

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. H. K. Müller – Hermelink

Zur Pathogenese der AIDS-Enzephalitis —
Kompartmentspezifische Immunreaktion in der Frühphase der SIV-Infektion
von Rhesusaffen (*Macaca mulatta*)

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius–Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Henry Johannes Oskar Madlon
aus Bayreuth

Würzburg, April 2006

Referent: Prof. Dr. med. Justus G. Müller

Koreferent: Prof. Dr. med. Wolfgang Roggendorf

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2006

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	5
2.1 Untersuchungsmaterial	5
2.2 Immunhistochmie	9
2.3 Morphometrie	13
2.4 Statistische Methoden	14
3. Ergebnisse	16
3.0. Darstellung des Tierkollektivs	16
3.1. Vergleich der infizierten Tiere mit den Kontrolltieren	17
3.1.1 Lymphozyten bei Virus-Subtyp SIV _{mac251} / 32H	17
3.1.2 Makrophagen bei Virus-Subtyp SIV _{mac251} / 32H	19
3.1.3 Lymphozyten bei Virus-Subtyp SIV _{mac251} / MPBMC	21
3.1.4 Makrophagen bei Virus-Subtyp SIV _{mac251} / MPBMC	23
3.2. Vergleich der Infizierten mit den Erkrankten	24
3.2.1 Lymphozyten bei Virus-Subtyp SIV _{mac251} / 32H und SIV-assoziiertes Enzephalitis	25
3.2.2 Makrophagen bei Virus-Subtyp SIV _{mac251} / 32H und SIV-assoziiertes Enzephalitis	26
3.2.3 Lymphozyten bei Virus-Subtyp SIV _{mac251} / MPBMC und SIV-assoziiertes Enzephalitis	27
3.2.4 Makrophagen bei Virus-Subtyp SIV _{mac251} / MPBMC und SIV-assoziiertes Enzephalitis	28
3.3. Einfluß der Zeit seit Infektion	30
3.4. Vergleich der Lymphozyten mit den Makrophagen	34

4. Diskussion	37
5. Zusammenfassung	59
Literaturverzeichnis	60
Danksagungen	
Lebenslauf	

1. Einleitung

Anfang der 80er Jahre wurde eine neue Krankheit — zunächst bei jungen homosexuellen Männern in den USA — beobachtet, die mit einem Zusammenbruch des menschlichen körpereigenen Immunsystems einhergeht und unter anderem durch das Auftreten sogenannter opportunistischer Infektionen gekennzeichnet ist. (12)

Opportunistische Infektionen treten bei intaktem Immunsystem nicht auf, da die Erreger durch die Mechanismen der Immunabwehr abgefangen und vernichtet werden, bevor es überhaupt zur Auslösung einer Infektion kommt.

Durch die weltweit einsetzende Forschung nach dem Auslöser dieser neuen Krankheit gelang im Jahre 1983 den beiden Wissenschaftler Luc Montagnier und Robert C. Gallo die Identifizierung eines Retrovirus, der im Folgejahr 1984 den Namen Humanes Immundefizienz-Virus (kurz HIV) erhielt und der Auslöser der HIV-Infektion sowie der erworbenen Immunschwäche AIDS (für englisch acquired immunodeficiency syndrome) ist. (12)

Die weltweite Forschung auf diesem Gebiet sucht seitdem nach den verschiedenen Wegen der Infektionsausbreitung im menschlichen Körper und nach Erklärungen für das Auftreten der unterschiedlichen Krankheiten und Symptome im Verlauf der HIV-Infektion.

Eine zentrale Rolle spielt dabei der durch den HI-Virus verursachte Verlust der T-Helferzellen, einer Gruppe von Lymphozyten, welche durch Freisetzung von Zellbotenstoffen, sogenannten Mediatoren, das Immunsystem aktivieren und damit unter anderem die Produktion von Antikörpern in Gang setzen. Zielstruktur für den HI-Virus ist dabei ein auf den Zellen befindlicher Rezeptor (der sogenannte CD4-Rezeptor) an dem das Virus zu binden vermag. (40) Voraussetzung für die Infektion ist das zusätzliche Vorhandensein von Korezeptoren. (40) Als Zielzellen für die HIV-Infektion kommen u.a., neben den CD4-positiven T-Zellen, Makrophagen und ihre Varianten, wie z.B. die Mikrogliazellen im ZNS in Betracht.

In den zwei Jahrzehnten seit der Entdeckung des HI-Virus konnte man beobachten, daß das Immunsystem des Menschen durch die Infektion schrittweise zerstört wird.

Neben vielen anderen Begleiterkrankungen, die bedingt durch den Untergang der körpereigenen Immunabwehr auftreten können, weisen ca. 60% aller Infizierten neurologische Dysfunktionen auf, wiederum 30% bis 40% hiervon entwickeln eine subcorticale Demenz, klinisch auch als HIV-assoziierte Demenz bezeichnet. (44)

Das pathologische Korrelat ist eine durch das HI-Virus ausgelöste Enzephalitis, die auch HIV-Enzephalitis genannt wird. (44)

Um sich diesem neuropathogenen Verlauf der HIV-Infektion beim Menschen möglichst dicht anzunähern und gleichzeitig die Möglichkeit zur Durchführung von Experimenten zu haben, suchte man bereits frühzeitig nach einem passenden Tiermodell.

Wegen großer Ähnlichkeiten zwischen den beiden menschlichen Virussubtypen HIV-1 und HIV-2 und dem SI-Virus (englisch für simian immunodeficiency virus = Affen Immunschwäche Virus, kurz SIV) in Bezug auf große Teile homologer Sequenzen in den Genen des Virus und deren Organisation (11,15), wurde schon bald das SIV-Makaken Tiermodell als sehr gute Annäherung zur Erforschung der Veränderungen im zentralen Nervensystem benutzt. So entwickeln ebenfalls ca. 30 bis 40 Prozent der mit dem SIV infizierten Makakenaffen eine Enzephalitis. (44) Histopathologisch finden sich sowohl in Läsionen der HIV- wie auch der SIV-Enzephalitis gleichartige Veränderungen. (44)

Dieser experimentelle Ansatz wird auch durch die Erkenntnis gestützt, daß die AIDS-Erkrankung ihren Ursprung in der Tierwelt hat. (16)

Ferner sind sowohl bei HIV als auch bei SIV Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten die primären Zielzellen der Infektion (18,44)

Durch die Verwendung des Tiermodells konnten nun auch Zell- oder Gewebeveränderungen im ZNS in der frühen Infektionsphase untersucht werden, da dies beim Menschen nicht möglich ist. (25,35)

In der vorliegenden Arbeit wird dieses Tiermodell unter Verwendung zweier unterschiedlicher Virusstämme für die Untersuchung der Zelldichten der Lymphozyten und Makrophagen im zentralen Nervensystem, untersucht.

Zwei Tierkollektive (Rhesusaffen der Gattung *Macaca mulatta*) wurden dazu mit den beiden unterschiedlichen Virussubtypen experimentell infiziert.

Das erste Virus SIV_{mac251}/ 32H ist ein durch in vivo Passage entstandener Subtyp des Viruswildtyp SIV_{mac251} und wurde aus peripheren Blutlymphozyten eines Rhesusaffen isoliert. (6)

Der zweite Virussubtypus SIV_{mac251}/ MPBMC ist als sehr frühe in vivo Passage des Viruswildtyp SIV_{mac251} entstanden und erhielt seine Spezifizierung nach in vitro Kultivierung mit mononukleären Blutzellen von Rhesusaffen (38)

Im weiteren wurde dann das Hirngewebe dieser Tiere nach unterschiedlicher Infektionsdauer untersucht, mittels immunhistochemischer Färbetechniken die verschiedenen Zellen sichtbar gemacht und mit Hilfe der Morphometrie die gewonnenen Präparate ausgewertet.

Zum besseren Verständnis soll nun vorab der zeitliche Verlauf der primären Virämie bei einer SIV-Infektion kurz angesprochen werden. Zur Erläuterung sei darauf hingewiesen, daß der Nachweis von Virus-RNS (Ribonukleinsäure) als aktive, replizierende Infektion zu verstehen ist. Dagegen bedeutet der Nachweis von Virus-DNS (Desoxyribonukleinsäure) eher das Ruhen oder Persistieren der retroviralen Infektion (HIV/SIV).

In einer Arbeit von Nowak und Lloyd (29) konnte am siebten Tag nach intravenöser Infektion mit SIV bei allen Versuchstieren Virus-RNS im Plasma als Zeichen der Virusaktivität nachgewiesen werden, ein Spitzenwert wurde zwischen dem zehnten und dem zwanzigsten Tag erreicht und ein Abfall auf ein stabiles Zwischenplateau nach im Mittel 42 Tagen, also sechs Wochen. Eine andere experimentelle Studie (43), bei der 20 juvenile Makakken intravenös mit dem SI-Virus infiziert worden waren, wies bei allen Versuchstieren mit Hilfe der polymerase chain reaction (PCR) nach 14 Tagen Virus DNS im Hirngewebe nach.

Bedeutung hat dieser zeitliche Verlauf vor allem deshalb, weil auch bei der HIV-Infektion, als Reaktion auf die primäre Virämie, spezifische Antikörper im Blut des Infizierten in der Regel innerhalb von zwei Monaten nach Infektion nachgewiesen werden können. (3)

Die Variationsbreite wird dabei durch die zahlreichen individuellen Faktoren, welche sowohl im Beginn als auch im Fortschritt der Infektion eine bedeutende Rolle spielen,

erklärt. Es finden sich also auch beim zeitlichen Ablauf Gemeinsamkeiten zwischen HIV und SIV, welche die Verwendung des SIV-Makaken Tiermodells rechtfertigen.

Die Reaktion des Immunsystems mit Bildung spezifischer Antikörper, denen zelluläre Mechanismen wie Antigenpräsentation durch Makrophagen, T-Lymphozyten-Stimulation von B-Lymphozyten und die Differenzierung dieser zu Antikörper produzierenden Plasmazellen vorausgehen, findet also in dem obengenannten Zeitraum statt.

Dies ist auch der Zeitrahmen, in dem sich die Untersuchungen dieser Arbeit bewegen, die intracerebrale Zellzahlveränderung von Lymphozyten und Makrophagen bei Versuchstieren von zwei bis zu zwanzig Wochen nach SIV-Infektion, und zwar vor Auftreten einer Enzephalitis oder klinischen Symptomatik.

Im folgenden wird daher vor allem auf die Ergebnisse der Zellzahlveränderung in den drei unterschiedlichen Bereichen (im weiteren auch Kompartimente genannt) — Cortex, subcorticales weißes Mark (auch als „weiße Substanz“ oder „white matter“ bezeichnet) und perivaskulärer Raum — von Lymphozyten und Makrophagen, im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen (Kapitel 3.1) und zu Versuchstieren mit SIV-Enzephalitis (Kapitel 3.2) eingegangen werden.

Ferner wird der Einfluß der Zeit auf die Infektion untersucht (Kapitel 3.3)

Auf eventuelle Zusammenhänge zwischen den Zelldichten von Makrophagen und Lymphozyten wird im Kapitel 3.4 eingegangen.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial bestand aus dem präparierten, histopathologisch und immunhistochemisch aufgearbeiteten Großhirngewebe von 29 Rhesusaffen.

Dabei waren zuvor 24 dieser 29 Versuchstiere — juvenile, präpubertäre Makaken der Gattung *Macaca mulatta* — in einem kontrollierten Versuch mit unterschiedlichen Virussubtypen des SIV (simian immunodeficiency virus, Affen Immunschwäche Virus) infiziert worden.

Die erste Gruppe der Versuchstiere (n=11) wurde mit dem Subtyp SIV_{mac251}/ 32H inokuliert, dabei entwickelte ein Tier eine SIV-assoziierte Enzephalitis.

SIV_{mac251}/ 32H ist ein durch in vivo Passage entstandener Subtyp des Viruswildtyp SIV_{mac251} und wurde aus peripheren Blutlymphozyten eines Rhesusaffen isoliert.(6)

Die zehn Tiere ohne SIV-assoziiertes Enzephalitis werden in Tabelle 2.1 charakterisiert.

Interne Nummer	wpi
1	1
65	1
2	3
42	3
68	3
69	3
3	6
70	6
4	12
46	12

Tabelle 2.1 Aufstellung der zehn SIV positiven Tiere ohne SIV-assoziierte Enzephalitis und der jeweiligen Infektionsdauer (wpi = weeks post inoculation) bei Infektion mit Subtyp SIV_{mac251}/ 32H.

Das noch fehlende Tier mit einer Infektionsdauer von 20 Wochen entwickelte eine SIV-assoziierte Enzephalitis, welche sich klinisch in einer Apathie mit Gewichtsverlust zeigte, was zur Beendigung des Experimentes veranlaßte.

Interne Nummer	wpi	Klinik/pathologische Befunde
7	20	SIV-Enzephalitis, Apathie, Gewichtsverlust

Tabelle 2.2 Infektionsdauer (wpi = weeks post inoculation) des Tieres mit SIV-assoziiertes Enzephalitis bei Infektion mit Subtyp SIV_{mac251}/32H.

Das für diese Arbeit verwendete zweite Kollektiv der Versuchstiere (n=13) — darunter befinden sich drei Tiere mit SIV-assoziiertes Enzephalitis — wurden mit dem Virussubtypus SIV_{mac251}/MPBMC inokuliert.

Zunächst ist dieser Subtyp als sehr frühe in vivo Passage des Viruswildtyp SIV_{mac251} entstanden. Seine Spezifizierung erhielt er nach in vitro Kultivierung mit mononukleären Blutzellen von Rhesusaffen, die Abkürzung MPBMC steht dabei für **M**acaque **p**eripheral **b**lood **m**ononuclear **c**ell als ursprüngliches Kulturmedium. Dieser Virussubtyp weist in vivo eine gesteigerte Replikationsfähigkeit auf. (38)

Interne Nummer	wpi
94	1
97	2
98	3
102	7
113	8
99	12
116	12
101	16
118	16
119	16

Tabelle 2.3 Infektionsdauer (wpi = weeks post inoculation) der zehn SIV positiven Tiere ohne SIV-assoziiertes Enzephalitis oder AIDS bei Infektion mit Virussubtyp SIV_{mac251}/MPBMC.

Von den folgenden drei Versuchstieren entwickelten alle Tiere eine SIV-assoziierte Enzephalitis, das dritte Versuchstier stellt jedoch einen Sonderfall dar.

Interne Nummer	wpi	Pathologische Befunde
111	2	SIV-Enzephalitis
114	12	SIV-Enzephalitis

Table 2.4 *Infektionsdauer (wpi = weeks post inoculation) der beiden Tiere mit SIV-assoziiertes Enzephalitis bei Infektion mit Virussubtyp SIV_{mac251}/MPBMC.*

Das dritte Versuchstier entwickelte ebenfalls eine SIV-assoziierte Enzephalitis, war jedoch ab dem 14. Tag post inoculationem regelmäßig mit 0,35 ml zweiprozentigem Selegilin mittels intramuskulärer Injektion behandelt worden. Selegilin ist ein selektiver, irreversibler Hemmstoff der Monoaminoxidase Typ B, welche im zentralen Nervensystem vorwiegend für den Abbau von Dopamin und anderer Katecholamine, zum Beispiel Noradrenalin, verantwortlich ist. (19)

In einem anderen Tiermodell waren verschiedene Veränderungen durch die Behandlung mit Selegilin, unter anderem die verstärkte Empfänglichkeit für die Retrovirusinfektion und das vermehrte Auftreten von neurodegenerativen Veränderungen, beschrieben worden. (7) Da die anderen Versuchstiere diese Behandlung nicht bekamen, kann dieses Versuchstier nicht im Kollektiv mit den Anderen verglichen werden, es wird daher als Einzelexperiment betrachtet und diskutiert.

Interne Nummer	Virussubtyp	wpi	Pathologische Befunde
117	SIV _{mac251} /MPBMC	12	SIV-Enzephalitis

Table 2.5 *Infektionsdauer (wpi = weeks post inoculation) des Tieres mit SIV-assoziiertes Enzephalitis und Selegilinbehandlung (0,35 ml Selegilin 2% i.m./die) ab dem 14. Tag post inoculationem.*

Alle Versuchstiere wurden, nach den Prinzipien der Labortierhaltung und den vorgegebenen Richtlinien der Deutschen Ethikkommission, im Deutschen Primatenforschungszentrum in Göttingen betreut.

Sämtliche Versuchstiere waren vor Beginn des Experimentes auf Virusfreiheit bezüglich des simian immunodeficiency virus (SIV), des T-cell lymphotropic virus, des foamy virus und anderer type B-Retrovirus untersucht worden, zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte dann die intravenöse Inokulation mit dem jeweiligen Virussubtyp, (100 MID₅₀).

Dem gedanklichen Ansatz des Experiments folgend wurden nach beabsichtigter Infektionsdauer (Infektionswochen, entspricht wpi = **w**eeks **p**ost **i**noculation) bzw. bei nicht länger zu vertretender klinischer Symptomatik die betäubten Tiere durch Exsanguination euthanisiert.

Fünf weitere nicht infizierte Rhesusaffen dienten als Kontrolltiere.

Nach Präparation und Fixierung des Gehirns in zehnprozentiger gepufferter Formalinlösung erfolgte der Zuschnitt des Cortex, die Einbettung in Paraffin, das Schneiden mit dem Mikrotom und das Aufbringen auf silanisierte Objektträger zur weiteren Diagnostik mit Hilfe von immunhistochemischen Verfahren und Morphometrie.

Die in dieser Arbeit verwendeten Präparate entstammen einem jeweils identischen Bereich des parietalen Cortex und des subcorticalen Markes der verschiedenen Versuchstiere.

2.2. Immunhistochemie

Als immunhistochemische Färbemethode wurde die sogenannte „markierte Avidin-Biotin-technik“ (= labelled avidin-biotin technique, in Kurzform als LAB bezeichnet) verwendet, die eine annähernd vier- bis achtfache höhere Empfindlichkeit aufweist als die herkömmliche Avidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC) Technik. (14)

Benötigt werden für diese Färbemethode drei Hauptreagenzien. (zur Verdeutlichung des Verfahrens siehe auch Abbildung 2.1)

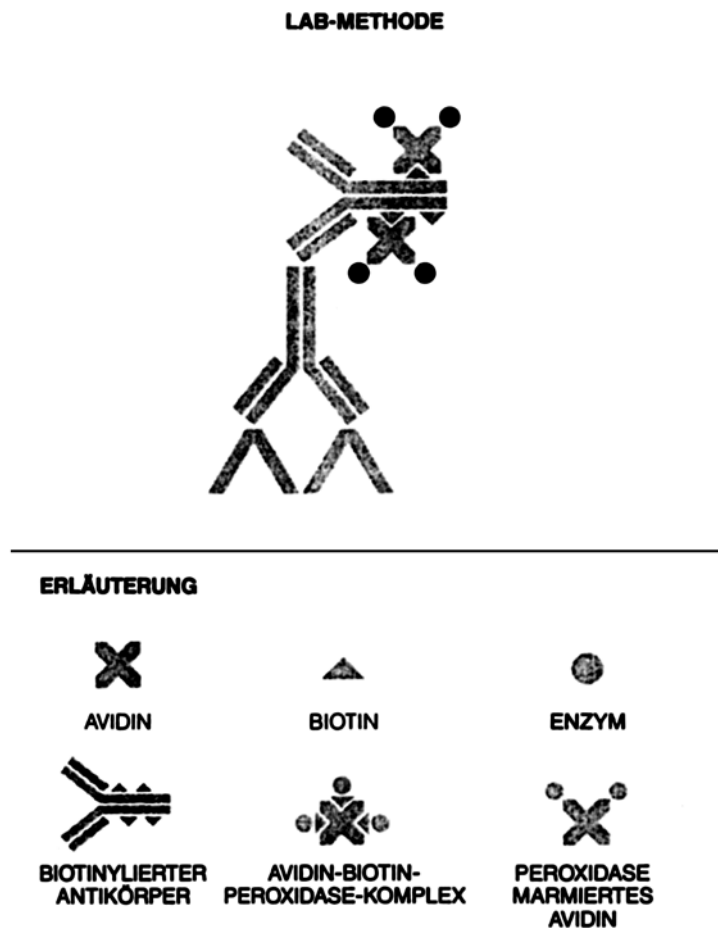


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der labelled avidin-biotin technique der immunhistochemischen Färbung (Quelle:(27))

Der Primärantikörper bindet an das interessierende Antigen, z.B. an Antigene auf der Zelloberfläche.

Der Sekundärantikörper, der mit Biotin konjugiert ist und sich an den ersten Antikörper binden kann, wird durch einen Enzym-Avidin Komplex (in der von uns verwendeten Methode Meerrettichperoxidase-Streptavidin Komplex), der wiederum am Biotin des Brücken- oder Sekundärantikörpers bindet, detektiert. (27)

Das Enzym des Enzym-Avidin Komplexes, der nun über zwei Antikörper an das interessierende Antigen bindet, welches zum Beispiel auf der Oberfläche einer Zelle sitzt, die man markieren oder färblich hervorheben möchte, wird abschließend mit einem geeigneten Farbstoff, einem sogenannten Chromogen, sichtbar gemacht. Dieser Arbeitsschritt wird auch Entwicklung genannt.

In unserem Fall setzten wir 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) als Chromogen und gleichzeitig Elektronendonator für die Peroxidasereaktion ein. Dabei kommt es zur Oxidation dieses Stoffes, wobei sich ein braunes Reaktionsprodukt bildet, so daß schließlich die interessierenden Zellen eine bräunliche Anfärbung des Cytoplasmas aufweisen. (28)

Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin zur Anfärbung der Zellkerne und das abschließende Eindecken mit Eukitt.

