

Aus dem **Institut für Rechtsmedizin**
des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. K. Püschel

**Analyse des Expressionsmusters endothelialer und
leukozytärer Adhäsionsmoleküle bei bakterieller Meningitis**

Promotion

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Anna-Sophie Torke
aus Rendsburg
Hamburg 2007

angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 18.01.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. M. Tsokos

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Glatzel

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Lockemann

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung.....	4
2. Einleitung.....	5
2.1. Meningitis.....	5
2.2. Endotheliale und leukozytäre Adhäsionsmoleküle	12
3. Material und Methoden.....	14
3.1. Material.....	14
3.2. Histologie.....	15
3.3. Mikrobiologie.....	15
3.4. Tissue Micro Array (TMA).....	16
3.5. Meningitis-Array.....	17
3.6. Immunhistochemie.....	21
3.7. Statistik.....	22
4. Ergebnisse.....	23
4.1. Histologie der Meningitisfälle.....	23
4.2. Mikrobiologie der Meningitisfälle.....	25
4.3. Expression von P-Selektin.....	27
4.4. Expression von LFA-1.....	39
4.5. Expression von VCAM-1.....	41
5. Diskussion.....	42
5.1. Histologie der Meningitisfälle.....	42
5.2. Mikrobiologie der Meningitisfälle.....	42
5.3. Expression von P-Selektin.....	43
5.4. Expression von LFA-1.....	45
5.5. Expression von VCAM-1.....	46
5.6. Schlussfolgerungen.....	47
6. Zusammenfassung.....	50
7. Literaturverzeichnis.....	51
8. Danksagung.....	56
9. Lebenslauf.....	57
10. Eidesstattliche Versicherung.....	58

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Untersuchungen zur Expression endothelialer und leukozytärer Adhäsionsmoleküle bei bakterieller Meningitis an humanem Autopsiematerial (autoptisch definierte bzw. verifizierte, letal verlaufene Fälle) liegen bisher nicht vor. Deshalb ist es das Ziel dieser, auf humanem Autopsiematerial basierenden Untersuchungen, das Expressionsmuster endothelialer und leukozytärer Adhäsionsmoleküle auf Endothel bzw. Leukozyten in leptomeningealen und intrazerebralen Gefäßen in topographisch definierten Hirnarealen bei bakterieller Meningitis zu evaluieren. Das Expressionsmuster leukozytärer und endothelialer Adhäsionsmoleküle soll in Korrelation zu den jeweils individuellen Parametern nachgewiesener Erreger, systemische Mitbeteiligung (Sepsis), topographische Zuordnung zu den verschiedenen Hirnregionen mit nachweisbaren histopathologischen Veränderungen in den verschiedenen Hirnarealen und der Ausprägung des entzündlichen Infiltrates gebracht werden. Dabei wird das neue Verfahren der Tissue Micro Arrays (TMA) verwendet und für Entzündungen modifiziert.

In dieser Arbeit sollen speziell die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Wie verhält sich die lokale Expression der endothelialen und leukozytären Adhäsionsmoleküle P-Selektin, LFA-1 und VCAM-1 auf dem Endothel leptomeningealer und intrazerebraler Gefäße und auf Leukozyten in der Mikrostrombahn der Gefäße bei bakterieller Meningitis hinsichtlich der topographischen Zuordnung in den verschiedenen Hirnregionen im Vergleich zu nicht entzündlich verändertem Hirngewebe von autoptisch gewonnenen Kontrollfällen? 2. Im Rahmen von Einzelfallanalysen: Wie verhält sich das individuelle Expressionsmuster der genannten endothelialen und leukozytären Adhäsionsmoleküle vor dem Hintergrund des Vorliegens bzw. Fehlens einer Sepsis, dem nachgewiesenen Erregerspektrum, der Ausprägung des entzündlichen Infiltrates und bei Vorhandensein von Vaskulitis, Thrombosierungen und Enzephalitis?

2. Einleitung

2.1. Meningitis

Die Meningitis ist eine Entzündung der Hirn- und/oder Rückenmarkshäute (*Meningitis cereбрalis*, *Meningitis spinalis*). Ätiologisch kommen neben verschiedenen Erregern wie Bakterien, Viren, Protozoen und Pilzen auch Autoimmunprozesse, Malignome, Toxine oder auch eine vorausgegangene Bestrahlung als ursächlich in Betracht. Häufig liegt zugleich eine Entzündung des Hirngewebes (*Meningoenzephalitis*) vor.

Die eitrige Meningitis (*Meningitis purulenta*) ist eine perakut bis subakut verlaufende Infektion, die in der Regel durch die Bluthirnschranke überwindende Bakterien verursacht wird. Der häufigste Erreger der bakteriellen Meningitis in den westlichen Industrienationen ist zurzeit *Neisseria meningitidis* (Meningokokken). Weiterhin eine Rolle als Erreger spielen *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken), *Borrelia burgdorferi*, *Listeria monocytogenes* und Staphylokokken [30]. *Haemophilus influenzae* spielt im Gegensatz zu früher kaum noch eine Rolle als Meningitis-Erreger. Der Einsatz der *Haemophilus influenzae* Serotyp b-Vakzine hat zu einem deutlichen Rückgang von *Haemophilus influenzae*-Meningitiden in Europa im letzten Jahrzehnt geführt [30].

In den ersten Jahrzehnten des 20. Jahrhunderts verliefen bakterielle Meningitiden in der Regel tödlich. Sehr eindrucksvoll beschreibt Thomas Mann die Symptomatik des Krankheitsbildes in seinem 1947 erschienenen Roman „Doktor Faustus“ [20]; der kleine Nepomuk ist an bakterieller Meningitis, in einer Zeit vor der Antibiotika-Ära, erkrankt:

