der Kontrollen, den unbehandelten und den zweifach-depletierten Tieren.

Mit PMN-Antikörper vorbehandelte Versuchstiere, denen PBS intrazisternal injiziert worden war, verhielten sich im Bezug auf den intrakraniellen Druck ähnlich wie die Tiere der Kontrollgruppe (Gruppe 1). Die Werte von vorbehandelten Kontrolltieren zeigt Tabelle 4.

Unter der Monozyten/ Makrophagendepletion kam es zu einem nur geringen Druckanstieg von $3,2 \pm 1,9$ mmHg, welcher sich signifikant von allen anderen experimentellen Gruppen außer derjenigen der Neutrophilen-depletierten Tiere unterschied. Ein Versuchstier, das mit Carrageenan vorbehandelt war, aber anstelle von Pneumokokken PBS intrazisternal appliziert erhielt, wies keinen Anstieg des intrakraniellen Druckes und mit 26 Zellen/ μ l Liquor keinen eindeutigen Unterschied zu den unbehandelten Kontrollen auf. (s. Tabelle 4)

Mit einem Abfall von $-2,3 \pm 1,5$ mmHg gegenüber dem Ausgangswert unterschieden sich die mit Carrageenan und zusätzlich mit PMN-Antikörpern vorbehandelten nicht von den Kontrolltieren. Gegenüber allen anderen Gruppen war der intrakranielle Druckanstieg bei diesen Tieren signifikant reduziert.

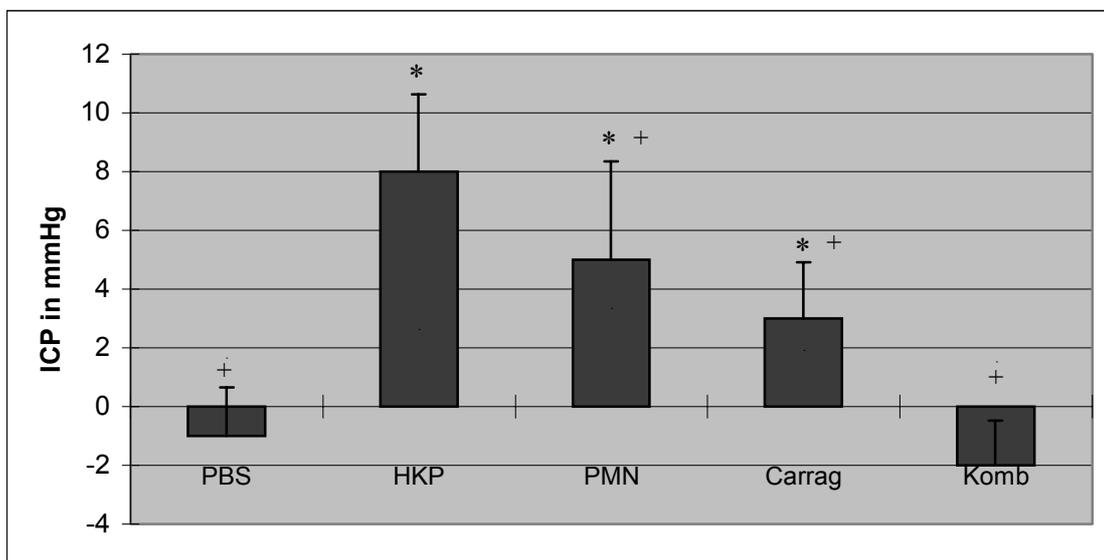
Im Diagramm 2 sind die Ergebnisse der Gruppen 1-5 bezüglich des ICP-Anstiegs im Vergleich dargestellt.

Tabelle 4: ICP-Anstieg, Liquorzellen und EB-Liquorgehalt bei behandelten Kontrolltieren

	ICP- Anstieg (mmHg)	Liquorzellen/ μ l	EB mg/ μ l
PMN +PBS			
1	3	10	1,0
2	1	19	1,1
Carrageenan +PBS			
	-2	26	0,8

PMN, polymorphnukleäre Granulozyten; ICP, Intrakranieller Druck;
EB, Evans-blau;

Diagramm 2: Veränderungen des intrakraniellen Druckes innerhalb von 6 Stunden nach intrazisternaler Gabe von Hitze-abgetöteten Pneumokokken bzw. PBS



Anmerkungen: ICP, Intrakranieller Druck; PBS, Kontrollen; HKP, unbehandelte Ratten; PMN, mit PMN-Antikörper vorbehandelte Tiere; Carrag., vorbehandelt mit Carrageenan; Komb., mit PMN-Antikörper und Carrageenan vorbehandelte Tiere; außer der PBS-Gruppe wurde allen Tieren HKP injiziert; Angaben als Mittelwerte \pm SD.

* $p < 0,05$ im Vergleich zu den Kontrollen und zweifach-depletierten Tieren

+ $p < 0,05$ im Vergleich zu den unbehandelten HKP-Tieren

4.1.5 Veränderungen der Blut-Hirnschranke

Eine Zunahme der Permeabilität wurde an Hand des Übertritts des EB/Albumin-Komplexes in den Liquorraum bestimmt.

Während sich bei den Kontrolltieren dieser Komplex im Liquor nicht nachweisen ließ ($-0,2 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$), zeigten unbehandelte HKP-Tiere eine deutliche Anreicherung des Farbstoffes in der zerebrospinalen Flüssigkeit. Mit Konzentrationen von $10,5 \pm 4,8 \mu\text{g/ml}$ war der Unterschied zu den Kontrolltieren signifikant.

Neutropenische Ratten wiesen sechs Stunden nach intrazisternaler Gabe von Hitze-abgetöteten Pneumokokken eine Evans-blau-Konzentration von $3,3 \pm 1,2 \mu\text{g/ml}$ Liquor auf. Die Extravasation an Evans-blau war signifikant erniedrigt, verglichen mit derjenigen der unbehandelten Tiere. Im Vergleich zu den Kontrollen fanden sich bei den neutropenischen Tieren zwar höhere Werte, es bestand jedoch keine Signifikanz.

Die intrazisternale Applikation von PBS unter Neutropenie erzeugte keine Zunahme der Evans-blau-Extravasation (s. Tabelle 4).

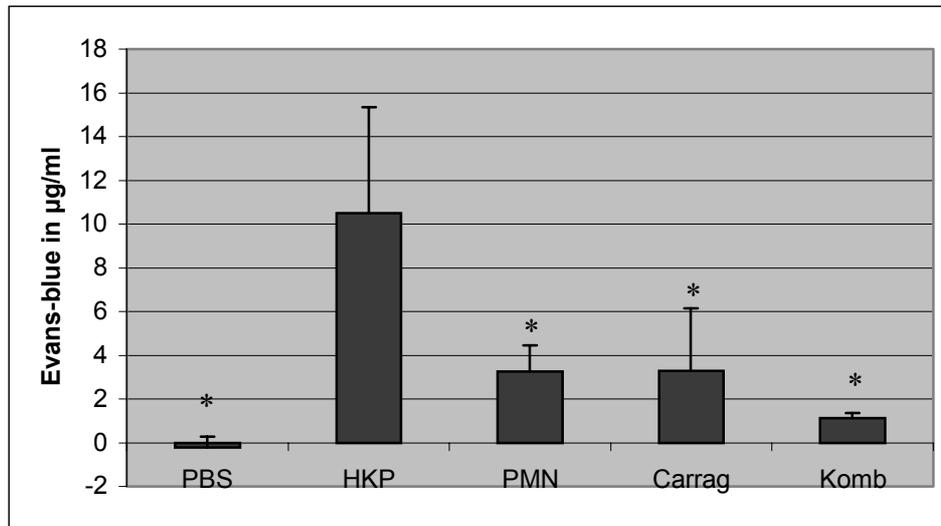
Bei den Versuchstieren der Monozyten/ Makrophagendepletion konnte sechs Stunden nach intrazisternaler Gabe von HKP ein Übertritt von Evans-blau festgestellt werden, der mit einer Konzentration von $3,3 \pm 2,9 \mu\text{g/ml}$ in etwa derjenigen der neutropenischen Tiere entsprach. Wie auch unter Neutropenie bestand trotz einer gewissen Differenz in den festgestellten Konzentrationen keine Signifikanz gegenüber den Kontrollen; gegenüber den unbehandelten Tieren jedoch war die Reduktion der Schrankenstörung eindeutig ($p < 0,05$).

Die intrazisternale Gabe von PBS unter Depletion mononukleärer Zellen hatte keine verstärkte Extravasation des Farbstoff-Komplexes ($0,8 \mu\text{g/ml}$) verglichen mit Tieren der Kontrollgruppe zur Folge. (s. Tab. 4)

Die Evans-blau-Konzentration bei den kombiniert depletierten Ratten lag nach Versuchsende bei $1,1 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ Liquor. Damit war die Blut-Hirnschranken-Permeabilität bei diesen Tieren signifikant niedriger als bei den unbehandelten Ratten. Selbst gegenüber den einfach-depletierten Tieren fiel eine zusätzliche Reduktion der Evans-blau-Extravasation auf. Der Unterschied zu diesen Gruppen sowie zu den Kontrollen war allerdings nicht signifikant.

Diagramm 3 und die Abbildungen 4.1-4.4 beschreiben die Blut-Hirnschranken-Permeabilität in den einzelnen Gruppen.

Diagramm 3: Evans-blau-Konzentration im Liquor 6 Stunden nach intrazisternaler Applikation von HKP/PBS



Anmerkungen: PBS, Kontrollen; HKP, unbehandelte Ratten; PMN, mit PMN-Antikörper vorbehandelte Tiere; Carrag, vorbehandelt mit Carrageenan; Komb., mit PMN-Antikörper und Carrageenan vorbehandelte Tiere; außer der PBS-Gruppe wurde allen Tieren HKP injiziert; Angaben als Mittelwerte ± SD.

*p < 0,05 gegenüber der unbehandelten HKP-Gruppe

Abb. 4.1-4.4: Evans-blau-Extravasation in den Meningen 6 h nach intrazisternaler Applikation von HKP/ PBS

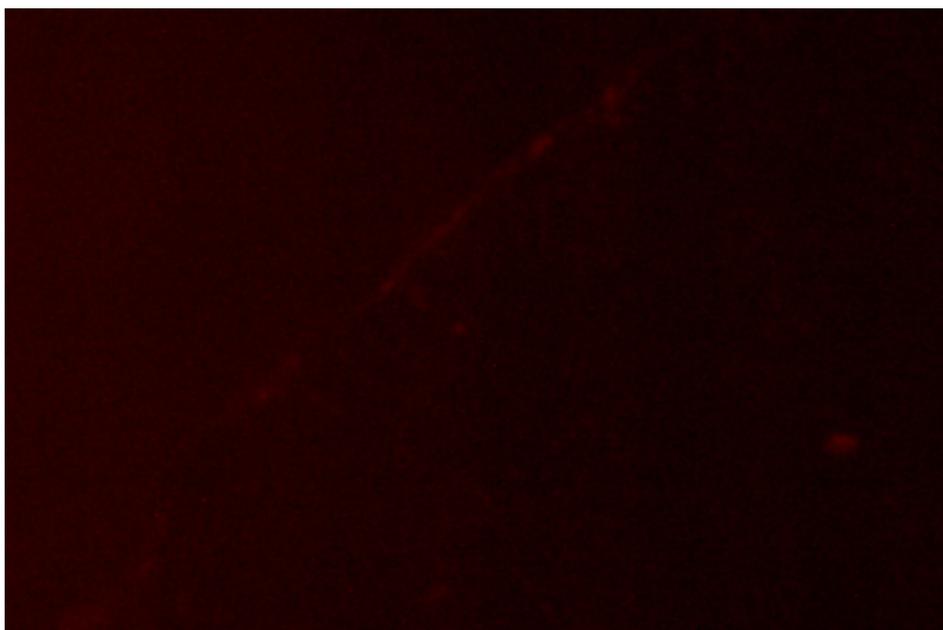


Abb.4.1: EB-Fluoreszenz an Hirnschnitten von Kontrolltieren (i.c. Gabe von PBS)