Die einzelnen Arbeitsschritte dieser Immunperoxidase Färbetechnik sind in Abbildung 2.2 aufgeführt, Einzelheiten der primären Antikörper zeigt Tabelle 2.6, des sogenannten Link- oder Sekundärantikörpers Tabelle 2.7.

1. Vorbehandlung	<ul style="list-style-type: none"> • Paraffinschnitte auf silanisierten Objektträger • Entparaffinieren 3 mal 8 Minuten im Roticlear • Absteigende Alkoholreihe 100% bis 70% • Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphat buffered saline = PBS), bzw. Citratpuffer
2. Aufschluß (alternativ A o. B)	<p>A. Proteinase K-Behandlung</p> <ul style="list-style-type: none"> • 7 Minuten bei 37°C inkubieren mit Proteinase K • 2 mal 10 Minuten in PBS waschen • 15 Minuten bei Raumtemperatur in Wasserstoffperoxid/Methylalkohol Gemisch • 15 Minuten bei 37°C in Normalserum (Tissue Gnost UniPak Kit, Firma Merck) blocken <p>B. Mikrowellenbehandlung</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3 mal 5 Minuten in Citratpuffer pH 6,0 in Mikrowelle aufschließen • 2 mal 10 Minuten in PBS waschen • 15 Minuten bei 37°C in Normalserum blocken (wie in A. beschrieben)
3. Primär-Antikörper	<ul style="list-style-type: none"> • Inkubation: 1 Stunde bei 37°C oder 24–48 Stunden bei 4°C • Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper nach Fragestellung (vergleiche Tabelle 2.6) in einer feuchten Kammer • 2 mal 5 Minuten in PBS waschen
4. Sekundär-Antikörper	<ul style="list-style-type: none"> • 5 Minuten Inkubation bei 37°C mit biotinyliertem Brücken-Antikörper in feuchter Kammer (Super Sensitive MultiLink[®] Immunodetection System, Firma BioGenex; weitere Details in Tabelle 2.7) • 2 mal 5 Minuten in PBS waschen
5. Labeling (Enzym/Streptavidin Komplex)	<ul style="list-style-type: none"> • 5 Minuten Inkubation bei 37°C mit Meerrettichperoxidase konjugiertem Streptavidin in feuchter Kammer (Super Sensitive Label in PBS mit Proteincarrier, 0,01% Thimerosal; Firma BioGenex, Kananda) • 2 mal 5 Minuten in PBS waschen
6. Entwicklung in Tris-Puffer/DAB Gemisch	<ul style="list-style-type: none"> • 200 ml Tris-HCl-Puffer, 0,05 M, pH 7,6 • 40 mg DAB (in 1,5 ml aliquotiert, bei –20°C) filtrieren, eventuell auf Eis 10 Minuten inkubieren • 34 µl 30% Wasserstoffperoxidlösung • Sukzessive Entwicklung der Schnitte, dazwischen Unterbrechen in PBS, mikroskopische Kontrollen • Abschließend unter fließendem Wasser mind. 10 Minuten wässern

7. Gegenfärbung in Hämatoxylin	<ul style="list-style-type: none"> • Aqua dest. • 30 sec. bis zu 3 Minuten in Hämatoxylin färben (je nach gewünschter Intensität) • Aqua dest. • 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser bläuen, nach 3 Minuten Farbtiefe mikroskopisch kontrollieren, ggf. Hämatoxylinfärbung wiederholen • Aufsteigende Alkoholreihe 70% bis 100% • Eindecken in Eukitt
--------------------------------	--

Abbildung 2.2

Klassifikation	Konzentration	Spezifität	Bezugsquelle	Klon
Anti-Leukozyten Antigen L1 oder Calprotectin	1:1000 (Aufschluß mit Mikrowellenbehandlung)	Reaktive Gewebs-Makrophagen, Monozyten, Neutrophile Granulozyten	DAKO A/S Dänemark	MAC 387 (monoklonaler Mausantikörper)
Anti-Lysozym	1:800 (Aufschluß mit Proteinnase K-Behandlung)	Makrophagen, Monozyten, Granulozyten	DAKO A/S Dänemark	EC 3.2.1.17 (polyklonaler Kaninchenantikörper)
Anti-Leucocyte common antigen	1:100 (Aufschluß mit Mikrowellen- oder Proteinnase K-Behandlung)	Lymphozytäre Zellen	DAKO A/S Dänemark	PD7/26; 2B11 (zwei monoklonale Mausantikörper)

Tabelle 2.6 zeigt die gegen zelluläre Bestandteile gerichteten Primärantikörper.

Klassifikation	Spezifität	Bezugsquelle
Biotinylierter Brücken Antikörper (MultiLink [®] secondary antibodies)	Sekundärantikörper reagiert gegen Antikörper von Maus, Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte	BioGenex Kanada (Super Sensitive MultiLink [®] Immunodetection System)

Tabelle 2.7 enthält Informationen zum Link- oder Sekundärantikörper.

2.3. Morphometrie

Die fertigen Präparate wurden unter einem Binokular-Mikroskop (Zeiss Standard 20, Firma Zeiss, Deutschland) mit hundertfacher Vergrößerung ausgewertet.

Die eigentliche Messung erfolgte mit einem Spezialokular, das ein quadratisches Gitter enthält, welches wiederum in 25 kleinere Quadrate unterteilt ist (in der englischen Sprache als ‚Grid‘ bezeichnet; das verwendete Modell hat die genaue Bezeichnung 46 40 23 9901/CPL W 10x/18 und stammt von der Firma Zeiss, Deutschland).

Zur Morphometrie wurde das Gitter systematisch meanderförmig über den gesamten Gewebeschnitt bewegt, dabei die Zellzahl in den verschiedenen Gewebekompartimenten (Cortex, weiße Substanz, perivaskuläre Zellen) sowie die Anzahl der ausgewerteten Flächen festgehalten.

Um ein Mehrfachmessen von Zellen zu vermeiden, wurden Zellen die sich auf Linien des Gitters befanden nur dann als Ereignis gewertet, wenn diese sich auf der rechten Linie oder der unteren Linie eines Gitterquadrates befanden.

Ferner wurden nur Zellen als positiv gewertet, die eine eindeutige Braunfärbung des Zytoplasmas aufwiesen und bei denen ein blauvioletter (Hämatoxylinfärbung) Kern zu identifizieren war. Zellen, die lediglich ein angefärbtes Zytoplasma aufwiesen ohne daß der Kern sich darstellte, wurden nicht gewertet.

Bei den perivaskulären Zellen musste das Endothel im Präparat sichtbar sein.

Die Wertung eines Flächenanteils erfolgte nur dann, wenn mindestens 2/3 eines Zählquadrates optisch mit Gewebe ausgefüllt war.

Die Fläche des Gesamtgitters oder Grid wurde mit Hilfe des im Mikroskop integrierten Nonius bestimmt, sie beträgt $0,2025 \text{ mm}^2$.

Nach Abschluß der jeweiligen Messung wurde die Gesamtzahl der Zellen des jeweiligen Kompartimentes durch die Gesamtfläche des ausgewerteten Präparates geteilt, dadurch ergab sich eine bestimmte Zellzahl pro Fläche in mm^2 , im weiteren auch als Zelldichte bezeichnet. Damit wurde der unterschiedlichen Größe der Präparate Rechnung getragen und vergleichbare Werte hergestellt.

Bei den perivaskulären Zellen wurde die Zelldichte so berechnet, daß die gewerteten Zellen durch die addierte Gesamtfläche des jeweiligen Präparates — also der Summe aus dem Kompartiment Cortex und dem Kompartiment Weiße Substanz — dividiert wurden.

Dies war nötig, da die Gefäße sowohl den Cortex als auch die weiße Substanz durchziehen.

2.4. Statistische Methoden

Diese Auswertung im Rahmen einer Studie dient zur Beschreibung von Zelldichten in verschiedenen Kompartimenten, zu verschiedenen Zeiten und in unterschiedlichen Gruppen. Für diese Variablen kann man keine Gauß'sche Normalverteilung annehmen. Daher werden Rangtests verwendet und in den Graphiken werden Mediane dargestellt. Zu den Medianen werden die 68%-Vertrauensbereiche des Medians eingezeichnet, in Analogie zum 1-s-Bereich.

In den Tabellen wurde — wegen der eventuellen Vergleichbarkeit mit Angaben in der Literatur — der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung zur Darstellung der Untersuchungskollektive benutzt.

Folgende Tests kommen zur Anwendung:

- Der exakte U-Test nach Mann und Whitney (auch Wilcoxon's Rangsummentest) vergleicht Meßwerte zwischen zwei Gruppen. In der vorliegenden Arbeit werden Zelldichten zwischen infizierten Tiere und Kontrollen und zwischen verschiedenen Gruppen von infizierten Tieren innerhalb je eines Kompartimentes verglichen. Falls die Zahl der getesteten Tiere zu klein ist (unter 20), wird anstelle des approximativen der exakte U-Test gerechnet.
- Der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben vergleicht zwei Messungen beim gleichen Individuum, in der vorliegenden Arbeit wird er zur Prüfung der Unterschiede zwischen je zwei Kompartimenten verwendet. Falls die beiden Messungen viele gleiche Werte aufweisen (Rangbindungen), ist der Wilcoxon-Test nicht mehr zulässig. Dann wird anstelle des Wilcoxon-Tests der Vorzeichentest berechnet.

- Die Rangkorrelation nach Spearman, um die Abhängigkeit zweier Meßwerte voneinander zu beschreiben. Die Spearmansche Korrelation setzt voraus, daß keine oder fast keine Rangbindungen bestehen, d.h. daß die Meßwerte kontinuierlich sind und keine Werte mehrfach vorkommen. In der vorliegenden Arbeit beschreibt sie die Zelldichte der infizierten Tiere in Abhängigkeit von der Zeit.
- Die Rangkorrelation nach Kendall, um die Abhängigkeit zweier Meßwerte voneinander zu beschreiben, wenn die Spearmansche Rangkorrelation, was bei den meisten Rechnungen der Fall ist, wegen Rangbindungen nicht anwendbar ist.
- Die einfaktorielle Rangvarianzanalyse mit Meßwiederholungen nach Friedman. Sie wird hier verwendet, um die Unterschiede zwischen allen drei Kompartimenten simultan zu beschreiben. Die einfaktorielle Rangvarianzanalyse dient beim Vergleich der Zelldichten in den Kompartimenten als übergeordneter Test, Wilcoxon-Tests werden à posteriori zu Einzelvergleichen herangezogen.

Zur vergleichbaren Quantifizierung der Testergebnisse werden p-Werte angegeben. p-Werte unter 0.05 werden als „signifikant“ bezeichnet und als wesentlich interpretiert. Zur Markierung der p-Werte werden die vertrauten Stern-Symbole hinzugesetzt:

$$p < 0.05^*, p < 0.01^{**}, p < 0.001^{***}.$$

Bei p-Werten zwischen 0,05 und 0,1 wird in dieser Arbeit von Tendenzen ausgegangen.

3. Ergebnisse

3.0 Darstellung des Tierkollektivs

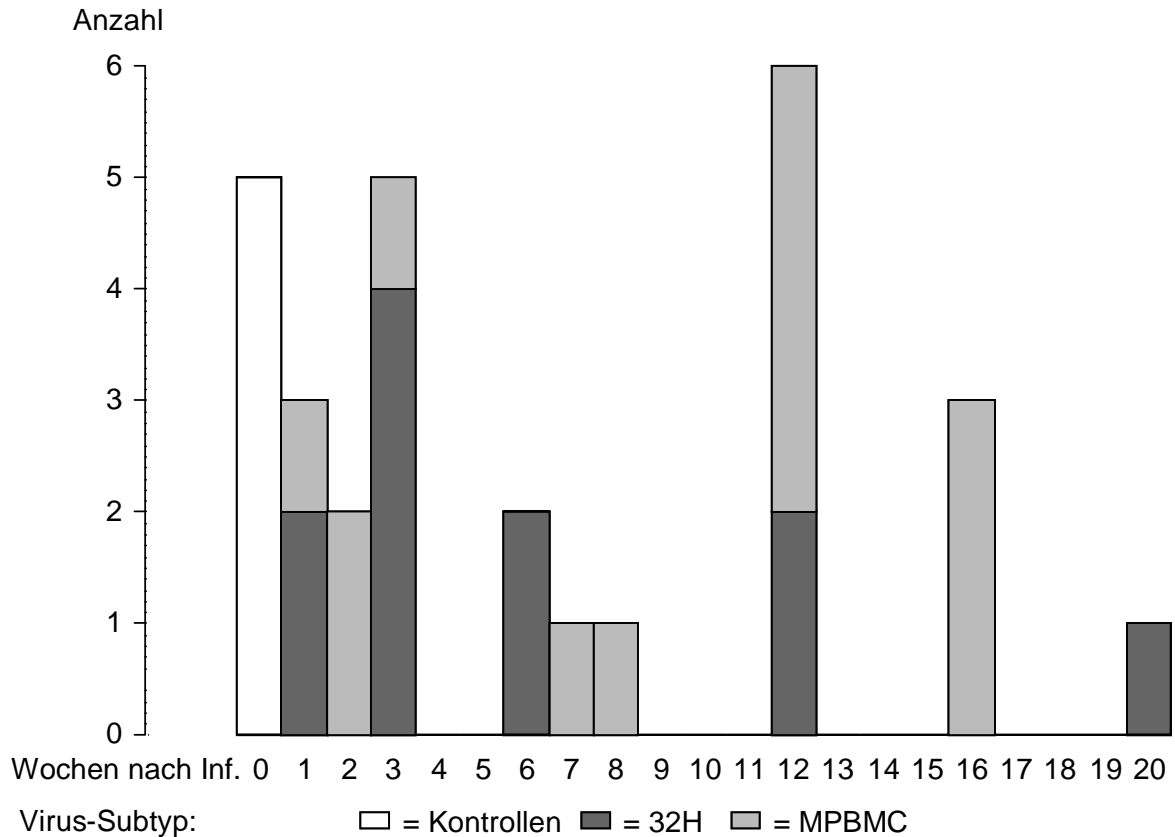


Abbildung 3.0 Anzahl ($n=24$) der Tiere die in der 1. bis 20. Woche untersucht wurden, aufgeteilt nach dem Virus-Subtyp (32H = $SIV_{mac251}/32H$; MPBMC = $SIV_{mac251}/MPBMC$) mit dem sie infiziert worden waren und der Zeitdauer der Infektion. Zum Zeitpunkt 0 sind die 5 Kontrollen eingezeichnet.

Im ersten Teil dieser Arbeit (Kapitel 3.1), in welchem die klinisch asymptomatische Frühphase der SIV-Infektion bis 20 Wochen nach Infektion untersucht wurde, besteht das zu testende Kollektiv aus 20 infizierten Tieren, dabei wurden jeweils zehn Tiere mit dem Virus-Subtyp $SIV_{mac251}/32H$ bzw. mit dem Subtyp $SIV_{mac251}/MPBMC$ infiziert. Keines dieser Tiere hatte eine Enzephalitis oder AIDS.

Diesen infizierten Tieren werden die Zelldichten der Lymphozyten und Makrophagen der fünf Kontrolltiere gegenübergestellt.

Vier zusätzliche Tiere — eines mit dem Subtyp $SIV_{mac251}/32H$ und drei mit dem Subtyp $SIV_{mac251}/MPBMC$ in der Gruppe mit 20 Wochen Infektionsdauer — hatten eine SIV-assoziierte Enzephalitis, darunter befindet sich ein mit Selegelin behandeltes Tier (Subtyp $SIV_{mac251}/MPBMC$).

Diese vier erkrankten Tiere werden im Kapitel 3.2. im Vergleich zu den nicht erkrankten Frühphase - Tieren (bis 20 Wochen nach Infektion) dargestellt.

3.1 Vergleich der infizierten Tiere mit den Kontrolltieren

Für die Zeitangabe der Wochen nach Infektion als auch für die Zelldichten der Lymphozyten und der Makrophagen kann *keine* Gaußverteilung angenommen werden. Daher werden in den Graphiken Mediane dargestellt und zur Beschreibung der Ergebnisse Rangtests verwendet.

3.1.1 Lymphozytendichte bei Virus-Subtyp $SIV_{mac251}/32H$

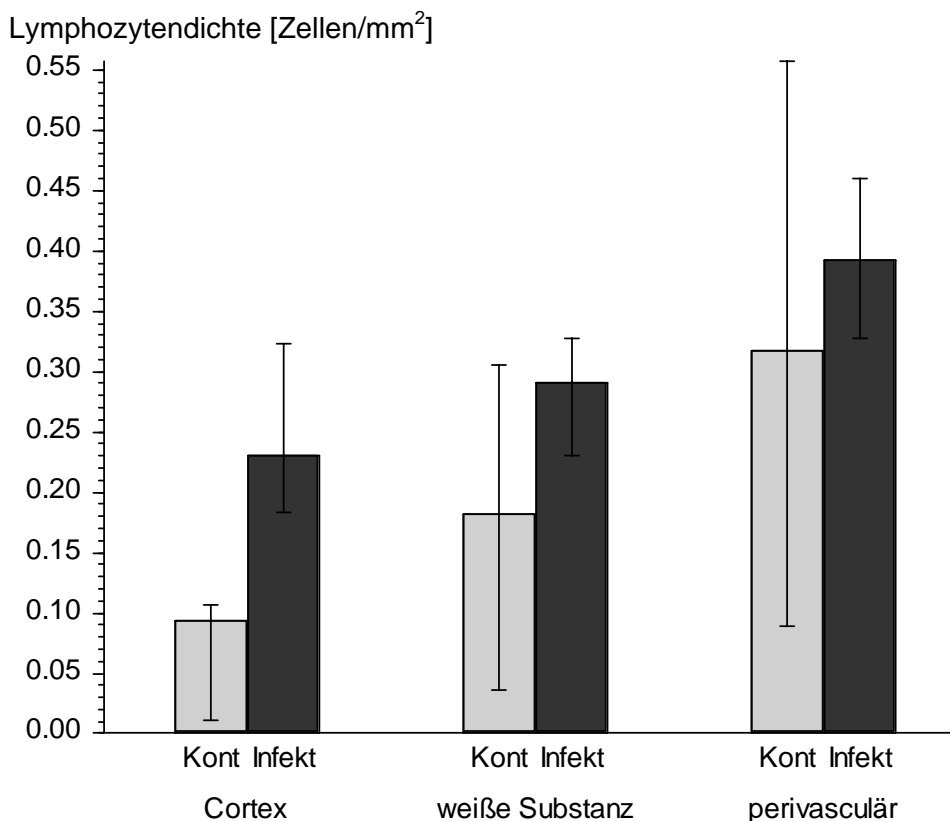


Abbildung 3.1 Lymphozytendichte. Median und 68%-Vertrauensbereich des Medians der Lymphozytendichte 0–20 Wochen nach Infektion mit dem Virus-Subtyp $SIV_{mac251}/32H$ in den verschiedenen Kompartimenten (Cortex, weiße Substanz und perivaskulär), getrennt für Kontrolltiere (Kont, grau) und infizierte Tiere (Infekt, schwarz).

Tab. 3.1 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Lymphozytendichten. Diese unterscheiden sich von denen der Abb. 3.1, welche die Mediane und deren Konfidenzintervalle darstellt, damit man ggf. mit anderen Arbeiten vergleichen kann.

Kompartiment	Lymphozytendichte SIV_{mac251}/ 32H				p
	Infizierte (n = 10)		Kontrollen (n = 5)		
	MW	ST	MW	ST	
Cortex	0,248	0,154	0,077	0,068	0,028*
Weißer Substanz	0,390	0,362	0,172	0,150	0,085
perivascular	0,487	0,329	0,367	0,362	0,31

Tabelle 3.1 Mittelwert mit Standardabweichung der Lymphozytendichte 0–20 Wochen nach Infektion mit SIV_{mac251}/32H in den verschiedenen Kompartimenten, getrennt für infizierte Tiere und Kontrolltiere. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. p aus dem exakten U-Test nach Mann und Whitney.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den mit SIV infizierten Tieren konnte mit $p=0,028$ im exakten U-Test nach Mann und Whitney für den Cortex gefunden werden. Die Lymphozytendichte bei den SIV infizierten Tieren ist hier signifikant erhöht.

Für die Zellen der weißen Substanz ergab sich eine Tendenz, aber keine signifikante Zunahme der Lymphozytendichte (siehe Tab. 3.1).

Der Unterschied der Zelldichte zwischen den drei Kompartimenten der infizierten Tiere ist nicht signifikant ($p = 0,080$ im Friedman-Test). Bei den infizierten Tieren zeigt sich kein Unterschied zwischen Cortex und perivascularer Gewebe ($p = 0,11$ im Wilcoxon-Test) oder zwischen Cortex und weißer Substanz ($p = 0,34$ im Wilcoxon-Test). Zwischen weißer Substanz und perivascularer Gewebe findet sich ebenfalls kein Unterschied ($p = 0,34$ im Wilcoxon-Test).

Für die Kontrollen ist ein paarweiser Vergleich der Kompartimente bezüglich der Lymphozytendichte wegen der geringen Fallzahl und der fehlenden Gaußverteilung nicht möglich.