„Die ersten Merkmale eines alterierten Befindens mit eingerechnet, spielte das Ganze sich in knapp zwei Wochen ab, von denen die erste noch das schrecklich Bevorstehende niemanden – ich glaube, niemanden – ahnen ließ. [...] Ein Schnupfen trübte die süße Klarheit seiner Augen – es war gewiss auch nur diese lästige Affektion, die ihm die Esslust raubte, ihn verdrießlich stimmte und die Somnolenz verstärkte, zu der er, seit wir ihn kannten, geneigt hatte. [...] Bald

trat eine Intoleranz gegen Licht und Töne hervor, beunruhigender als die bisherige Verstimmung. [...] Nepomuk hatte ein jähes, eruptionsartiges Erbrechen gehabt, und zugleich mit Fieber von allerdings nur mittleren Graden hatten Kopfschmerzen eingesetzt, die sich binnen wenigen Stunden ins offenbar Unerträgliche steigerten. Das Kind war, als der Doktor kam, schon zu Bett gebracht worden, hielt sich das Köpfchen mit beiden Händen und stieß Schreie aus, die sich oft, eine Marter für jeden, der es hörte [...] bis zum letzten Rest des Atems verlängerten. [...] Dann riss ein neues wildes Erbrechen es auf, von dem es unter Zuckungen zurücksank. Kürbis prüfte des Kindes Augen, deren Pupillen sehr klein zusammengezogen waren, und die eine Neigung zum Schielen zeigten. Der Puls eilte. Muskelkontraktionen und eine beginnende Starre des Nackens waren deutlich. Es war Cerebrospinal-Meningitis, die Hirnhautentzündung [...]. Nepomuk Schneidewein, Echo, das Kind, [...] entschlief [...]. Die Eltern nahmen den kleinen Sarg mit sich in ihre Heimat.“

Obwohl seit Beginn der Antibiotika-Ära die Letalität der bakteriellen Meningitis erheblich zurückgegangen ist, liegt je nach Erreger die Letalität der Erkrankung derzeit immer noch bei 5-40%.

Nachdem die Prophylaxe bezüglich der Pneumokokken in Deutschland ausgebaut und die Impfung gegen *Haemophilus influenzae* in die Routineimpfprogramme aufgenommen wurde (Impfung gegen den Serotyp b bei Kleinkindern seit 1990 von der ständigen Impfkommision des Bundesgesundheitsamtes empfohlen) sind Meningokokken die mit Abstand häufigsten Erreger der eitrigen Meningitis und für etwa 50% aller erfassten Fälle verantwortlich. Zweithäufigster Erreger der bakteriellen Meningitis in der Bundesrepublik ist derzeit *Streptococcus pneumoniae*; auf den Plätzen drei bis fünf rangieren *Borrelia burgdorferi*, *Listeria monocytogenes* und Staphylokokken [30].

Als Reservoir für Meningokokken fungiert ausschließlich der Mensch. Asymptomatisches Trägertum ist sehr häufig (>40% aller Erwachsenen sind Keimträger). Kinder in den ersten

fünf Lebensjahren sind am häufigsten betroffen. Die Übertragung der gramnegativen Erreger erfolgt durch Kontakt mit respiratorischen Sekreten („Tröpfcheninfektion“). Als Risikofaktoren für eine Meningokokken-Infektion zählen respiratorische Infekte und Exposition gegenüber Zigarettenrauch [10]. Die Inkubationszeit beträgt meist weniger als vier Tage. Es können acht humanpathogene Untergruppen (Serogruppen) der Meningokokken (A, B, C, X, Y, Z, W-135, L) differenziert werden. In Deutschland werden ca. 90% aller invasiven Meningokokken-Infektionen durch die beiden Serogruppen B und C verursacht [10].

Für das Jahr 2004 wurden dem Robert-Koch-Institut insgesamt 603 Fälle invasiver Erkrankungen durch Meningokokken übermittelt. Im Jahr 2004 wurden 47 Personen mit invasiver Meningokokken-Erkrankung als krankheitsbedingt verstorben gemeldet; die Gesamtleitilität lag damit bei 8% [31].

Eine positive Kultur aus normalerweise sterilen Medien wie Blut oder Liquor gilt als direkter Nachweis des Erregers und beweist die Infektion. Allerdings ist der kulturelle Nachweis nicht immer möglich und eine negative Blutkultur schließt eine Meningokokken-Infektion nicht aus, da *Neisseria meningitidis* sehr empfindlich auf physikalische, chemische und thermische Noxen reagiert [1]. Auch der mikroskopische Nachweis des gramnegativen Erregers, der Antigen-Nachweis oder die Polymerasekettenreaktion sind übliche Nachweismethoden.

Pneumokokken führen zu vielen verschiedenen Krankheitsbildern. Neben Otitis media, Sinusitis und chronischer Bronchitis sind vor allem die Meningitis, die ambulant erworbene Pneumonie und Sepsis zu nennen. Laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation sterben weltweit etwa 2 Millionen Menschen an den Folgen einer Pneumokokken-Infektion. Die Zahl der asymptomatischen Keimträger ist besonders im Kindesalter sehr hoch (60% der Kinder, 10% der Erwachsenen). Als Reservoir für *Streptococcus pneumoniae* ist fast ausschließlich der Nasopharynx des Menschen zu nennen, allerdings können nur bekapselte Pneumokokken-

Stämme Infektionen hervorrufen. Eine Pneumokokken-Meningitis tritt häufig im Anschluss an eine Infektion der Atemwege durch Pneumokokken auf. Die Letalität einer durch *Streptococcus pneumoniae* hervorgerufenen Meningitis kann bis zu 80% betragen, je nach Begleiterkrankungen und Risikofaktoren und findet ihren saisonalen Häufigkeitsgipfel von November bis April. Kinder unter fünf Jahren und Erwachsene über 60 Jahren sind am häufigsten betroffen. Die grampositiven Stäbchen werden entweder direkt mikroskopisch oder in der Liquor- und/oder in der Blutkultur nachgewiesen. Der zur Verfügung stehende Impfstoff deckt etwa 90% der Serotypen aller infektiösen Pneumokokkenstämme ab, jedoch ist die zunehmende Antibiotikaresistenz ein Problem, besonders im osteuropäischen und südwesteuropäischen Raum.

Dem klassischen pathologisch-anatomischen Konzept folgend wird zwischen Haubenmeningitis und basaler Meningitis unterschieden. Hierbei findet sich gelblicher oder gräulich-gelblicher Eiter entweder über der Großhirnkonvexität oder an der Hirnunterseite.

Bei perakut tödlich verlaufenden Fällen, speziell beim Waterhouse-Friderichsen-Syndrom, lässt sich häufig makroskopisch allenfalls eine vermehrte Gefäßzeichnung der Hirnoberfläche nachweisen [35,44]. Bei diesen perakut zum Tode führenden Fällen ist histologisch zum Teil noch überhaupt keine Entzündung der Leptomeningen nachzuweisen, zum Teil finden sich aber auch vereinzelte Granulozyten im Bereich der weichen Hirnhaut [35,39].