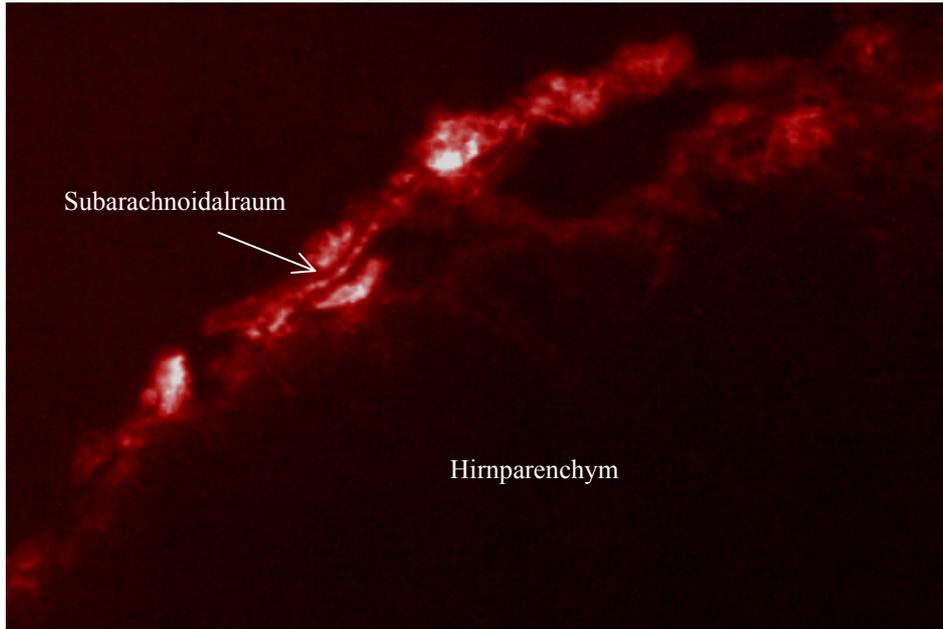


Abb.4.2: Evans-blau-Austritt bei unbehandelten Ratten nach HKP-Injektion

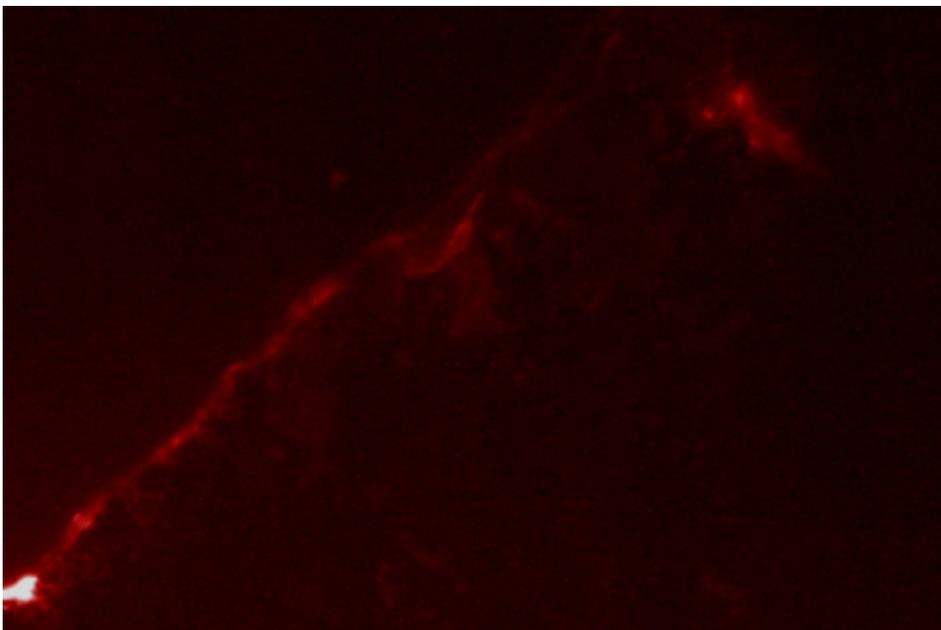


Abb.4.3: EB-Fluoreszenz bei neutropenischen Tieren

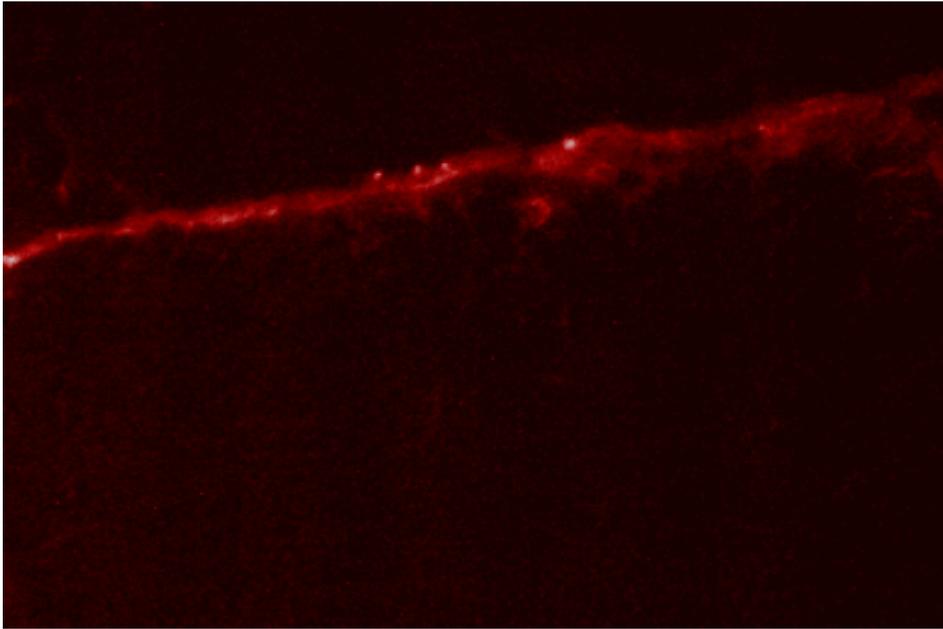


Abb.4.4: Übertritt von Evans-blau nach Makrophagen/ Monozyten-Depletierung

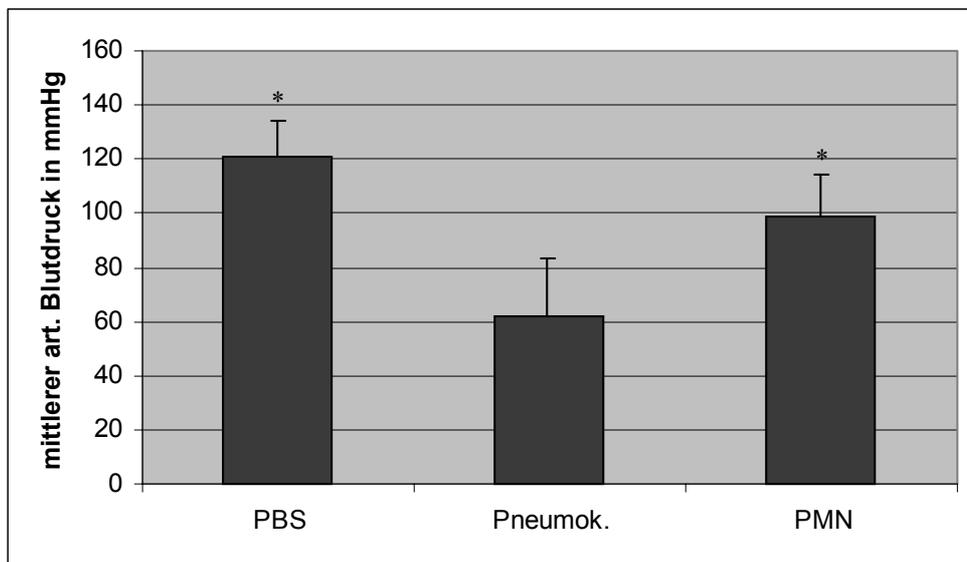
4.2 Pathophysiologische Veränderungen in der fortgeschrittenen Phase der experimentellen Meningitis

4.2.1 Physiologische Parameter

Der mittlere arterielle Blutdruck lag während des Beobachtungszeitraumes bei den Kontrollen und neutropenischen Tieren im Normbereich (> 80 mmHg).

Mit Pneumokokken infizierte Ratten wiesen dagegen einen signifikant niedrigeren Blutdruck (62 ± 21 mmHg) auf (s. Diagramm 4).

Diagramm 4: Mittlerer arterieller Blutdruck 24 Stunden nach Inokulation lebender *Pneumokokken*/ PBS



Anmerkungen: PBS, Kontrollen; Pneumok., unbehandelte infizierte Tiere; PMN, mit PMN-Antikörper vorbehandelte infizierte Ratten; Angaben als Mittelwerte \pm SD.

* $p < 0,05$ im Vergleich zu den unbehandelten infizierten Tieren

4.2.2 Differentialblutbild

Die intraperitoneale Gabe des gegen die Neutrophilen gerichteten Antikörpers lies auch 48 Stunden nach Injektion noch eine deutliche Reduktion der Neutrophilen erkennen. Allerdings war diese weniger stark ausgeprägt als in den Kurzzeitversuchen. Die Differentialblutbilder zweier Stichproben sind im folgendem dargestellt: s. Tabelle 5

Tabelle 5: Differentialblutbilder zweier Ratten 24 Stunden nach *Pneumokokken*-Gabe

	Tier 1	Tier 2
Lymphozyten	53%	84%
Segmentkernige Granulozyten	43%	12%
Monozyten	3%	4%

Anmerkung: Mittelwerte zum Zeitpunkt 6 Stunden post HKP: $3 \pm 2\%$ Granulozyten, $92 \pm 1\%$ Lymphozyten, $6 \pm 2\%$ Monozyten.

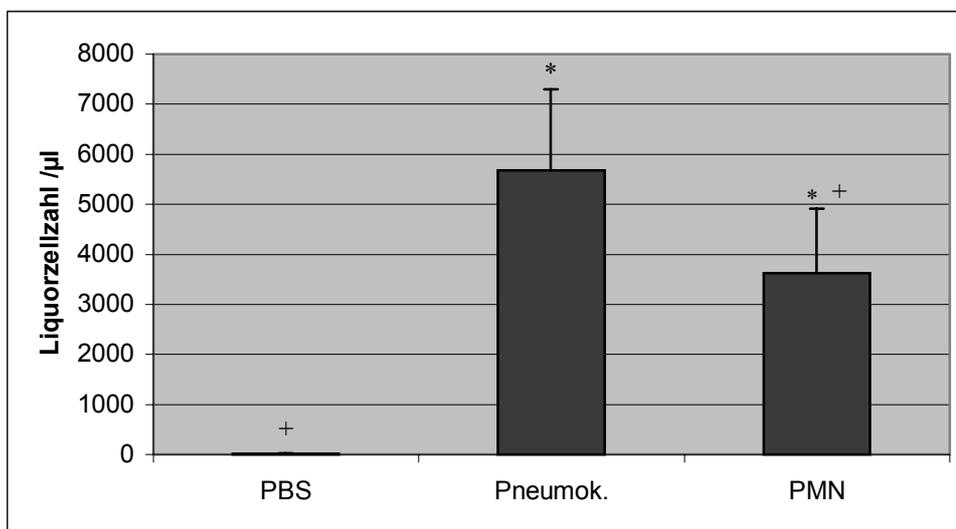
4.2.3 Liquorzellzahl

24 Stunden nach Injektion des Erregers konnte bei den unbehandelten Ratten eine Liquorpleozytose von 5683 ± 1617 Zellen/ μl festgestellt werden. Tiere, die dagegen PBS erhalten hatten, wiesen lediglich eine Zellzahl von 16 ± 8 / μl auf ($p < 0,05$).

Die Liquorpleozytose der mit PMN-Antikörpern vorbehandelten Ratten war mit 3618 ± 1290 Zellen / μl gegenüber den beiden vorher genannten Gruppen signifikant verändert.

Diagramm 6 zeigt die graphische Darstellung.

Diagramm 6: Liquorpleozytose 24 Stunden nach Applikation von Pneumokokken/ PBS



Anmerkungen: PBS, Kontrollen; Pneumok., unbehandelte infizierte Tiere; PMN, mit PMN-Antikörper vorbehandelte infizierte Ratten; Angaben als Mittelwerte \pm SD.

* $p < 0,05$ im Vergleich zu den Kontrollen

+ $p < 0,05$ im Vergleich zu den unbehandelten infizierten Tieren

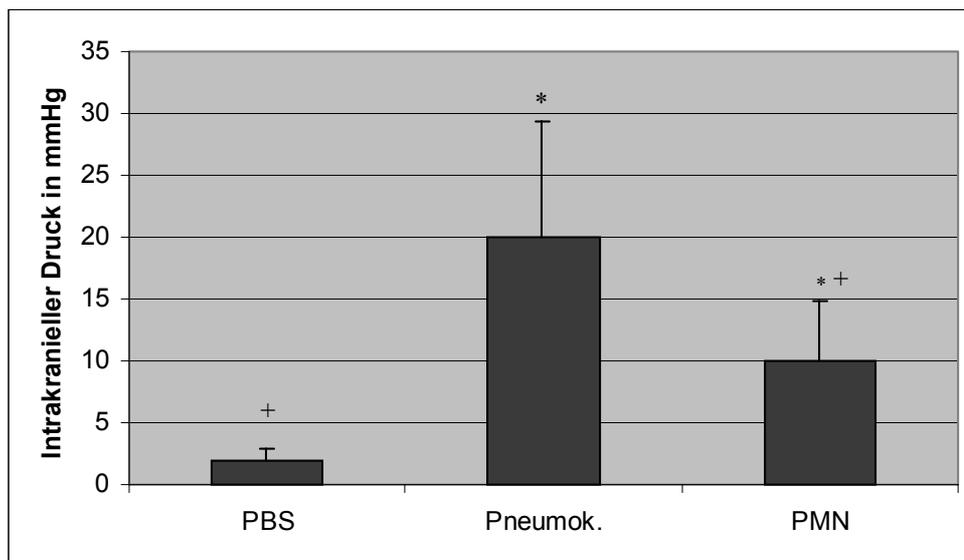
4.2.4 Intrakranieller Druck

Bei Versuchstieren, denen PBS intrazisternal appliziert worden war, lag der intrakranielle Druck bei $1,9 \pm 1,0$ mmHg. Die Inokulation lebender Pneumokokken führte zu einem dramatischen Druckanstieg auf $19,8 \pm 9,4$ mmHg ($p < 0,05$).

Die Depletierung der Neutrophilen bewirkte eine Reduktion des intrakraniellen Druckes auf Werte von $10,4 \pm 4,8$ mmHg. Der Unterschied war sowohl zu den Kontrollen als auch zu den unbehandelten Tieren signifikant.

In Diagramm 5 sind die Daten der einzelnen Gruppen dargestellt.

Diagramm 5: Intrakranieller Druck 24 Stunden nach intrazisternaler Gabe von Pneumokokken/ PBS



Anmerkungen: PBS, Kontrollen; Pneumok., unbehandelte infizierte Tiere; PMN, mit PMN-Antikörper vorbehandelte infizierte Ratten; Angaben als Mittelwerte \pm SD.

* $p < 0,05$ im Vergleich zu den Kontrollen

+ $p < 0,05$ im Vergleich zu den unbehandelten infizierten Tieren

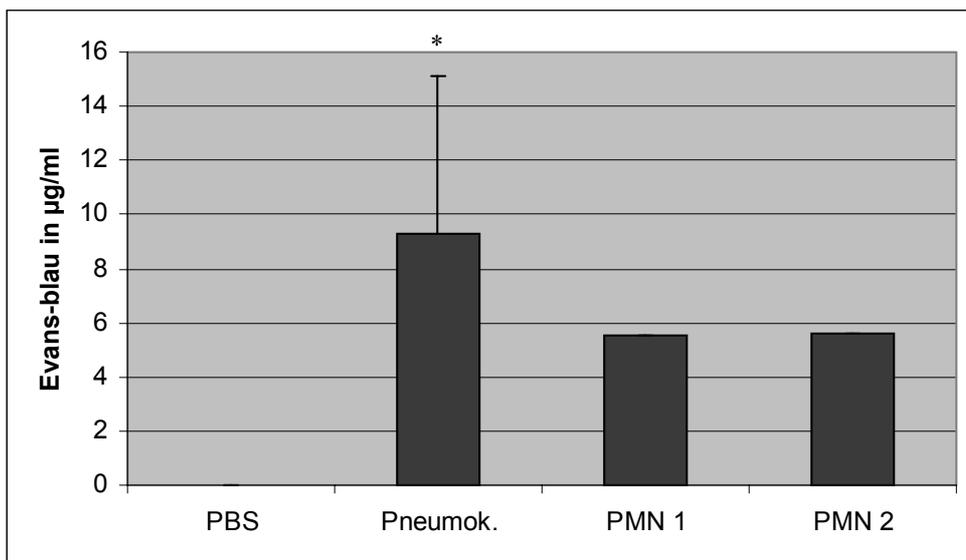
4.2.5 Veränderungen der Blut-Hirnschranke

Die Evans-blau-Extravasation der infizierten Tiere betrug $9,3 \pm 5,8 \mu\text{g/ml}$. Bei gesunden unbehandelten Tieren lag die Evans-blau-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze.

Die intraperitoneale Gabe von PMN-Antikörpern vor Applikation lebender Pneumokokken verminderte den Austritt von Evans-blau aus den Gefäßen. Die festgestellten Konzentrationen in zwei untersuchten Fällen lagen bei $5,5 \mu\text{g/ml}$ (Tier 1) und $5,6 \mu\text{g/ml}$ (Tier 2). Auf Grund der zu geringen Fallzahl auf Seiten der neutropenischen Tiere ist eine Aussage hinsichtlich der Signifikanz in den festgestellten Unterschieden zwischen neutropenischen und unbehandelten Ratten nicht möglich (s. Diagramm 7).

Zur bildlichen Darstellung der Blut-Hirnschrankenstörung wurden Hirnschnitte von Kontrollen, unbehandelten und neutropenischen Tieren unter fluoreszierendem Licht betrachtet. Hierbei zeigte sich eine deutlich geringere EB-Fluoreszenz bei den depletierten Ratten verglichen mit den unbehandelten (Abbildungen 4.5-4.7).

Diagramm 7: Evans-blau-Konzentration im Liquor 24 Stunden nach Inokulation lebender Pneumokokken/ PBS



Anmerkungen: PBS, Kontrollen; Pneumok., unbehandelte infizierte Ratten; PMN 1, mit PMN-Antikörper behandeltes Tier 1; PMN 2, behandeltes Tier 2; Angaben zu Pneumok. als Mittelwert \pm SD, zu PMN 1 und PMN 2 als Absolutwerte;

* $p < 0,05$ im Vergleich zu den Kontrollen

Abb.4.5-4.7: Evans-blau-Fluoreszenz an Hirnschnitten von Kontrollen, Ratten mit Meningitis und neutropenischen infizierten Tieren