3.1.2 Makrophagendichte bei Virus-Subtyp $SIV_{mac251}/32H$

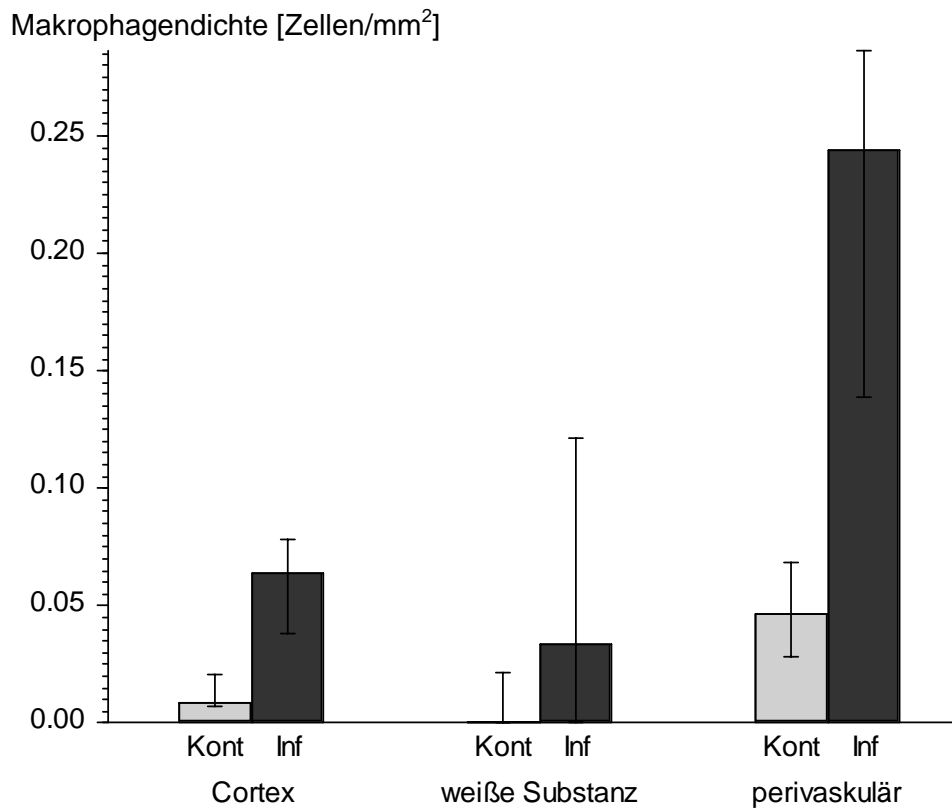


Abbildung 3.2 Makrophagendichte. Median und 68%-Vertrauensbereich des Medians der Makrophagendichte 0–20 Wochen nach Infektion mit Virus-Subtyp $SIV_{mac251}/32H$ in den verschiedenen Kompartimenten, getrennt für Kontrolltiere (Kont, grau) und infizierte Tiere (Inf, schwarz).

Tab. 3.2 zeigt Mittelwert und Standardabweichung der Zelldichte, Abb. 3.2 dagegen die Mediane mit ihrem Vertrauensbereich, die wegen der fehlenden Gaußverteilung den Sachverhalt besser wiedergeben.

Kompartiment	Makrophagendichte SIV_{mac251}/ 32H				p
	Infizierte		Kontrollen		
	(n=10)		(n = 5)		
	MW	ST	MW	ST	
Cortex	0,102	0,103	0,013	0,012	0,0040**
weiße Substanz	0,071	0,081	0,013	0,020	0,14
Perivascular	0,222	0,121	0,063	0,054	0,0040**

Table 3.2 Mittelwert mit Standardabweichung der Makrophagendichte 0–20 Wochen nach Infektion mit SIV_{mac251}/32H in den verschiedenen Kompartimenten, getrennt für Infizierte Tiere und Kontrolltiere. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. p aus dem exakten U-Test nach Mann und Whitney.

Für die Makrophagendichte im Cortex und im perivascularen Raum von Infizierten im Vergleich zu den Kontrollen findet sich ein hochsignifikanter Unterschied (s. Tab. 3.2), die Zelldichte ist bei den SIV-infizierten Tieren in diesen Kompartimenten deutlich erhöht.

Der Unterschied der Zelldichten in den verschiedenen Kompartimenten bei den infizierten Tieren ist hochsignifikant ($p = 0,00018^{***}$ im Friedman-Test).

Der Unterschied zwischen Cortex und weißer Substanz ist nicht signifikant ($p = 0,083$ im Wilcoxon-Test), dagegen sind die Unterschiede sowohl zwischen Cortex und perivascularer Gewebe ($p = 0,0059^{**}$ im Wilcoxon-Test) als auch zwischen weißer Substanz und perivascularer Gewebe ($p = 0,0059^*$ im Wilcoxon-Test) signifikant. Das perivascularer Gewebe weist jeweils deutlich höhere Zelldichten auf.

3.1.3 Lymphozytendichte bei Virus-Subtyp SIV_{mac251} / MPBMC

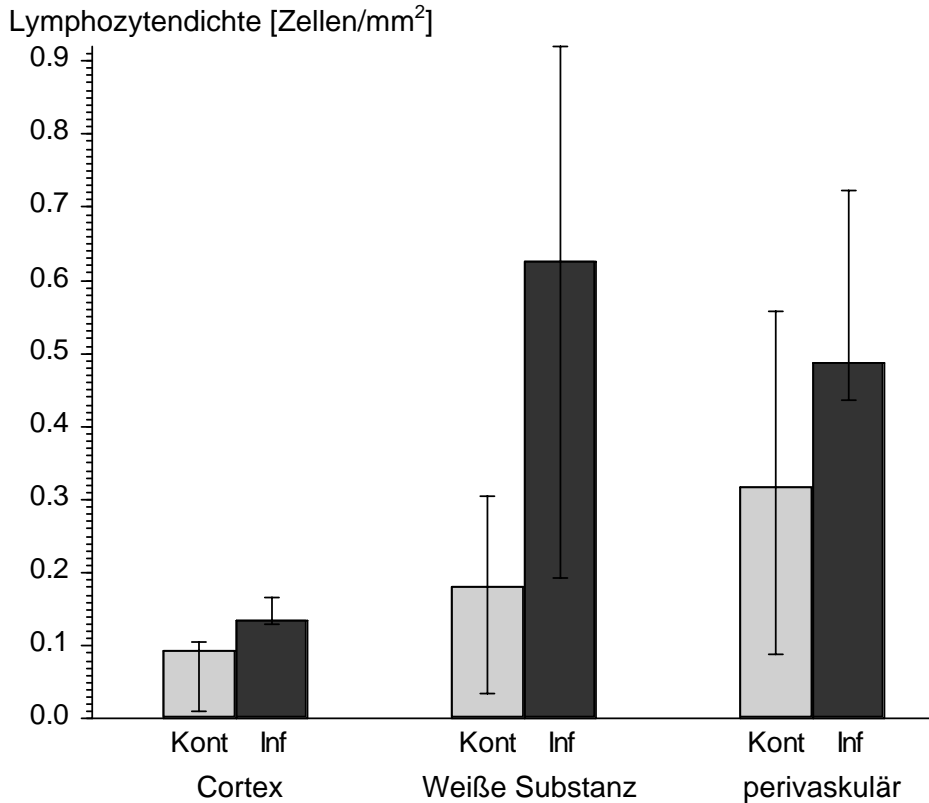


Abbildung 3.3 Lymphozytendichte. Median und 68%-Vertrauensbereich des Medians der Lymphozytendichte 0–20 Wochen nach Infektion mit dem Virus-Subtyp SIV_{mac251} / MPBMC in den verschiedenen Kompartimenten, getrennt für Kontrolltiere (Kont, grau) und infizierte Tiere (Inf, schwarz).

Kompartiment	Lymphozytendichte SIV_{mac251} / MPBMC				p
	Infizierte (n = 10)		Kontrollen (n = 5)		
	MW	ST	MW	ST	
Cortex	0,164	0,091	0,077	0,068	0,050*
weiße Substanz	0,836	0,838	0,172	0,150	0,050*
Perivaskulär	0,802	0,601	0,367	0,362	0,085

Tabelle 3.3 Mittelwert mit Standardabweichung der Lymphozytendichte 0–20 Wochen nach Infektion mit SIV_{mac251} / MPBMC in den verschiedenen Kompartimenten, getrennt für infizierte Tiere und Kontrolltiere. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. p aus dem exakten U-Test nach Mann und Whitney.

Die Zelldichte der infizierten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren ist im Cortex und in der weißen Substanz signifikant erhöht, für die Lymphozytendichte perivascular zeigt sich nur eine tendentielle Zunahme der Zelldichte.

Der Friedman-Test ergibt einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Kompartimenten ($p = 0,00041^{***}$). Zwischen weißer Substanz und perivascularärem Gewebe findet sich keinerlei Unterschied ($p = 1,00$ im Wilcoxon-Test) während sich die Lymphozytendichte zwischen perivascularärem Gewebe und Cortex ($p = 0,0059^{**}$ im Wilcoxon-Test) und auch zwischen Cortex und weißer Substanz (ebenfalls $p = 0,0059^{**}$ im Wilcoxon-Test) signifikant unterscheidet. Die Lymphozytendichte im Cortex ist somit im Vergleich am geringsten.

Zusätzlich zeigt sich, daß bei allen 10 infizierten Tieren die Zelldichte im Cortex immer unter der in der Weißen Substanz und unter der im perivascularären Gewebe liegt.

3.1.4 Makrophagendichte bei Virus-Subtyp SIV_{mac251} / MPBMC

Makrophagendichte [Zellen/mm²]

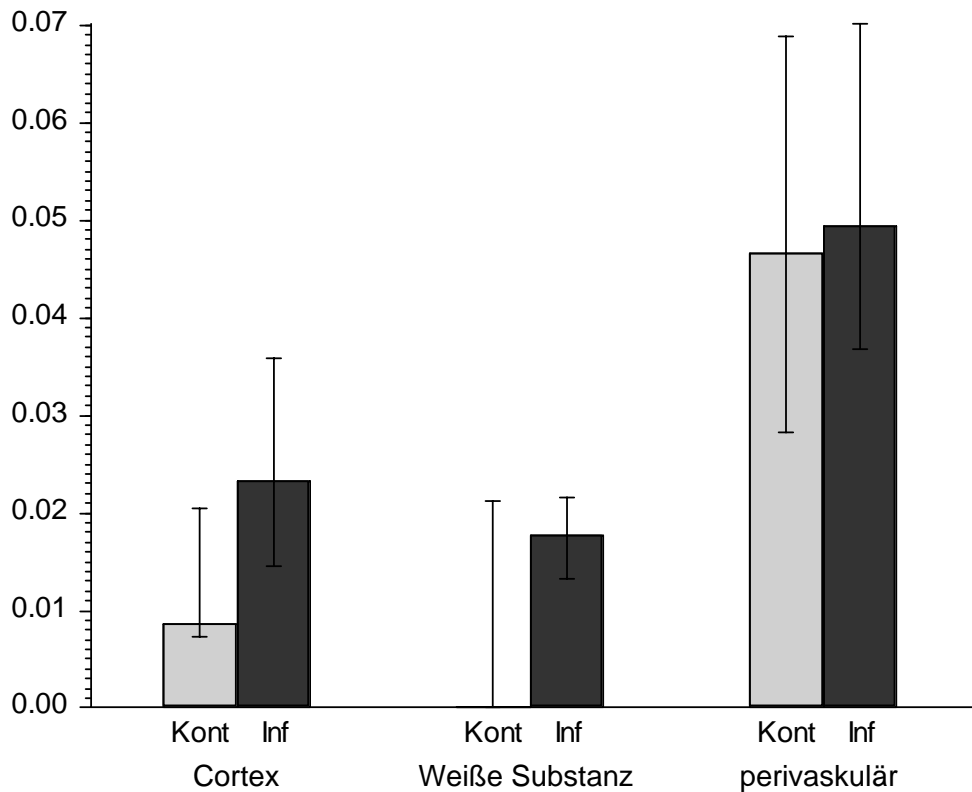


Abbildung 3.4 Makrophagendichte. Median und 68%-Vertrauensbereich des Medians der Makrophagendichte 0–20 Wochen nach Infektion mit Virus-Subtyp SIV_{mac251} / MPBMC in den verschiedenen Kompartimenten, getrennt für Kontrolltiere (Kont, grau) und infizierte Tiere (Inf, schwarz).

Kompartiment	Makrophagendichte bei SIV_{mac251} / MPBMC				p
	Infizierte (n=10)		Kontrollen (n=5)		
	MW	ST	MW	ST	
Cortex	0,046	0,060	0,013	0,012	0,085
weiße Substanz	0,043	0,082	0,013	0,020	0,21
Perivascular	0,135	0,242	0,063	0,054	0,62

Tabelle 3.4 Mittelwert mit Standardabweichung der Makrophagendichte 0–20 Wochen nach Infektion mit SIV_{mac251} / MPBMC in den verschiedenen Kompartimenten, getrennt für Infizierte Tiere und Kontrolltiere. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. p aus dem exakten U-Test nach Mann und Whitney.

In keinem Kompartiment finden sich signifikante Unterschiede in der Makrophagendichte zwischen infizierten Tieren und Kontrollen, allerdings kann man eine tendentielle Zunahme der Zelldichte im Bereich des Cortex annehmen.

Der Friedman-Test ergibt einen signifikanten Unterschied zwischen den Kompartimenten ($p = 0,0049^{**}$). Zwischen Cortex und weißer Substanz findet sich kein Unterschied ($p = 0,41$ im Wilcoxon-Test), während die perivaskuläre Makrophagendichte signifikant über der im Cortex ($p = 0,027^*$ im Vorzeichentest) und über der in der weißen Substanz ($p = 0,014^*$ im Wilcoxon-Test) liegt.

3.2 Vergleich zwischen den Tieren mit und ohne SIV-Enzephalitis

In der Gruppe der mit dem Subtyp SIV_{mac251}/32H infizierten Tiere trat bis zur 20. Woche nach Infektion bei nur einem Tier eine SIV-assoziierte Enzephalitis auf, die übrigen 10 Tiere hatten eine Infektion mit SIV ohne klinischen Befund.

In der Abb. 3.5 ist die Lymphozytendichte der Kontrolltiere, der SIV-Tiere und des Tieres mit SIV-assoziiierter Enzephalitis dargestellt.

Statistische Untersuchungen des Einzeltieres wurden selbstverständlich nicht durchgeführt.

3.2.1 Lymphozytendichte bei Virus-Subtyp $SIV_{mac251}/32H$ und SIV-assoziiertes Enzephalitis

Lymphozytendichte [Zellen/mm²]

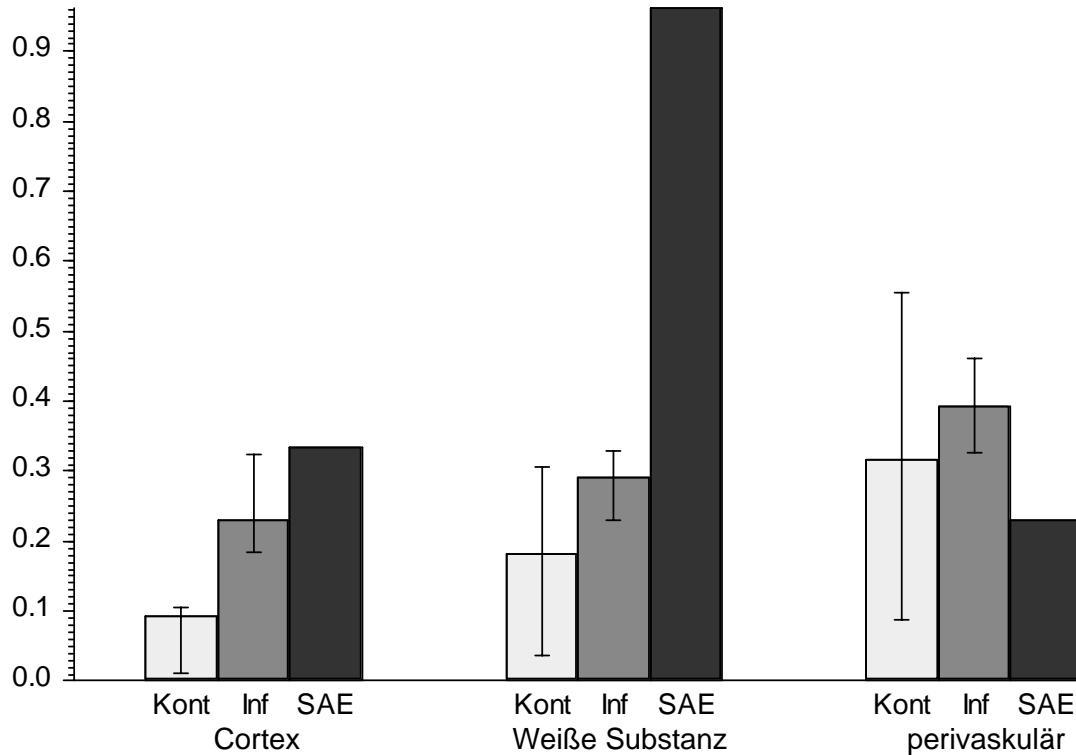


Abbildung 3.5 Lymphozytendichte. Median und 68%-Vertrauensbereich des Medians der Lymphozytendichte 0–20 Wochen nach Infektion mit dem Virus-Subtyp $SIV_{mac251}/32H$ in den verschiedenen Kompartimenten, getrennt für Kontrolltiere (Kont, grau), infizierte Tiere ohne Erkrankung (Inf, dunkelgrau) und ein Tier mit SIV-assoziiertes Enzephalitis (SAE, schwarz).

In der Graphik (Abbildung 3.5) zeigt sich eine deutlich höhere Zelldichte der Lymphozyten bei dem einzigen Tier mit SIV-assoziiertes Enzephalitis im Vergleich zu den SIV-infizierten Tieren ohne Erkrankung und den Kontrollen im Bereich der weißen Substanz. Für die Lymphozytendichte im Cortex beim Versuchstier mit SIV-assoziiertes Enzephalitis kann man einen tendentiellen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen und den infizierten Tieren erkennen.

3.2.2 Makrophagendichte bei Virus-Subtyp $SIV_{mac251}/32H$ und SIV-assoziiierter Enzephalitis

Makrophagendichte [Zellen/mm²]

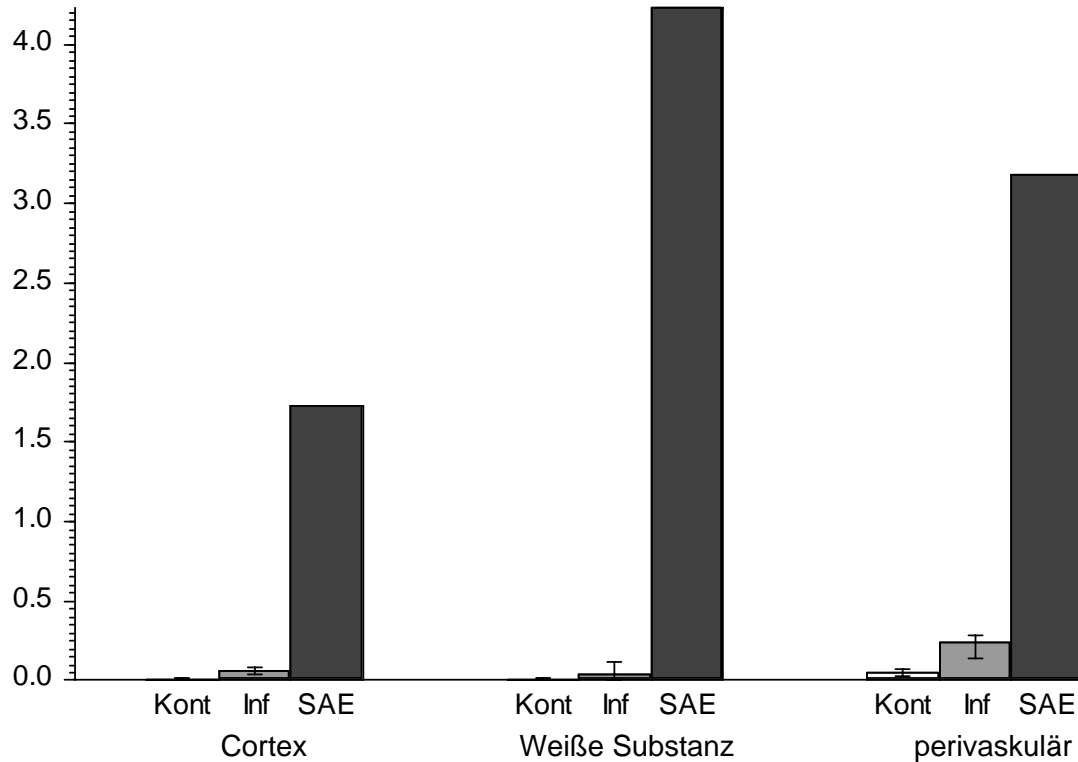


Abbildung 3.6 Makrophagendichte. Median und 68%-Vertrauensbereich des Medians der Makrophagendichte 0–20 Wochen nach Infektion mit Virus-Subtyp $SIV_{mac251}/32H$ in den verschiedenen Kompartimenten, getrennt für Kontrolltiere (Kont, grau), infizierte Tiere ohne Erkrankung (Inf, dunkelgrau) und ein Tier mit SIV-assoziiierter Enzephalitis (SAE, schwarz).

Man erkennt an der Graphik (Abbildung 3.6) eine deutlich höhere Zelldichte der Makrophagen bei dem Versuchstier mit SIV-Enzephalitis im Vergleich zu den SIV-infizierten Tieren und den Kontrollen in allen drei Kompartimenten.

3.2.3 Lymphozytendichte bei SIV_{mac251} /MPBMC und SIV-assoziiierter Enzephalitis

In der Gruppe der mit SIV_{mac251} /MPBMC infizierten Tiere trat vor der 20. Woche nach Infektion drei mal eine SIV-assoziierte Enzephalitis auf. Wie bereits im Kapitel Materialien und Methoden erläutert, wurde eines der Tiere mit einer SIV-assoziierten Enzephalitis mit Selegilin behandelt. Dieses Tier wird in der folgenden Abbildung als Einzelfall dargestellt und kann daher mit den beiden anderen Tieren des gleichen Virussubtyps und SIV-Enzephalitis verglichen werden.