Im Frühstadium der voll ausgebildeten eitrigen Meningitis zeigt sich der Subarachnoidalraum histologisch von reichlich Granulozyten infiltriert [17]. Entsprechend der chronomorphologischen Abfolge der Entzündungsreaktion treten nach wenigen Tagen zunehmend Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen im Subarachnoidalraum auf. Bakterien lassen sich in diesem Stadium sowohl extrazellulär als auch intrazellulär nachweisen. Neben den pathologischen Veränderungen im Subarachnoidalraum lässt sich, insbesondere bei der eitrigen Meningitis nach mehrtägigem Krankheitsverlauf, ein vielfältiges

histomorphologisches Bild zerebrovaskulärer und zerebroparenchymatöser Veränderungen finden [10,17,37,38,43]. Hierzu zählen fibrinoide Gefäßwandnekrosen und Thrombosierungen, Ventrikulitis und umschriebene Hirnparenchymnekrosen [3,10,17]. Leptomeningeale und intrazerebrale Vaskulitiden, die sowohl arterielle als auch venöse Gefäße verschiedensten Kalibers betreffen, sind fast regelhaft bei dem Vollbild der bakteriellen Meningitis nachzuweisen [38,43]. Eine Intimaverdickung der betroffenen Gefäße ist nach mehrtägigem Krankheitsverlauf nicht selten zu beobachten [43]. Komplikationen solcher Vaskulitiden sind fokale Ischämien mit nachfolgenden Infarzierungen des Hirngewebes.

Eine Meningitis kann nur dann ausbrechen, wenn die Erreger in den Subarachnoidalraum gelangen. Hierfür kommen prinzipiell zwei Wege in Betracht - entweder durch einen Defekt der Dura mater (z.B. nach Schädel-Hirn-Trauma oder neurochirurgischen Eingriffen) oder hämatogen mit nachfolgender Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch die Erreger. Auch eine per continuitatem Ausbreitung der Erreger („Durchwanderungs-Meningitis“) von einem Infektionsherd in der Nachbarschaft (z.B. Sinusitis, Otitis, Mastoiditis) mit nachfolgender Besiedlung des Subarachnoidalraumes durch die Meningitiserreger ist möglich [3].

In etwa 13% der Fälle kommt es bei der bakteriellen Meningitis zu einer Sepsis [13]; Schwere und Dauer einer die Erkrankung komplizierenden Sepsis beeinflussen die Letalität der Betroffenen erheblich.

Die Störung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke bei bakterieller Meningitis beruht offenbar im wesentlichen auf einer Separation der interzellulären tight junctions des Endothels der Leptomeninxkapillaren [28,42,43,44], die den bakteriellen Erregern die Invasion in den Subarachnoidalraum ermöglicht. Aber auch die direkte Penetration der Endothelien mit nachfolgender Migration der Erreger in den Subarachnoidalraum wird als alternativer Weg diskutiert [40,41] - eine erhöhte pinozytische Aktivität des Endothels der Blut-Hirn-

Schranke ist z.B. vom *capillary leakage* (Eindringen eiweißreicher Flüssigkeit) im Rahmen verschiedener Formen des Hirnödems bekannt. Das Auftreten leptomeningealer Vaskulitiden bei bakterieller Meningitis ist nach klinischer Einschätzung mit einem prognostisch ungünstigen Verlauf hinsichtlich letalen Ausgangs und bei Überlebenden mit gravierenden, persistierenden zentralnervösen Beeinträchtigungen korreliert [12,22,24]. In der Frühphase können an diesen (arteriellen und venösen) Gefäßen, neben Separation der tight junctions und Schwellung der Endothelzellen, pinozytotische Vesikel in den Endothelzellen und subintimale granulozytäre Infiltrate nachgewiesen werden [28,42]. In venösen Gefäßen (z.B. Hirnsinus, Kortexvenen) können Thrombosen mit nachfolgenden zerebralen hämorrhagischen Infarzierungen resultieren. Eine obliterierende Arteriitis oder arterielle Endangitis kann anämische Infarkte des Hirngewebes nach sich ziehen. Die Pathophysiologie dieser sehr wahrscheinlich durch einen Endothelzellschaden getriggerten leptomeningealen Vaskulitiden ist nicht abschließend geklärt [24,25]. Die Leukozyten-Infiltration in den Subarachnoidalraum wird über ihre rezeptorvermittelte Adhäsion an Gefäßendothelien vermittelt [3,21]. Eingeleitet wird dieser Prozess durch verschiedene Entzündungsmediatoren wie Zytokine oder bakterielle Lipopolysaccharide, die die Synthese bzw. Freisetzung verschiedener endothelialer und leukozytärer Adhäsionsmoleküle induzieren.

Die Prognose der bakteriellen Meningitis wird durch das Alter der/des Betroffenen, den jeweiligen Erreger, die neurologische Symptomatik, Vorhandensein einer generalisierten systemischen Mitbeteiligung (Sepsis), den Zeitraum des Beginns der Erstsymptome bis zur Diagnosestellung und somit den Zeitpunkt des Beginns einer (adäquaten) antibiotischen Therapie und von dem Einsatz einer ausreichenden supportiven Therapie bestimmt [43]. Risikofaktoren bzw. Erkrankungen, die das Anlaufen einer Meningitis begünstigen, sind unter anderem Zustände, die das Immunsystem schwächen, wie Alkoholismus, Diabetes mellitus, Splenektomie, besonders mit OPSI-Syndrom (overwhelming postsplenectomy infection

syndrome), und Immunsuppressionstherapie. Außerdem sind penetrierende Verletzungen des Schädeldaches und der harten Hirnhaut zu nennen, die eine Eintrittspforte für Erreger sein können, z.B. Schädel-Hirn-Traumata, neurochirurgische Eingriffe, und intrakraniell implantiertes Fremdmaterial (z.B. Sonden zur Hirndruckmessung, Ventrikeldrainagen). Schließlich stellen entzündliche Prozesse im Körper, wie Pneumonie, Endokarditis, Sinusitis, Otitis und/oder Mastoiditis einen weiteren möglichen Ausgangspunkt für eine bakterielle Meningitis dar.