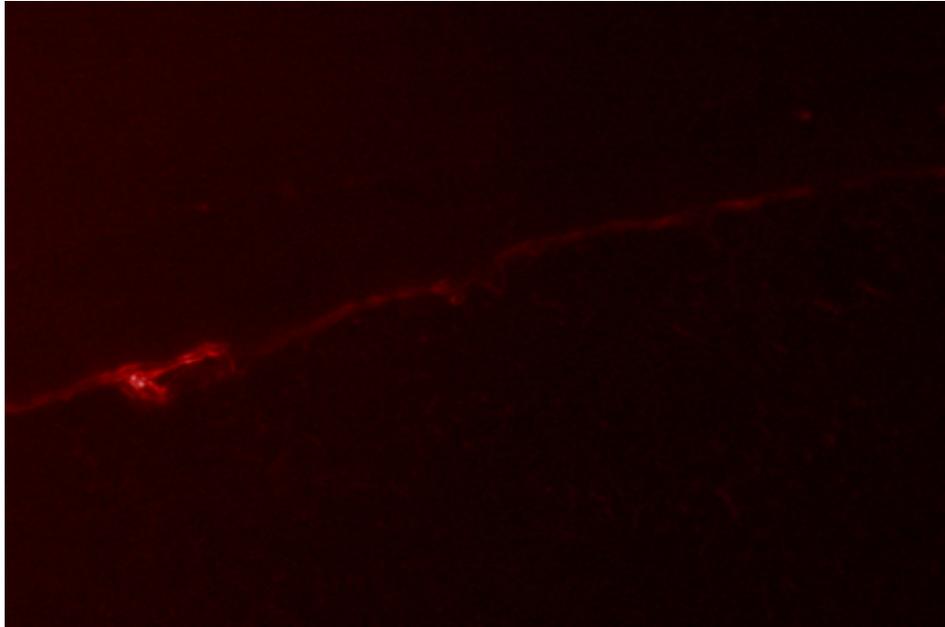


Abb.4.5: Evans-blau-Fluoreszenz nach Gabe von PBS

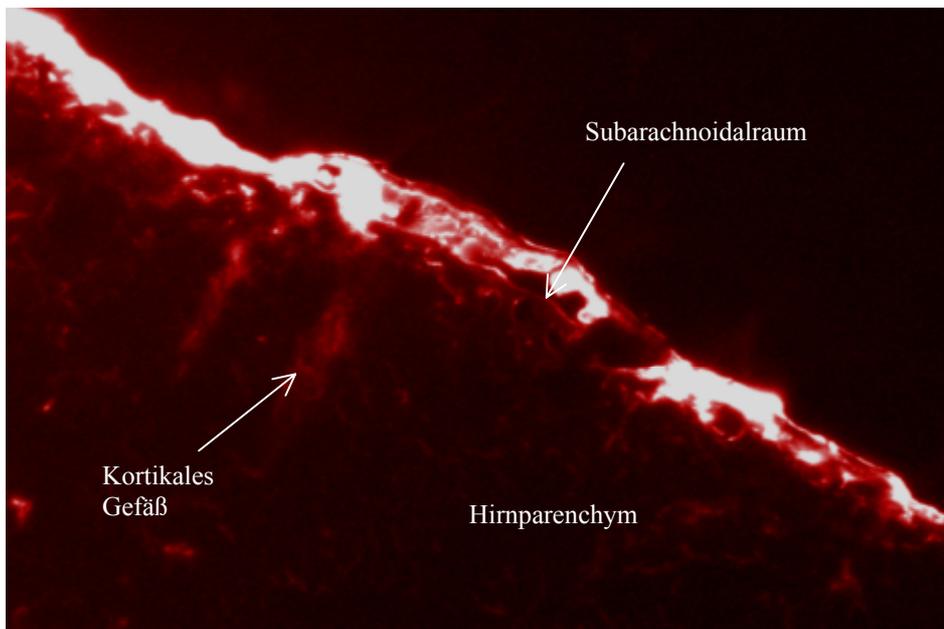


Abb.4.6: Extravasation bei infizierten unbehandelten Ratten

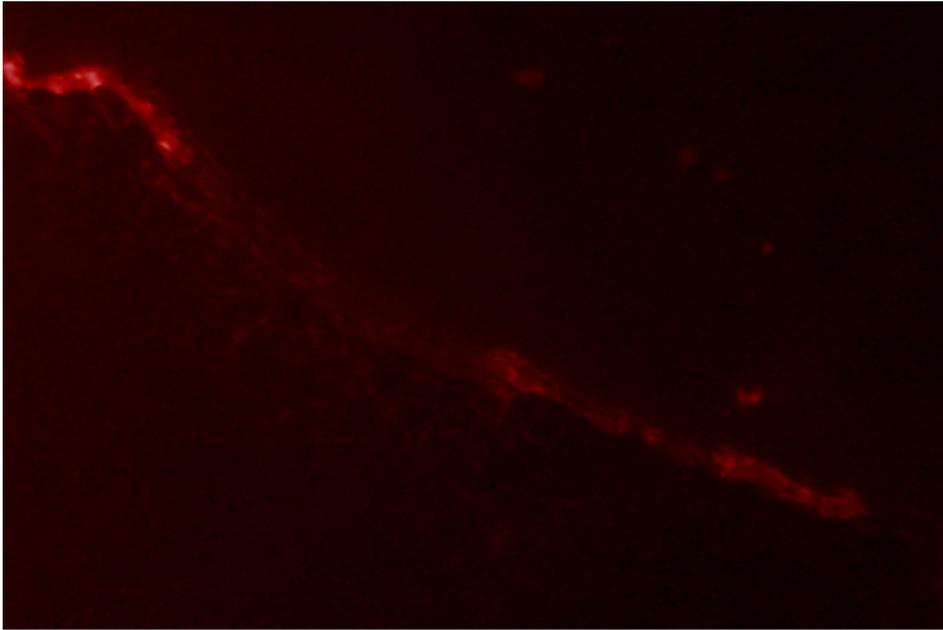


Abb.4.7: Evans-blau-Extravasation bei infizierten Tieren nach Neutrophilen-Depletion

5 Diskussion

5.1 Effekte in der Frühphase der bakteriellen Meningitis

5.1.1 Auswirkungen einer PMN-Depletion auf die Frühphase der Pneumokokkenmeningitis

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, daß sowohl Granulozyten als auch Monozyten/Makrophagen eine essentielle Rolle bei der Entstehung von ZNS-Veränderungen während der Pneumokokkenmeningitis spielen.

Die Depletion neutrophiler Leukozyten verminderte die Pneumokokken-induzierten pathophysiologischen Veränderungen, wie den Anstieg des intrakraniellen Druckes, die Störung der Blut-Hirnschrankenfunktion, sowie die Ausbildung einer Liquorpleozytose.

5.1.1.1 Kontroverse Ansichten über die Bedeutung der Leukozyten während der bakteriellen Meningitis

Erste indirekte Hinweise, daß Leukozyten den Verlauf der bakteriellen Meningitis negativ beeinflussen könnten, erbrachten Petersdorf und Luttrell 1962. Sie fanden heraus, daß Hunde mit einer Pneumokokkenmeningitis, die zuvor durch eine Ganzkörperbestrahlung in einen leukopenischen Zustand gebracht worden waren, nach Infizierung im Durchschnitt noch 62 Stunden lebten, während Hunde mit intakter Immunantwort bereits nach durchschnittlich 46 Stunden verstorben waren. Die Methode der Ganzkörperbestrahlung zur Induktion der Leukopenie minimiert allerdings die Validität dieser Untersuchung. Mc Allister und seine Kollegen unterstützen 1975 die Prämisse, das Ausmaß der Entzündung im Subarachnoidalraum stelle eine entscheidende Determinante für die Prognose der Meningitis dar. In ihrer Studie wiesen Tiere, die länger als der Durchschnitt überlebten, eine geringere leukozytäre Infiltration auf.

Im Gegensatz dazu existieren klinische und experimentelle Daten, die belegen, daß eine sehr niedrige Leukozytenzahl im Liquor in Verbindung mit einem hohen bakteriellen Titer ein ungünstiges prognostisches Zeichen darstellt – hinweisend auf eine möglicherweise protektive

Rolle der Leukozyten (Weiss et al., 1967; Tugwell et al., 1976; Baird et al., 1976). Giampaolo und seine Mitarbeiter berichteten 1981 in diesem Zusammenhang von einer guten Prognose bei ausgeprägter Liquorpleozytose in der Frühphase der experimentellen Pneumokokkenmeningitis, während zwei Tage nach Beginn der Therapie bei abfallendem Bakterientiter, eine hohe Leukozytenzahl im Liquor eher mit einem schlechten Ausgang assoziiert war. Der Grund für die Diskrepanz zwischen diesen Daten und denen leukopenischer Tiere wurde nicht untersucht.

Täuber et al. (1988) versetzten Kaninchen durch die Gabe von Mechlorethamin HCL in einen leukopenischen Zustand. Nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* wurden Veränderungen verschiedener pathophysiologischer Parameter über 24 Stunden aufgezeichnet. Die neutropenischen Kaninchen wiesen im Vergleich zu den unbehandelten Tieren keine signifikanten Unterschiede bzgl. intrakranieller Drucksteigerung und Zunahme des Hirnödems während des Experimentes auf. Täuber und seine Kollegen schlossen damit die Beteiligung der Granulozyten an der Entstehung intrakranieller Komplikationen aus.

Die von den Autoren verwendete Substanz Mechlorethamin zur Induktion der Leukopenie zählt zu den Alkylantien – einer Gruppe von Zytostatika. Die zytotoxische Wirkung dieser Stoffe geht auf eine Reaktion mit der DNA zurück, die dadurch chemisch verändert und funktionell geschädigt wird (Povirk und Shunker 1994; Estler 1992). Die Wirkung ist besonders in schnellteilendem Gewebe ausgeprägt. Eine typische und in Täubers Studie genutzte Nebenwirkung ist daher die Immunsuppression mit Verminderung der Granulopoese; allerdings sind auch die Lympho-, Thrombo- und Erythropose mitbetroffen. Neben weiteren diversen unerwünschten Wirkungen wurde auch eine Neurotoxizität mit neuronal-degenerativen Veränderungen unter Alkylantien beobachtet (Bruggers et al., 1994; Sullivan et al., 1982). Das breite Spektrum der Zytotoxizität mit Einbeziehung aller drei Stammzellreihen und die Neurotoxizität könnten den Verlauf der Meningitis unbestimmt beeinflussen. Eine experimentelle Studie unter diesen Bedingungen dürfte daher in ihrer Validität deutlich eingeschränkt sein.

5.1.1.2 Blockade der Endothel-Leukozyten-Interaktion

Zytokine und Adhäsionsmoleküle spielen eine zentrale Rolle bei der Invasion aktivierter Leukozyten in den Subarachnoidalraum. Die Endothelzell-Leukozyten-Interaktionen sind wahrscheinlich über die Öffnung interzellulärer Verbindungen mitverantwortlich für die initiale Zerstörung der Blut-Hirnschranke. Substanzen, die Wechselbeziehungen zwischen Endothelzellen und Leukozyten - wie Rollen und feste Adhäsion - beeinträchtigen und somit eine „funktionelle Leukopenie“ verursachen, führten in experimentellen Studien der bakteriellen Meningitis zu einem klinisch günstigerem Verlauf.

So behandelten beispielsweise Tuomanen et al. (1989) Kaninchen – vor Induktion der Pneumokokkenmeningitis – mit einem Antikörper gegen die CD18-Integrinfamilie (IB4) vor (nähere Erläuterungen zur Funktion der Integrine siehe S. 12-15). Liquorproben im Verlaufe des Experimentes ergaben, daß der monoklonale Antikörper gegen den CD18 Komplex den Leukozyteneinstrom in den Liquor verhindert, die Ausbildung von Hirnödemen und Blut-Hirnschrankenstörung reduziert und die Überlebenszeit der Kaninchen verlängert. In ähnlicher Weise erzielten Saez-Llorens et al. (1991) durch Injektion von IB4 eine Reduktion der Entzündungsantwort und Blut-Hirnschranken-Permeabilität bei Kaninchen mit *Haemophilus influenzae*-induzierter Meningitis. Der Effekt wurde durch die zusätzliche Verabreichung von Dexamethason, das eine Überproduktion von Zytokinen in Folge bakterieller Stimulation verhindert, verstärkt. Vermutlich ebenfalls über die Blockade der CD18 Aktivierung hemmten prokaryotische Peptide, die Selektine nachahmen, aber dabei die Leukozytenadhäsion ans Endothel und die Hochregulation von CD11b/ CD18 verhindern, in einem Tiermodell der Pneumokokkenmeningitis die Leukozyteninvasion und verminderten die Akkumulation von Proteinen im Liquor als Zeichen für die Unversehrtheit des Kapillarendothels (Rozdzinski et al., 1993).

Weber et al. (1995) zeigten in einem Rattenmodell, daß durch die Blockade von ICAM-1, einem essentiellen Rezeptor zur Ausbildung einer festen Adhäsion (nähere Erläuterungen siehe S. 13-15), eine Minderung der Liquorpleozytose, Hirnödementwicklung und des zerebralen Blutfluß- und intrakraniellen Druckanstieges während der Frühphase der bakteriellen Meningitis erreicht werden kann.

Weitere experimentelle Studien verhinderten erfolgreich die Leukozyteninvasion, in dem sie in den Vorgang des Leukozyten-Rollens eingriffen. Dieser Vorgang geht der festen Adhäsion voraus und wird, wie erwähnt, durch Selektine reguliert (zur genaueren Beschreibung der Selektine siehe S. 11-15). Fukoidin unterbindet durch Blockade von L- und P-Selektin das Rollen und damit die nachfolgende transendotheliale Emigration der Leukozyten. Eine dem

Fukoidin vergleichbare Hemmwirkung auf das Leukozytenrollen konnte auch für Heparin nachgewiesen werden. Versuchstiere in der Frühphase der Pneumokokkenmeningitis wiesen unter Behandlung mit Fukoidin oder Heparin eine signifikante Verbesserung pathophysiologischer Veränderungen wie intrakranieller Druck, Hirnödem, zerebrales Blutvolumen und Blut-Hirnschranken-Permeabilität auf (Granert et al., 1994; Angstwurm et al., 1995; Weber et al., 1997).

In einer Untersuchung zur Zytokin-induzierten Meningitis mittels IL-1 β und TNF α zeigte sich an P- und E-Selektin defizienten Mäusen eine komplette Reduktion des Leukozyteneinstroms in den Liquor und der Blut-Hirnschranken-Permeabilität (Tang et al., 1996).

Die aufgeführten Befunde symbolisieren eine funktionelle Leukopenie und stehen im Einklang mit den Ergebnissen der selektiven und kombinierten Depletion neutrophiler und mononukleärer Zellen in der vorliegenden Arbeit. Allerdings lassen sie keine Aussage darüber zu, inwiefern die Veränderungen während der bakteriellen Meningitis allein den Neutrophilen oder Makrophagen zugeschrieben werden können. Des Weiteren besteht in allen Studien mit Antikörpern die Möglichkeit, daß Leukozyten über Adhäsionsmoleküle, die nicht von den Antikörpern blockiert wurden, interagieren oder zur Ausschüttung von Toxinen aktiviert werden. Unter Rezeptorblockade konnte zudem weiterhin die Ausschüttung von Zytokine, wie z.B. TNF α , festgestellt werden (Saez-Llorens et al., 1991; Granert et al., 1999), von denen man annimmt, daß vor allem aus dem Blut stammende Leukozyten für ihre Freisetzung verantwortlich sein dürften (Ostergaard et al., 2000b). Diese Zytokine können ebenfalls zur Entstehung des Hirnödems und Störung der Blut-Hirnschrankenfunktion beitragen (Saukkonen et al., 1990). Daher ist anzunehmen, daß der Einfluß von Leukozyten auf den Entzündungsprozeß durch die Blockade von Adhäsionsmolekülen nicht vollkommen aufgehoben wird.

5.1.1.3 Neutrophile als Produzenten gewebezerstörender Faktoren

Neutrophile sind „Mikro-Phagen“ und somit phagozytisch an der Keimbeseitigung beteiligt. Zu diesem Zweck setzen sie aber auch proteolytische, chemotaktische und andere Substanzen ein (Riede und Schaefer, 1995). Doch treffen sie mit ihren Waffen nur den Feind?

Neutrophile sind kaum fähig zwischen fremden und wirtseigenen Antigenen zu differenzieren und verlassen sich deshalb auf die Mithilfe anderer Mitglieder des Immunsystems (z.B. Antikörper, Komplement und Zytokine), ihre Ziele richtig auszuwählen. Das Waffenarsenal

der Neutrophilen umfaßt nahezu 50 bisher bekannte toxische Metaboliten (Malech et al., 1987), darunter freie Sauerstoffradikale, Enzyme und Stickstoffmonoxid (NO). Sie dienen der Bekämpfung von Bakterien und anderen Mikroorganismen, können aber auch normale Zellen schädigen bzw. zerstören und Bindegewebe auflösen (Dallegrì und Ottonello, 1997).

Sauerstoffradikale sind äußerst reaktionsfreudig und oxidieren jegliche Art von organischen Molekülen in ihrer Nähe. Werden Zellmembranen, Zellorganelle, Enzyme oder DNS oxidiert, kann dies zum Funktionsverlust und zum Absterben der Zelle führen (Bauerova und Bezek, 1999; Leib und Täuber, 2000; Droge, 2002). Zum Arsenal reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zählen z.B. Superoxide, Hydroxyradikale und Wasserstoffperoxid. Letzteres besitzt die Fähigkeit mit Hilfe der Myeloperoxidase Cl^- zu seiner hypochlorigen Säure HOCL zu oxidieren (Babior, 1978; Weiss 1989). Beinahe simultan zur Freisetzung der Radikale fusionieren intrazelluläre Granula mit der Plasmamembran und entleeren ihren Inhalt sowohl in den Extrazellularraum als auch in die phagozytischen Vakuolen (Lehrer et al., 1988). Neutrophile Granula enthalten eine Reihe mikrobizider Peptide, Proteine und Enzyme; darunter befinden sich drei proteolytische Enzyme: die Serinprotease Elastase und die beiden Matrix Metalloproteinasen (MMPs) Kollagenase und Gelatinase. Untersuchungen ergaben, daß Neutrophile freie Radikale nicht nur zum direkten Angriff nutzen, sondern sie auch zur oxidativen Inaktivierung von Proteinaseinhibitoren einsetzen. Sie schaffen damit eine Umgebung, in der es proteolytischen Enzymen möglich ist, ihre destruktive Wirkung ungehindert zu entfalten (Weiss und Regiani, 1984; Weiss, 1989; Huang et al., 1998). Im Rahmen einer physiologischen Entzündungsantwort ermöglicht dies den Neutrophilen, u.a. Bindegewebsbarrieren aufzulösen und eingeschlossene Mikroben zu zerstören. Für gewöhnlich ist der Einstrom Neutrophiler streng reguliert und reißt ab, sobald das auslösende Antigen vernichtet wurde.