Signifikante Unterschiede finden sich wegen der geringen Fallzahl erwartungsgemäß nicht.

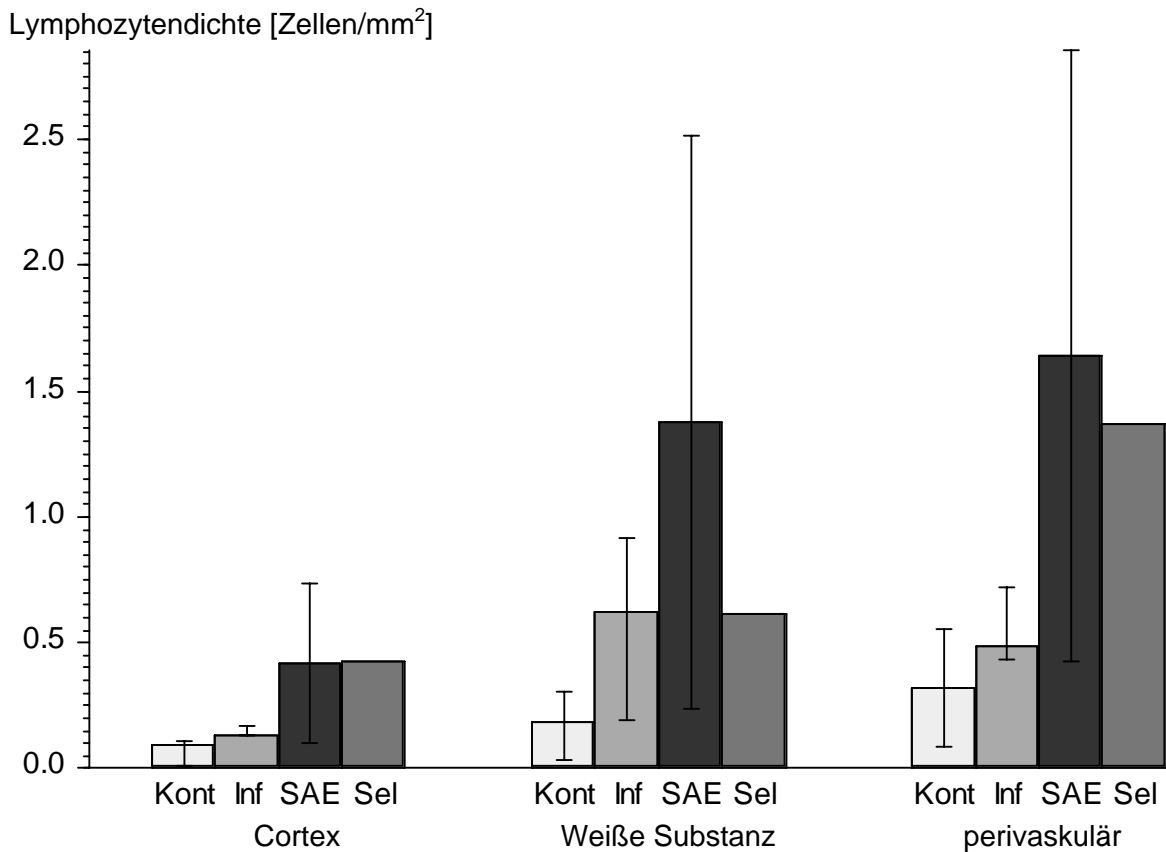


Abbildung 3.7 Lymphozytendichte. Median und 68%-Vertrauensbereich des Medians der Lymphozytendichte 0–20 Wochen nach Infektion mit dem Virus-Subtyp SIV_{mac251} /MPBMC in den verschiedenen Kompartimenten, getrennt für Kontrolltiere (Kont, grau), infizierte Tiere ohne Erkrankung (Inf, dunkelgrau), zwei Tiere mit SIV-assoziiierter Enzephalitis (SAE, schwarz) und ein Tier mit SIV-assoziiierter Enzephalitis und Selegilinbehandlung (0,35 ml Selegilin 2% i.m./die) ab dem 14. Tag post inoculationem (Sel, schwarzgrau).

Für die zwei Tiere mit SIV-assoziiertes Enzephalitis zeigen sich in allen drei Kompartimenten deutlich höhere Lymphozyten-Zelldichten als bei den Kontrolltieren und den infizierten Tieren.

Für das mit Selegilin behandelte Versuchstier kann man eine höhere Zelldichte nur für den Cortex und den perivaskulären Raum erkennen.

3.2.4 Makrophagendichte bei SIV_{mac251}/MPBMC und SIV-assoziiertes Enzephalitis

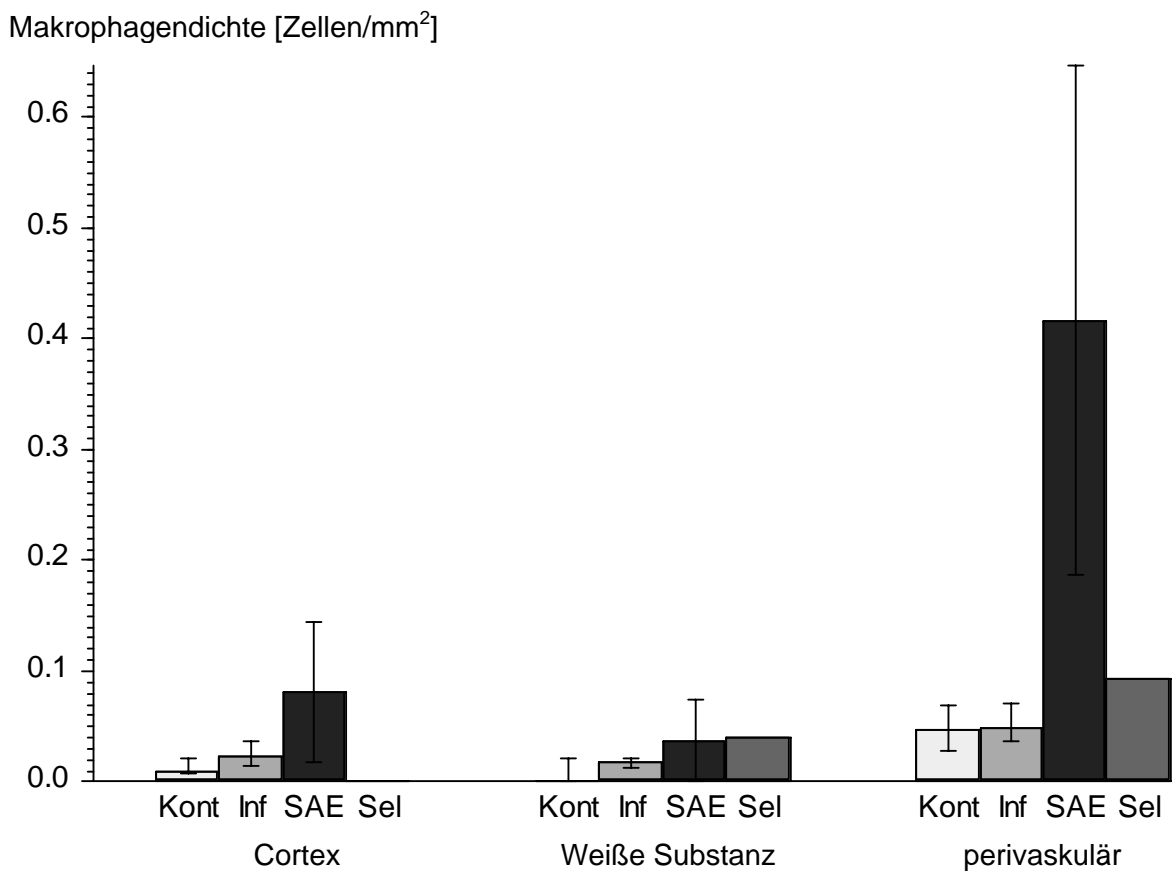


Abbildung 3.8 Makrophagendichte. Median und 68%-Vertrauensbereich des Medians der Makrophagendichte 0–20 Wochen nach Infektion mit Virus-Subtyp SIV_{mac251}/MPBMC in den verschiedenen Kompartimenten, getrennt für Kontrolltiere (Kont, grau), infizierte Tiere ohne Erkrankung (Inf, dunkelgrau), zwei Tiere mit SIV-assoziiertes Enzephalitis (SAE, schwarz) und ein Tier mit SIV-assoziiertes Enzephalitis und Selegilinbehandlung (0,35 ml Selegilin 2% i.m./die) ab dem 14. Tag post inoculationem (Sel, schwarzgrau).

Auch für die Makrophagendichte findet sich, wenn man die Kompartimente einzeln testet, kein Unterschied zwischen den an SIV-assoziiertes Enzephalitis erkrankten und den klinisch asymptomatischen SIV-Tieren.

Man sieht aber eine deutliche Zunahme der Makrophagendichte vor allem im perivaskulären Raum, tendenziell auch im Cortex bei den beiden Versuchstieren mit SIV-assoziiertes Enzephalitis.

3.3 Einfluß der Zeit seit Infektion

	Korrelation mit der Zeit	
	tau	p
Subtyp SIV_{mac251} / 32H (n=10)		
Lymphozytendichte Cortex	-0,4969	0,046 *
Lymphozytendichte weiße Substanz	0,1988	0,42
Lymphozytendichte perivascular	0,0497	0,84
Makrophagendichte Cortex	-0,1988	0,42
Makrophagendichte weiße Substanz	-0,3469	0,16
Makrophagendichte perivascular	-0,1491	0,55
Subtyp SIV_{mac251} / MPBMC (n = 10)		
Lymphozytendichte Cortex	0,2561	0,30
Lymphozytendichte weiße Substanz	0,3958	0,11
Lymphozytendichte perivascular	0,2561	0,30
Makrophagendichte Cortex	-0,6751	0,0066**
Makrophagendichte weiße Substanz	-0,1205	0,63
Makrophagendichte perivascular	-0,5355	0,031 *

Tabelle 3.5 Zeit nach Infektion und Zelldichte. Kendallsche Rangkorrelation der Wochen nach Infektion mit Lymphozytendichte und Makrophagendichte in den drei Kompartimenten, getrennt nach Virus-Subtyp. tau = Rangkorrelations-Koeffizient nach Kendall, p aus der Kendallschen Rangkorrelation.

Für infizierte Tiere mit dem Subtyp SIV_{mac251} / 32H nahm die Lymphozytendichte im Cortex in den ersten Wochen nach Infektion im Vergleich zu den Kontrollen zunächst zu (vergleiche Tabelle 3.1.). Im weiteren Verlauf der Infektion ging diese frühe, asymptomatische „Enzephalitis“ wieder zurück, so daß sich für den gesamten Zeitverlauf (siehe Tabelle 3.5.) eine negative Korrelation ergibt.

Weitere Abhängigkeiten der Lymphozytendichten bei Infektion mit dem Subtyp SIV_{mac251} / 32H oder mit SIV_{mac251} / MPBMC von der Zeit nach Infektion (s. Tab. 3.5) fanden sich in diesem Kollektiv nicht. Ebenso nimmt die Makrophagendichte bei Infektion mit dem Subtyp SIV_{mac251} / 32H nicht signifikant mit der Zeit nach Infektion zu.

Bei Infektion mit dem Subtyp SIV_{mac251} /MPBMC jedoch nimmt die Makrophagendichte in diesem Versuchskollektiv im Cortex und perivascularär mit der Zeit nach Infektion signifikant ab. Bei der Makrophagendichte in der weißen Substanz läßt sich ein solcher Trend nicht erkennen.

Die Abbildungen 3.9 bis 3.11 zeigen exemplarisch den zeitlichen Verlauf der Makrophagendichte bei mit dem Virus-Subtyp SIV_{mac251} /MPBMC infizierten Tieren. Hierbei fallen deutliche interindividuelle Unterschiede in der Makrophagendichte bei den einzelnen Tieren auf.

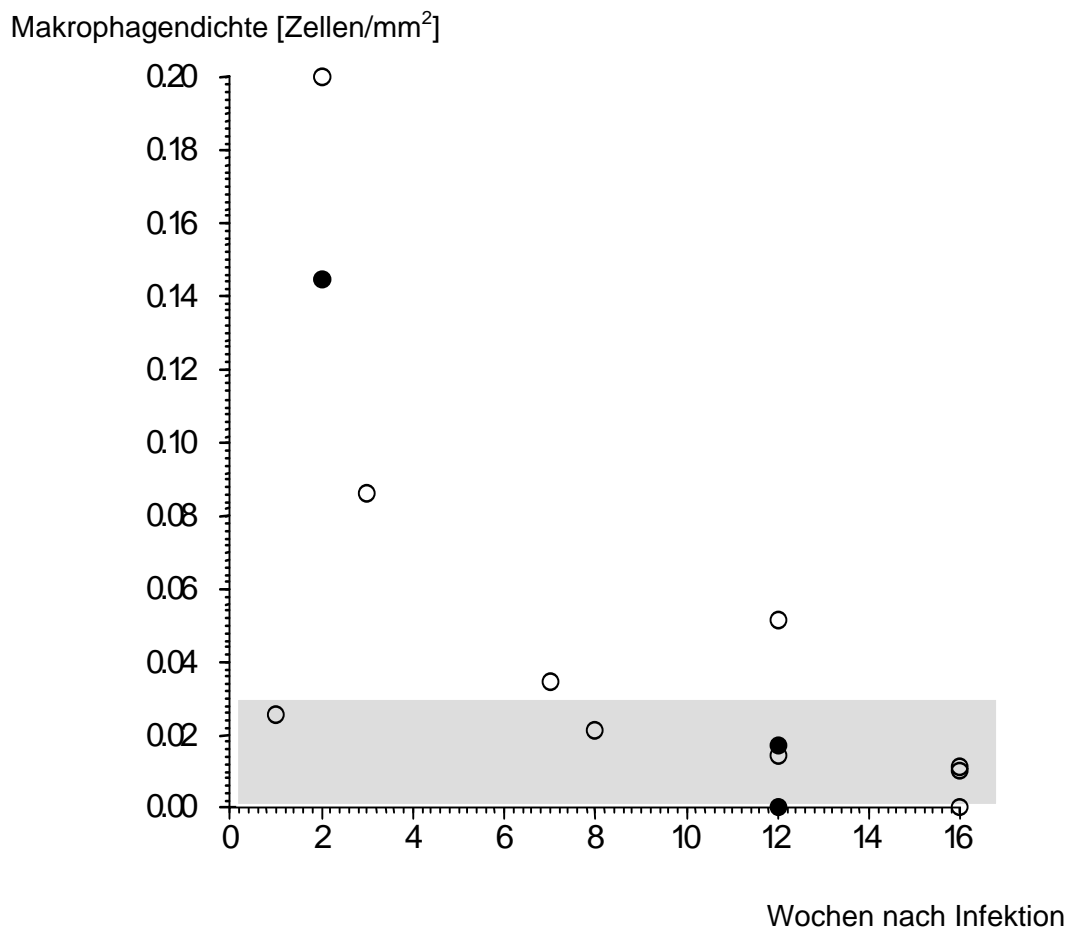


Abbildung 3.9 Zeit seit Infektion und Makrophagendichte des Cortex für mit SIV_{mac251} /MPBMC Infizierte bis 20 Wochen nach Infektion. Die Tiere mit SIV-assoziierte Enzephalitis sind durch gefüllte Kreise dargestellt, die übrigen durch offene. Der aus den 5 Kontrolltieren geschätzte Normbereich ist schattiert.

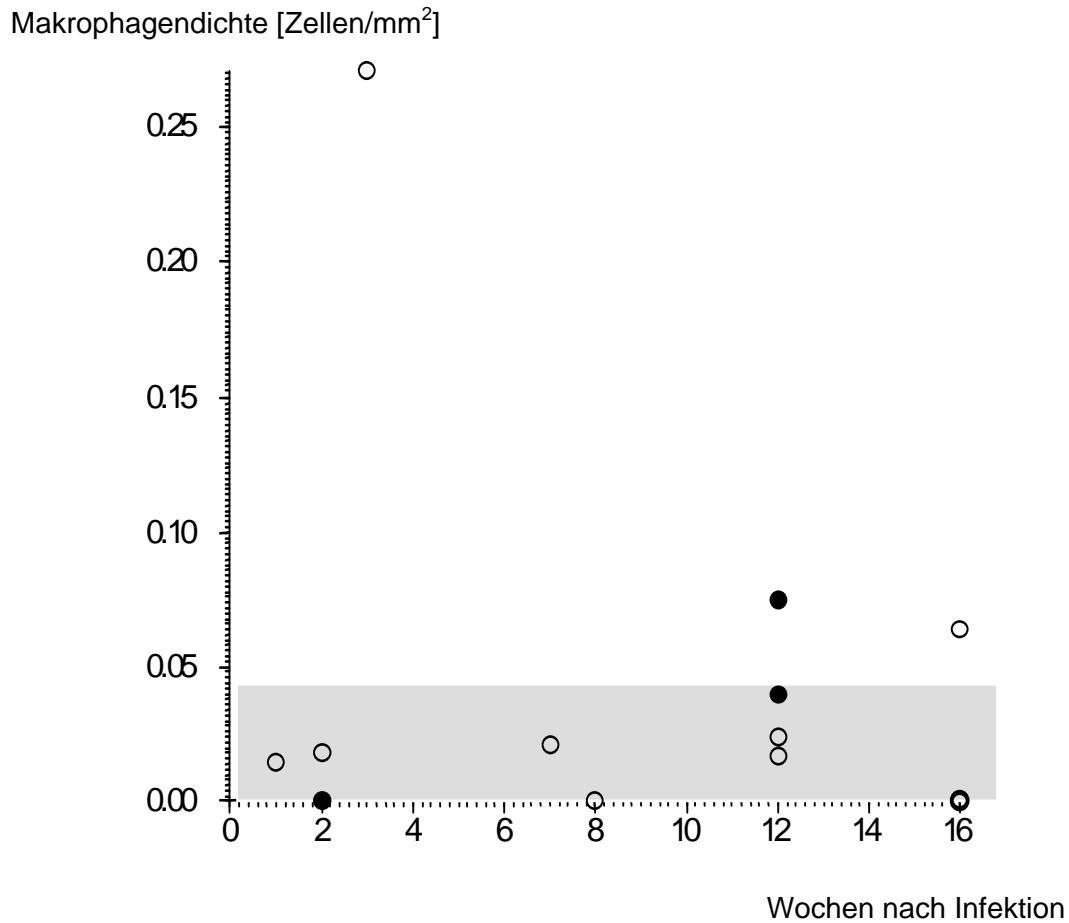


Abbildung 3.10 Zeit seit Infektion und Makrophagendichte in der weißen Substanz für mit SIV_{mac251} /MPBMC Infizierte bis 20 Wochen nach Infektion. Die Tiere mit SIV-assoziiierter Enzephalitis sind durch gefüllte Kreise dargestellt, die übrigen durch offene. Die Zelldichte mit dem Wert 0 für 16 Wochen nach Infektion wurde zweimal gemessen, dies wird durch eine verstärkte Kreislinie in der Abbildung dargestellt (●). Der aus den 5 Kontrolltieren geschätzte Normbereich ist schattiert.

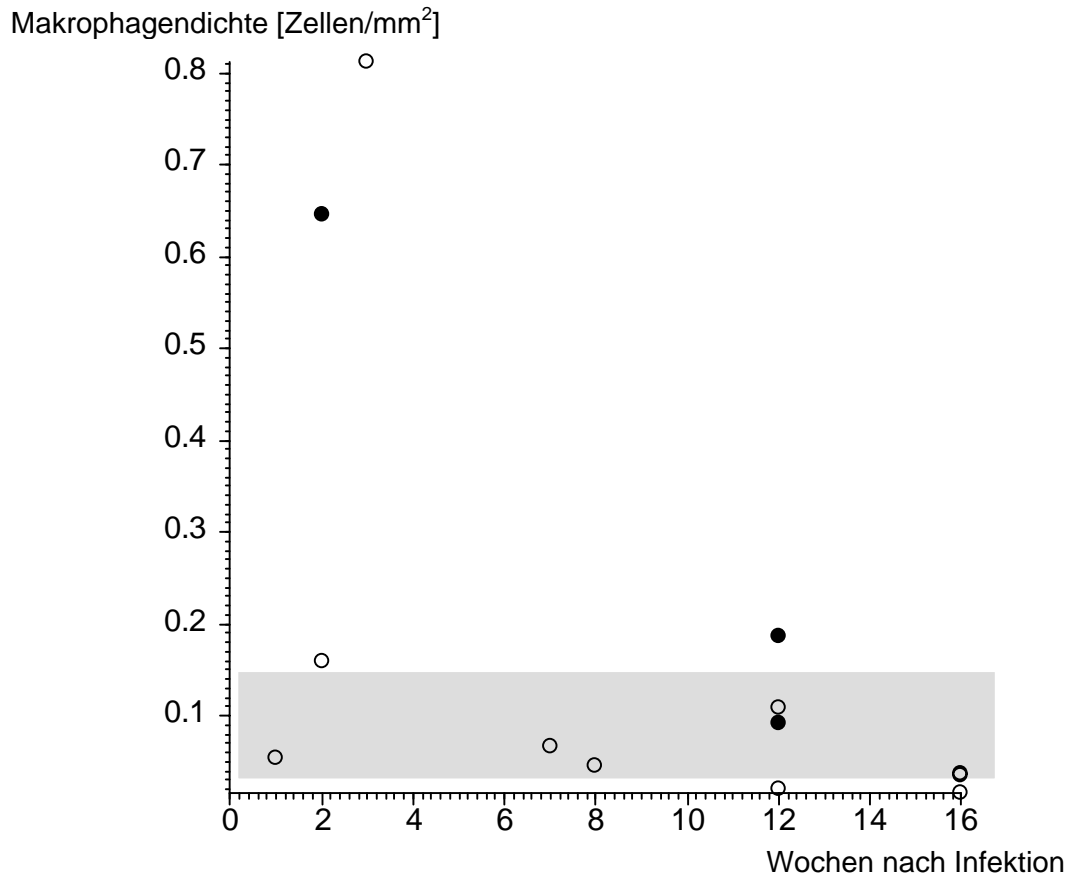


Abbildung 3.11 Zeit seit Infektion und perivaskuläre Makrophagendichte für mit SIV_{mac251} /MPBMC Infizierte bis 20 Wochen nach Infektion. Die Tiere mit SIV-assoziiierter Enzephalitis sind durch gefüllte Kreise dargestellt, die übrigen durch offene. Bei 16 Wochen nach Infektion liegen zwei Messergebnisse nahe beieinander (0,034 und 0,037). Dies wird durch eine verstärkte Kreislinie in der Abbildung dargestellt (●), die dadurch entsteht, weil sich die offenen Kreise überlappen. Der aus den 5 Kontrolltieren geschätzte Normbereich ist schattiert.