Todesursächlich ist, auch in Abhängigkeit von Schwere und Dauer einer Sepsis, eine Erhöhung des intrakraniellen Druckes [3,38]. Die Erhöhung des intrakraniellen Drucks führt in einem *circulus vitiosus* (über eine verminderte zentrale Perfusion, einhergehend mit einer metabolischen Azidose) zu einer zerebralen Vasodilatation. Hierdurch kommt es zu einer weiteren Hirndruckzunahme und letztlich zu zerebraler Minderperfusion und letaler zentraler Dysregulation [6]. Bei einer akuten bakteriellen Meningitis ist das Hirnödem meist eine Kombination eines vasogenen, zytotoxischen und interstitiellen Ödems. Zerebrovaskuläre Komplikationen wie lokale Gefäßengstellungen, aber auch -erweiterungen, arterielle Okklusionen, Thrombosen von Hirnsinus und Kortexvenen sowie Vaskulitiden (sowohl Arteriitis als auch Phlebitis) sind die häufigsten Meningitis-assoziierten intrakraniellen Komplikationen und, neben dem Ausmaß einer septischen Multiorgandysfunktion, die entscheidenden prognostischen Determinanten für die Mortalität der bakteriellen Meningitis [26].

Nach dem seit dem 01.01.2001 geltenden *Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen* („Infektionsschutzgesetz“) besteht für die Meningokokken-Meningitis und den direkten Nachweis von *Haemophilus influenza* aus Liquor oder Blut eine Meldepflicht an das jeweils zuständige Gesundheitsamt.

2.2. Endotheliale und leukozytäre Adhäsionsmoleküle

Endothelzellaktivierung und Endothel-Leukozyten-Interaktion sind die grundlegenden Mechanismen der Entzündung. Die Extravasation und transendotheliale Migration von im Blutstrom zirkulierenden Leukozyten an den Ort der Entzündung ist das Charakteristikum und eigentliche Schlüsselereignis der inflammatorischen Antwort. Die Kommunikation von Endothel und Leukozyten wird durch endotheliale und leukozytäre Adhäsionsmoleküle, die auf der Zelloberfläche auf Zytokin-Stimuli hin exprimiert werden, reguliert. Die Adhäsionsmoleküle werden nach ihrer chemischen Struktur in drei Gruppen (Selektine, Integrine und Immunglobulin-Superfamilie) unterteilt [36,23,2]. Neben ihrer Hochregulierung bei Infektion und Sepsis werden Adhäsionsmoleküle auch bei Trauma, Schock, chronischen entzündlichen Erkrankungen und Reperusionsprozessen im Rahmen der inflammatorischen Kaskade auf Leukozyten und Endothelzellen verstärkt exprimiert.

Bei der Extravasation neutrophiler Granulozyten in das Gebiet der Inflammation wird der erste Schritt, der initiale Kontakt der Neutrophilen mit den Endothelzellen und das Entlangrollen (*rolling*; transiente, instabile Endothel-Leukozyten-Adhäsion) an der Endotheloberfläche, von der Expression dreier verschiedener Selektine (E-Selektin, von aktivierten Endothelzellen de novo synthetisiert; P-Selektin, präformiert in Endothelzellen gespeichert; L-Selektin, auf Leukozytenoberfläche exprimiert) gesteuert. Im zweiten Schritt kommt es zum festen Anhaften der Neutrophilen an das Endothel und zur Diapedese, vermittelt durch die Verbindung von Endothel und Leukozyten über ihre entsprechenden Liganden aus der Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie (z.B. ICAM-1, VCAM-1) und der Integrine (z.B. LFA-1, VLA-4) [2,8,18,36]. Im Entzündungsprozess führt dieser Zell-Zell-Kontakt zum Zusammenkleben von Leukozyten und Endothel (*sticking*; feste Adhäsion) und zur Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit des Blutes im Kapillarbett. Diese Leukozytenadhäsion ist ein initialer Schritt der natürlichen Keimabwehr des Organismus und

korreliert mit dem Ausmaß der Leukozytenaktivierung im Rahmen von Infektion und Sepsis. Die schwere Zerstörung des endothelialen Zellverbandes durch Leukozytenadhäsion in der Frühphase der Infektion in der Peripherie der systemischen Zirkulation ist mitverantwortlich für den Verlust der Barrierefunktion des Endothels und führt durch das *capillary leakage* zur Extravasation von Plasmawasser und Eiweißverlust [11,29,19].

Selektine steuern die initiale Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel. Dabei interagieren sie mit Kohlenhydrat-Liganden und vermitteln das initiale *rolling* der Leukozyten am Endothel und initiieren damit den nachfolgenden transendothelialen Migrationsprozess. P-Selektin (CD 62P) stellt hierbei den frühesten exprimierten Rezeptor während der Entzündungsreaktion dar und bindet an den sulfatierten Sialyl-Lewis-Komplex. CD 62P ist auf aktiviertem Endothel und auf Thrombozyten zu finden.

Integrine binden an Zelladhäsionsmoleküle und stärken die Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothelzellen. Das *rolling* wird dadurch verlangsamt und ein stärkerer Kontakt zwischen Leukozyt und Endothel wird initiiert. Die Rezeptoren setzen sich aus zwei Anteilen zusammen, einem alpha- und einem beta-Teil, wobei der alpha-Anteil der spezifische von beiden ist, der beta-Anteil ist bei den Integrinen gleich. LFA-1 (CD11a) wird auf Monozyten, T-Zellen, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert und bindet nach einer induzierten Konformationsänderung an ICAM-1 und ICAM-2.

ICAM, VCAM und PECAM sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie. Sie sind der endotheliale Ligand für die Integrine und sorgen zusammen mit ihnen für eine feste Bindung zwischen Leukozyt und Endothel. VCAM-1 (CD 106) ist auf aktiviertem Endothel zu finden und bindet an dem Integrin VLA-4.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Im Zeitraum 1995 bis 2004 wurden im Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bei 17 Obduktionsfälle von an Meningitis Verstorbener Hirngewebe asserviert. Es wurden aus folgenden Hirnarealen standardmäßig Gewebeproben entnommen: Großhirnrinde, Großhirnmark, Kleinhirn und Hirnstamm. Die Gewebeproben wurden primär in Formalin fixiert und später in Paraffin gegossen. Nach histologischer und mikrobiologischer Sicherung der Diagnose Meningitis wurden sie dem zu untersuchenden Kollektiv zugeordnet.

Als Meningitis-Kontroll-Material wurde im Zeitraum von 1998 bis 2005 von zehn Obduktionsfällen Gewebe aus entsprechenden vier Hirnarealen asserviert. Die Verstorbenen der Kontrollgruppe verstarben meist an kardialen Ursachen. Auch diese Gewebeproben wurden primär Formalin fixiert und später in Paraffin gegossen.

Das Standard-Control-Tissue des Meningitis-Arrays, das verwendet wurde um die immunhistochemische Färbung zu prüfen, entstammt dem Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Welche Gewebe im Detail verwendet wurden findet sich im Abschnitt Meningitis-Array (3.5.). Diese wurden ebenfalls primär in Formalin fixiert und später in Paraffin gegossen.