Tierexperimentelle Studien in den letzten Jahren erbrachten vielfach Hinweise auf die Beteiligung freier Sauerstoffradikale an Meningitis-assoziierten intrakraniellen Komplikationen und Hirnschäden. Sie zeigten, daß Vorbehandlungen mit Antioxidantien wie Superoxiddismutase und Katalase Schutz vor pathophysiologischen Veränderungen in der Frühphase der bakteriellen Meningitis bieten. Der Anstieg des intrakraniellen Druckes und zerebralen Blutflusses, wie er bei unbehandelten, mit Pneumokokken-infizierten Tieren zu beobachten ist, konnte unter Gabe von Antioxidantien zum Teil vollständig blockiert und zudem die Ausbildung eines Hirnödems verhindert werden (Pfister et al., 1990 a,b und 1992 b,c; Koedel et al., 1995). Untersuchungen von Chan et al. 1984 ergaben, daß zerebrale freie Sauerstoffradikale neben zellulären Schäden auch zu gesteigerter Permeabilität der Blut-

Hirnschranke und Ödembildung führen. Die Veränderungen waren durch die Superoxiddismutase hemmbar.

Zu den Hydroxyradikalfängern zählen Mannitol und Deferoxamin. Eine kontinuierliche Infusion von Mannitol bzw. Deferoxamin reduzierte den Anstieg von intrakraniellm Druck, zerebralen Blutfluß und Hirnwassergehalt während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis. Die Liquorzellzahl blieb von der Behandlung mit Mannitol unbeeinflusst (Lorenzl et al., 1996; Pfister et al., 1992b). Das Antioxidans N-Acetyl-L-Cystein dagegen blockierte neben dem intrakraniellen Druckanstieg auch die Ausbildung einer Liquorpleozytose im Tiermodell der Pneumokokkenmeningitis (Koedel und Pfister, 1997).

Der genaue Entstehungsort freier Sauerstoffradikale ist nicht bekannt. Man nimmt an, daß eine Vielzahl von Zellen bspw. neben Neutrophilen auch Mikroglia, Endothelzellen und Bakterien an ihrer Bildung beteiligt sein könnten. Die Tatsache, daß die Depletierung von Neutrophilen in ähnlicher Weise wie die Behandlung mit Antioxidantien zur Reduktion des intrakraniellen Druckes und der Blut-Hirnschranken-Permeabilität führte, deutet darauf hin, daß die in den Liquor eingewanderten weißen Blutzellen einen wesentlichen Beitrag zur Bildung freier Radikale leisten.

Wie schon erwähnt setzten Neutrophile simultan zu Sauerstoffradikalen auch Matrix Metalloproteinasen (MMPs) frei. Yushchenko et al. berichteten 2000, daß Granulozyten und Makrophagen die Hauptproduzenten von MMP-9 sein dürften.

MMPs sind in viele physiologische (z.B. Wundheilung und Angiogenese) (Miganetti et al., 1996), aber auch pathophysiologische Prozesse (Arthritis, Hirntumor, Multiple Sklerose) involviert (Gottschall und Deb, 1996; Yong et al., 1998). Bei Patienten und Tieren mit bakterieller Meningitis wurden erhöhte MMP-9 Werte beobachtet, während Liquores gesunder Probanden bzgl. MMP-9 vollständig unauffällig waren (Azeh et al., 1998; Paul et al., 1997, 1998). Neben MMP-9 konnten auch erhöhte Werte an MMP-8 – wahrscheinlich ebenfalls ein Produkt von Granulozyten – bei der bakteriellen Meningitis nachgewiesen werden (Leppert et al., 2000). Darüber hinaus zeigten Leppert et al. 2000, daß MMP-9 einen Risikofaktor für die Entwicklung postmeningealer Komplikationen darstellt. Patienten mit persistierender Hörminderung und sekundärer Epilepsie wiesen einen 2,5-fach höheren Spiegel an MMP-9 im Liquor auf als Patienten, die sich komplikationslos erholten.

Paul et al. und Azeh et al. demonstrierten 1998, daß MMP-9 eine Rolle bei der Öffnung der Blut-Hirnschranke spielt. Inhibierung der MMP-9 Aktivität mittels Batimastat (BB-94) verminderte einen durch Meningokokken induzierten Anstieg des intrakraniellen Druckes und

der Blut-Hirnschranken-Permeabilität. Yushchenko et al. (2000) und Azeh et al. (1998) stellten des Weiteren eine signifikante Korrelation zwischen der MMP-9 Konzentration und der Zahl leukozytärer Zellen im Liquor bei gleichzeitiger Schwächung der Blut-Hirnschranke fest. Damit erscheint es wahrscheinlich, daß im Verlauf der Meningitis in den Liquor einwandernde Zellen – Granulozyten und Monozyten/ Makrophagen – MMP-9 bereitstellen. Nicht alle Studien jedoch konnten einen Zusammenhang zwischen der Zellzahl und der MMP-9 Konzentration im Liquor finden (Paul et al., 1998; Betsuyaku et al., 1999; Leppert et al., 2000). Untersuchungen in anderen entzündlichen ZNS-Erkrankungen wie Borreliose und virale Meningitis dagegen berichteten ebenso von einer Korrelation zwischen MMP-9 und der Zahl weißer Blutzellen im Liquor (Perides et al., 1998; Kolb et al., 1998). Die Ursache für diese Diskrepanz wurde bisher nicht untersucht.

Eine weitere reaktive Sauerstoffverbindung, die in die pathophysiologischen Veränderungen während der bakteriellen Meningitis verwickelt ist, ist Stickstoffmonoxid (NO).

NO ist ein Vasodilatator (Moncada et al., 1998), es verändert die Durchlässigkeit von Kapillaren (Moncada et al., 1991) und besitzt bakterizide und zytotoxische Wirkung, wenn es in exzessiven Mengen produziert wird (Hibbs et al., 1998).

Bakterien und Bestandteile ihrer Zellwand können über Induktion der NO-Synthase (NOS) zur Produktion enormer Mengen an NO führen (Freyer et al., 1996; Buster et al., 1995). Der genaue Bildungsort von NO bei der bakteriellen Meningitis ist nicht bekannt. Eine Vielzahl an Zellen ist nachweislich zur Produktion von NO fähig; z.B. Bakterien, Neurone, Mikroglia, aber besonders Astrozyten (Bernatowicz et al., 1995), Endothelzellen (Palmer et al., 1988), Neutrophile und Makrophagen (Salvemini et al., 1989).

Mehrere klinische Studien berichteten über erhöhte Nitritkonzentrationen, einem stabilen Metabolit von NO, in Liquores von Patienten mit bakterieller Meningitis, verglichen mit Kontrollpersonen. So fanden bspw. Kornelisse et al. (1996) signifikant erhöhte Nitrit- und Nitratwerte in Liquorproben von Kindern mit Meningokokkenmeningitis. Auch in Tiermodellen der bakteriellen Meningitis konnten erhöhte Konzentrationen für NO und Nitrit beobachtet werden (Koedel et al., 1995; Boje, 1996; Korytko und Boje, 1996).

Während der letzten Jahre wurde in mehreren experimentellen Studien untersucht, ob die Hemmung der NO-Synthase einen Benefit für den Verlauf der bakteriellen Meningitis mit sich bringt. Vorbehandlungen mit nicht-selektiven NOS-Inhibitoren wie N-nitro-L-Arginin Methylester führten hierbei zu einer signifikanten Reduktion pathophysiologischer Veränderungen wie intrakranieller Druckanstieg, Erhöhung des zerebralen Blutflusses und

Ödembildung während der Frühphase der experimentellen bakteriellen Meningitis (Haberl et al., 1994; Buster et al., 1995; Koedel et al., 1995). Buster et al. (1995) berichteten zudem von einer Verminderung der Blut-Hirnschranken-Permeabilität und Liquorpleozytose mit einhergehendem Abfall des Liquornitritspiegels bei Ratten mit *Haemophilus influenzae* Meningitis unter Behandlung mit N-nitro-L-Arginin Methylester.

Jedoch existieren auch gegensätzliche Berichte über die Auswirkungen einer Behandlung mit NOS-Inhibitoren. Im Jahre 1996 stellten Leib et al. unter Verwendung des NOS-Inhibitors Aminoguanidin bei neugeborenen, mit Streptokokken Gruppe B-infizierten Ratten eine Zunahme der neuronalen Schäden fest. Art des Inhibitors und Erregers könnten eine Erklärung für diese Diskrepanz abgeben.

In Anbetracht der Vielzahl an Zellen, die zur NO Produktion fähig sind, wäre es denkbar, daß Neutrophile und Makrophagen nur in geringem Maße für NO-bedingte Komplikationen während des Krankheitsprozesses verantwortlich sind. NO führt allerdings unter Reaktion mit Superoxid – wie oben erwähnt ein Produkt von Leukozyten – auch zur Bildung von Peroxynitrit (Beckmann et al., 1999). Peroxynitrit verfügt über eine ausgeprägt zytotoxische Wirkung in Form verschiedener Mechanismen wie DNS-Schädigung, Tyrosinnitrierung und Lipidperoxidation (Zhang et al., 1994). Es hat vermutlich einen schädlicheren Einfluß auf den Krankheitsverlauf als NO selbst. Kastenbauer et al. demonstrierten 1999, daß Harnsäure als Antagonist von Peroxynitrit positive Effekte auf die Veränderungen von intrakraniellm Druck, Liquorpleozytose und Blut-Hirnschranken-Permeabilität während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis hat.

Die Elimination Neutrophiler bedeutet also in weiten Teilen auch die Elimination freier Sauerstoffradikale, Matrix-Metalloproteinasen, Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit. Eine vergleichbare oder zum Teil ausgeprägtere Reduktion pathophysiologischer Veränderungen insbesondere des intrakraniellen Druckanstieges, der Ausbildung von Liquorpleozytose und Blut-Hirnschrankenstörungen im Rahmen der Neutrophilen-Depletion während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis in der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Behauptung.

Es stellt sich die Frage, warum es den Neutrophilen nicht möglich ist, ihr umfassenden Waffenarsenals und ihre Fähigkeit zur Phagozytose gegen die Eindringlinge einzusetzen, sondern stattdessen körpereigenes Gewebe zerstören.

Die Phagozytose, ein Prozeß des Erkennens und "Auffressens" von Mikroorganismen, ist wichtig für eine erfolgreiche Erregerabwehr. Häufig tarnen sich Erreger durch bestimmte Polysaccharide, um sich der Phagozytose zu entziehen. Hüllproteine, auch Opsonine genannt, können diese Polysaccharide überdecken und den Phagozyten das Fremdmaterial zum Fressen wieder „schmackhaft“ machen. Klassische Opsonine sind C3b des Komplementsystems und spezifische IgG-Antikörper (Riede und Schaefer, 1995).

Zwahlen et al. konnten 1982 in nur 15 von 27 Fällen bakterieller Meningitis Komplementvermittelte Opsonierungsaktivität nachweisen. Das Fehlen der Opsonierungsaktivität und des Komplements war mit einer schlechten Prognose für die Patienten verbunden. Beim Gesunden beträgt das Verhältnis Immunglobuline im Blut : Liquor $\sim 800:1$. Die Konzentrationen von IgG im Liquor liegen hierbei bei $3,1 \pm 1,2$ mg/100 ml. Im Verlauf der bakteriellen Meningitis steigen zwar die IgG-Konzentrationen im Liquor an, verbleiben aber mit $9,9 \pm 8,2$ mg/100 ml trotzdem auf einem viel niedrigeren Stand als im Verhältnis dazu stehende Serumkonzentrationen (Smith et al., 1973).

Sehr früh schon stellte man fest, daß virulente Pneumokokken in Körperhöhlen mit seröser Flüssigkeit wie Pleurahöhle, Peritoneum und Meningen in Abwesenheit von Antikörpern von Leukozyten nicht phagozytiert werden können. Es scheint, als ob die Verteilung von Flüssigkeit zur Anzahl phagozytärer Zellen in seröser Flüssigkeit größer ist als in soliden Organen. Die Leukozyten finden dadurch nicht genügend Oberflächenkontakt zu Gewebe oder anderen Zellen, den sie benötigen, um Bakterien umzingeln und phagozytieren zu können (Smith et al., 1951).

Diese Tatsache und die unzureichende Unterstützung durch Komplement und Antikörper sind verantwortlich für die Immuninsuffizienz im Liquor während der bakteriellen Meningitis. Unter physiologischen Bedingungen reißt, wie erwähnt, der Neutrophileneinstrom nach Vernichtung des Erregers ab. Bleibt aber wie im Fall der bakteriellen Meningitis die Eliminierung aus, resultiert dies in einem ungebremsten Einstrom an Entzündungszellen und einer fortwährenden Freisetzung ihrer Toxine, die infolge einer unzureichenden Steuerung durch Immunglobuline und Komplement vor allem wirtseigenes Gewebe treffen und schädigen können. Erschwert wird zudem den Leukozyten der Angriff auf *S. pneumoniae* durch die Tatsache, daß sich dieser durch eine Superoxiddismutase vor der Attacke durch freie Radikale schützt (Poyart et al., 1995).

5.1.1.4 Neutrophile und Monozyten bei anderen akuten oder chronisch entzündlichen Erkrankungen

Die Meningitis stellt als eine Erkrankung, in der Leukozyten die Entzündung und den Gewebeschaden verstärken und möglicherweise eine Heilung behindern, keine Ausnahme dar. Eine Vielzahl internistischer und dermatologischer Krankheiten zeichnen sich durch ähnliche Charakteristika aus. Wir sprechen hierbei von Autoimmunerkrankungen.

Im folgenden sind einige dieser Erkrankungen unter Berücksichtigung der leukozytären Funktion kurz dargestellt:

Die rheumatoide Arthritis ist mit einer Entzündung innerhalb peripherer Gelenke assoziiert. Die Entzündung führt primär zur Zerstörung des Gelenkknorpels und der Kapsel und schließlich zum Verlust der Gelenkfunktion. Experimentelle Studien in den 70- und 80-iger Jahren zeigten eine Ansammlung Neutrophiler im Bereich der Pannus-Knorpel-Verbindung, wo typischerweise erste Erosionen beobachtet werden können (Mohr und Wessinghage, 1977; Mohr und Menninger, 1980). Weitere Untersuchungen ergaben, daß Produkte der Neutrophilen und Monozyten (Proteinasen, radikale Verbindungen, NO) zum einen über Depolymerisation der Hyaluronsäure, was einen Viskositätsverlust der Synovialflüssigkeit zur Folge hat (Greenwald und Moy, 1980), und zum anderen über direkte Schädigung des Knorpels zur Zerstörung des Gelenks beitragen können (Edwards und Hallet, 1997; Bauerova und Bezek, 1999).

Die Wegener'sche Granulomatose ist durch eine nekrotisierende granulomatöse Vaskulitis charakterisiert. Betroffen sind vor allem der obere und untere Respirationstrakt und die Nieren, aber auch die Haut, die Augen und das zentrale Nervensystem können befallen sein (Fauci et al., 1983; Hoffman et al., 1992).

Anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) stehen in enger Verbindung mit der Wegener'schen Granulomatose (Falk und Jenette, 1988). *In vitro* Untersuchungen ergaben, daß ANCA an Neutrophile oder Monozyten binden und sie zur Freisetzung und Bildung proteolytischer Enzyme, freier Sauerstoffradikale und proinflammatorischer Mediatoren stimulieren (Falk et al., 1990; Moore, 1995).

Qasim und seine Kollegen (1996) bestätigten im Rahmen einer Studie zur experimentellen Vaskulitis die Anwesenheit von Neutrophilen im Entzündungsinfiltrat betroffener Gewebe. Mittels RP3 - einem gegen Neutrophile gerichteten Antikörper – gelang es ihnen das Infiltrat zu reduzieren und zugleich den Gewebeschaden zu vermindern.

Das bullöse Pemphigoid ist eine subepidermale blasenbildende Erkrankung, die mit der Bildung von Antibasalmembran-Antikörpern einhergeht (Jordan et al., 1967; Mutasim et al., 1985).

Liu und Diaz (2001) erzeugten durch die Injektion von Anti-BP-180-Antikörper bei Mäusen ein der humanen Erkrankungen vergleichbares bullöses Pemphigoid. Histologische und immunologische Untersuchungen des betroffenen Gewebes ergaben, daß die Blasenbildung u.a. von der Infiltration Neutrophiler abhängt. Aktivierte Neutrophile setzen Elastase und Gelatinase B frei, welche zur Abspaltung der Epidermis von der Dermis führte. Mäuse, denen diese Enzyme fehlten, erwiesen sich als resistent gegenüber dem pathogenetischen Effekt von Anti-BP-180-Antikörper.

Dies ist nur ein kleiner Ausschnitt aus einer Vielzahl von Erkrankungen, in der die destruktive Wirkung der Leukozyten auch auf das wirtseigene Gewebe übergreift.

Selbst in T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen wie bspw. der Psoriasis konnte ein Mitwirken von Neutrophilen und Makrophagen nachgewiesen werden (Terui et al., 2000).

5.1.1.5 Antiinflammatorische Substanzen vermindern pathophysiologische Veränderungen im Verlauf der Meningitis

In den zuvor beschriebenen Erkrankungen erwiesen sich häufig anti-entzündliche Behandlungen als die effektivste Therapie, um die Akkumulation Neutrophiler und den Schaden im Gewebe zu reduzieren (Fiveson, 1997; O'Dell, 2001).