3.4 Vergleich der Lymphozytendichte mit der Makrophagendichte

Die Abb. 3.12 bis Abb. 3.14 stellen die Einzelwerte der Makrophagen- und der zugehörigen Lymphozytendichten in den drei verschiedenen Kompartimenten dar.

Beide Achsen sind nicht äquidistant, sondern mit der Kubikwurzel der Werte eingeteilt, was eine bessere Darstellung ergibt.

Zwischen den Zelldichten der Lymphozyten und Makrophagen finden sich keine Korrelationen ($p > 0.28$ in der Spearmanschen Rangkorrelation), was die nun folgenden Abbildungen verdeutlichen.

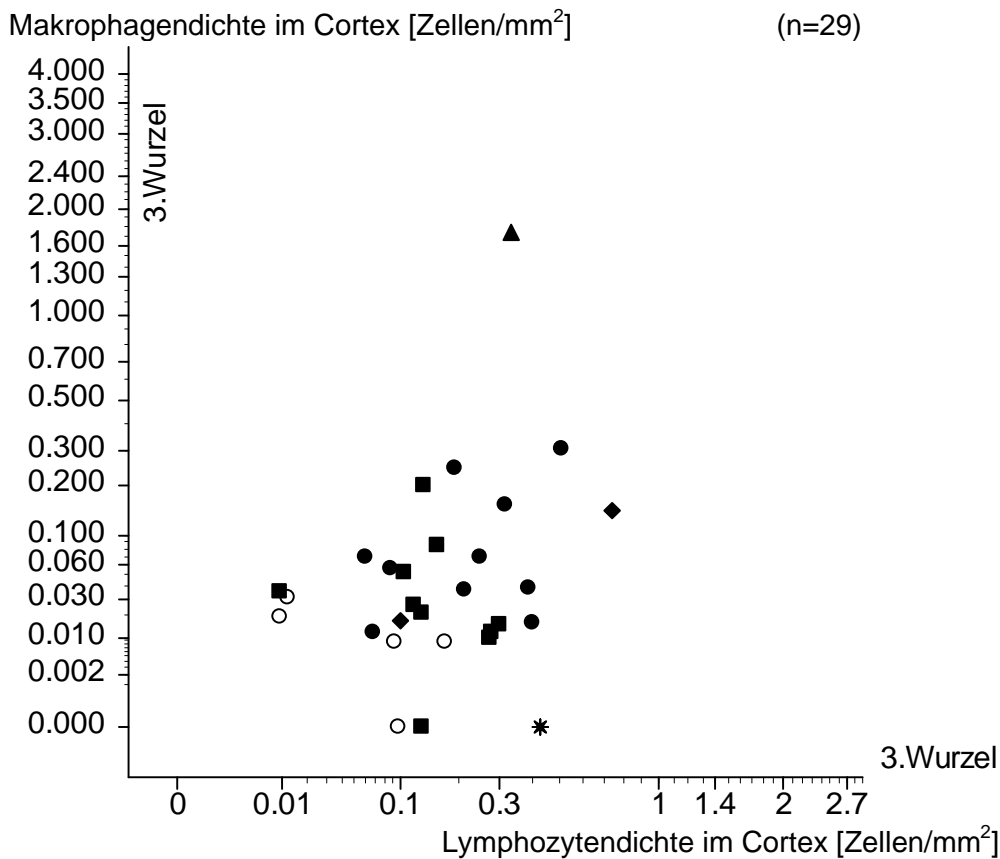


Abbildung 3.12 Zusammenhang zwischen Lymphozytendichte und Makrophagendichte im Cortex. Die Punkte sind nach dem Virustyp markiert und stellen je ein Versuchstier dar, getrennt für Kontrolltiere (o), mit SIV_{mac251}/32H infizierte Tiere (●) und mit SIV_{mac251} / MPBMC infizierte Tiere (■), mit SIV_{mac251}/32H infizierte und an SAE erkrankte Tiere (▲), mit SIV_{mac251} / MPBMC infizierte und an SAE erkrankte Tiere (◆) und ein mit SIV_{mac251} / MPBMC infiziertes und an SAE erkranktes Tier mit Selegilin-Therapie (*). Es sind nur die Werte mit einer Versuchsdauer von höchstens 20 Wochen dargestellt.

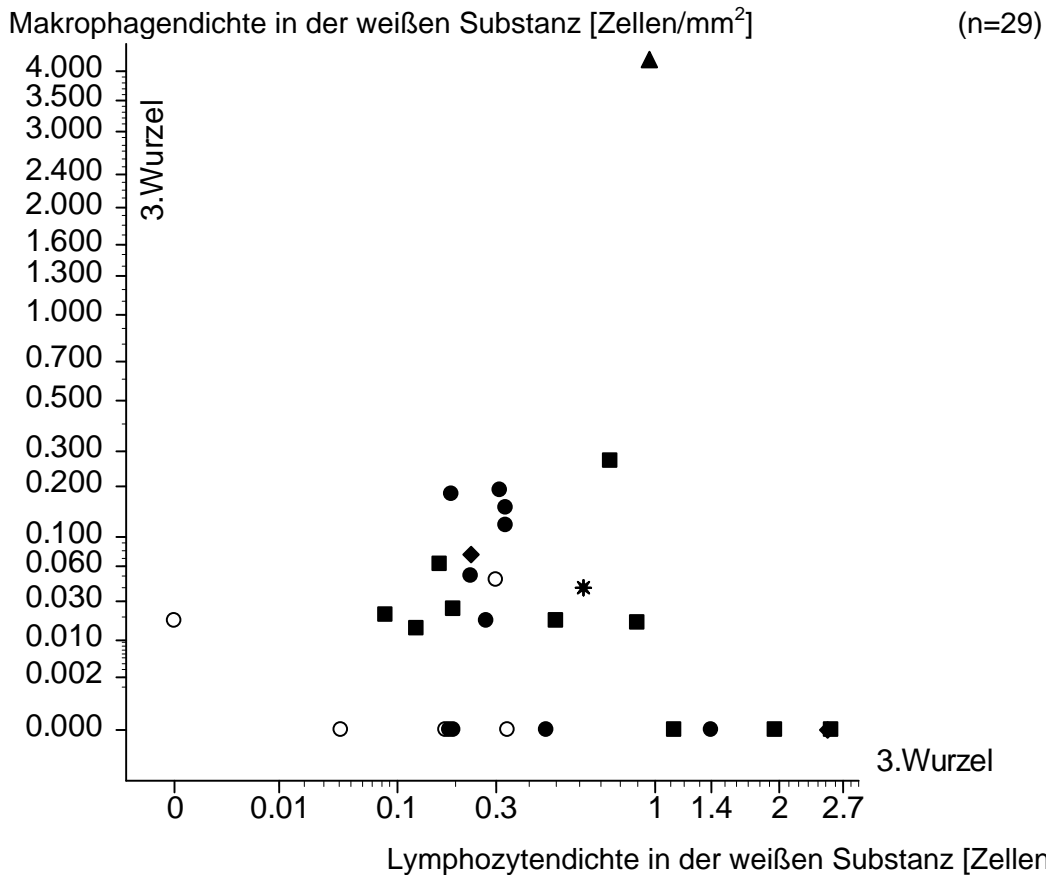


Abbildung 3.13 Zusammenhang zwischen Lymphozytendichte und Makrophagendichte in der weißen Substanz. Die Punkte sind nach dem Virustyp markiert und stellen je ein Versuchstier dar, getrennt für Kontrolltiere (○), mit $SIV_{mac251}/32H$ infizierte Tiere (●) und mit $SIV_{mac251}/MPBMC$ infizierte Tiere (■), mit $SIV_{mac251}/32H$ infizierte und an SAE erkrankte Tiere (▲), mit $SIV_{mac251}/MPBMC$ infizierte und an SAE erkrankte Tiere (◆) und ein mit $SIV_{mac251}/MPBMC$ infiziertes und an SAE erkranktes Tier mit Selegilin-Therapie (*). Es sind nur die Werte mit einer Versuchsdauer von höchstens 20 Wochen dargestellt.

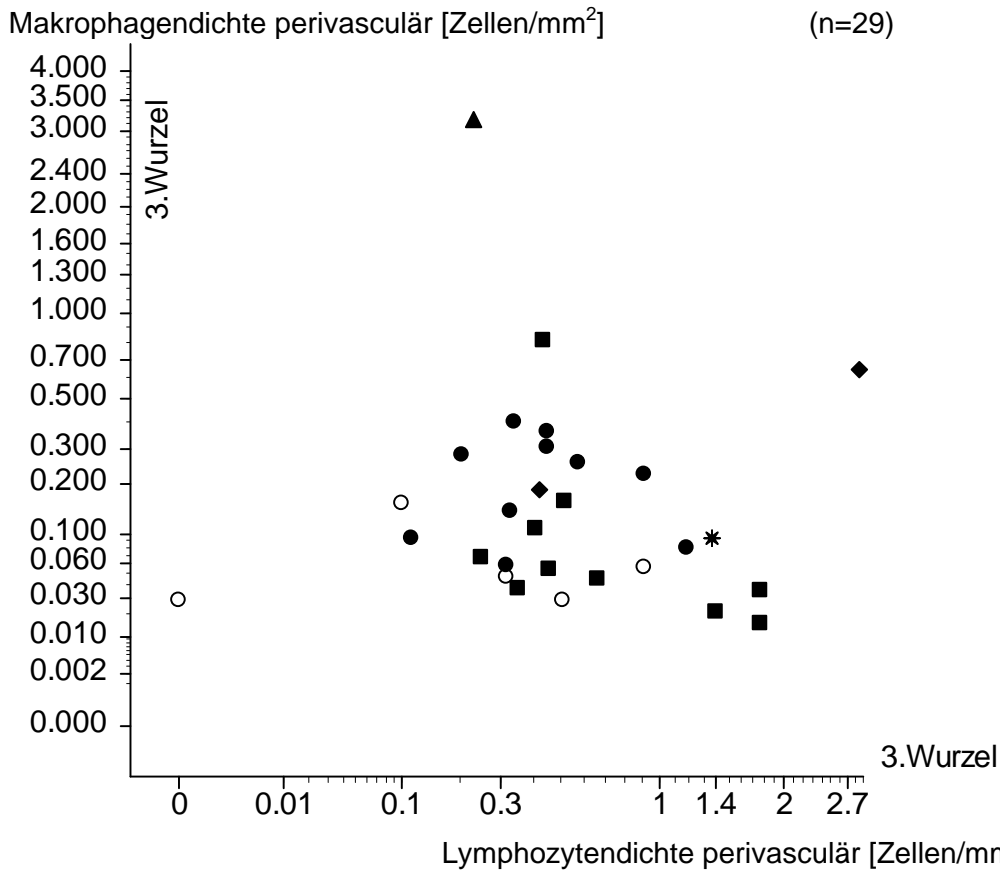


Abbildung 3.14 Zusammenhang zwischen Lymphozyten- und Makrophagendichte im perivaskulären Raum. Die Punkte sind nach dem Virustyp markiert und stellen je ein Versuchstier dar, getrennt für Kontrolltiere (o), mit *SIV_{mac251}/32H* infizierte Tiere (•) und mit *SIV_{mac251} / MPBMC* infizierte Tiere (■), mit *SIV_{mac251}/32H* infizierte und an SAE erkrankte Tiere (▲), mit *SIV_{mac251} / MPBMC* infizierte und an SAE erkrankte Tiere (◆) und ein mit *SIV_{mac251} / MPBMC* infiziertes und an SAE erkranktes Tier mit Selegilin-Therapie (★). Es sind nur die Werte mit einer Versuchsdauer von höchstens 20 Wochen dargestellt.

4. Diskussion

Veränderungen der Lymphozytendichte im Hirnparenchym bei Infektion mit SIV

Viele Untersuchungen über das Verhalten der Lymphozyten bei einer HIV- bzw. SIV-Infektion, und dabei speziell der T-Lymphozyten, beziehen sich auf die Veränderung der Lymphozyten-Zellzahl im Blut. Die Blutlymphozyten stellen nur zwei Prozent der gesamten Lymphozytenpopulation eines Organismus dar. (36) Daraus folgt, daß sich die meisten Lymphozyten in Geweben — vor allem den Geweben der lymphatischen oder anderer Organe — befinden und damit Veränderungen der Lymphozytendichte durch Blutuntersuchungen nicht ausreichend repräsentativ erfaßt werden können. Eine Untersuchung der Blutlymphozyten wird somit der Zelldichte in Bezug auf die einzelnen Organe nicht gerecht.

Bestätigt wird dies durch eine im Jahr 2003 erschienene Arbeit von Sopper und Nierwetberg. (36) In dieser waren die Lymphozytenzahlen im Blut und in 14 verschiedenen Organgeweben — unter anderem Gehirn, lymphatische Organe, Knochenmark — untersucht und quantifiziert worden. Man bediente sich des SIV-Makaken-Tiermodells und untersuchte 20 Tiere ohne Anzeichen von AIDS in einem Zeitraum von zwölf bis 78 Wochen nach Infektion mit dem SI-Virus. Die überraschende Erkenntnis war, daß die gewebeständigen Lymphozytenzahlen in allen Organen zusammen betrachtet bei den SIV-positiven Versuchstieren in der asymptomatischen Phase der SIV-Infektion um das dreifache, im Vergleich zu den infektfreien Kontrolltieren, angestiegen waren. Beim Vergleich der Lymphozytenzahlen im Blut gab es hingegen zu diesem Zeitpunkt keine relevanten Unterschiede. Veränderungen der Zellzahl gewebeständiger Lymphozyten können durch Blutuntersuchungen somit nicht sicher prognostiziert werden.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war daher die Erfassung der Zellzahldichte der gewebeständigen und der gefäßassoziierten (perivaskulären) Lymphozyten im Gewebe des Großhirns.

Zunächst sollen die Untersuchungsergebnisse der gesunden Kontrolltiere näher betrachtet werden (Vergleiche Abbildung 3.1). Hier fällt auf, daß die höchste Lymphozytendichte im perivaskulären Raum gemessen werden kann, gefolgt vom subcorticalen weißen Mark und schließlich dem Cortex, wo sich im Verhältnis am wenigsten Lymphozyten befinden. Man kann dieses Ergebnis so interpretieren, daß sich eine vermehrte Ansammlung der Zellen des spezifischen Immunsystems vor allem dort messen läßt, wo ein Höchstmaß an Überwachung notwendig ist, nämlich perivaskulär. Dort können z.B. Krankheitserreger vom Blutsystem in das Hirnparenchym übertreten, vor allem dann, wenn es zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke im Rahmen von Infektionen kommt. HIV vermag zum Beispiel Endothelzellen im Bereich der Blut-Hirn-Schranke zu infizieren (35).

Die Bedeutung des Eintrittes des SI-Virus in das ZNS über die Blut-Hirn-Schranke, wird jedoch kontrovers diskutiert, da es selbst bei nachweislich intakten Verhältnissen zur Entwicklung von SIV-induzierten neurologischen Erkrankungen kam. (37) (34)

Weiterhin fällt auf, daß die Zelldichte im perivaskulären Raum die größte interindividuelle Schwankungsbreite aufweist. Ursachen sind zum einen Unterschiede in der Anlage und Funktion des Immunsystems bei verschiedenen Individuen. Zum anderen liegt ein dynamisches System vor, so daß zum Zeitpunkt der Messung — von Individuum zu Individuum unterschiedlich — eine bestimmte Phase des reagierenden Immunsystems festgehalten worden ist.

Bemerkenswert ist auch die Tatsache, daß die Lymphozytendichte bei gesunden Versuchstieren im subcorticalen weißen Mark deutlich höher ist als im Cortex.

Beim Vergleich der Kontrolltiere mit den SIV infizierten Tieren ($n = 20$) fallen folgende Besonderheiten auf:

Einzelne Versuchstiere zeigen keine Zunahme der Lymphozytendichte gegenüber den Kontrolltieren. Am deutlichsten zeigt sich dies im Kompartiment „Cortex“, wo insgesamt vier Tiere aus beiden Kollektiven (Virussubtyp $SIV_{mac251}/32H$ und $SIV_{mac251}/MPBMC$) den Medianwert der Kontrolltiere von $0,09$ Lymphozyten/ mm^2 unterschreiten (Ergebnis aus den Rohwerten der Messungen, nicht dargestellt).

Eine Erklärung dafür ist der zeitliche Ablauf der Infektion im einzelnen Individuum. Wir gehen davon aus, daß einer Phase der normalen oder vermehrten Replikation von Lymphozyten als Reaktion auf die Infektion, eine Phase des Rückgangs der Zelldichte

folgt, so daß zum Zeitpunkt der Messung wieder eine normalisierte Lymphozytenzahl vorliegen kann.

In der hier vorliegenden Arbeit kann dies bei den zehn Versuchstieren ohne Enzephalitis gezeigt werden, welche mit dem Virussubtyp SIV_{mac251}/ 32H infiziert worden waren: Die Lymphozytendichte im Cortex nimmt signifikant über die Gesamtzeit des Experimentes ab, eine zunächst frühe corticale Lymphozytose ging also im Verlauf der Zeit zurück (siehe Tabelle 3.5). Dabei wurde aber nur der Einfluß der Zeit *innerhalb* der SIV-infizierten Tiere betrachtet, es erfolgte kein Vergleich zu den Kontrolltieren.

Ferner können sich hinter der fehlenden Zunahme der Lymphozytendichte auch solche Versuchstiere verbergen, bei denen das Immunsystem *nicht* in der Lage ist, auf die Infektion nach physiologisch normalen Kriterien zu reagieren: Bei diesen Individuen kommt es zu keiner oder nur einer geringen Vermehrung der Lymphozyten, dafür aber zu einer massiven Zunahme der Makrophagen. Als Folge einer unzureichenden Reaktion der spezifischen Immunabwehr kommt es zu einer massiven Vermehrung des Virus und damit zu einem *beschleunigten* und *rasch fortschreitenden, progressiven* Krankheitsverlauf. In der Literatur werden diese Versuchstiere daher als „rapid progressors“ bezeichnet (44) (37). Da die Tiere im klinisch asymptomatischen Stadium getötet und nicht detailliert immunologisch charakterisiert wurden, kann nicht eindeutig gesagt werden, welche Tiere in unseren Kollektiven später evtl. als „rapid progressors“ eingestuft worden wären.

In verschiedenen Arbeiten wird berichtet, daß 40 % bis 50 % der Versuchs-Makaken „rapid progressors“ sind und eine SIV-Enzephalitis entwickeln. (44) (41) Dabei kann in nur ca. einem Viertel der untersuchten Fälle eine Vermehrung von cytotoxischen T-Lymphozyten im Hirnparenchym festgestellt werden (37). In einer anderen Arbeit war die Einwanderung von CD8(+)-T-Zellen in das Gehirngewebe weniger ausgeprägt und SIV-Antigen spezifische cytotoxische T-Lymphozyten konnten nicht nachgewiesen werden (35).

In einer Arbeit von Sopper und Sauer et al. (37) entwickelten 12 von 43 mit SIV_{mac251}/MPBMC infizierten Makakenaffen SIV-AIDS innerhalb von 28 Wochen nach Infektion und wurden als „rapid progressors“ eingestuft. SIV-spezifische Antikörper konnten bei diesen Versuchstieren weder im Plasma noch im Liquor nachgewiesen werden.

Die nicht stattfindende Synthese von virusspezifischen Antikörpern führt zu einer uneingeschränkten Vermehrung des Virus und konsekutiv zu einer frühen Mortalität. (37)

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, daß die länger überlebenden Versuchstiere („slow progressors“) sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort im ZNS entwickelten. (37)

Beim Vergleich der Kontrolltiere mit den Virussubtyp $SIV_{mac251}/32H$ -infizierten Tieren ohne Enzephalitis ($n = 10$) zeigt sich der deutlichste Anstieg der Lymphozytendichte im Bereich des Cortex, bei der Testung wird dort Signifikanz erreicht (siehe Abbildung 3.1). Für das subcorticale weiße Mark zeigt sich eine tendentielle Zunahme der Zelldichte im Vergleich zu den Kontrolltieren, dort findet sich aber eine ausgeprägte interindividuelle Schwankungsbreite, die Standardabweichung entspricht nahezu dem Mittelwert (vergleiche Tabelle 3.1), was die Aussagekraft des Meßergebnisses einschränkt. Die größte Lymphozytendichte findet sich wie bei den Kontrolltieren im perivaskulären Raum, allerdings wird Signifikanz nicht erreicht.