3.2. Histologie

Nach der Paraffineinbettung wurden die angefertigten Schnitte (Schnittdicke ca.5µm) mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt und folgendermaßen auf ein dafür entwickeltes standardisiertes Protokoll von drei Untersuchern beurteilt:

- Lokalisation der Inflammation (Haube, basal, Haube + basal)
- vorherrschender Zelltyp des entzündlichen Infiltrates (Granulozyten, Makrophagen, gemischtzelliges Infiltrat) und Grad der Ausprägung (gering, mäßig, stark)
- Vorliegen einer Begleitenzephalitis, einer Vaskulitis und von Thrombosierungen

3.3. Mikrobiologie

Vom Autopsiematerial wurden Abstriche für mikrobiologischer Untersuchungen genommen und so die Erreger typisiert. Nach der Paraffineinbettung wurden die angefertigten Schnitte nach Gram gefärbt und die Morphologie der Erreger untersucht. Aus den Sektionsunterlagen wurde auf eine mögliche Antibiotikatherapie und vorangegangene Splenektomie hin evaluiert. Außerdem wurden autoptische Hinweise für das Vorliegen eines septischen Geschehens berücksichtigt.

3.4. Tissue Micro Array (TMA)

Das Prinzip der TMA-Herstellung wurde bereits umfassend beschrieben [16,33]. Das *Tissue Micro Array-Verfahren* (TMA) erlaubt das Einbringen von bis zu tausend Gewebezyclindern (bei Durchmesser 0,6mm) aus histologisch definierten Regionen verschiedener Gewebetypen in einen einzigen Paraffinblock. Die Funktionsweise des „Arrayers“ ist in Abb. 1 dargestellt.

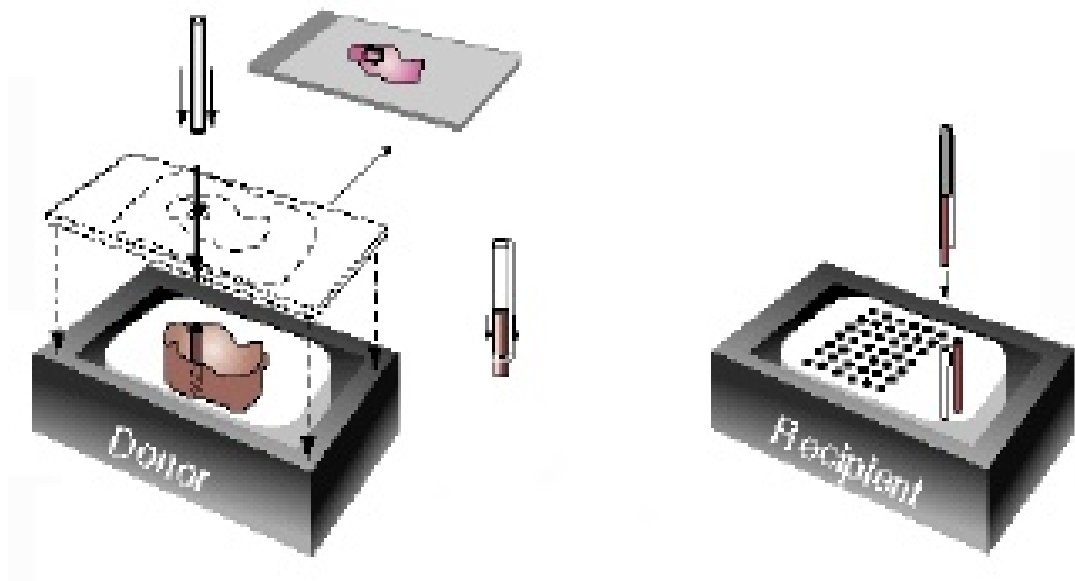


Abb. 1: Tumor-Array-Herstellung. Das Instrument besteht aus einem dünnen, an der Spitze geschärften Hohlzylinder (innerer Durchmesser ca. 600 μm), welcher in einem X-Y-Achsen-Präzisionsgerät gehalten wird. Ein genau in den Hohlzylinder passender Stahldraht ermöglicht das Ausstoßen von gestanzten Gewebestücken in, mit einem analogen Instrument (äußerer Durchmesser ca. 600 μm), vorgefertigte Löcher im Empfängerblock (Tumor-Array). Ein verstellbarer "Eindring-Stopper" sichert eine konstante Länge von Zylindern und vorgefertigten Löchern im Empfängerblock. Bis zu tausend Gewebezyclinder können in einen 20 x 40 mm messenden Empfänger-Paraffinblock eingebracht werden.

3.5. Meningitis-Array

Für den eigens von uns für diese Studie in Kooperation mit der Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf entwickelten Meningitis-Array wurden statt 0,6mm Stanzen 4mm Stanzen verwendet. Diese Modifikation ermöglicht eine bessere Übersicht über den Bereich der Inflammation, dessen Ausprägung lokal leicht variieren kann. Um die entzündungsstärksten Areale der vier Hirnregionen Großhirnrinde, Großhirnmark, Kleinhirn und Hirnstamm der einzelnen Fälle sicher zu stanzen, wurden diese im Vorfeld histologisch gesichert und markiert. Aus diesen Arealen wurden aus dem Paraffinblock die Stanzen entnommen und in den Empfängerblock transferiert. Bei einer Stanzengröße von 4mm konnten 18 Gewebezyylinder in den 20x40mm messenden Empfänger Paraffinblock eingebracht werden. Um die Qualität der immunhistochemischen Färbung zu kontrollieren, wurden weitere 38 Gewebezyylinder im Durchmesser von 0,6mm auf den noch freien unteren Teil des Empfängerblockes eingestantzt, das so genannte *Standard-Control-Tissue*. Bei jeweiliger Berücksichtigung der vier genannten Hirnareale fanden vier komplette Fälle und zwei Gewebstanzen eines weiteren Falles pro neu entstandenem Empfängerblock Platz, so dass zwei unterschiedliche Anordnungen des Materials auf den Blöcken nötig wurden (siehe Abb. 2 und Abb. 3). Insgesamt entstanden sechs Empfängerblöcke, die das gesamte Gewebematerial der 17 Meningitis-Fälle, der zehn Meningitis-Kontrollfälle und das *Standard-Control-Tissue* enthielten. Der Aufbau der einzelnen Blöcke wird in den Abb. 2 und 3 genauer dargestellt.