Basierend auf Hinweisen, daß Entzündungsmediatoren und -zellen selbst an den pathophysiologischen Veränderungen in der Frühphase der bakteriellen Meningitis beteiligt sind und die Letalität direkt mit dem Ausmaß der meningealen Entzündung korreliert (McAllister et al., 1975), erscheint es wahrscheinlich, daß antiinflammatorische Medikamente wie Kortikoide, Indomethacin und Diclofenac auch bei der Therapie der Pneumokokkenmeningitis von Nutzen sein könnten.

Für Glukokortikoide konnte nachgewiesen werden, daß sie die Transkription diverser Zytokine u.a. IL-1 und TNF- α , sowie die Bildung von NO hemmen (Beutler et al., 1986; Moncada et al., 1991). Des Weiteren reduzieren Kortikoide in hoher Dosis die Freisetzung lysomaler Enzyme und die Produktion von Superoxid in polymorphnukleären Leukozyten (Goldstein et al., 1976). Methylprednisolon wird eine Hemmung der Leukozytenadhäsion an

Endothelzellen zugeschrieben (Sibbald et al., 1982). Tuomanen et al. (1987) zeigten, daß Methylprednisolon und Cyclooxygenase-Inhibitoren die größte Effektivität bei der Reduktion des Leukozyteneinstroms in den Subarachnoidalraum besitzen, während Indomethacin und Diclofenac in diesem Zusammenhang nur eine geringe Wirkung aufweisen.

In Tiermodellen der *Haemophilus influenzae*-Meningitis begrenzten Kortikoide das Ausmaß der Entzündung und pathophysiologischen Veränderungen im Verlauf der Erkrankung (Mustafa et al., 1989). Klinische Untersuchungen bestätigten in pädiatrischen Fällen von HIB-Meningitis positive Auswirkungen auf die Komplikationsrate bei kombinierter Therapie von Antibiotika und Dexamethason (Lebel et al., 1988; Schaad et al., 1995).

Tierexperimentelle Studien in den 90er Jahren unterstützten die Hypothese, daß Kortikoide auch die Prognose der Pneumokokkenmeningitis verbessern könnten. In einem Rattenmodell unterdrückte die Vorbehandlung mit Dexamethason den Anstieg von intrakraniellm Druck, zerebralem Blutvolumen und die Hirnödembildung. Auch Dexamethason-Gaben zwei Stunden nach Infektion mit lebenden Pneumokokken brachten eine Verbesserung dieser Veränderungen (Pfister et al., 1990a). Koedel et al. demonstrierten 1994, daß durch die Behandlung mit Methylprednisolon vor oder vier Stunden nach intrazisternaler Inokulation von Zellwandbestandteilen eine signifikante Verminderung von Ödem, Hirndruck und Liquorpleozytose erreicht werden kann. Die Wirkung von Methylprednisolon auf spätere Stadien der Erkrankung war bereits 1985 Thema einer experimentellen Untersuchung. Täuber et al. wiesen unter Gabe dieses Steroids – 15 bis 22 Stunden nach Infektion – eine Reduktion des Hirnwassergehaltes nach; auf den intrakraniellen Druck dagegen hatte die Behandlung keinen Einfluß.

Während die Dexamethason-Therapie bei Kindern mit *Haemophilus influenzae*-Meningitis erfolgreich audiologische und neurologische Komplikationen verminderte (Quagliarello und Scheld, 1997), ist der Nutzen einer Glukokortikoid-Therapie bei Erwachsenen, insbesondere bei der Pneumokokkenmeningitis weiter umstritten.

Zwei ältere klinischen Studien von Girgis et al. 1989 und Kennedy et al. 1991 legten nahe, daß die Behandlung mit Steroiden auch die Prognose der durch Pneumokokken verursachten Meningitis verbessere. In einer neueren Untersuchung allerdings, die 56 Kinder mit Pneumokokkenmeningitis einschloß, traten audiologische und neurologische Komplikationen bei zusätzlich mit Glukokortikoiden behandelten Kindern zwar in geringerer Zahl auf, die Differenz war jedoch nicht signifikant (Kanra et al., 1995). Cabellos et al. (2000) berichteten darüber hinaus über eine höhere Anzahl an Therapieversagern in einem Tiermodell und schlechteren Ergebnissen bzgl. der Bakterienabtötung bei Dexamethason begleiteter Therapie

cephalosporin-resistenter Stämme von *Streptococcus pneumoniae*. Mögliche Ursachen für diese Erfolge und Mißerfolge könnten zum einen die Dosierung und der Zeitpunkt der Dexamethason-Gabe sein. Die Notwendigkeit der frühzeitigen Behandlung mit Kortikoiden, um einen therapeutischen Effekt zu erreichen, wurde bereits unter anderen pathophysiologischen Bedingungen wie z.B. der posttraumatischen Rückenmarksischämie demonstriert (Hall, 1992). Zum anderen und möglicherweise entscheidender dürfte die Tatsache sein, daß Dexamethason die bakterizide Aktivität und Penetrationsfähigkeit von Antibiotika, wie z.B. Vancomycin, in hohem Maße beeinträchtigt – wie es eine Studie der experimentellen Meningitis unter Verwendung hoch penicillin-resistenter *Streptococcus pneumoniae* Stämme zeigte (Paris et al., 1994).

Insgesamt gesehen sind die bisher erhobenen Daten über Dexamethason-Therapien bei Erwachsenen mit bakterieller Meningitis noch nicht ausreichend, um Schlußfolgerungen bzgl. ihrer Wirksamkeit zu ziehen. Weitere Daten sind nötig, um eine zuverlässige Antwort geben zu können, ob Dexamethason in der Therapie der Pneumokokkenmeningitis beim Erwachsenen eingesetzt werden sollte.

Wecken auch die Resultate von Dexamethason-Therapien am Menschen zum Teil Zweifel an der Annahme, daß eine überschießende Entzündungsreaktion maßgeblich an den pathophysiologischen Veränderungen während der Frühphase der Pneumokokkenmeningitis beteiligt sind, so sprechen doch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit und die vorangegangenen Diskussionspunkte eindeutig für die Korrektheit dieser Annahme.

Als mögliche Erklärung für die Tatsache, daß durch die Depletion Neutrophiler der intrakranielle Druckanstieg, die Pleozytose und die Blut-Hirnschrankenstörung nicht vollständig blockiert werden konnten, kommen folgende Gesichtspunkte in Betracht:

1. Weitere Zellen, bspw. Mikroglia, Endothelzellen, Astrozyten und Bakterien sind an der Produktion freier Radikale, MMPs und anderer Toxine beteiligt.
2. Trotz massiver Reduktion der Neutrophilen (unter 10%) war die Depletion nicht 100%ig. Im Blut noch verbliebene Zellen könnten für die nachgewiesenen Veränderungen verantwortlich sein.

5.1.2 Effekte der Makrophagen- Depletion auf die Frühphase der Pneumokokkenmeningitis

Obwohl das Entzündungsinfiltrat in der Frühphase der bakteriellen Meningitis zu über 90 Prozent aus Granulozyten besteht, scheinen die mononukleären Zellen in dieser Phase nicht bedeutungslos zu sein. Die Ergebnisse der Monozyten/ Makrophagen-Depletion demonstrieren, daß mononukleäre Phagozyten sogar eine sehr wichtige Rolle in der Entzündungskaskade der bakteriellen Meningitis spielen. Nach Elimination der monozytären Zellen kam es zu einer der Granulozyten-Depletion vergleichbaren signifikanten Reduktion von intrakraniellm Druck, Leukozytenzahl und Blut-Hirnschranken-Permeabilität.

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen berichteten Zysk et al. 1997 in einem Tiermodell der Pneumokokkenmeningitis von einer stark verminderten Leukozytenmigration in den Subarachnoidalraum nach Elimination von Blutmonozyten durch intravenöse Gabe von Dichlormethylen Diphosphonat (CL₂MDP)-enthaltenden Liposomen, obwohl Neutrophile in ihrer Zirkulation nicht gestört waren. Weiterhin beobachteten die Autoren eine an der Proteinkonzentration im Liquor gemessene geringere Dysfunktion der Blut-Hirnschranke und eine verminderte Freisetzung von IL-1 β in den Liquor bei mit CL₂MDP behandelten Tieren. Die TNF- α Konzentration im Liquor war dagegen bei diesen Tieren verglichen mit den Kontrollen nicht herabgesetzt, so daß Zysk et al. davon ausgingen, daß mononukleäre Zellen nicht für die TNF- α Produktion verantwortlich sind. Dieser letzten Aussage widersprechen Ergebnisse von Bitsch et al. (1997). Die Autoren identifizierten während einer experimentellen Pneumokokkenmeningitis TNF- α mRNA in Monozyten, die sich im Entzündungsinfiltrat in den Meningen befanden. Da der Anteil dieser Zellen im Infiltrat sehr gering war, wie es für ein granulozyten-dominierendes Zellbild typisch ist, und bei monozyten-depletierten Tieren keine TNF- α positiven Zellen in den Meningen gefunden werden konnten, schloß man, daß es sich bei den TNF- α produzierenden Zellen vornehmlich um Monozyten aus dem Blutpool handle.

Zytokine sind an der Leukozytenimmigration beteiligt, indem sie u.a. zur Aktivierung von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen beitragen (Spanaus et al., 1997; Wong und Dorovini Zis, 1992; Gotsch et al., 1994). IL-1 β , die dominante Form von IL-1, scheint dabei größeren Einfluß auf die Neutrophilenwanderung auszuüben als TNF- α (Quagliariello et al., 1991). Während die intrazisternale Inokulation von TNF- α alleine nur eine minimale Pleozytose und Blut-Hirnschranken-Permeabilität auslöst, konnten Quagliariello et al. einen synergistischen Effekt bei Kombination mit IL-1 β feststellen. IL-1 selbst besitzt keine chemotaktische

Aktivität. Man fand allerdings heraus, daß es die Freisetzung eines chemotaktischen Faktors stimuliert (Yoshimura et al., 1987). Bei diesem Faktor handelt es sich um Interleukin-8, einem CXC-Chemokin mit ausgesprochen chemotaktischer Wirkung auf Neutrophile (siehe S. 9-11). IL-8 wird vorwiegend von Mikroglia, gewebetypischen Makrophagen im Gehirn, freigesetzt (Ehrlich et al., 1998).

Neben Zysk et al. (1997) untersuchten auch De Rijk et al. (1993) und Salkowski et al. (1995) die Bedeutung der Makrophagen im Rahmen der Entzündungskaskade *in vivo*. Sie applizierten Makrophagen-depletierten Ratten und Mäusen systemisch LPS. Diese Experimente resultierten in einer ausgeprägten Konzentrationsminderung von IL-1 β im Blut. Damit erscheint es wahrscheinlich, daß hauptsächlich Makrophagen/ Monozyten für die Freisetzung von IL-1 β verantwortlich sind.

In Anbetracht der großen Bedeutung dieses Interleukins stellt sich die Frage, inwiefern auch natürlicherweise in den Meningen befindliche Makrophagen an der Produktion von IL-1 und somit an der Rekrutierung von Leukozyten beteiligt sind.

Die mononukleären Zellen im Hirngewebe umfassen drei Hauptpopulationen: Mikroglia, perivaskuläre Makrophagen und Makrophagen in den Meningen und im Choroidplexus (Lassman et al., 1991). Meningealmakrophagen scheinen neben ihrer phagozytischen Aktivität fähig zu sein, spezifische Proteine wie das *beta-trace* Protein (Blödorn et al., 1997) und andere Immunmediatoren (Elmqvist et al., 1997) bilden zu können.

Trostdorf et al. (1999) untersuchten die Funktion der im Gehirn und in den Meningen befindlichen Makrophagen, indem sie deren Anteil durch intrazisternale Injektion von CL₂MDP um 77% herabsetzten. Anschließend infizierten sie die Kaninchen mit *Streptococcus pneumoniae*. Die 24 Stunden post infectionem (p.i.) gemessenen Konzentrationen an TNF- α und IL-1, sowie die Dichte der Leukozyten wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen behandelten Tieren und Kontrollen auf, während NSE, ein Marker für neuronale Schäden, bei den behandelten Kaninchen erhöht war. Damit erscheint es wahrscheinlich, daß die in den Meningen befindlichen Makrophagen nicht wesentlich an der Migration von Leukozyten während einer Meningitis beteiligt sind. Der erhöhte NSE-Titer nach Depletion dieser Makrophagenpopulation legt nahe, daß sie eher zum Schutz des Hirnparenchyms vor neurotoxischen Produkten, die von Pneumokokken oder Leukozyten freigesetzt werden, dienen.

Neben den Zytokinen konnten auch Chemokine in Makrophagen nachgewiesen werden. Diab et al. untersuchten 1999 den Ursprung des CXC-Chemokins MIP-2 und der CC-Chemokine MIP-1 α , MCP-1 und RANTES bei mit *Haemophilus influenzae*-infizierten Tieren. Dabei

identifizierten sie Granulozyten und Makrophagen als MIP-2, MIP-1 α und MCP-1 positive Zellen im Subarachnoidalraum. In Astrozyten und Mikroglia war kein Signal für MIP-1 α und MIP-2 auszumachen und nur wenige Astrozyten waren MCP-1 positiv.

Als Hauptproduzenten von IL-1, CXC-Chemokin MIP-2 und möglicherweise auch TNF- α stellen Makrophagen somit unverzichtbare Komplizen und Vorläufer für polymorphnukleäre Granulozyten dar, da sie mit Hilfe ihrer Zytokine und Chemokine den PMN ihren Weg in den Subarachnoidalraum bahnen. Ihr Fehlen hat dementsprechend – wie die vorliegenden Daten zeigen – eine massive Reduktion der Liquorpleozytose zur Folge. Es ist bisher nicht bekannt, ob λ -Carrageenan fähig sind, die Blut-Hirnschranke zu überwinden und dabei neben zirkulierenden Makrophagen bzw. Monozyten auch hirnsspezifische Makrophagen zerstört werden könnten. Dies könnte möglicherweise Auswirkungen auf die Resultate der Experimente haben. In Tierversuchen, in denen λ -Carrageenan intraventrikulär appliziert wurde, kam es zu einer Zunahme der Blut-Hirnschranken-Permeabilität und Neutrophilen-Extravasation (Gamache et al., 1986). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kontrolltiere, denen λ -Carrageenan intraperitoneal verabreicht worden war, zeigten keine signifikant verstärkte Liquorpleozytose oder Evans-blau-Extravasation gegenüber den unbehandelten Kontrollen, so daß nicht von einem wesentlichen Übertritt der λ -Carrageenan in den Liquorraum ausgegangen werden muß.

Weitere Untersuchungen, die ergaben, daß mononukleäre Zellen aus dem Blut noch vor den Neutrophilen im Entzündungsexudat erscheinen, sprechen zudem für die „Vorläuferthese“ der Blutmonozyten. Faustmann et al. (1995) bspw. stellten fest, daß nach subarachnoidaler Applikation von Komplement C5a zur Induktion einer Meningitis Granulozyten über postkapilläre Venolen in den Liquor einwandern und mit einer dort befindlichen Monozyten-Makrophagen-Zelllinie in Kontakt treten. Färbungen mit unterschiedlichen Markern ergaben einen erhöhten Anteil an ED2-positiven Zellen als Hinweis auf ihren hämatogenen Ursprung. Es ist allerdings auch denkbar, daß eine spezielle Subpopulation von Meningealmakrophagen, die ebenfalls ED2-positiv reagiert, sich hinter diesen Zellen verbirgt.

Makrophagen bzw. Monozyten könnten auch durch ihre direkt toxische Wirkung an den pathophysiologischen Veränderungen während der bakteriellen Meningitis beteiligt sein. Ähnlich wie Neutrophile sind auch sie nach Stimulation durch Pneumokokken fähig, reaktive Sauerstoffverbindungen (Koedel und Pfister, 1999) und MMP-9 (Yushchenko et al., 2000) zu bilden sowie NO frei zu setzen (Salvemini et al., 1989; Moncada et al., 1991). In Anbetracht des überwiegend granulozytären Zellbildes und nur geringen Anteils an mononukleären

Zellen in der Liquorpleozytose scheint dieser Faktor im Hinblick auf leukozyten-vermittelte Gewebeschäden eher von geringerem Gewicht zu sein als ihre Produktion von Zytokinen. Anders verhält es sich dagegen mit der Freisetzung von Glutamat aus Makrophagen. Glutamat führt zu neuronalem Zelltod und wurde in Liquores von Patienten (Spranger et al., 1996) und Versuchstieren (Guerra-Romero et al., 1993) mit bakterieller Meningitis in erhöhter Konzentration nachgewiesen. Diese Konzentrationen korrelierten mit der Schwere der Erkrankung. Makrophagen bildeten hierbei bemerkenswerte Mengen an Glutamat. (Spranger et al., 1996).