Für die mit dem Virussubtyp $SIV_{mac251}/MPBMC$ infizierten Versuchstiere zeigt sich der deutlichste Anstieg der Lymphozytendichte im subcorticalen weißen Mark, allerdings ist die interindividuelle Schwankungsbreite in Analogie zum Subtyp $SIV_{mac251}/32H$ sehr hoch. Für dieses Kompartiment, wie auch für den Cortex werden bei der Testung signifikante Ergebnisse erreicht. Eine tendentielle Zunahme der Zelldichte kann für den perivaskulären Raum nachgewiesen werden, allerdings ist — im Gegensatz zu den Kontrolltieren — hier nicht die größte Zelldichte meßbar (Vergleiche Abbildung 3.3).

In unserer Arbeit weisen wir somit für beide Virussubtyp-Kollektive eine statistisch signifikante Zunahme der gewebeständigen Lymphozyten kompartimentspezifisch im Cortex und der weißen Substanz als Reaktion auf die frühe cerebrale SIV -Infektion nach. Dabei überwiegt die corticale die subcorticale Lymphozytose, da die Aussagekraft letzterer durch eine hohe interindividuelle Schwankungsbreite (unter anderem durch die evtl. im Kollektiv eingeschlossenen „rapid progressors“ bedingt) relativiert wird.

Weitere Faktoren, die zu einer hohen Schwankungsbreite und damit Unterschieden der interindividuellen Meßergebnisse beitragen können, sind

- individuelle Unterschiede in der Geschwindigkeit und Produktivität des Immunsystems: Während das eine Versuchstier die Auseinandersetzung mit dem Virus bereits absolviert hat, befindet sich ein anderes noch in der Hochphase der Reaktion auf den Erreger. Dementsprechend ergeben sich bei den Ergebnissen kleinere oder größere Vertrauensbereiche der Mediane bzw. Standardabweichungen (vergleiche Abbildungen sowie Tabellen 3.1 und 3.3).
- der Einsatz unterschiedlicher Virusstämme, allerdings findet hier eine kontroverse Diskussion statt: Während verschiedene Arbeiten darauf verweisen, daß in der Initialphase kein Unterschied beim Einsatz der verschiedenen Virusstämme in Bezug auf Zelltropismus und Neuropathogenität besteht (10,23,35), gibt es an anderer Stelle Hinweise darauf, daß sich manche Virusstämme neurovirulenter verhalten (35). Jedenfalls kann vom „in vitro“-Verhalten eines Stammes nicht auf das Verhalten in vitalem Gewebe geschlossen werden (10).
- unterschiedliches Verhalten bzw. Veränderung des Virus (genetische Variabilität) in Abhängigkeit vom Individuum, vom Gewebe und den Veränderungen im Gewebe, sowie als Reaktion auf unterschiedliche immunologische Vorgänge, wie z.B. das Einwirken von Cytokinen (25,44)

Eine Differenzierung in die bekannten Lymphozytensubpopulationen über Oberflächenantigene mittels spezifischer immunhistochemischer und/oder flowcytometrischer Untersuchungsmethoden war nicht Aufgabe der hier vorliegenden Arbeit und zum Zeitpunkt dieser Untersuchung im Gewebeschnitt, mangels geeigneter Antikörper gegen CD8 von Rhesus-Affen, nicht möglich. Im weiteren werden aber Arbeiten zum Vergleich angeführt, die solche Untersuchungsmethoden verwendeten.

Zum Beispiel beschäftigt sich eine Veröffentlichung von Marcondes und Burudi (26) mit der Veränderung der Lymphozytenzahlen bei der frühen ZNS-Infektion durch SIV bei Rhesusaffen mit elf Wochen Infektionsdauer. Dabei gelang es den Autoren über fünfmal mehr CD8(+)-T-Lymphozyten in den Gehirnen der SIV infizierten Versuchstiere nachzuweisen als in denen der nicht infizierten Kontrolltiere.

Bereits eine Woche nach Infektion gelang Herrath und Oldstone der Nachweis von SIV spezifischen CD8(+)-T-Lymphozyten im Gehirngewebe von Rhesus Makaken. (39) Eine andere Arbeit weist bei einem Versuchstier mit sieben Tagen nach Infektion einen moderaten, bei einem Makakenaffen mit 30 Tagen Infektionsdauer einen deutlichen Anstieg der T-Lymphozyten im Hirnparenchym im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren nach. (4)

Das Resultat dieser Arbeiten besteht in einer Zunahme der intracerebralen Lymphozytendichte in der frühen Phase der Infektion. Dies wird auch in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt, überdies hinaus werden bei uns aber noch spezifische Aussagen über die Lokalisation gemacht.

Beim Vergleich *innerhalb* der infizierten Versuchstiere in unserer Arbeit waren die Lymphozytendichten im subkortikalen weißen Mark und bei den perivaskulären Zellen jeweils signifikant höher als im Cortex (vergleiche Kapitel 3.1.3). Allerdings ergaben unsere Untersuchungen nur für die mit dem Virussubtyp SIV_{mac251}/ MPBMC infizierten Versuchstiere signifikante Unterschiede.

Man kann dieses Ergebnis vielleicht so interpretieren, daß eine vermehrte Präsenz der Lymphozyten in jenen Bereichen gemessen werden konnte, die das Virus oder mit dem Virus infizierte Zellen passieren müssen, bevor sie in den Cortex vordringen. Dadurch kann vielleicht eine weitere Ausbreitung verlangsamt bzw. unterbunden oder eine raschere Antwort des noch funktionierenden Immunsystems vorbereitet werden.

Gestützt wird diese Überlegung durch eine neuere Arbeit von Williams und Hickey (44), die zeigen konnten, daß es nicht zu einer fortschreitenden Infektion im ZNS kommt, solange ein noch funktionierendes zelluläres (lymphozytäres) und humorales Immunsystem die SIV-Infektion zu kontrollieren vermag.

Mögliche Erklärungen für diese Beobachtung und die spezielle Rolle der Lymphozyten für den Ablauf der Infektion liefern folgende Arbeiten:

Von den CD8(+)-T-Lymphozyten stellt man sich gegenwärtig vor, daß sie möglicherweise direkt die zerebrale Virusvermehrung kontrollieren oder virusinfizierte Zellen abtöten. (44) (37) In einer anderen Versuchsanordnung entwickelten 80 Prozent der Versuchstiere, bei denen man experimentell die Entwicklung von CD8(+)-T-Lymphozyten unterdrückte, AIDS mit einer SIV-Enzephalitis. (32,42,44)

Obwohl es noch keine vollständigen Beweise gibt, ist derzeit davon auszugehen, daß zytotoxische CD8(+)-T-Lymphozyten die Ausprägung der Infektion beeinflussen, indem sie infizierte Zellen, wie z.B. aus dem Blut oder Knochenmark stammende Monozyten oder Makrophagen, lysieren und damit abtöten können. Somit würden sie auch die Einwanderung dieser infizierten Zellen in das ZNS kontrollieren. Ein Verlust oder Ineffektivität dieser Zellpopulation führt vermutlich zu einer neuropathogenen, aktivierten, aber dysfunktionalen Makrophagenpopulation. (44) Den CD8(+)-T-Lymphozyten wird damit eine Kontrollfunktion bei der Entstehung einer SIV-Enzephalitis zugeschrieben. (42)

Im Gegensatz dazu konnte von Marcondes und Burudi (26) zwar ebenfalls eine zahlenmäßig signifikante Zunahme der CD8(+)-T-Lymphozyten im Gehirn in der Frühphase bis 11 Wochen nach SIV-Infektion beobachtet werden, man geht aber *nicht nur* von einer protektiven Rolle dieser Zellen in dieser Arbeit aus. Verschiedene Untersuchungsergebnisse geben dort Hinweise auf eine Schädigung von Gehirnzellen durch die von aktivierten CD8(+)-T-Lymphozyten produzierten zytolytischen und entzündungsauslösenden Zellmoleküle.

Aktivierte Lymphozyten könnten also auch zu einer Schädigung des Gewebes führen.

Der zeitliche Verlauf einer im Gehirn stattfindenden SIV-Infektion war Gegenstand einer Arbeit von Clements und Babas et al., die Autoren sahen in ihrem Modell den Zeitraum von zehn Tagen als akute, die Zeiträume von 21 und 56 Tagen nach Infektion als asymptomatische Phase der SIV-Infektion im Gehirn an. (5,25)

Bei allen Versuchstieren mit einer Infektionsdauer von zehn Tagen wurde SIV-RNS im Gehirn als Zeichen der Virusvermehrung mittels PCR nachgewiesen. Im Gegensatz dazu war die SIV-RNS bei allen Versuchstieren mit 21 Tagen Infektionsdauer im Gehirn nicht nachweisbar, von den sechs Versuchstieren nach 56 Tagen Infektionsdauer hatten nur zwei Tiere nachweisbare Virus-RNS Spiegel im Hirngewebe. Die Autoren folgern daraus, daß es bei nahezu allen Tieren mit 21 und 56 Tagen Infektionsdauer zu einer ausgeprägten Unterdrückung der SIV-Replikation im Gehirngewebe gekommen war. (5)

Parallel zum Rückgang der aktiven Virusvermehrung zeigte sich intracerebral eine signifikante Zunahme der zytotoxischen T-Lymphozyten und der natürlichen

Killerzellen bei den Tieren mit 21 und 56 Tagen Infektionsdauer im Vergleich zu den Kontrolltieren. (5) Die Autoren nehmen an, daß diese beiden lymphozytären Zellgruppen entweder infizierte Zellen abtöten oder aktivierte Populationen von Makrophagen / Mikroglia regulieren können.

Auch einen deutlichen Anstieg der CD4(+)-T-Lymphozyten (T-Helfer-Lymphozyten) im Gehirngewebe bei den Tieren in der asymptomatischen Phase der SIV-Infektion verglichen mit infektfreien Kontrolltieren konnte man nachweisen. (25)

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß man beim Vergleich zwischen nicht infizierten Kontrolltieren und SIV-infizierten Versuchstieren ohne Enzephalitis intrazerebral vielfach höhere Lymphozytenzahlen bei den SIV-Infizierten beobachten konnte. Ferner wurde ein Rückgang der Virusvermehrung (SIV-RNS) im Gehirn nach der frühen Infektionsphase beobachtet. Diese Ergebnisse spiegeln ein noch funktionierendes Immunsystem wieder, bei dem durch die verschiedenen Lymphozytenpopulationen (B- und T-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen) die Virusvermehrung unterdrückt oder zumindest deutlich reduziert werden kann, der Organismus befindet sich in einer asymptomatischen Phase der SIV-Infektion.

Die Besonderheit im Vergleich zu den oben beschriebenen Arbeiten in unserer Arbeit ist, daß wir nicht nur eine Vermehrung der Lymphozyten feststellen, sondern auch die Frage beantworten, in welchen Kompartimenten diese stattfinden. Dabei findet die quantitativ stärkste Zunahme im Vergleich zu den Kontrolltieren im Cortex statt. Wir gehen davon aus, daß es durch die Zunahme der Lymphozyten im Cortex und subcorticalen Mark gelingt, in Parallelität zu den Ergebnissen der obigen Publikationen, die aktive Virusvermehrung in der asymptomatischen Phase der Infektion zu unterdrücken.

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß bei den Versuchstieren ohne Enzephalitis in beiden Viruskollektiven die Zelldichte der Lymphozyten in allen Kompartimenten die der Makrophagen übersteigt, es kommt also zu einer ausgeprägteren Reaktion der gewebeständigen Lymphozyten.

Veränderungen der Makrophagendichte im Hirnparenchym bei Infektion mit SIV

In diesem Kapitel soll nun auf die Rolle der Makrophagen bei der frühen SIV-Infektion des Gehirns eingegangen werden. Der Terminus „Makrophage“ wird aus Vereinfachungsgründen im weiteren benutzt werden. Mit diesem Begriff werden jedoch mehrere unterschiedliche aus dem Knochenmark stammende Zelltypen, wie ins Gewebe via Blut eingewanderte und differenzierte Monozyten, sowie perivaskuläre und gewebeständige Makrophagen und Mikrogliazellen zusammengefaßt. Eine Differenzierung dieser Makrophagen-Populationen erfolgte nicht.

Obwohl das HI- beziehungsweise das SI-Virus initial sowohl den Beginn der ZNS-Erkrankung als auch die Unterdrückung des Immunsystems auslöst, scheint eine Dysregulation der Makrophagen schließlich für die Schädigung und Fehlfunktion des Nervensystems verantwortlich zu sein. (44) Man verdächtigt aktivierte Makrophagen neurotoxische Produkte zu produzieren und damit die Schädigung von Neuronen auszulösen. (25) (13)

Im weiteren werden wir aufgrund unserer Messungen und durch Vergleich zwischen nicht infizierten und infizierten Versuchstieren weiterführende Erkenntnisse über das Verhalten der Makrophagen aufzeigen.

Vorab betrachtet werden wieder die Untersuchungsergebnisse der gesunden Kontrolltiere in Bezug auf Menge und Lokalisation der Makrophagen (vergleiche Abbildung und Tabelle 3.2).

Hier fällt auf, daß sich die größte Makrophagendichte für den perivaskulären Raum messen läßt, gefolgt von der Zelldichte im Cortex. Wir gehen davon aus, daß — in Parallelität zu der höchsten Lymphozytendichte im perivaskulären Raum bei den Kontrolltieren — die Makrophagen als Vertreter der unspezifischen Immunität sich ebenfalls dort akkumulieren um den perivaskulären Raum besser überwachen zu können. Warum dies sinnvoll ist, wird weiter unten erörtert werden.

Der Median — wegen der fehlenden Gaußverteilung in unseren Kollektiven repräsentativer als der Mittelwert — beträgt für die Makrophagen im subcorticalen weißen Mark den Zahlenwert null (Ergebnis aus den Rohwerten der Messungen, nicht dargestellt). Ebenfalls auffallend ist, daß dort die Standardabweichung (ST) den

Mittelwert (MW) überschreitet ($ST = 0,02 > MW = 0,013$). Damit wird die Aussagekraft in Bezug auf dieses Kompartiment deutlich eingeschränkt. Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis ist, daß bei drei der fünf Kontrolltiere dort überhaupt keine Makrophagen gemessen werden konnten (Ergebnis aus den Rohwerten der Messungen, nicht dargestellt).

In allen drei Kompartimenten zeigt sich eine hohe interindividuelle Schwankungsbreite der Meßergebnisse, welche durch die Amplitude des Vertrauensbereiches des Medians in der Abbildung bzw. die Standardabweichung in der jeweiligen Tabelle dargestellt wird. Auf die Ursachen der interindividuellen Schwankungsbreite bei den Kontrolltieren hatten wir bereits bei der Diskussion der Lymphozytendichte hingewiesen.

Vergleichen wir nun wieder diese Kontrolltiere mit den SIV-infizierten Tieren ohne Enzephalitis ($n=20$). Dabei fallen bei der Betrachtung der Rohwerte zwei Extreme auf: Zum einen reagieren die Versuchstiere gewissermaßen gar nicht auf die Infektion bzw. gelingt es uns in der hier vorliegenden Arbeit nicht eine Reaktion nachzuweisen.

Dies fällt ganz besonders im Kompartiment „subcorticales weißes Mark“ auf. Dort lassen sich für insgesamt sieben Versuchstiere aus beiden Virussubtyp-Kollektiven keine Makrophagen messen. (Ergebnis aus den Rohwerten der Messungen, nicht dargestellt). Eine mögliche Ursache sind, neben individuellen Unterschieden in der Reaktion und Anlage des Immunsystems, sowie der unterschiedlichen Kinetik beim Vergleich zwischen verschiedenen Individuen, das Vorkommen von „slow progressing“-Versuchstieren. Diese zeigen — nach einer anfänglichen Makrophagenreaktion — eine lymphozytär-humorale wie auch -zelluläre Immunantwort im ZNS (44) (37) und unterdrücken dort die Virusvermehrung. Erst wenn diese Funktion des Immunsystems zusammenbricht, kommt es wieder zu einer deutlichen Zunahme der Makrophagen. (44) Möglicherweise fällt unsere Messung der Makrophagendichte bei einigen Versuchstieren genau in diesen Zeitraum und daher sind nur wenige Makrophagen präsent bzw. durch unsere Methode nicht meßbar.

Zum anderen reagieren manche Versuchstiere sehr früh und sehr deutlich.

So können bei zwei Versuchstieren des Virussubtypes $SIV_{mac251}/32H$ mit einer und drei Wochen Infektionsdauer und bei ebenfalls zwei Versuchstieren des Virussubtypes

SIV_{mac251}/ MPBMC mit zwei und drei Wochen Infektionsdauer die höchsten Makrophagendichten überhaupt gemessen werden. Einen Trend zur Akkumulation in einem bestimmten Kompartiment kann man aus den Ergebnissen dieser vier Versuchstiere jedoch nicht erkennen (Ergebnis aus den Rohwerten der Messungen, nicht dargestellt). Diese vier Versuchstiere werden von uns als „rapid progressors“ eingestuft. Zur Verdeutlichung dienen die Abbildungen 3.9 bis 3.11, welche die Makrophagendichte in Abhängigkeit von der Zeit beim Subtyp SIV_{mac251}/ MPBMC darstellen: Bei der Betrachtung erkennt man, daß die Makrophagendichte von den zwei Tieren mit zwei bzw. drei Wochen Infektionsdauer deutlich größer ist als die Makrophagendichte bei den Kontrolltieren (geschätzter Normbereich (schattiert)) und dem Versuchstier mit SIV-Enzephalitis (zwei Wochen Infektionsdauer).

Auf das Vorkommen von „rapid progressors“ in den Kollektiven der Versuchstiere waren wir bereits im vorhergehenden Kapitel eingegangen. Als Hauptkriterien haben diese eine unzureichende spezifische bzw. humorale Immunantwort, konsekutiv einen rapid fortschreitenden Krankheitsverlauf durch eine unkontrollierte Vermehrung des Virus und als letzten Versuch einer unspezifischen Immunantwort eine massive Vermehrung der Makrophagen. Letzteres wird durch eine Beobachtung von Czub und Müller (10) unterstützt: Bei Versuchstieren mit rasch voranschreitender Erkrankung, welche schon nach wenigen Wochen Infektionsdauer zu einer ausgeprägten klinischen Verschlechterung führte, waren die vorrangig in das ZNS-Gewebe eingedrungenen Zellen Makrophagen. Diese Aussage konnte für alle moribunden Versuchstiere gemacht werden und zwar unabhängig davon, welcher SIV-Virusstamm für die Infektion benutzt worden war. (10)

Bevor wir uns der Betrachtung der Meßergebnisse in beiden Kollektiven im Vergleich zu den Kontrolltieren zuwenden, wird noch kurz darauf eingegangen, wie es überhaupt dem Virus gelingt in das ZNS einzudringen und dort eine Infektion, sowie evtl. eine Enzephalitis auszulösen. Dies ist bislang nicht vollständig geklärt und mehrere Hypothesen existieren parallel. So wird einerseits angenommen, daß freies oder extrazelluläres Virus Endothelzellen von Gehirngefäßen infiziert und so Zugang zum Neuroparenchym bekommt. (44) Auch ein direkter Zugang des Virus zum ZNS wird diskutiert. (1) Ferner wird der Eintritt innerhalb eines infizierten Monozyten/

Makrophagen oder Lymphozyten als Infektionsweg postuliert, dies geschieht während routinemäßiger immunologischer Überwachung des ZNS. (31,43,44,46)

Als bildhafte Umschreibung für das in einer — ursprünglich dem Knochenmark entstammenden — Zelle in das ZNS gelangende Virus wird daher in mehreren Arbeiten der Begriff des „trojanischen Pferdes“ gebraucht. (20)(24,30,43) Ebenso unklar bleibt bislang ob Virusproteine, freies Virus, Virus infizierte Makrophagen oder eine Kombination aus alledem zur Infektion und damit zur Schädigung des ZNS führen. (44)

Beim Vergleich der infizierten Tiere mit den Kontrolltieren konnte der größte Unterschied für die perivaskulären Makrophagen beim Subtyp $SIV_{mac251}/32H$ gemessen werden, im U-Test wird eine hohe Signifikanz erreicht. Ein ebenfalls sehr deutliches Meßergebnis zeigt die Makrophagendichte im Cortex bei beiden Virussubtypen, für die Zelldichte bei $SIV_{mac251}/MPBMC$ wird nur tendentielle Signifikanz erreicht.

Insgesamt fallen bei allen Meßergebnissen in den jeweils drei Kompartimenten eine große Schwankungsbreite für den 68 %-Vertrauensbereich des Medians bzw. hohe Werte für die Standardabweichung auf. Ursachen dafür (individuelles Immunsystem, unterschiedliche Reaktion des Virus auf die Umgebung u.a.) waren im vorhergehenden Kapitel aufgeführt worden und sind hier von gleicher Bedeutung.

In unserer Arbeit gelingt uns der Nachweis einer signifikanten Reaktion der Makrophagen auf die frühe Infektion im Cortex.

Für die perivaskulären Makrophagen konnte neben obigem Ergebnis noch folgendes in unserer Arbeit gezeigt werden: In beiden mit den Virussubtypen $SIV_{mac251}/32H$ bzw. $SIV_{mac251}/MPBMC$ infizierten Untersuchungskollektiven (jeweils $n = 10$), ist beim Vergleich *innerhalb* der infizierten Versuchstiere ohne Enzephalitis die Zelldichte der Makrophagen perivaskulär — im Vergleich zur Zelldichte im Cortex und im subcorticalen Mark — signifikant am höchsten (Vergleiche Abbildung 3.2. und 3.4.). Wir zeigen also, daß es in der frühen Infektionsphase zu einer deutlichen Akkumulation der perivaskulären Makrophagen kommt.

Unser Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen mehrerer Arbeiten, welche darauf hinweisen, daß die perivaskulären Makrophagen, als Hauptzielzellen der intrazerebralen

HIV- bzw. SIV-Infektion angesehen werden müssen.(17,24,31,33,43-45)

Im folgenden soll anhand von einigen Arbeiten auf diese Theorie etwas näher eingegangen werden.