Auf jeden Empfängerblock wurde das *Standard-Control-Tissue* in bekannter TMA-Technik eingebracht. Dabei wurden insgesamt 38 Stanzen von 0,6mm Durchmesser folgender Gewebetypen genutzt: je zwei Stanzen Herz, Niere, Lunge, Kolon Mukosa, Endometrium, Prostata, Lymphknoten, Quergestreifte Muskulatur und Haut; je fünf Stanzen Mamma-

Karzinom, Lungen-Karzinom (zusammengesetzt aus 3 Stansen Plattenepithelkarzinom und 2 Stansen Adenokarzinom), Kolon-Karzinom und Prostata-Karzinom.

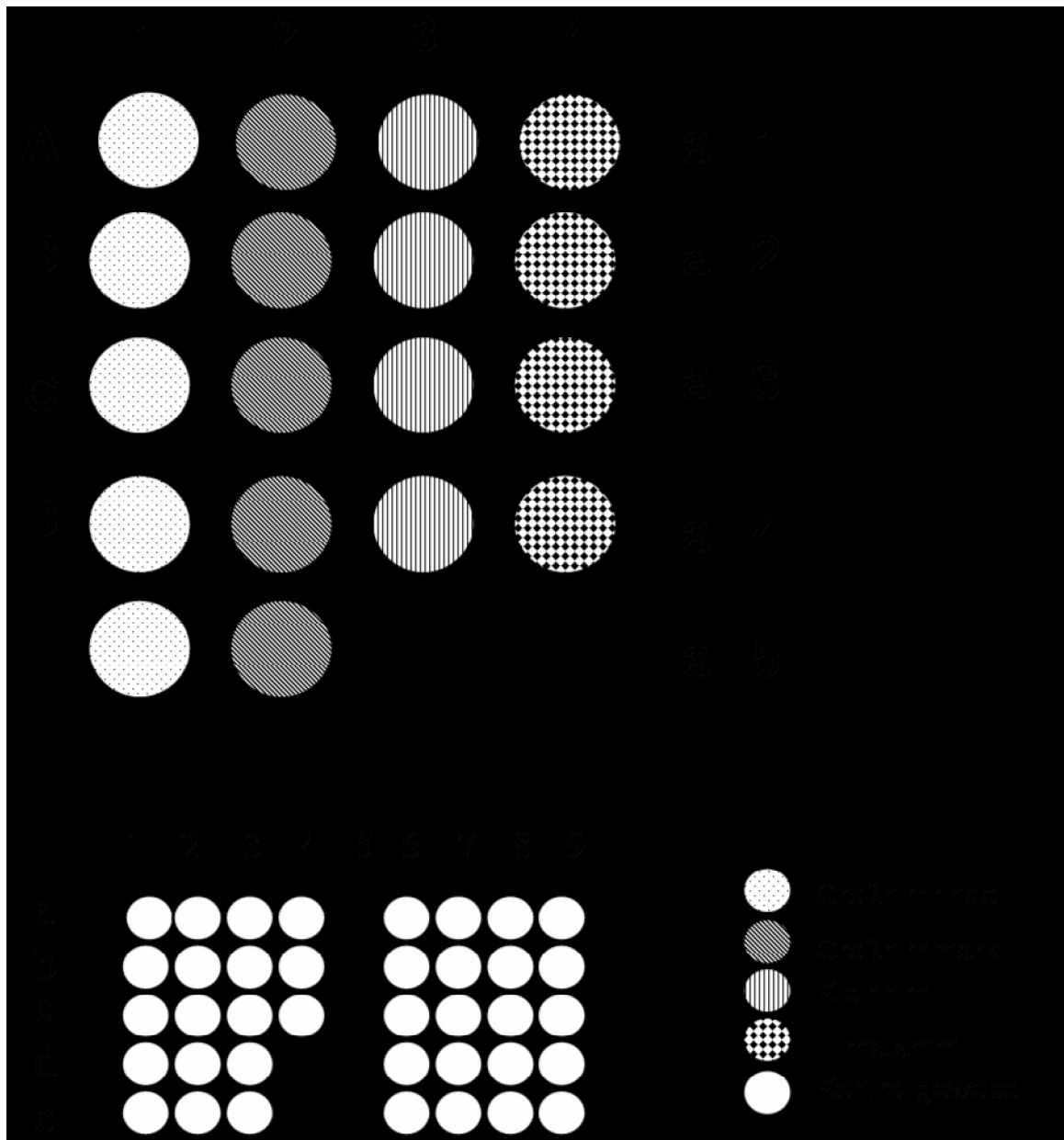


Abb. 2: Aufbau des Meningitis-Array Block 1. Alle ungeraden Blöcke enthalten in der Spalte 1 Gewebzylinder mit Großhirnrinde. Spalte 2 entspricht Gewebe aus dem Großhirnmark, Spalte 3 enthält Kleinhirn. Hirnstamm findet sich in Spalte 4. Das Kontrollgewebe (a1 bis e9) setzt sich auf allen Blöcken gleichermaßen zusammen.