5.1.3 Effekte der kombinierten Depletion auf die Frühphase der Pneumokokkenmeningitis

In der Gruppe der Makrophagen-depletierten wie in der Gruppe der Neutrophilen-depletierten Tiere konnte neben der Reduktion der Liquorpleozytose auch eine signifikante Verminderung der Blut-Hirnschranken-Permeabilität beobachtet werden. Beide Gruppen wiesen annähernd gleiche Werte bzgl. der Evans-blau Konzentration – als Ausdruck für die Dysfunktion der Blut-Hirnschranke – und der Leukozytenzahl im Liquor auf.

Parallel zur Verbesserung der Blut-Hirnschranken-Funktion und der Reduktion der Pleozytose war auch eine Verminderung des intrakraniellen Druckes verglichen mit unbehandelten Tieren festzustellen. Im Gegensatz zur Liquorpleozytose und der EB-Extravasation blieb der intrakranielle Druck jedoch in beiden einfach-depletierten Gruppen gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Die Ursache hierfür dürfte wohl in der multifaktoriellen Genese des Druckanstieges und einem Synergismus von Neutrophilen und Monozyten bzw. Makrophagen liegen. Wie in einem früheren Kapitel beschrieben, sind am Anstieg des intrakraniellen Druckes mehrere Mechanismen beteiligt: das vasogene, zytotoxische und interstitielle Hirnödem, sowie die Hyperämie und der Hydrozephalus infolge einer Liquorzirkulationsstörung. Wie bereits diskutiert können beide Zellarten durch die Freisetzung von Toxinen und Zytokinen gleichzeitig auf mehrere dieser Faktoren Einfluß nehmen und sich zusätzlich gegenseitig verstärken.

Ergebnisse in der Gruppe der zweifach-depletierten Tiere verdeutlichen diesen Synergismus. Die Tiere zeigten bzgl. der Leukozyten und Evans-blau Konzentration im Liquor eine weitere,

wenn auch nicht signifikante Reduktion gegenüber den einfach-depletierten Tieren. Ihre Werte waren denen der Kontrollen nahezu identisch. Bei diesen zweifach-depletierten Tieren lag auch der intrakranielle Druck im Normbereich und wies während der gesamten Dauer des Experiments keine Tendenz zum Ansteigen auf.

Während die Eliminierung von Neutrophilen oder Makrophagen die Blut-Hirnschranken-Permeabilität, die Pleozytose und vor allem den intrakraniellen Druckanstieg lediglich reduzierte, führte die Ausschaltung beider Zellarten zu einer vollständigen Blockade dieser Parameter. Dies bedeutet, daß Granulozyten und Monozyten/Makrophagen gemeinsam hauptverantwortlich für die pathophysiologischen Veränderungen und die damit verbundenen Komplikationen – insbesondere in der Frühphase - der bakteriellen Meningitis sein dürften.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Makrophagen bzw. Monozyten proinflammatorische Mediatoren bilden, die in hohem Maße für die Wanderung der PMN in den Subarachnoidalraum verantwortlich sind. In Anbetracht der Schäden, die aus der Neutrophilenimmigration resultieren, tragen mononukleäre Zellen damit indirekt zur Zerstörung von Hirngewebe während der Pneumokokkenmeningitis bei. Infolge ihrer Glutamat-Freisetzung könnten sie des Weiteren auch direkt an den auftretenden Schäden beteiligt sein.

Die kombinierte Depletion von Granulozyten und Makrophagen verdeutlichte schließlich, daß das Zusammenspiel dieser beiden Zellpopulationen der Hauptfaktor für das Ausmaß der Hirnschäden in der Frühphase der Erkrankung zu sein scheint.

5.2 Auswirkungen der PMN-Depletion auf die Spätphase der Pneumokokkenmeningitis

Abschließend wurde untersucht, ob die während der Frühphase gewonnen Erkenntnisse auch auf die fortgeschrittene Phase der Pneumokokkenmeningitis zutreffen.

Die Messung der einzelnen Parameter erfolgte 24 Stunden nach intrazisternaler Injektion lebender Pneumokokken. Differentialblutbild-Kontrollen an zwei Versuchstieren zeigten zu diesem Zeitpunkt noch eine deutliche Reduktion der Neutrophilen. Verglichen mit den Kurzzeitversuchen war diese jedoch schwächer ausgeprägt. Zunehmende Einbußen in der Wirksamkeit des Antikörpers während des Experiments sind vermutlich für diese Diskrepanz verantwortlich. Langzeituntersuchungen zu dem betreffenden Antikörper waren bisher nicht erfolgt.

Trotz der abgeschwächten Wirkung war eine signifikante Verminderung der Liquorpleozytose und des intrakraniellen Druckanstieges zu erkennen. Die in zwei Tieren festgestellten Evansblau-Konzentrationen im Liquor fielen geringer aus als bei unbehandelten Ratten. Auch die Normalisierung der Blutdruckwerte spricht für einen positiven Effekt der Neutrophilen-Depletion.

Spanaus und seine Kollegen (1997) beschrieben, daß Liquorproben von Patienten mit bakterieller Meningitis, die hohe Konzentrationen an CXC-Chemokinen aufwiesen, ebenfalls hohe Konzentrationen an CC-Chemokinen enthielten. Das Blutbild bleibt jedoch während der längsten Zeit der Erkrankung überwiegend granulozytär differenziert. Ein zusätzlicher Faktor muß demnach für die Modulation der Leukozytenmigration in den Subarachnoidalraum verantwortlich sein. Die Eliminierung der Granulozyten könnte vom Wegfall dieses Faktors begleitet sein und einen verstärkten Einstrom von Monozyten/ Makrophagen bewirken, was wie in der Frühphase der Meningitis die erhöhte Liquorzellzahl erklären könnte.

MIP-1, RANTES und besonders MCP-1 als Repräsentanten der CC-Chemokinfamilie üben eine starke chemotaktische Wirkung auf Monozyten, Lymphozyten und andere Zellen aus (Spanaus et al., 1997). MIP-1 α und MCP-1 erreichen ca. 24 Stunden nach Stimulation mit Bakterien ihre maximalen Konzentrationen im Liquor, bei RANTES tritt dies erst 48 Stunden post infectionem ein (Diab et al., 1999). Dies könnte bedeuten, daß 24 Stunden p.i. ein stärkerer Einstrom von Monozyten/Makrophagen stattfindet, als es 6 Stunden nach Infektion der Fall ist. Im weiteren könnte dies die Ursache für die unterschiedlichen Ausmaße der Liquorpleozytose während der Früh- und Spätphase der experimentellen Meningitis sein.

Mit eine Ursache für die Diskrepanz in der CSF-Pleozytose bei Kurz- und Langzeitversuchen ist sicherlich die verminderte Elimination der Neutrophilen auf Grund der nachlassenden Depletionswirkung des Antikörpers in den Langzeitversuchen.

In Anbetracht der Auswirkungen, die sich aus den Depletionen in der Frühphase der Meningitis ergaben, und der Ergebnisse der Neutrophilen-Depletion in der Spätphase wäre es vorstellbar, daß eine kombinierte Depletion von Monozyten und Granulozyten in der fortgeschrittenen Phase der experimentellen Pneumokokkenmeningitis zu ähnlichen Ergebnissen wie in der Frühphase führt.

Mit Carrageenan vorbehandelte Versuchstiere zeigten zum Teil erhebliche Blutdrucksenkungen im Laufe des Experiments. Einige Tiere, bei denen es bereits frühzeitig zu einem rapiden Abfall des Blutdrucks gekommen war oder deren systolischer Druck einen Wert von 80 mmHg für längere Zeit unterschritt, mußten deswegen aus der Wertung genommen werden. Aus diesem Grunde war es nicht möglich, Carrageenan in den Langzeitversuchen einzusetzen.

Mit anderen Methoden zur Depletion sollte daher die Bedeutung mononukleärer Zellen in der fortgeschrittenen Phase der Pneumokokkenmeningitis untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Trotz beträchtlicher Fortschritte in der antibiotischen Behandlung bakterieller Erkrankungen blieb der Krankheitsverlauf und die Sterberate der bakteriellen Meningitis, insbesondere der Pneumokokkenmeningitis, innerhalb der letzten Jahre unverändert. Mit der Erkenntnis, daß das Ausmaß der intrakraniellen Entzündung positiv mit dem Verlauf der Erkrankung korreliert, gewann die Frage nach der Rolle der Leukozyten im Rahmen des Krankheitsgeschehens zunehmend an Bedeutung.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Bedeutung von Granulozyten, Monozyten und des Zusammenspiels dieser beiden Zellarten im Rahmen der pathophysiologischen Abläufe während der experimentellen Pneumokokkenmeningitis aufzudecken. Insbesondere wurden Veränderungen in den Parametern intrakranieller Druck, Liquorpleozytose und Blut-Hirnschrankenstörung in der Frühphase und im fortgeschrittenen Stadium der Meningitis untersucht.

Hierfür kamen zwei Tiermodelle zur Anwendung:

- 1) Frühphase der Erkrankung: Hierbei wurde narkotisierten Ratten durch intrazisternale Injektion von Hitze-abgetöteten Pneumokokken (HKP) eine Meningitis induziert. Anschließend wurden über einen Zeitraum von sechs Stunden kontinuierlich Blutdruck, intrakranieller Druck und Temperatur überwacht. Eine Stunde vor Versuchsende erhielten die Tiere 1 ml Evans-blau zur Quantifizierung der Blut-Hirnschrankenstörung intravenös injiziert. Nach Ablauf des Beobachtungszeitraums wurden Liquorproben zur Bestimmung der Zellzahl und Evans-blau-Konzentration und Gehirnproben zur histologischen Aufarbeitung gewonnen.
- 2) Fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung (Spätphase): In diesem Modell wurde die Meningitis mittels transkutaner Injektion von *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 3 in die Cisterna magna ausgelöst. 24 Stunden nach Injektion wurden auch bei diesen Tieren die Leukozytenzahl und Evans-blau Konzentration im Liquor bestimmt sowie Gehirnproben zur weiteren Aufarbeitung gewonnen.

Um die Beteiligung der Granulozyten an den pathophysiologischen Veränderungen während der Früh- bzw. Spätphase der bakteriellen Meningitis untersuchen zu können, wurden die Versuchstiere mit einem gegen polymorphkernige Leukozyten gerichteten Antikörper (Rabbit

Anti-Rat-PMN-Antikörper) vorbehandelt, wodurch eine nahezu vollständige Depletion der Granulozyten erreicht wurde.

Um ebenso die durch Monozyten bedingten Auswirkungen während der Frühphase der Pneumokokkenmeningitis feststellen zu können, wurde eine weitere Gruppe mit λ -Carrageenan vorbehandelt, einer Substanz, deren toxische Wirkung auf mononukleäre Zellen bekannt ist. In einer dritten Gruppe schließlich wurden beide Wirkstoffe in Kombination miteinander verabreicht.

Für die Frühphase der Pneumokokkenmeningitis ergaben sich folgende Ergebnisse:

- 1) Die intrazisternale Gabe von Hitze-abgetöteten Pneumokokken führte im Verlauf von sechs Stunden bei den Ratten zu einem Anstieg des intrakraniellen Drucks, der Liquorleukozytenzahl und zur Störung der Blut-Hirnschrankenfunktion.
- 2) Die Depletion neutrophiler oder monozytärer Zellen bewirkte bei den Versuchstieren eine signifikante Reduktion der Liquorpleozytose und des intrakraniellen Druckanstieges. Gemessen an der Evans-blau-Extravasation wiesen diese Tiere auch eine geringere Funktionsstörung der Blut-Hirnschranke auf.
- 3) Bei den zweifach-depletierten Tieren waren diese Ergebnisse noch ausgeprägter. Sie zeigten bzgl. des intrakraniellen Druckanstieges, der Liquorpleozytose und Blut-Hirnschrankenfunktion keinen wesentlichen Unterschied zu unbehandelten Kontrolltieren.

Für das fortgeschrittene Stadium der Meningitis zeigte sich folgendes:

Nach Depletion granulozytärer Zellen ließ sich auch hier eine deutliche Reduktion des intrakraniellen Druckanstieges, der Liquorpleozytose und der Blut-Hirnschrankenstörung erreichen. Allerdings war diese Reduktion weitaus schwächer ausgeprägt als in den vorangegangenen Untersuchungen. Derzeit liegen noch keine Langzeituntersuchungen zur Wirkdauer des gegen polymorphkernige Leukozyten gerichteten Antikörpers vor. Daher ist nur zu vermuten, daß möglicherweise ein zunehmender Wirkverlust des Antikörpers während des Experiments für diese Diskrepanz verantwortlich sein könnte. Unterstützung findet diese Annahme durch den eindeutig höheren prozentualen Anteil neutrophiler Zellen in Differentialblutbildern von Langzeitversuchen verglichen mit denjenigen der Kurzzeitversuche.

Da mit Carrageenan vorbehandelte Tiere zum Teil erhebliche Blutdrucksenkungen im Laufe des Experimentes aufwiesen, war es nicht möglich, diese Substanz in den Langzeitversuchen einzusetzen.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, daß Granulozyten, aber auch Monozyten eine essentielle Rolle im Hinblick auf die Ursachen pathophysiologischer Veränderungen während der Früh- und vermutlich auch der späteren Phase der Pneumokokkenmeningitis spielen. Andere Methoden zur Depletion monozytärer Zellen sollten künftig angewendet werden, um die Auswirkungen einer Monozyten-Depletion auf die fortgeschrittene Phase der Pneumokokkenmeningitis genauer untersuchen zu können.

Es kommen verschiedene Mechanismen in Betracht, wie Granulozyten und Monozyten zu diesen Veränderungen führen können:

1) Neutrophile sind als Produzenten gewebezerstörender Faktoren bekannt. Ihr Waffenarsenal umfaßt eine Vielzahl toxischer Metabolite, darunter freie Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid und Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen. In vorangegangenen Studien wurde bereits die Relevanz dieser Mediatoren für die bakterielle Meningitis belegt (z.B. Pfister et al., 1990 a,b; Koedel et al., 1995; Paul et al., 1998). Ohne Mithilfe anderer Mitglieder des Immunsystems sind Neutrophile nicht fähig zwischen fremden und wirtseigenen Antigenen zu unterscheiden; ihre „Waffen“ richten sich in diesem Fall auch gegen den eigenen Wirt.

Frühere Studien zeigten, daß im Liquorraum von einem Komplementmangel ausgegangen werden muß und somit hier der zellulären Abwehr die nötige Unterstützung fehlt, um das richtige Ziel der Zerstörung preiszugeben.

2) Monozyten/Makrophagen gelten als Hauptproduzenten von IL-1 und anderen Chemokinen, die als chemotaktisches Signal für Neutrophile dienen. Sie stellen damit unverzichtbare Komplizen und Vorläufer für granulozytäre Zellen dar, da sie wesentlich an deren Immigration in den Subarachnoidalraum beteiligt sind.

Ferner könnten mononukleäre Zellen durch ihre Freisetzung von Glutamat direkt an den auftretenden Schäden beteiligt sein.