Bereits eine frühe Arbeit von Chakrabarti, Hurtrel, et al. weist bei Versuchstieren mit sieben und dreißig Tagen Infektionsdauer einen moderaten Anstieg der perivaskulären Makrophagen im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren nach. (4) Eine weitere Arbeit der gleichen Autoren (18) untersucht Versuchstiere innerhalb des ersten Monats nach intravenöser Infektion mit SIV. Dabei zeigte sich ebenfalls, daß die meisten infizierten Zellen perivaskuläre Makrophagen waren.

Eine andere Arbeit von Lane, Sasseville et al. (24) wies eine signifikante Zunahme der perivaskulären Makrophagen und Mikroglia parallel zur Invasion des SI-Virus in das Gehirn nach. Die Autoren gehen aufgrund ihrer Untersuchungsergebnisse davon aus, daß der Eintritt des SI-Virus in das Gehirn durch die Einwanderung von infizierten Monozyten stattfindet, welche sich dann im Gewebe zu Makrophagen differenzieren.

In einer jüngeren Arbeit von Williams, Corey et al. (43) wurden fünf Versuchstiere zum Zeitpunkt des Virämiegipfels zwei Wochen nach Infektion untersucht. Dabei konnte man nachweisen, daß die Zellen in den perivaskulären Zellansammlungen allesamt Makrophagen und individuell unterschiedlich mit dem SI-Virus infiziert waren. Den Autoren gelang in ihrer Arbeit der Nachweis, daß perivaskuläre Makrophagen die vornehmlich infizierten Zellen im Rahmen einer cerebralen SIV-Infektion zum Höhepunkt der Virämie 14 Tage nach Infektion sind. (43) In der gleichen Arbeit konnte man bei allen Versuchstieren, welche mit SIV infiziert worden waren, 14 Tage nach Infektion SIV-DNS im frontalen Cortex und Stammhirn mit Hilfe der polymerase chain reaction nachweisen. (43) Das bedeutet also, daß das Virus zu einem sehr frühen Zeitpunkt das Gehirn infiziert, was auch von anderen Autoren so bestätigt wird. (4,23)

Alle oben zitierten Arbeiten untersuchten — in Analogie zu der hier vorliegenden Arbeit — Tiere in frühen Phasen der cerebralen Infektion vor Auftreten einer SIV-Enzephalitis.

Aufgrund dieser Arbeiten lassen sich zwei Theorien aufstellen:

1. Das Virus dringt mit Hilfe infizierter Monozyten/Makrophagen in das Gehirn ein, dadurch kommt es zu einer vermehrten Ansammlung von Makrophagen perivaskulär und/oder
2. Freies Virus oder Virusprotein dringt über die Gefäße in das ZNS ein und führt dort — also perivaskulär — zur Infektion von Makrophagen und konsekutiv zu einer lokalen Zunahme dieser Zellen.

Durch die Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit, welche vor allem die Zellzahlveränderungen in den verschiedenen Kompartimenten zum Ziel hat, werden die obigen Arbeiten und Theorien unterstützt:

In beiden, mit unterschiedlichen Virussubtypen ($SIV_{mac251}/32H$ und $SIV_{mac251}/MPBMC$) infizierten Untersuchungskollektiven (jeweils $n = 10$), ist beim Vergleich *innerhalb* der infizierten Versuchstiere ohne Enzephalitis die Zelldichte der Makrophagen perivaskulär — im Vergleich zur Zelldichte im Cortex und im subcorticalen Mark — signifikant am höchsten (Vergleiche Abbildung 3.2. und 3.4.). Wir weisen in unserer Arbeit somit ebenfalls nach, daß es in der frühen Infektionsphase zu einer deutlichen Akkumulation der perivaskulären Makrophagen kommt.

Ob nun diese kompartmentspezifische Vermehrung von perivaskulären Makrophagen durch die Einwanderung Virus infizierter Makrophagen bedingt ist oder eine Reaktion der Makrophagen auf über die Gefäße eingedrungenes Virus darstellt oder aus einer Kombination dieser beiden Ursachen resultiert, kann durch unsere Arbeit nicht beantwortet werden. Ferner konnte die zweithöchste Makrophagendichte *innerhalb* der Infizierten jeweils im Cortex gemessen werden.

Zum zeitlichen Ablauf der cerebralen SIV-Infektion werden Aussagen in der Arbeit von Williams und Corey gemacht (43). Mit Hilfe der polymerase chain reaction (PCR) gelang der Nachweis von SIV-DNS ab 14 Tagen nach Infektion und von da an zu allen späteren Zeitpunkten bis zur terminalen Entwicklung einer SIV-Enzephalitis oder AIDS. Im Gegensatz dazu konnte SIV-RNS bei Versuchstieren mit sieben bis 14 Tagen Infektionsdauer nachgewiesen werden, danach aber bis zum Auftreten von AIDS nicht mehr.

Die Autoren schließen daraus, daß das Virus sehr kurz nach intravenöser Infektion der Versuchstiere in das ZNS eindringt. Nach 14 Tagen Infektionsdauer wird die reproduktive Phase jedoch nicht weiter unterhalten oder deutlich minimiert, bis das Vollbild der AIDS-Erkrankung auftritt und virale RNS als Zeichen der Virusvermehrung wieder nachweisbar wird. (43)

Auch in der bereits weiter oben zitierten Arbeit von Clements und Babas (5), konnte dieser Verlauf der Nachweisbarkeit von Virus-RNS bzw. -DNS im Parenchym gezeigt werden, zusätzlich wurde aber dort die intrazerebrale Population der aktivierten Makrophagen und Mikrogliazellen immunhistochemisch quantifiziert. Dabei zeigte sich parallel zum Nachweis von SIV-RNS eine signifikante Zunahme dieser Zellen in der akuten Phase der Infektion (zehn Tage nach Inokulation), während in der asymptomatischen Phase (21 und 56 Tage Infektionsdauer) kein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren bestand.

Zusammen betrachtet, nahmen also die aktivierten Makrophagen/Mikrogliazellen in der Phase der aktiven Virusvermehrung (SIV-RNS-PCR positiv) signifikant zu. In der asymptomatischen Phase (21 Tage Infektionsdauer), in der Virus-RNS nicht mehr nachweisbar war, zeigte sich auch kein Unterschied in der Zellzahl von Makrophagen/Mikrogliazellen im Vergleich zu infektfreien Kontrolltieren. (5)

Wenn man nun die beiden obigen Arbeiten (5,43) zusammen mit der Aussage betrachtet, daß die hauptsächlich infizierten Zellen perivaskuläre Makrophagen sind (43), kann man daraus folgende Erkenntnisse ziehen:

1. Das SI-Virus dringt um den Zeitpunkt des Virämie Gipfels herum in das Gehirn ein und repliziert sich dort. Virus-RNS konnte schon nach sieben Tagen Infektionsdauer im Gehirn nachgewiesen werden.
2. Zum Zeitpunkt der Virusvermehrung konnte eine signifikante Zunahme der *perivaskulären* Makrophagen nachgewiesen werden.
3. Im weiteren Verlauf ging die Zellzahl der Makrophagen bis zum Auftreten einer SIV-Enzephalitis oder AIDS auf das Niveau der Kontrolltiere zurück.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit bestätigen Teile dieser Aussagen:

Zum einen konnte eine signifikante Zunahme der perivaskulären Makrophagen beobachtet werden, wenn man die Zelldichten in den drei verschiedenen Kompartimenten *innerhalb* der SIV positiven Versuchstiere miteinander vergleicht.

Zum anderen beobachteten wir in unserer Arbeit ebenfalls den Rückgang der Zelldichte der Makrophagen im zeitlichen Verlauf der Infektion für die Kompartimente „Cortex“ und „perivaskulärer Raum“. Hier wurde allerdings nur für das Kollektiv mit dem Virussubtyp SIV_{mac251}/MPBMC Signifikanz erreicht. (vergleiche Tabelle 3.5.)

Zusammenfassend lassen sich aus unseren Ergebnissen in Bezug auf die Makrophagen folgende Aussagen machen: Deutliche Zunahme der Makrophagen im perivaskulären Raum, da dort das Virus — auf die eine oder andere Weise — in das ZNS eindringt. Gleichzeitig signifikante Zunahme der Makrophagendichte im Cortex in beiden Kollektiven, wobei die Makrophagen die unspezifische Immunantwort repräsentieren. Für die Makrophagen Vermehrung in unserer Arbeit gab es keine morphologischen Hinweise auf andere Ursachen, wie z.B. ischämische Ereignisse oder Zelluntergänge.

Im zeitlichen Verlauf konnte ein Rückgang der Makrophagen-Zelldichte gemessen werden, der durch das Einsetzen der spezifischen — Lymphozyten vermittelten — Immunantwort erklärt werden kann. Eine Korrelation der Zelldichten von Lymphozyten und Makrophagen kann in unserer Arbeit nicht gezeigt werden (vergleiche Kapitel 3.4). Besonderheiten wie eine ausbleibende oder überschießende Immunantwort bei den Makrophagen kann durch das Vorkommen von „slow“- und „rapid progressors“ zum Teil erklärt werden oder sind methodisch bedingt. Insgesamt fällt eine hohe interindividuelle Variabilität bei unseren Versuchstieren auf.

Veränderungen der Zelldichten bei den Versuchstieren mit SIV-assoziiertes Enzephalitis

Insgesamt waren in der hier vorliegenden Arbeit Messungen der Zelldichten an vier Tieren mit SIV-assoziiertes Enzephalitis durchgeführt worden, wobei das vierte Versuchstier eine Behandlung mit Selegilin erfuhr und daher einzeln betrachtet werden muß, es wird daher zum Schluß besprochen.

Ein Versuchstier mit 20 Wochen Infektionsdauer und Infektion mit dem Virussubtyp SIV_{mac251}/32H zeigt die deutlichste Zunahme der Lymphozytendichte im subcorticalen weißen Mark, verglichen mit den Versuchstieren ohne Enzephalitis wird dort eine mehr als dreifach so hohe Zelldichte erreicht. Ebenfalls kann eine Zunahme der Zelldichte im Cortex gemessen werden, die aber längst nicht so deutlich wie in der weißen Substanz ausfällt, da der obere Wert des 68%-Vertrauensbereiches des Medians nur geringfügig überschritten wird. Im perivaskulären Raum bleibt die Zelldichte unter dem Niveau der Kontrolltiere und der Versuchstiere ohne Enzephalitis. (vergleiche Abbildung 3.5)

Beim Vergleich zu den SIV Infizierten ohne Enzephalitis weisen dort einzelne Versuchstiere mit ein und drei Wochen Infektionsdauer in einzelnen Kompartimenten höhere Lymphozytendichten als das Enzephalitis-Tier auf, diese Versuchstiere werden als „rapid progressors“ betrachtet. (Ergebnis aus den Rohwerten der Messungen, nicht dargestellt).

Bei den Makrophagen messen wir bei unserem Versuchstier eine sehr deutliche Zunahme der Zelldichte in allen drei Kompartimenten, die besonders im subcorticalen weißen Mark eine über zwanzigfache Zunahme der Makrophagendichte im Vergleich zu den Kontrolltieren und Tieren ohne Enzephalitis ergab. Die zweithöchste Zunahme der Makrophagen findet im Cortex statt. (vergleiche Abbildung 3.6)

Hier liegen auch die Meßwerte in allen drei Kompartimenten weit oberhalb der Meßwerte der einzelnen SIV-Versuchstiere ohne Enzephalitis (Ergebnis aus den Rohwerten der Messungen, nicht dargestellt).

Zusammenfassend beobachten wir eine deutliche Immunreaktion der Lymphozyten und Makrophagen, die am deutlichsten jeweils im subcorticalen weißen Mark gemessen werden kann. Die Immunreaktion der Makrophagen fällt quantitativ wesentlich höher aus als bei den Lymphozyten, bei der Messung der Makrophagendichte wird in allen

drei Kompartimenten die Zelldichte der Kontrolltiere und SIV – Infizierten deutlich überschritten. Die Ergebnisse spiegeln einen beginnenden bzw. stattgefundenen Zusammenbruch des spezifischen (lymphozytären) Immunsystems wieder, es kommt zu einer massiven Infektion, Vermehrung und Aktivierung der Makrophagen im ZNS. (44) Zwei weitere an SIV-Enzephalitis erkrankte Versuchstiere mit zwei und zwölf Wochen Infektionsdauer und Infektion mit dem Virussubtyp SIV_{mac251}/ MPBMC zeigen beim Vergleich miteinander individuelle Reaktionsmuster: Dabei fällt auf, daß das Tier mit zwei Wochen Infektionsdauer vor allem bei den Lymphozyten eine bis zu zehnfach höhere Zelldichte aufweist, als das Tier mit zwölf Wochen Infektionsdauer. Auch bei der Makrophagendichte reagiert dieses Tier stärker. (Ergebnisse aus den Rohwerten der Messungen, nicht dargestellt) Diese individuell unterschiedliche Reaktion erklärt auch die hohe Amplitude des Vertrauensbereiches des Medians in den im folgenden diskutierten Meßergebnissen (vergleiche Abbildung 3.7 und 3.8) In Anbetracht der Tatsache das dieses Versuchstier bereits nach zwei Wochen eine SIV-Enzephalitis entwickelt hat, gehen wir von einem „rapid progressor“ aus.

Beim Vergleich dieser beiden an Enzephalitis erkrankten Versuchstiere mit den Versuchstieren ohne Enzephalitis erkennt man bezüglich der Lymphozytendichte in allen drei Kompartimenten eine doppelt bis über dreifach so hohe Zelldichte, am ausgeprägtesten im Cortex und im perivaskulären Raum. (vergleiche Abbildung 3.7) Bei den Makrophagen ist die Zelldichte im perivaskulären Raum um das über achtfache im Vergleich zu den Tieren ohne Enzephalitis erhöht, im Cortex ist die Reaktion nicht ganz so deutlich. Bei dem „rapid progressor“-Versuchstier konnten keine Makrophagen im subcorticalen weißen Mark gemessen werden (Ergebnis aus den Rohwerten der Messungen), daher reicht der Median-Vertrauensbereich bis zur Nulllinie und die Aussage wird dadurch stark eingeschränkt. (vergleiche Abbildung 3.8) Zusammenfassend finden wir bei den Tieren mit SIV-Enzephalitis in beiden Viruskollektiven eine deutliche Zunahme der Lymphozyten im Bereich des subcorticalen Markes und des Cortex, wobei die Zelldichten beim Virussubtyp SIV_{mac251}/ MPBMC, bedingt durch den „rapid progressor“ mit nur 2 Wochen Infektionsdauer im Kollektiv, quantitativ höher ausfallen. Im Gegensatz dazu ist die Zunahme der Makrophagendichte beim Subtyp SIV_{mac251}/ 32H wesentlich ausgeprägter, generell in allen drei Kompartimenten, jedoch mit einer Betonung von subcorticalen

weißem Mark und dem Cortex im Vergleich zu den SIV-Infizierten ohne Enzephalitis. (vergleiche Abbildungen 3.5 bis 3.8)

Wenn man nun die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit mit Ergebnissen aus anderen Arbeiten vergleicht, beobachten andere Autoren ebenfalls eine Akkumulation von Makrophagen im Gehirn beim Auftreten einer HIV- bzw. SIV-Enzephalitis. (44)

In der Arbeit von Reinhart, Rogan et al. (31) hatten vier Versuchstiere mit zweieinhalb bis sechseinhalb Monaten Infektionsdauer eine AIDS Erkrankung entwickelt. Bei drei dieser Tiere konnte eine deutliche aktive Virusvermehrung durch den Nachweis von SIV-RNS im Cortex nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden bei zwei Versuchstieren mit AIDS mittels Immunhistochemie die Makrophagen markiert als auch das SI-Virus mit Hilfe von in situ-Hybridisierung dargestellt und so gezeigt, daß sie den vornehmlichen infizierten Zelltyp im ZNS darstellen, in welchem sich das SI-Virus produktiv vermehrt. (31) Mit den gleichen Untersuchungsmethoden wurden von Hurtrel, Chakrabarti et al. (17) sechs Versuchstiere mit einer Infektionsdauer von sieben Tagen bis zu drei Monaten untersucht, auch hier waren die Mehrheit der im Gehirn von SIV infizierten Zellen Makrophagen.

In einer Arbeit von Zink, Suryanarayana et al. (47) konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Makrophagen Anzahl im subcorticalen weißen Mark und der Schwere der Läsionen im ZNS bei Versuchstieren mit SIV-Enzephalitis gezeigt werden. Dies veranlaßt die Autoren zu der Aussage, daß die Zahl der entzündlich veränderten Makrophagen der beste Indikator für den neuronalen Schaden bei der SIV-Enzephalitis ist (44,47). In unserer Arbeit findet sich die größte Zunahme der Makrophagendichte in der subcorticalen weißen Substanz bei dem moribunden Versuchstier (Enzephalitis, Apathie, Gewichtsverlust; siehe Tabelle 2.2) mit 20 Wochen Infektionsdauer, somit läßt sich die These der obigen Arbeiten gut mit unserem Versuchstier vereinbaren, da die Enzephalitis zur klinischen Symptomatik führte und zum Abbruch des Experimentes veranlaßte.

Eine kompartmentspezifische Untersuchung in Bezug auf die Makrophagendichte wird in der Arbeit von Bissel, Wang et al. durchgeführt. (2)

Beim Vergleich der darin untersuchten Versuchstiere mit SIV-Enzephalitis im Vergleich zu denen mit SIV-Infektion ohne Enzephalitis fiel zunächst eine um fünf Größenordnungen höhere Virusvermehrung im Gehirn (Nachweis von SIV-RNS) bei den Versuchstieren mit Enzephalitis auf. Im weiteren untersuchten die Autoren mit Hilfe von Immunfluoreszenz oder enzymatischer Immunhistochemie quantitativ die Zelldichte der Makrophagen in den verschiedenen Kompartimenten des Gehirns. Dabei zeigte sich eine signifikante 25-fache Zunahme der Makrophagen im Bereich der frontalen neocorticalen grauen Substanz, weniger ausgeprägt auch in der weißen Substanz bei den Versuchstieren mit SIV-Enzephalitis. In einer weiteren Untersuchung konnte zusätzlich gezeigt werden, daß die — bei den an Enzephalitis Erkrankten — am deutlichsten in der frontalen neocorticalen grauen Substanz vermehrten Makrophagen auch die höchste Viruslast aufwiesen. (quantitativer immunhistochemischer Nachweis eines SIV-Hüllproteins) (2)

In der hier vorliegenden Arbeit war bei den Makrophagen im Cortex in beiden Kollektiven die jeweils zweithöchste Zunahme der Zelldichte bei den an Enzephalitis erkrankten Versuchstieren zu beobachten.

In einer Arbeit von Zink, Amedee et al. (46) wies man vor allem große, aktivierte und mit dem SI-Virus infizierte Makrophagen als perivaskuläre Anhäufungen nach. In einer anderen Arbeit von Williams, Schwartz et al. (45) vertreten die Autoren aufgrund ihrer Untersuchungen die Ansicht, daß es sich bei der SIV- oder HIV-Enzephalitis nicht um chronisch progressive Erkrankungen handelt, da perivaskuläre Ansammlungen von *infizierten mononukleären Zellen* im Gehirn erst mit dem Beginn von AIDS und dem Zusammenbruch des Immunsystems auftreten.

Dies kann in unserer Arbeit weder bestätigt noch widerlegt werden, da eine parallele Untersuchung auf gleichzeitigen Virusbefall (z.B. durch in situ-Hybridisierung) der untersuchten Zellen nicht Aufgabe dieser Arbeit war. Wir beobachteten allerdings auch bei den Versuchstieren ohne Enzephalitis eine zum Teil signifikante Zunahme der perivaskulären Makrophagen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die deutlichste Zunahme der perivaskulären Makrophagen — bis zu zwölfmal verglichen mit den

Versuchstieren ohne Enzephalitis — beobachten wir ebenfalls bei den Tieren mit Enzephalitis.

In der Arbeit von Lackner, Smith et al. (22) waren Rhesus Makaken mit einer Infektionsdauer von 96 bis 384 Tagen untersucht worden, von denen fünf Versuchstiere eine SIV-Enzephalitis mit zellulären Infiltraten entwickelten. In diesen Zellinfiltraten waren circa 90 bis 95 Prozent der Zellen Monozyten bzw. Makrophagen, die verbleibenden Zellen waren T-Lymphozyten.

In unserer Arbeit liegen beim Vergleich der Enzephalitis erkrankten Versuchstiere miteinander die Lymphozytendichten beim Virussubtyp SIV_{mac251}/ 32H um das vier- bis zu dreizehnfache unterhalb der Zelldichten der Makrophagen, dagegen übersteigen die Lymphozytendichten die der Makrophagen beim Virussubtyp SIV_{mac251}/ MPBMC um das bis zu sechsfache (Ergebnisse aus den Rohwerten der Messungen; nicht dargestellt), eine einheitliche Aussage läßt sich hier nicht treffen.

Bei Lackner, Smith et al. fanden sich wiederum zahlreiche Makrophagen und geringere Anzahlen von Lymphozyten in Assoziation zu Gefäßen, also perivaskulär. (22) In unserer Arbeit kann eine solche Aussage nicht getroffen werden, da je nach Virussubtyp die Lymphozyten oder Makrophagen im perivaskulären Raum überwiegen (vergleiche auch Abbildungen 3.5. bis 3.8)

Bedeutung haben die drei in der hier vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchstiere insofern, da sie in der von uns schwerpunktmäßig untersuchten Frühphase der SIV-Infektion bis zu 20 Wochen nach Infektion eine SIV-Enzephalitis entwickelten. Wenngleich die Fallzahl gering ist und interindividuelle Unterschiede des Organismus im Umgang und in der Abwehr der Infektion eine nicht unbedeutende Rolle spielen, sehen wir deutliche Tendenzen. Die Reaktion der Lymphozyten erfolgt vor allem kompartmentspezifisch, wir sprechen von einer lymphozytär-corticalen und lymphozytär-subcorticalen Reaktion.