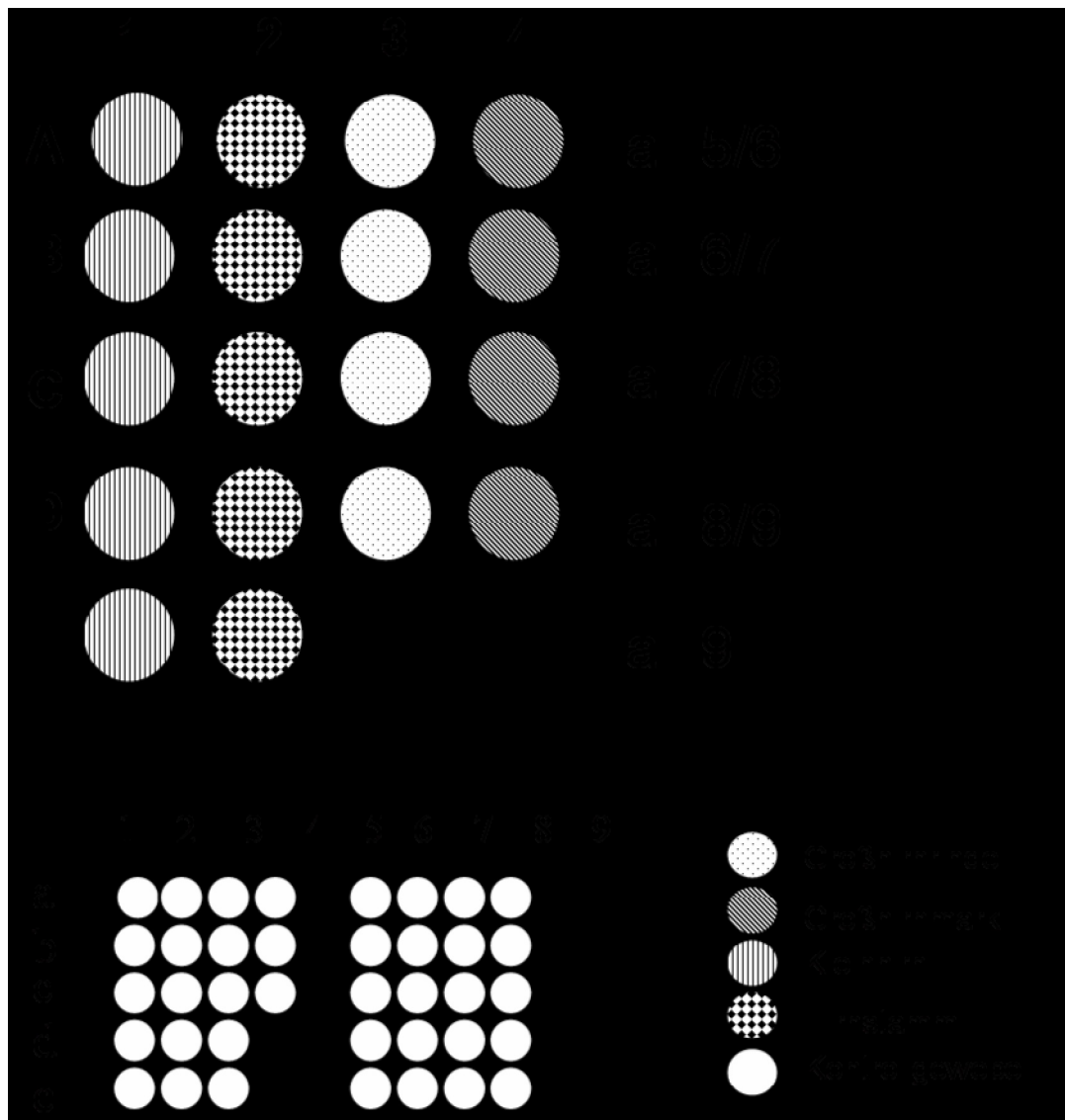


Abb. 3: Aufbau des Meningitis-Array Block 2. Alle geraden Blöcke sind den ungeraden gegenüber ähnlich aufgebaut. Allerdings ist die Spaltenverteilung der einzelnen Gewebe um zwei Positionen verschoben. Sie enthalten in der Spalte 1 Gewebzylinder mit Kleinhirn. Spalte 2 entspricht Gewebe aus dem Hirnstamm, Spalte 3 enthält Großhirnrinde. Großhirnmark findet sich in Spalte 4. Das Kontrollgewebe (a1 bis e9) setzt sich auf allen Blöcken gleichermaßen zusammen.

3.6. Immunhistochemie

Die 4µm-Schnitte der TMA-Blöcke wurden auf adhäsiv beschichtete Objektträger (Instrumedics, Hackensack, New Jersey) aufgezogen. Für die immunhistochemische Analyse wurde die standardisierte indirekte Immunoperoxidase-Prozedur angewandt (ABC-Elite, Vector Laboratories, Berlingame, CA). Der monoklonale Mausantikörper gegen P-Selektin (CD 62P) (Cat. # M7199, Klon 1E3, DAKO, Glostrup, Denmark) wurde zur Immunhistochemie 1:20 verdünnt. Optimale Färbeergebnisse konnten nach Vorbehandlung im Autoklaven (5 min bei 98 °C in Zitratpuffer 10 mmol/L, pH 2,0) erzielt werden.

Der monoklonale Mausantikörper gegen VCAM-1 (CD 106) (Cat. # M7106, Klon 1.4C3, DAKO, Glostrup, Denmark) wurde zur Immunhistochemie 1:20 verdünnt. Optimale Färbeergebnisse konnten nach Vorbehandlung im Autoklaven (30 min. bei 98 °C in Dako Target Retrieval Solution, pH 9,0) erzielt werden.

Der monoklonale Mausantikörper gegen LFA-1 (CD 11a) (Cat. # MCA1848, Klon 38, serotec, Oxford, UK) wurde zur Immunhistochemie 1:1800 verdünnt. Optimale Färbeergebnisse konnten nach Vorbehandlung im Autoklaven (5 min. bei 98 °C in Zitratpuffer 10 mmol/L, pH 2,0) erzielt werden.

Es wurde die Expression der einzelnen Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel, auf den ins Gewebe eingewanderten und in den Gefäßen befindlichen Entzündungszellen, sowie auf den verschiedenen Zelltypen des Zentralnervensystems (ZNS) (Astrozyten, Oligodendrozyten, Körnerzellen des Kleinhirns) untersucht.

Bei allen untersuchten Stanzen wurde der Anteil der positiven Zellen geschätzt (<50% = 1, 50% - 70% = 2, >70% = 3) und die Färbeintensität semiquantitativ bestimmt (nicht angefärbt = 0, schwach angefärbt = 1+, stark angefärbt = 2+). Diese beiden Werte wurden miteinander multipliziert, so dass eine Gruppierung mit den Zahlenwerten 0 bis 6 entstand. Diese Gruppe wurde in drei Gruppen kategorisiert:

0) *negativ*: Zellen ohne irgendeine Anfärbung

1) *schwach positiv*: Zellen mit 1+ Färbeintensität in bis zu 70% der jeweiligen Zellart oder mit einer 2+ Intensität in weniger als 50% der jeweiligen Zellart

2) *stark positiv*: Zellen mit 1+ Färbeintensität in mehr als 70% der jeweiligen Zellart oder mit einer 2+ Färbeintensität in mehr als 50% der jeweiligen Zellart

Zu einer besseren Gruppierung wurde diese Einteilung in positive und negative Expression differenziert.

3.7. Statistik

Es wurden Mehrfeldertests, Chi-Quadrat Tests und Fisher's Exact Test angewendet, um die Expression von P-Selektin und LFA-1 auf Endothel-, Entzündungs- und Bindegewebszellen der vier verschiedenen Hirnareale bei Meningitis und bei nicht vorhandener Meningitis zu untersuchen. Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikant festgesetzt. Hierbei wurde mit dem Programm SPSS Version 13.0 für Windows gearbeitet.