7 Literaturverzeichnis

Adams DH, Shaw S. Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. *Lancet* (1994) 343: 831-836

Adams DH, Lloyd AR. Chemokines: leukocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* (1997) 349: 490-495

Aloisi F, Care A, Borsellino G, Gallo P, Rosa S, Bassani A, Cabibbo A, Testa U, Levi G, Peschle C. Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* (1992) 149: 2358-2366

Anderson DC, Springer TA. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in MAC-1, LFA-1, and p150/95 glycoprotein. *Annu Rev Med* (1987) 38: 175-192

Angstwurm K, Weber JR, Segert A, Bürger W, Weih M, Freyer D, Einhäupl KM, Dirnagl U. Fucoidin, a polysaccharide inhibiting leukocyte rolling, attenuates inflammatory responses in experimental pneumococcal meningitis in rats. *Neurosci Lett* (1995) 191: 1-4

Azeh I, Mäder M, Smirnov A, Beuche W, Nau R, Weber F. Experimental pneumococcal meningitis in rabbits: the increase of matrix metalloproteinase-9 in cerebrospinal fluid correlates with leucocyte invasion. *Neurosci Lett* (1998) 256: 127-130

Babior BM. Oxygen-dependent killing by phagocytes. *N Engl J Med* (1978) 298: 659-668

Baethmann A, Jantzen JP, Piek J, Prange H, Unterberg A. Physiology and pathophysiology of intracranial pressure. *Zentralbl Neurochir* (1997) 58: 29-31

Baggiolini M, Loetscher P, Moser B. Interleukin-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol* (1995) 17:103-108

Baird DR, Whittle HC, Greenwood BM. Mortality from pneumococcal meningitis. *Lancet* (1976) 2: 1344-1346

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane bound chemokine with a CX(3)C motif. *Nature* (1997) 385: 640-644

Bauerova K, Bezek, A. Role of reactive oxygen and nitrogen species in ethiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys* (1999) 18 Spec No: 15-20

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* (1990) 87: 1620-1624

Bernatowicz A, Koedel U, Frei K, Fontana A, Pfister HW. Production of nitrite by primary rat astrocytes in response to pneumococci. *J Neuroimmunol* (1995) 60: 53-61

Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A. Control of cachetin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science* (1986) 232: 977-980

Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* (1987) 84: 9238-9242

Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* (1993) 91: 379-387

Bitsch A, Trostorf F, Brück W, Schmidt H, Fischer FR, Nau R. Central nervous system TNF α -mRNA expression during rabbit experimental pneumococcal meningitis. *Neurosci Lett* (1997) 237: 105-108

Blödorn B, Mäder M, Urade Y, Hayaishi O, Flegenhauer K, Brück W. Choroid plexus: the major site of mRNA expression for the beta trace protein (prostaglandin D synthase) in human brain. *Neurosci Lett* (1997) 209: 117-120

Boje KMK. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates blood-brain barrier disruption during experimental meningitis. *Brain Res* (1996) 720: 75-83

Brown EJ, Joiner KA, Gaither TA, Hammer CH, Frank MM. The interaction of C3b bound to Pneumococci with factor H (β 1H globulin) factor I (C3b/C4b inactivator), and properdin factor B of human complement system. *J Immunol* (1983) 131: 409-415

Bruggers CS, Friedman HS, Tien R, DeLong R. Cerebral atrophy in an infant following treatment with ifosfamid. *Med Pediatr Oncol* (1994) 23: 380-383

Buster BL, Weintrob AC, Townsend GC, Scheld WM. Potential role of nitric oxide in the pathophysiology of experimental bacterial meningitis in rats. *Infect Immun* (1995) 63: 3835-3839

Cabellos C, Martinez-Lacasa J, Tubau F, Fernandez A, Viladrich PF, Linares J, Gudiol F. Evaluation of combined ceftriaxone and dexamethasone therapy in experimental cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *J Antimicrob Chemother* (2000) 45: 315-320

Cabral DA, Flodmark O, Farrell K, Speert DP. Prospective study of computed tomography in acute bacterial meningitis. *J Pediatr* (1987) 111: 201-205

Cairns H, Russel DS. Cerebral arteriitis and phlebitis in pneumococcal meningitis. *J Pathol Bacteriol* (1946) 58: 649-665

Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* (1994) 84: 2068-2101

Chan PH, Schmidley JW, Fishmaan RA, Longar SM. Brain injury, edema, and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology* (1984) 34: 315-320

Collignon PJ, Turnidge JD. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Med J Aust* (2000) 173 Suppl: 58-64

Corbi AL. Leukocyte integrins, structure, expression and function. Heidelberg: Springer Verlag (1996)

Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idänpään-Heikkilä I, Tuomanen EI. Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* (1995) 377: 435-438

Dallegrì F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm Res* (1997) 46: 382-391

De Rijik RH, Strijbos PJLM, van Rooijen N, Rothwell NJ, Berkenbosch F. Fever and thermogenesis in response to bacterial endotoxin involve macrophage-dependent mechanisms in rats. *Am J Physiol* (1993) 265: R 1179-1183

Diab A, Abdalla H, Li HL, Shi FD, Zhu J, Höjberg B, Lindquist L, Wretling B, Bakhiat M, Link H. Neutralization of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) and MIP-1 α attenuates neutrophil recruitment in the central nervous system during experimental bacterial meningitis. *Infect Immun* (1999) 67: 2590-2601

Dodge PR, Swartz MN. Bacterial meningitis: a review of selected aspects. *N Engl J Med* (1965) 272: 1003-1010

Dodge PR, Davis H, Feigin RD et al. Prospective evaluation of hearing impairment as a sequelae of acute bacterial meningitis. *N Engl J Med* (1984) 311: 869-874

Drickamer K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* (1988) 263: 9557-9560

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* (2002) 82: 47-95

Durand ML, Claderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS, Swartz MN. Acute bacterial meningitis in adults: a review of 493 episodes. *N Engl J Med* (1993) 328: 21-28

Edwards SW, Hallett MB. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunol Today* (1997) 18: 320-324

Ehrlich LC, Hu S, Sheng WS, Sutton RL, Rockswold GL, Peterson PK, Chao CC. Cytokine regulation of human microglial cell IL-8 production. *J Immunol* (1998) 160: 1944-1948

Elmqvist JK, Breder CD, Sherin JD, Scammell TE, Hickey WF, Dewitt D, Saper CB. Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol* (1997) 381: 119-129

Ernst JD, Decazes JM, Sande MA. Experimental pneumococcal meningitis: role of leukocytes in pathogenesis. *Infect Immun* (1983) 4: 275-279

Estler CJ. Pharmakologie und Toxikologie. Schattauer-Verlag (1992) S. 543

Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* (1990) 87: 4115-4119

Fauci AS, Haynes BF, Katz P, Wolff SM. Wegener's granulomatosis: prospective clinical and therapeutic experience with 85 patients for 21 years. *Ann Intern Med* (1983) 98: 76

Faustmann PM, Krause D, Dux R, Dermietzel R. Morphological study in the early stages of complement C5a fragment-induced experimental meningitis: activation of macrophages and astrocytes. *Acta Neuropathol* (1995) 89: 239-247

Fishman RA. Brain edema. *N Engl J Med* (1975) 293: 706-711

Fiveson DP. Nonsteroidal treatment of autoimmune skin diseases. *Dermatol Clin* (1997) 15: 695-705

Freyer D, Weih M, Weber JR, Bürger W, Scholz P, Manz R, Ziegenhorn A, Angstwurm K, Dirnagl U. Pneumococcal cell wall components induce nitric oxide synthase and TNF- α in astroglial-enriched cultures. *GLIA* 16:1-6

Friedl A, Schaad HJ, Sturzenegger M, Caversaccio M. Otogenic meningitis. *Schweiz Rundsch Med Prax* (1998) 87 (24): 839-844

Fujii T, Igorashi T, Kishimoto S. Significance of suppressor macrophages for immunosurveillance of tumor bearing mice. *J Natl Cancer Inst* (1987) 78: 509-517

Furie MB, Tanciino MC, Smith CW. Monoclonal antibodies to leukocyte integrins CD11a/CD18 and CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro. *Blood* (1991) 78: 2089-2097

Gamache DA, Povlishock JT, Ellis EF. Carrageenan-induced brain inflammation. *J Neurosurg* (1986) 65: 679-685

Giampaolo C, Scheld M, Boyd J, Savory J, Sande M, Wills M. Leukocyte and bacterial interrelationships in experimental meningitis. *Ann Neurol* (1981) 9: 328-333

Girgis NI, Farid Z, Mikhail IA, Farrag I, Sultan Y, Kilpatrick ME. Dexamethasone treatment for bacterial meningitis in children and adults. *Ped Infect Dis J* (1989) 8:848-855

Goldstein JM, Roos D, Weissman G, Kaplan HB. Influence of corticosteroids on human polymorphonuclear leukocyte function in vitro: reduction of lysosomal enzyme release and superoxide production. *Inflammation* (1976) 1: 305-315

Gotsch U, Jager U, Dominis M, Vestweber D. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF- α in vivo. *Cell Adhesion and Communication* (1994) 2:7-14

Gottschall PE, Deb S. Regulation of matrix metalloproteinase expression in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation* (1996) 3: 69-75

Granert C, Raud J, Xie X, Lindquist L, Lindbom L. Inhibition of leukocyte rolling with polysaccharide fucoidin prevents pleocytosis in experimental meningitis in the rabbit. *J Clin Invest* (1994) 93: 929-936

Granert C, Raud J, Waage A, Lindquist L. Effects of polysaccharide fucoidin on cerebrospinal fluid interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in pneumococcal meningitis in the rabbit. *Infect Immun* (1999) 67: 2071-2074

Graves BJ, Crowther RL, Chandran C, Rumberger JM, Li S, Huang K-S, Presky DH, Familletti PC, Wolitzky BA, Burns DK. Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains. *Nature* (1994) 367: 532-538

Greenwald RA, Moy WW. Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum* (1980) 23: 455-463

Grimwood K, Anderson VA, Bond L, Catroppa C, Hore RL, Keir EH, Nolan T, Robertson DM. Adverse outcomes of bacterial meningitis in school-age survivors. *Pediatrics* (1995) 95: 646-656

Guerra-Romero L, Tureen JH, Fournier MA, Makrides V, Täuber MG. Amino acids in cerebrospinal and brain interstitial fluid in experimental pneumococcal meningitis. *Pediatr Res* (1993) 33: 510-513

Haberl RL, Anneser F, Koedel U, Pfister HW. Is nitric oxide involved as a mediator of cerebrovascular changes in the early phase of experimental pneumococcal meningitis? *Neurol Res* (1994) 16:108-112

Hall ED,. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg* (1992) 76: 13-22

Hammer DA, Apte SM. Stimulation of cell rolling and adhesion on surface in shear flow: general results and analysis of selectin-mediated neutrophil adhesion. *Biophys J* (1992) 63: 35-57

Heumann D, Barras C, Severin A, Glauser M, Tomasz A. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun* (1994) 62: 2715-2721

Hibbs JBJ, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* (1988) 157: 87-94

Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY et al. Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. *Ann Intern Med* (1992) 116: 488-498

Huang YI, Surichamorn W, Cao GL, Meng M, Pou S, Rosen GM, Salcedo TW, Strimpler A, Veale C, Bernstein PR, Bonuccelli CM. Effect of trifluoromethyl ketone-based elastase inhibitors on neutrophil function in vitro. *J Leukoc Biol* (1998) 64: 322-30

Hynes RO. Integrines: a family of cell surface receptors. *Cell* (1987) 48: 549-554

Igarashi M, Gilmartin RC, Gerald B, Wilburn F, Jabbour JT. Cerebral arteritis and bacterial meningitis. *Arch Neurol* (1984) 41: 531-535

Jordan RE, Beutner EH, Witebsky E, Blumental G, Hale WC, Lever WF. Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. *JAMA* (1967) 200: 751-758

Jung TM, Gallatin WM, Weissman IL, Dailey MO. Down-regulation of homing receptors after T cell activation. *J Immunol* (1988) 141: 4110-4117

Jung U, Norman KE, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, Ley K. Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. *J Clin Invest* (1998) 102: 1526-1533

Kanra GY, Ozen H, Secmeer G, Ceyhan M, Ecevit Z, Belgin E. Beneficial effects of dexamethasone in children with pneumococcal meningitis. *Pediatr Infect Dis* (1995) 14: 490-494

Kastenbauer S, Koedel U, Pfister HW. Role of peroxynitrite as a mediator of pathophysiological alterations in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* (1999) 180: 1164-1170

Katagiri K, Hattori M, Minato N, Irie SK, Takatsuk K, Kinashi T. Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Mol Cell Biol* (2000) 20: 1956-1969

Kennedy WA, Hoyt MJ, McCracken GH. The role of corticosteroid therapy in children with pneumococcal meningitis. *AJDC* (1991) 145: 1374-1378

Kirkpatrick B, Reeves DS, MacGowan AP. A review of the clinical presentation, laboratory, features, antimicrobial Therapy and outcome of 77 episodes of pneumococcal meningitis occurring in children and adults. *J Infect* (1994) 29: 171-182

Koedel U, Pfister HW, Tomasz A. Methylprednisolone attenuates inflammation, increase of brain water content and intracranial pressure, but does not influence cerebral blood flow changes in experimental pneumococcal meningitis. *Brain Res* (1994) 644: 25-31

Koedel U, Bernatowicz A, Paul R, Frei K, Fontana A, Pfister HW. Experimental pneumococcal meningitis: cerebrovascular alterations, brain edema, and meningeal inflammation are linked to the production of nitric oxide. *Ann Neurol* (1995) 37: 313-323

Koedel U, Pfister HW. Protective effect of the antioxidant N-acetyl-L-cysteine in pneumococcal meningitis in the rat. *Neurosci Lett* (1997) 225: 33-36

Koedel U, Pfister HW. Oxidative stress in bacterial meningitis. *Brain Pathol* (1999) 9: 57-67

Kolb SA, Lahrtz F, Paul R, Leppert D, Nadal D, Pfister HW, Fontana A. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinases in viral meningitis: up-regulation of MMP-9 and TIMP-1 in cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* (1998) 84: 143-150

Kornelisse RF, Hokman K, Visser JJ, Hop WCJ, Huijmans JGM, van der Straaten PJC, van der Heijden AJ, Sukhai RN, Neijens HJ, de Groot R. The role of nitric oxide in bacterial meningitis in children. *J Infect Dis* (1996) 174: 120-126

Korytko PJ, Boje KMK. Pharmacological characterization of nitric oxide production in a rat model of meningitis. *Neuropharmacol* (1996) 35: 231-237

Kunkel EJ, Ley K. Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ Res* (1996) 79: 1196-1204

Kunkel EJ, Dunne JL, Ley K. Leukocyte arrest during cytokine-dependent inflammation in vivo. *J Immunol* (2000) 164: 3301-3308

Lahrtz F, Piali L, Spanaus KS, Seebach J, Fontana A. Chemokines and chemotaxis of leukocytes in infectious meningitis. *J Neuroimmunol* (1998) 85: 33-43

Lassmann H, Zimprich F, Vass K, Hickey WF. Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *J Neurosci Res* (1991) 28: 236-243

Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on an selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* (1991) 65: 859-873

Lawrence MB, Kansas GS, Kunkel EJ, Ley K. Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62, L, P, E). *J Cell Biol* (1997) 136: 717-727

Lebel MH, Freig BJ, Syragiannopoulos GA, Chrane DF, Hoyt MJ, Stewart SM, Kennard BD, Olsen KD, McCracken GH. Dexamethason therapy for bacterial meningitis. Results of two double-blind, placebo-controlled trials. *N Engl J Med* (1988) 319: 964-971

Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME, Babior BM, Curnutte JT. Neutrophils and host defense. *Ann Intern Med* (1988) 109: 127-142

Leib SL, Kim YS, Black SM, Ferreiro DM, Täuber MG. Detrimental effect of nitric oxide inhibition in experimental bacterial meningitis. *Ann Neurol* (1996) 39: 555-556

Leib SL, Täuber MG. Suche nach Strategien zur Verhinderung des Hirnschadens als Folge von bakterieller Meningitis. *Schweiz Med Wochenschr* (2000) 130: 928-935

Leppert D, Leib SL, Grygar C, Miller KM, Schaad UB, Holländer GA. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin Infect Dis* (2000) 31: 80-84

Lewinsohn DM, Bargatze RF, Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes and other leukocytes. *J Immunol* (1987) 138: 4313-4321

Liu Z, Diaz LA. Bullous pemphigoid: end of the century overview. *J Dermatol* (2001) 28: 647-650

Lopez-Cortes LF, Cruz-Ruiz M, Gomez-Mateos J, Viciano-Fernandez P, Martinez-Marcos FJ, Pachon J. Interleukin-8 in cerebrospinal fluid from patients with meningitis of different etiologies: its possible role as neutrophil chemotactic factor. *J Infect Dis* (1995) 172: 581-584

Malech HL, Gallin JI. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med* (1987) 317: 687-694

Männel DN, Moore RN, Mergenhagen SE. Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor necrotizing factor). *Infect Immun* (1980) 30: 523-530

Mc Allister CK, O'Donoghue JM, Beaty HN. Experimental pneumococcal meningitis. II. Characterization and quantitation of the inflammatory process. *J Infect Dis* (1975) 132: 355-360

Mc Ever RP, Bbeckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* (1989) 84: 92-99

Meldrum DR, Sheridan BC, Cleveland JC, Fullerton DA, Banerjee A, Harken AH. Neutrophils are required for endotoxin-induced myocardial cross-tolerance to ischemia-reperfusion injury. *Arch Surg* (1996) 131: 1203-1208

Mignatti P, Rifkin DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein* (1996) 49: 117-137

Mohr W, Wessinghage D. The relationship between polymorphonuclear granulocytes and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* (1977) 36: 316-331

Mohr W, Menninger H. Polymorphonuclear granulocytes at the pannus-cartilage junction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (1980) 23: 1413-1414

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous vasodilator. *Hypertension* (1988) 12: 365-372

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* (1991) 43: 109-142

Moore PM. Neurological manifestation of vasculitis: update on immunopathogenetic mechanisms and clinical features. *Ann Neurol* (1995) 37 (S1): S131-141

Morikawa K, Hosokawa M, Hamada J, Xu Z, Kobayashi H. Possible participation of tumoricidal macrophages in therapeutic effect of bleomycin on a transplantable rat fibrosarcoma. *Cancer Res* (1986) 46: 684-688

Mustafa MM, Ramilo O, Mertsola J, Risser RC, Beutler B, Hansen EJ et al. Modulation of inflammatory cachectin activity in relation to treatment of experimental *Haemophilus influenzae* type b meningitis. *J Infect Dis* (1989) 160: 818-825