Bei den Makrophagen findet mehr eine generelle Stimulierung oder Aktivierung mit Zunahme der Zelldichte im Regelfall in allen drei Kompartimenten statt.

Zum Schluß soll nun noch kurz auf das mit Selegilin behandelte Versuchstier mit zwölf Wochen Infektionsdauer eingegangen werden. Dort kommt es bei den Lymphozyten in den beiden Kompartimenten Cortex und perivaskulärer Raum zu einer deutlichen Zunahme der Zelldichte, die etwa in der Größenordnung der beiden anderen an SIV-Enzephalitis Erkrankten liegt. Bei den Makrophagen gehen wir aber nicht von einer generellen Aktivierung aus: Im subcorticalen weißen Mark und im perivaskulären Raum hatte sich die Zelldichte im Vergleich zu den SIV Infizierten ohne Enzephalitis circa verdoppelt, die gemessene Zelldichte für die perivaskulären Makrophagen blieb aber deutlich unterhalb des Niveaus der anderen Enzephalitis-Erkrankten. Im Kompartiment „Cortex“ konnten bei diesem Versuchstier keine Makrophagen gemessen werden. (vergleiche ebenfalls Abb. 3.7 und 3.8)

Selegilin ist ein selektiver Hemmstoff der Monoaminoxidase, die unter anderem Dopamin im ZNS abbaut. Da beim natürlichen Abbau chemisch aktive Verbindungen entstehen, die zellschädigend sein können, soll Selegilin neuroprotektiv wirken. (19) Durch die Wiederherstellung der cerebralen Cholin-Acetyltransferase Aktivität bei SIV-infizierten Versuchsaffen gab es bei Koutsilieri, Scheller, et al. (21) zusätzlich Hinweise für einen möglichen medikamentösen Einsatz in der Anti-Demenz Therapie.

Diesen positiven Eigenschaften von Seligilin stehen aber die Ergebnisse anderer Untersuchungen entgegen. Die Autoren (8,9) konnten dabei zeigen, daß es bei mit Selegilin behandelten, asymptomatischen Versuchstieren in der frühen Phase einer SIV-Infektion zu einer Vakuolisierung im ZNS kam, zur spongiformen Poliencephalopathie und zu enzephalitischen Läsionen. Überdies konnte eine vermehrte Replikation des SIV-Virus gezeigt werden und es gab Hinweise auf die Produktion von neurotoxischen Substanzen. Ausgehend von der Übertragbarkeit der Ergebnisse vom SIV-AIDS Modell auf menschliche Verhältnisse, gaben die Autoren daher zu Bedenken, daß der Einsatz dopaminergischer Medikamente eventuell zu einer Potenzierung der HIV-assoziierten neurologischen Erkrankungen (z.B. HIV-Enzephalitis, HIV-Demenz) führen könnte. (8,9)

In Bezug auf unser Versuchstier bleibt anzumerken, daß das Tier unter Behandlung mit Selegilin nach zwölf Wochen Infektionsdauer eine SIV-Enzephalitis entwickelte, wobei die Zunahme der Lymphozytendichte im Cortex sowie perivaskulär im Vergleich zu Versuchstieren ohne Enzephalitis im Vordergrund stehen.

5. Zusammenfassung

Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung von Gehirngewebe in der asymptomatischen Phase der SIV-Infektion zur Erfassung immunologischer Vorgänge bei der Entstehung einer SIV-Enzephalitis am Beispiel der gewebeständigen Lymphozyten und Makrophagen. Wir benutzten das etablierte SIV-AIDS Modell mit Makakenaffen. Untersucht wurden 24 Versuchstiere im Zeitraum von bis zu 20 Wochen, die zuvor mit einem der beiden Virusstämme (SIV_{mac251}/ 32H oder SIV_{mac251}/ MPBMC) infiziert worden waren, vier der Versuchstiere entwickelten eine SIV-Enzephalitis, eines dieser Tiere war mit Selegilin behandelt worden. Fünf weitere infektfreie Makaken dienten als Kontrollen. Nach definierten Zeiträumen wurden die Versuchstiere getötet, die Gehirne präpariert und mittels Immunhistochemie Lymphozyten und Makrophagen angefärbt. Im weiteren führten wir eine lichtmikroskopische Morphometrie, getrennt nach einzelnen Kompartimenten des Gehirns, wie Cortex, subcorticalem weißem Mark und perivaskulärem Raum, durch.

Die Ergebnisse unserer Arbeit — die infizierte, asymptomatische Tiere mit den Kontrolltieren vergleicht — zeigen eine ausgeprägte lymphozytäre Reaktion speziell im Cortex, zum Teil auch im subcorticalen Mark. Die Makrophagen zeigen eine Zunahme der Zelldichte perivaskulär und im Cortex, welche quantitativ deutlich unter der der Lymphozyten bleibt.

Die Tiere mit Enzephalitis zeigen allesamt eine corticale, wie auch subcorticale Zunahme der lymphozytären Zelldichte, bei den Makrophagen zeigt sich eine überwiegend generelle Stimulierung in allen drei Kompartimenten.

Die Ergebnisse unserer Arbeit — die sich durch die Untersuchung asymptomatischer Versuchstiere sehr gut an die Verhältnisse bei der HIV-Infektion annähert — lassen vermuten, daß es dem Immunsystem mit Hilfe der gewebeständigen Lymphozyten im Cortex und subcorticalen Mark für eine ganze Weile gelingt, den Ausbruch einer Enzephalitis und damit der AIDS Erkrankung zu verzögern.

Literaturverzeichnis

- 1 Banks, WA, Freed, EO, Wolf, KM, Robinson, SM, Franko, M, and Kumar, VB. Transport of human immunodeficiency virus type 1 pseudoviruses across the blood - brain barrier: role of envelope proteins and adsorptive endocytosis. *Journal of Virology* 75, 4681-4691. 2001.
- 2 Bissel, SJ, Wang, G, Ghosh, M, Reinhart, TA, III, SC, Cole, KS, Murphey-Corb, M, Piatak, M Jr, Lifson, JD, and Wiley, CA. Macrophages Relate Presynaptic and Postsynaptic Damage in Simian Immunodeficiency Virus Encephalitis. *American Journal of Pathology* 160, No.3, 927-941. 2002.
- 3 Busch, MP and Satten, GA. Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. *American Journal of Medicine* 102(5B), 117-124. 1997.
- 4 Chakrabarti, L., Hurtrel, M., Maire, M. A., Vazeux, R, Dormont, D., Montagnier, L., and Hurtrel, B. Early Viral Replication in the Brain of SIV - infected Rhesus Monkeys. *American Journal of Pathology* 139, No 6, 1273-1280. 1991.
- 5 Clements, JE, Babas, T, Mankowski, JL, Suryanarayana, K., Piatak, M Jr, Tarwater, PM, Lifson, JD, and Zink, MC. The central nervous system as a reservoir for simian immunodeficiency virus (SIV): steady - state levels of SIV DNA in brain from acute through asymptomatic infection. *The Journal of Infectious Diseases* 186(7), 905-913. 2002.
- 6 Cranage, M. P., Cook, N., Johnstone, P., Greenaway, P. J., Kitchin, P. A, Stott, E. J., Almond, N., and Baskerville, A. SIV infection of rhesus monkeys: in vitro titration of infectivity and development of an experimental vaccine, in "Proceedings of the International TNO Meeting on Animal Models in

AIDS" (Horzinek, M.C. & Schellekens, H.) (pp. 103-113). Elsevier, Amsterdam . 1990.

- 7 Czub, M., Czub, S., Gosztonyi, G., Koutsilieri, E., Sopper, S., Müller, J. G., Gerlach, M., Riederer, P., and ter Meulen, V. Effects of Selegiline in a retroviral rat model for neurodegenerative disease. *Journal of Neurovirology* 5, 458-464. 1999. 1999.
- 8 Czub, S, Czub, M, Koutsilieri, E, Sopper, S, Villinger, F, Müller, JG, Stahl-Henning, C, Riederer, P, ter Meulen, V, and Gosztonyi, G. Modulation of simian immunodeficiency virus neuropathology by dopaminergic drugs. *Acta Neuropathologica (Berl)* 107(3), 216-226. 2004.
- 9 Czub, S, Koutsilieri, E, Sopper, S, Czub, M, Stahl-Henning, C, Müller, JG, Pedersen, V, Gsell, W, Heeney, JL, Gerlach, M, Gosztonyi, G, Riederer, P, and ter Meulen, V. Enhancement of central nervous system pathology in early simian immunodeficiency virus infection by dopaminergic drugs. *Acta Neuropathologica (Berl)* 101(2), 85-91. 2001.
- 10 Czub, S., Müller, J. G., Czub, M., and Müller-Hermelink, H. K. Impact of various simian immunodeficiency virus variants on induction and nature of neuropathology in macaques. *Res.Virol.* 147, 165-170. 1996.
- 11 Desrosiers, RC. The simian immunodeficiency viruses. *Annual Review of Immunology* 8, 557-578. 1990.
- 12 Gallo, Robert C. and Montagnier, Luc. AIDS in 1988. *Scientific American* 259(4), 41-48. 1988.
- 13 Gendelman, HE, Lipton, SA, Tardieu, M, Bukrinsky, MI, and Nottet, HS. The neuropathogenesis of HIV-1. *Journal of Leukocyte Biology* 56, 387-388. 1994.

- 14 Giorno, R. A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn Immunol* 2 (3), 161-166. 1984.
- 15 Hahn, B., Shaw, G., Cock, KD, and Sharp P. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287, 607-614. 2000.
- 16 Holmes, EC. On the origin and evolution of the human immunodeficiency virus (HIV). *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 76(2), 239-254. 2001.
- 17 Hurtrel, B., Chakrabarti, L., Hurtrel, M., Maire, M. A., Dormont, D., and Montagnier, L. Early SIV encephalopathy. *Journal of Medical Primatology* 20(4), 159-166. 1991.
- 18 Hurtrel, B., Chakrabarti, L., Hurtrel, M., and Montagnier, L. Target cells during early SIV encephalopathy. *Res.Virol.* 144, 41-46. 1993.
- 19 Karow, Thomas and Lang-Roth, Ruth. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 311-311. 1996. 50259 Pulheim, 50931 Köln, Karow, Lang-Roth. 1996.
- 20 Kim, W. K., Corey, S., Alvarez, Xavier, and Williams, Kenneth C. Monocyte/macrophage traffic in HIV and SIV encephalitis. *Journal of Leukocyte Biology* 74(5), 650-656. 2003.
- 21 Koutsilieri, E., Scheller, C, Sopper, S., Gotz, ME, Gerlach, M., ter Meulen, V., and Riederer, P. Selegiline completely restores choline acetyltransferase activity deficits in simian immunodeficiency infection. *European Journal of Pharmacology* 411(1-2), R1-R2. 2001.
- 22 Lackner, AA, Smith, MO, Munn, RJ, Martfeld, DJ, Gardner, MB, Marx, PA, and Dandekar, S. Localization of Simian Immunodeficiency Virus in the

Central Nervous System of Rhesus Monkeys. *American Journal of Pathology* 139, No.3, 609-621. 1991.

- 23 Lackner, AA, Vogel, P, Ramos, RA, Kluge, JD, and Marthas, M. Early events in tissues during infection with pathogenetic (SIV mac239) and nonpathogenic (SIV mac1A11) molecular clones of simian immunodeficiency virus . *American Journal of Pathology* 145, 428-439. 1994.
- 24 Lane, JH, Sasseville, VG, Smith, MO, Vogel, P, Pauley, DR, Heyes, MP, and Lackner, AA. Neuroinvasion by simian immunodeficiency virus coincides with increased numbers of perivascular macrophages/microglia and intrathecal immune activation. *Journal of Neurovirology* 2, 423-432. 1996.
- 25 Mankowski, Joseph L., Clements, Janice E., and Zink, M. Christine. Searching for Clues: Tracking the Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Central Nervous System Disease by Use of an Accelerated, Consistent Simian Immunodeficiency Virus Macaque Model. *The Journal of Infectious Diseases* 186 (Suppl 2), 199-208. 2002.
- 26 Marcondes, M. C. G., Burudi, E. M. E., Huitron-Resendiz, S., Sanchez-Alavez, M., Watry, D., Zandonatti, M., Henriksen, S. J., and Fox, H. S. Highly Activated CD8(+) T Cells in the Brain Correlate with Early Central Nervous System Dysfunction in Simian Immunodeficiency Virus Infection. *The Journal of Immunology* 167, 5429-5438. 2001.
- 27 Naish, Sally J. Hrsg., Boenisch, Thomas, Farmilo, A. J., and Stead, R. H. *Handbuch II immunchemischer Färbemethoden*. 25. 1989. DAKO Corporation.
- 28 Naish, Sally J. Hrsg., Boenisch, Thomas, Farmilo, A. J., and Stead, R. H. *Handbuch II immunchemischer Färbemethoden*. 19. 1989. DAKO Corporation.

- 29 Nowak, M., Lloyd, A., Vasquez, G., Wiltout, T., Wahl, L., Bischofberger, N., Williams, J., Kinter, A., Fauci, A., Hirsch, V., and Lifson, J. Viral Dynamics of Primary Viremia and Antiretroviral Therapy in Simian Immunodeficiency Virus Infection. *Journal of Virology* 71, No. 10, 7518-7525. 1997. American Society for Microbiology.
- 30 Peluso, R., Haase, A., Stowring, L., Edwards, M., and Ventura, P. A trojan horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. *Virology* 147, 231-236. 1985.
- 31 Reinhart, TA, Rogan, MJ, Huddleston, D, Rausch, DM, Eiden, LE, and Haase, AT. Simian immunodeficiency virus burden in tissues and cellular compartments during clinical latency and AIDS. *The Journal of Infectious Diseases* 176, 1198-1208. 1997.
- 32 Schmitz, JE, Kuroda, MJ, Santra, S, Sasseville, VG, and Simon, MA. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection of CD8+ lymphocytes. *Science* 283, 857-860. 1999.
- 33 Sharer, LR, Micheals, J, Murphey-Corb, M, Hu, FS, Kuebler, DJ, Martin, LN, and Baskin, GB. Serial pathogenesis study of SIV brain infection. *Journal of Medical Primatology* 20, 211-217. 1991.
- 34 Smith, MO, Heyes, MP, and Lackner, AA. Early intrathecal events in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) infected with pathogenic or nonpathogenic molecular clones of simian immunodeficiency virus. *Laboratory Investigation* 72(5), 547-558. 1995.
- 35 Sopper, S., Koutsilieri, E., Scheller C., Czub, S., Riederer, P., and ter Meulen, V. Macaque animal model for HIV-induced neurological disease. *Journal of Neural Transmission* 109, 747-766. 2002. Springer Verlag.

- 36 Sopper, S., Nierwetberg, D., Halbach, A., Sauer, U., Scheller, C., Stahl-Henning, C., Mätz-Rensing, K., Schäfer, F., Schneider, T., ter Meulen, V., and Müller, J. G. Impact of simian immunodeficiency virus (SIV) infection on lymphocyte numbers and T-cell turnover in different organs of rhesus monkeys. *Blood* 101(4), 1213-1219. 2003.
- 37 Sopper, S., Sauer, U., Hemm, S., Demuth, M., Müller, J. G., Stahl-Henning, C., Hunsmann, G., ter Meulen, V., and Dörries, R. Protective Role of the Virus-Specific Immune Response for Development of Severe Neurologic Signs in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques. *Journal of Virology* 72, No. 12, 9940-9947. 1998.
- 38 Stahl-Henning, C., Voss, G., Dittmer, U., Coulibaly, C., Petry, H., Makoschey, B., Cranage, M. P., Aubertin, A. M., Lüke, W., and Hunsmann, G. Protection of monkeys by a split vaccine against SIV_{mac} depends upon biological properties of the challenge virus. *AIDS* 7, 787-795. 1993.
- 39 von Herrath, M, Oldstone, MBA, and Fox, HS. Simian immunodeficiency virus (SIV) - specific CTL in cerebrospinal fluid and brains of SIV - infected rhesus macaques. *The Journal of Immunology* 154, 5582-5589. 1995.
- 40 Weber, Jonathan N. and Weiss, Robin A. HIV infection: the cellular picture. *Scientific American* 259(4), 100-109. 1988.
- 41 Westmoreland, SV., Halpern, E, and Lackner, AA. Simian immunodeficiency virus encephalitis in rhesus macaques is associated with rapid disease progression. *Journal of Neurovirology* 4(3), 260-268. 1998.
- 42 Williams, Kenneth C., Alvarez, Xavier, and Lackner, Andrew A. Central Nervous System Perivascular Cells Are Immunoregulatory Cells That Connect the CNS With the Peripheral Immune System. *Glia* 36, 156-164. 2001.

- 43 Williams, Kenneth C., Corey, S., Westmoreland, Susan V., Pauley, D., Knight, H., deBakker, C., Alvarez, Xavier, and Lackner, Andrew A. Perivascular Makrophages Are the Primary Cell Type Productively Infected by Simian Immunodeficiency Virus in the Brains of Macaques: Implications for the Neuropathogenesis of AIDS. *The Journal of Experimental Medicine* 193, 905-916. 2001.
- 44 Williams, Kenneth C. and Hickey, William F. Central Nervous System Damage, Monocytes and Macrophages, and Neurological Disorders in AIDS. *Annual Review of Neuroscience* 25, 537-562. 2002.
- 45 Williams, Kenneth C., Schwartz, A., Corey, S., Orandle, M., Kennedy, W., Thompson, B., Alvarez, Xavier, Brown, Ch., Gartner, S., and Lackner, Andrew A. Proliferating Cellular Nuclear Antigen Expression as a Marker of Perivascular Makrophages in Simian Immunodeficiency Virus Encephalitis. *American Journal of Pathology* 161, 575-585. 2002.
- 46 Zink, MC, Amedee, AM, Mankowski, JL, and et al. Pathogenesis of SIV encephalitis. Selection and replication of neurovirulent SIV. *American Journal of Pathology* 151, 793-803. 1997.
- 47 Zink, MC, Suryanarayana, K., Mankowski, JL, Shen, A., Piatak, M Jr, Spelman, J. P., Carter, D. L., Adams, R. J., Lifson, J., and Clements, J. E. High Viral Load in the Cerebrospinal Fluid and Brain Correlates with Severity of Simian Immunodeficiency Virus Encephalitis. *Journal of Virology* 73, No. 12, 10480-10488. 1999.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich es nicht versäumen, allen zu danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst gilt mein größter Dank Herrn Prof. Justus G. Müller für die Vergabe dieser Arbeit und die Möglichkeit, diese im Institut der Pathologie der Universität Würzburg anfertigen zu können. Meinen herzlichsten Dank drücke ich ihm auch aus für die theoretische Einarbeitung und die Unterstützung bei der praktischen Durchführung, sowie für die Zeit für persönliche Gespräche und postalischen Austausch, ohne die ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ferner danke ich auch herzlich Frau Dr. Stefanie Czub, die mich unter anderem in die Techniken der Morphometrie einführte und im praktischen Teil der Arbeit stets hilfreich zur Seite stand.

Im weiteren danke ich ganz besonders herzlich Frau Dr. Imme Haubitz für die statistisch-mathematischen Beratungen, den unermüdlichen Einsatz dafür und manches mutmachende Wort.

Herzlicher Dank gilt auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Pathologischen Institutes der Universität Würzburg, allen voran den medizinisch-technischen AssistentenInnen, aber auch den Ärzten, Sekretärinnen und wissenschaftlichen MitarbeiternInnen.

Schließlich möchte ich noch „privaten“ Dank abstaten:

Meinen lieben Eltern und Geschwistern, die mich immer auf meinen privaten und beruflichen Wegen unterstützt haben, sei es durch ermutigendes Gespräch, durch Tat oder Gebet.

Nicht zuletzt auch meinen Freunden für die vielen schönen gemeinsamen Stunden und Jahre, sowie manchen Rat und manche Idee.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Henry Johannes Oskar Madlon
Geburtsdatum und -ort: 23. Juni 1970, Kulmbach
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1976 bis 1980 Grundschole in Bayreuth
1980 bis 1989 Wirtschafts-wissenschaftliches Gymnasium in Bayreuth (math.naturwissenschaftl.Zweig)
Juni 1989 Abitur
WS 1991/92 bis SS 1998 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
April 1994 Physikum
April 1995 1. Staatsexamen
September 1997 2. Staatsexamen
27. Oktober 1997 bis 30. September 1998 Praktisches Jahr, Innere Medizin und Chirurgie in der Missionsärztlichen Klinik Würzburg (mit Funktionswochen in der Gynäkologie, Urologie, Intensivstation, Radiologie und Sonographie/Endoskopie)
Wahlfach Pädiatrie Children's Hospital der University of Western Ontario, Kanada, in den Bereichen Genetik, Allgemeine Pädiatrie, Neurologie, Entwicklungsstörungen, Notfallmedizin und bei einem niedergelassenen community paediatrician
November 1998 3. Staatsexamen
Februar 1999 bis August 2000 Arzt im Praktikum in der Kinderklinik Aschaffenburg
18. August 2000 Approbation
September bis Dezember 2000 Assistenzarzt Neonatologische/Pädiatrische Intensivstation
Seit dem 01.04.2001 Assistenzarzt in der Kinderklinik Weiden
Seit dem 09.11.2005 Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin

Weiden, 12. April 2006