Mutasim DF, Takahashi Y, Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Diaz LA. A pool of bullous pemphigoid antigen(s) is intracellular and associated with the basal cell cytoskeleton-hemidesmosome complex. *J Invest Dermatol* (1985) 84: 47-53

O'Dell JR. How is the best to treat early rheumatoid arthritis patients. *Best Pract Res Clin Rheumatol* (2001) 15: 125-137

Ostergaard C, Zieng-Kow RV, Larsen CG, Mukaida N, Matsushima K, Benfield T, Frimodt-Moller N, Espersen F, Kharazmi A, Lundgren JD. Treatment with a monoclonal antibody to IL-8 attenuates the pleocytosis in experimental pneumococcal meningitis in rabbits when given intravenously, but not intracisternally. *Clin Exp Immunol* (2000a) 122: 207-211

Ostergaard C, Yieng-Kow RV, Benfield T, Frimodt-Moller N, Espersen F, Lundgren JD. Inhibition of leukocyte entry into the brain by the selectin blocker fucoidin decreases Interleukin-1 (IL-1) levels but increases IL-8 levels in cerebrospinal fluid during experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Infect Immun* (2000b) 68: 3153-3157

Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* (1988) 333: 664-666

Paris MM, Hickey SM, Uscher MI, Shelton S, Olsen KD, McCracken GH. Effect of dexamethasone on therapy of experimental penicillin- and cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* (1994) 38: 1320-1324

Paul R, Lorenzl S, Koedel U, Frosch M, Vogel U, Pfister HW. Involvement of matrix metalloproteinases (MMP) in the disruption of blood-brain-barrier in bacterial meningitis. Abstract at the 37th interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy (1997)

Paul R, Lorenzl S, Koedel U, Sporer B, Vogel U, Frosch M et al. Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis. *Ann Neurol* (1998) 44: 592-600

Perides G, Charness ME, Tanner LM, Peter O, Satz N, Steere AC et al. Matrix metalloproteinases in cerebrospinal fluid of patients with lyme neuroborreliosis. *J Infect Dis* (1998) 177: 401-408

Petersdorf RG, Luttrell CN. Studies on the pathogenesis of meningitis. I. Intrathecal infection. *J Clin Invest* (1962) 41: 311-319

Petit V, Thiery JP. Focal adhesion: structure and dynamics. *Biol Cell* (2000) 92: 477-494

Pfister HW. Die komplizierte eitrige Meningitis des Erwachsenen: weiterhin hohe Letalität durch Vaskulitis und Hirndruck. *Nervenarzt* (1989) 60: 249-254

Pfister HW, Koedel U, Haberl RL, Dirnagl U, Feiden W, Ruckdeschel G, Einhüpl KM. Microvascular changes during the early phase of experimental bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* (1990a) 10: 914-922

Pfister HW, Koedel U, Dirnagl U, Haberl RL, Feiden W, Einhüpl KM. Superoxid dismutase inhibits brain oedema formation in experimental pneumococcal meningitis. *Acta Neurochir Suppl* (1990b) 51: 378-380

Pfister HW, Borasio GD, Dirnagl U, Bauer M, Einhüpl KM. Cerebrovascular complications of bacterial meningitis in adults. *Neurology* (1992) 42: 1497-1504

Pfister HW, Koedel U, Lorenzl S, Tomasz A. Antioxidants attenuate microvascular changes in the early phase of experimental pneumococcal meningitis in rats. *Stroke* (1992b) 23: 1798-1804

Pfister HW, Koedel U, Dirnagl U et al. Effect of catalase on regional cerebral blood flow and brain edema during the early phase of experimental pneumococcal meningitis *J Infect Dis* (1992c) 166: 1442-1445

Pfister HW, Feiden W, Einhüpl KM. Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. *Arch Neurol* (1993) 50: 575-581

Pfister HW, Koedel U, Paul R. Acute meningitis. *Curr Infect Dis Rep* (1999) 1: 153-159

Plaut AG. The IgA proteases of pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* (1983) 37: 603-622

Povirk LF, Shunker DL. DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. *Mutat Res* (1994) 318: 205-226

Poyart C, Berche P, Trieu CP. Characterization of superoxide dismutase genes from gram-positive bacteria by polymerase chain reaction using degenerate primers. *FEMS Microbiol Lett* (1995) 131: 41-45

Qasim FJ, Mathieson PW, Sendo F, Thiru S, Oliveira DBG. Role of neutrophils in the pathogenesis of experimental vasculitis. *Am J Pathol* (1996) 149: 81-88

Quagliarello VJ, Wispelwey B, Long WF, Scheld WM. Recombinant interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. *J Clin Invest* (1991) 87: 1360-1366

Quagliarello VJ, Scheld WM. Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med* (1992) 327: 864-872

Quagliarello VJ und Scheld WM. New perspectives on bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* (1993) 17: 603-610

Quagliarello VJ, Scheld WM. Treatment of bacterial meningitis. *N Engl J Med* (1997) 336: 708-716

Quan PC, Burtin P. Demonstration of nonspecific suppressor cells in the peripheral lymphocytes of cancer patients. *Cancer Res.* (1978) 38: 288-296

Riede UN, Schaefer HE. Allgemeine und spezielle Pathologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1995

Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. *J Clin Invest* (1998) 102 (2): 347-360

Robert Koch Institut. Infektionen des Zentralnervensystems - 2.Folge. Epidemiologisches Bulletin (2000) 36: 287-291

Rozdzinski E, Jones T, Burnette WN, Burroughs M, Tuomanen E. Antiinflammatory effects in experimental meningitis of prokaryotic peptides that mimic selectins. *J Infect Dis* (1993) 168: 1422-1428

Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrines. *Science* (1987) 238: 491-497

Saez-Llorens X, Jafari HS, Severien C, Parras F, Olsen KD, Hansen EJ, Singer II, McCracken GH. Enhanced attenuation of meningeal inflammation and brain edema by concomitant administration of anti-CD18 monoclonal antibodies and dexamethasone in experimental haemophilus influenzae meningitis. *J Clin Invest* (1991) 88: 2003-2011

Salkowski CA, Neta R, Wynn TA, Strassmann G, van Rooijen N, Vogel SN. Effect of liposome-mediated macrophage depletion on LPS induced cytokine gene expression and radioprotection. *J Immunol* (1995) 155: 3168-3179

Salvemini D, de Nucci G, Gryglewski RJ, Vane JR. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) 86: 6328-6332

Saukkonen K, Sande S, Cioffe C, Wolpe S, Sherry B, Cerami A, Tuomanen E. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J Exp Med* (1990) 171: 439-448

Schaad UB, Kaplan SL, McCracken GH. Steroid therapy for bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* (1995) 20: 685-690

Schindler R, Gelfand JA, Dinarello CA. Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor: translational signal provided by lipopolysaccharide or IL-1 itself. *Blood* (1990) 76: 1631-1638

Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, Lefkowitz L, Perkins BA. Bacterial meningitis in the United States in 1995. *N Engl J Med* (1997) 337: 970-976

Sibbald WJ, Driedger AA, Finley RJ, et al. High-dose corticosteroids in the treatment of pulmonary microvascular injury. *Ann NY Acad Sci* (1982) 384: 496-516

Sica A, Matsushima K, Van DJ, Wang JM, Polentarutti N, Dejana E, Colotta F, Mantovani A. IL-1 transcriptionally activates the neutrophil chemotactic factor/ IL-8 gene in endothelial cells. *Immunology* (1990) 69: 548-553

Smith MR, Perry WD, Berry JW, Wood WB. Surface phagocytosis in vivo. *J Immunol* (1951) 67: 71-74

Smith H, Bannister B, O'Shea MJ. Cerebrospinal fluid immunoglobulins in meningitis. *Lancet* (1973) 2: 591-593

Spanaus KS, Nadal D, Pfister HW, Sebach J, Widmer U, Frei K, Gloor S, Fontana A. C-X-C and C-C chemokines are expressed in cerebrospinal fluid in bacterial meningitis and mediate chemotactic activity on peripheral blood-derived polymorphonuclear and mononuclear cells in vitro. *J Immunol* (1997) 158: 1956-1964

Spellerberg B, Tuomanen EI. The pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Ann Med* (1994) 26: 411-418

Spranger M, Krempien S, Schwab S, Maiwald M, Bruno K, Hacke W. Excess glutamate in the cerebrospinal fluid in bacterial meningitis. *J Neurol Sci* (1996) 143: 126-131

Sprenger H, Rosler A, Tonn P, Braune HJ, Huffmann G, Gemsa D. Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis. *Clin Immunol Immunopathol* (1996) 80: 155-161

Springer TA. Adhesion receptors of the immun system. *Nature* (1990) 346: 425-434

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* (1994) 76: 301-314

Steimle CN, Gynn TP, Morganroth ML, Bolling SF, Carr K, Deeb GN. Neutrophils are necessary for ischemia-reperfusion lung injury. *Ann Thorac Surg* (1992) 53: 64-73

Stephens DS, Farley MM. Pathogenic events during infection of the human nasopharynx with *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*. *Rev Infect Dis* (1991) 13: 22-33

Sullivan KM, Storb R, Shulman HM, Shaw CM, Spence A, Beckham C, Clift RA, Buckner CD, Stewart P, Thomas ED. Immediate and delayed neurotoxicity after mechlorethamine preparation for bone marrow transplantation. *Ann Intern Med* (1982) 97: 182-189

Swartz MN. Bacterial meningitis: more involved than just the meninges. *N Engl J Med* (1984) 311: 912-914

Tang T, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, Mayadas TN. Cytokine-induced meningitis is dramatically attenuated in mice deficient in endothelial selectins. *J Clin Invest* (1996) 97: 2485-2490

Täuber MG, Khayam-Bashi, H, Sande MA. Effects of ampicillin and corticosteroids on brain water content, cerebrospinal fluid pressure, and cerebrospinal fluid lactate levels in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* (1985) 151: 528-534

Täuber MG, Borschberg U, Sande MA. Influence of granulocytes on brain edema, intracranial pressure, and cerebrospinal fluid concentrations of lactate and protein in experimental meningitis. *J Infect Dis* (1988) 157: 456-464

Terui T, Ozawa M, Tagami H. Role of neutrophils in induction of acute inflammation in T-cell-mediated immune dermatosis, psoriasis: a neutrophil-associated inflammation-boosting loop. *Exp Dermatol* (2000) 9: 1-10

Thomson AW, Fowler EF, Pugh-Humphreys RGP. Immunopharmacology of the macrophage-toxic agent carrageenan. *Int J Immunopharmac* (1979) 1: 247-261

Thomson AW, Fowler EF. Carrageenan: a review of its effects on the immune system. *Agents and Actions* (1981) 11: 265-273

Toomey JA, Roach F. Pneumococcal meningitis. *Ohio State M J* (1939) 35: 841ff

Trostdorf F, Brück W, Schmitz-Salue M, Stuertz K, Hopkins SJ, van Rooijen N, Huitinga I, Nau R. Reduction of meningeal macrophages does not decrease migration of granulocytes into the CSF and brain parenchyma in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol* (1999) 99: 205-210

Tugwell P, Greenwood BM, Warrell DA. Pneumococcal meningitis: a clinical and laboratory study. *Q J Med* (1976) 45: 583-601

Tuomanen E, Hengstler B, Rich R, Bray MA, Zak O, Tomasz A. Nonsteroidal antiinflammatory agents in the therapy for experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* (1987) 155: 985-990

Tuomanen E, Tomasz A, Hengstler B, Zak O. The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* (1985) 151: 859-868

Tuomanen EI, Saukkonen K, Sand S, Cioffe C, Wright SD. Reduction of inflammation, tissue damage and mortality in bacterial meningitis in rabbits treated with monoclonal antibodies against adhesion-promoting receptors of leukocytes. *J Exp Med* (1989) 170: 959-968

Tuomanen EI. Molecular and cellular mechanisms of pneumococcal meningitis. *Ann NY Acad Sci* (1996) 797: 42-52

Tureen HJ, Dworkin RJ, Kennedy SL, Sachdeva M, Sande MA. Loss of cerebrovascular autoregulation in experimental meningitis in rabbits. *J Clin Invest* (1990) 85: 577-581

van Kooyk Y, van de Weil-van Kemenade P, Weder P, Kuijpers TW, Figdor CG. Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T-lymphocytes. *Nature* (1989) 342: 811-813

van Kooyk Y, Figdor CG. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr Opin Cell Biol* (2000) 12: 542-547

Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of selectins and their ligands. *Physiol Rev* (1999) 79: 181-213

Weber JR, Angstwurm K, Bürger W, Einhüpl KM, Dirnagl U. Anti ICAM-1 (CD54) monoclonal antibody reduces inflammatory changes in experimental bacterial meningitis. *J Neuroimmunol* (1995) 63: 63-68

Weber JR, Angstwurm K, Rosenkranz T, Lindauer U, Freyer D, Bürger W, Busch C, Einhüpl KM, Dirnagl U. Heparin inhibits leukocyte rolling in pial vessels and attenuates inflammatory changes in a rat model of experimental bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* (1997) 17: 1221-1229

Weiss W, Figueros W, Shapiro WH, Flippen HF. Prognostic factors in pneumococcal meningitis. *Arch Intern Med* (1967) 120: 517-522

Weiss SJ, Regiani S. Neutrophils degrade subendothelial matrices in the presence of alpha-1-proteinase inhibitor: cooperative use of lysosomal proteinases and oxygen metabolites. *J Clin Invest* (1984) 73: 1297-1303

Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* (1989) 320: 365-376

Wolman M, Klatzo I, Chui E, Wilmes F, Nishimoto K, Fujiwara K, Spatz M. Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol* (1981) 54: 55-61

Wong D, Dorovini Zis K. Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary culture of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* (1992) 39: 11-21

Xia M, Leppert D, Hauser SL, Sreedharan SP, Nelson PJ, Krensky AM, Goetzl EJ. Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane. *J Immunol* (1996) 156: 160-167

Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R, Edwards DR. Matrix metalloproteinases and disease of the CNS. *Trends Neurosci* (1998) 21: 75-80

Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ, Leonard EJ. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). *J Immunol* (1987) 139: 788-793

Yushchenko M, Weber F, Mäder M, Schöll U, Maliszewska M, Tumani H, Felgenhauer K, Beuche W. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human cerebrospinal fluid (CSF): elevated levels are primarily related to CSF cell count. *J Neuroimmunol* (2000) 110: 244-251

Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* (1994) 263: 687-689

Zwahlen A, Nydegger UE, Vaudaux P, Lambert PH, Waldvogel FA. Complement-mediated opsonic activity in normal and infected human cerebrospinal fluid: early response during bacterial meningitis. *J Infect Dis* (1982) 145: 635-646

Zysk G, Brück W, Huitinga I, Fischer FR, Flachsbarth F, van Rooijen N, Nau R. Elimination of blood-derived macrophages inhibits the release of interleukin-1 and the entry of leukocytes into the cerebrospinal fluid in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol* (1997) 73: 77-80

Zysk G, Schneider-Wald BK, Hwang JH, Bejo L, Kim KS, Mitchell TJ, Hakenbeck R, Heinz HP. Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity of brain microvascular endothelial cells caused by streptococcus pneumoniae. *Infect Immun* (2001) 69 (2): 845-852

Danksagung

Herrn Prof. Pfister möchte ich danken für die Möglichkeit, die hier vorgestellte Arbeit in seinem Neuroinfektiologischen Labor an der Neurologischen Klinik der Universität München durchzuführen und für die Unterstützung und Motivation, die ich all die Jahre hinweg erhalten habe. Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. U. Ködel und Herrn Dr. R. Paul für die exzellente Betreuung, die wertvollen Anregungen und lehrreichen Diskussionen während meiner Zeit im Labor. Bei PD Dr. Grabein und PD Dr. Roggenkamp möchte ich mich für die Bereitstellung der Pneumokokkensuspension bedanken. Mein Dank gilt außerdem Fr. B. Angele, die mir in zahlreichen technischen Problemen hilfreich zur Seite stand.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Michaela, Martina Ramersdorfer
Geburtsdatum: 05.09.1974
Geburtsort: Beilngries
Konfession: römisch-katholisch
Nationalität: Deutsch

Schulbildung:

09/81 – 07/85 Grundschole Beilngries
09/85 – 07/94 Gabrieli-Gymnasium Eichstätt
06/94 Abitur

Studium:

10/94 – 10/97 Universität Leipzig, Studiengang Humanmedizin
10/97 – 04/00 Ludwig-Maximilians-Universität
Studiengang Humanmedizin, Klinik
04/00 – 03/01 Ludwig-Maximilians-Universität, Praktisches Jahr
06/01 Drittes Staatsexamen

Berufstätigkeit:

seit 10/01 ÄIP in der Neurologischen Klinik, Klinikum Ingolstadt
(Prof. Dr. Ochs)