4. Ergebnisse

4.1. Histologie der Meningitisfälle

Insgesamt wurden 17 Meningitisfälle untersucht, dabei handelte es sich um zehn Männer und sieben Frauen, die im Zeitraum 1995 bis 2004 an bakterieller Meningitis verstarben. Das Durchschnittsalter lag bei 53 Jahren (Altersspanne 19–93 Jahre). In sieben Fällen handelte es sich um eine Haubenmeningitis, in vier Fällen war die Entzündung rein basal lokalisiert und in sechs Fällen war die Meningitis sowohl auf der Haube als auch basal lokalisiert. In zehn Fällen bestand ein granulozytäres entzündliches Infiltrat, das gering bis stark ausgeprägt war, in nur einem Fall konnten mäßig viele Schaumzellen nachgewiesen werden und in sechs Fällen lag ein gemischtzelliges entzündliches Infiltrat vor, das gering bis mäßig viele Zellen enthielt. In einem Fall wurde die Ausprägung des entzündlichen Infiltrates nicht näher bestimmt. Eine Begleitenzephalitis konnte bei sechs Fällen beobachtet werden, eine Vaskulitis in vier und Thrombosierungen der Gefäße des Subarachnoidalraums wurden bei fünf an Meningitis Verstorbenen nachgewiesen.

Einen Überblick über die Ergebnisse der histologischen Untersuchung zeigt Tab. 1.

Alter	Geschlecht	Lokalisation	Zelltyp, Ausprägung d. entzündl. Infiltrates	Enze- phalitis	Vasku- litis	Thrombo- sierung
19	m	Haube + basal	Granulozyten, mäßig	+	-	+
72	w	Haube + basal	Granulozyten, mäßig	-	-	+
80	w	Haube	Granulozyten, mäßig	-	-	+
43	m	Haube	Granulozyten, stark	+	+	-
41	m	basal	Gemischtzellig, mäßig	-	-	-
33	m	Haube + basal	Granulozyten, mäßig	+	-	+
56	m	Haube	Gemischtzellig, gering	-	-	-
49	m	Haube	Granulozyten, stark	-	-	+
62	w	basal	Granulozyten, stark	-	-	-
57	m	basal	Schaumzellen, mäßig	-	-	-
93	w	basal	Granulozyten, gering	+	-	-
44	m	Haube + basal	Gemischtzellig, nicht ermittelt	+	+	-
56	w	Haube + basal	Granulozyten, gering	-	-	-
77	w	Haube	Gemischtzellig, mäßig	+	+	-
33	m	Haube	Gemischtzellig, mäßig	-	-	-
56	m	Haube + basal	Granulozyten, stark	+	+	-
26	w	Haube	Gemischtzellig, gering	-	-	-

Tab. 1: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der 17 untersuchten Meningitisfälle

4.2. Mikrobiologie der Meningitisfälle

Zwölf Fälle des Meningitis Kollektivs wurden mikrobiologisch untersucht. Das Anlegen mikrobiologischer Kulturen ergab in der Mehrheit der Fälle die Diagnose einer Pneumokokken-Infektion ($n=8$). In einem Fall wurden Viridans Streptokokken und in einem weiteren Fall *E.coli* festgestellt, bei zwei Abstrichen blieb die Kultur negativ. Das Mikroskopieren der nach Gram gefärbten Paraffinschnitte zeigte in zehn Fällen grampositive Diplokokken.

Nur bei vier Fällen konnte aus den Sektionsunterlagen eine vorangegangene Antibiotikatherapie verifiziert werden. Der Hemmstofftest blieb bei den übrigen Fällen negativ. Bei zehn Meningitiden konnten während der Sektion Hinweise für ein septisches Geschehen gefunden werden. In vier Fällen waren die Erkrankten im Vorfeld splenektomiert worden. Eine Zusammenstellung der mikrobiologischen Ergebnisse zeigt Tab. 2.

Alter	Geschlecht	Antibiotika	Sepsis	Splenektomie	Erreger	Morphologie d. Erreger
19	m	+	+	+	negativ	grampos. Diplokokken
72	w	-	+	-	<i>Str. pneumoniae</i>	grampos. Diplokokken
80	w	-	+	-	nicht durchgeführt	grampos. Diplokokken
43	m	-	-	-	Viridans Streptokokken	
41	m	-	+	-	<i>Str. pneumoniae</i>	
33	m	-	+	-	nicht durchgeführt	grampos. Diplokokken
56	m	+	-	+	<i>Str. pneumoniae</i>	grampos. Diplokokken
49	m	-	+	+	<i>Str. pneumoniae</i>	grampos. Diplokokken
62	w	-	-	-	<i>Str. pneumoniae</i>	grampos. Diplokokken
57	m	-	-	-	nicht durchgeführt	
93	w	+	+	-	<i>E. coli</i>	
44	m	-	-	-	<i>Str. pneumoniae</i>	grampos. Diplokokken
56	w	-	-	-	negativ	
77	w	-	-	-	<i>Str. pneumoniae</i>	grampos. Diplokokken
33	m	-	+	-	nicht durchgeführt	grampos. Diplokokken
56	m	+	+	+	<i>Str. pneumoniae</i>	
26	w	-	+	-	nicht durchgeführt	

Tab. 2: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der 17 Meningitisfälle

4.3. Expression von P-Selektin

P-Selektin (CD 62P) wurde im Großhirn (Rinde und Mark), im Kleinhirn und im Hirnstamm gleichermaßen auf Endothelzellen, Astrozyten, Oligodendrozyten, Körnerzellen (nur im Kleinhirn anzutreffen) in derselben Weise bei Meningitis und bei nicht vorhandener Entzündung nukleär und zytoplasmatisch exprimiert. Bei inflammatorischen Prozessen konnte P-Selektin auch auf Entzündungszellen nachgewiesen werden.

Die Expressionsmuster auf den einzelnen Zellen in den verschiedenen Hirnregionen wurden statistisch miteinander in Beziehung gesetzt. Im Folgenden werden die signifikanten Ergebnisse vorgestellt:

4.3.1. Vergleich der Expression von P-Selektin auf Endothelzellen der Großhirnrinde mit der Expression von P-Selektin auf Astrozyten der Großhirnrinde

Es wurden 20 Fälle analysiert (zwölf Meningitis-Fälle, acht Non-Meningitis-Fälle). Alle acht Non-Meningitis-Fälle zeigten eine Expression von P-Selektin auf den Astrozyten, davon zwei Non-Meningitis-Fälle mit negativer Expression auf dem Endothel, sechs Non-Meningitis-Fälle mit positivem Endothel. In der Meningitis Gruppe exprimierten nur in einem Fall die Astrozyten P-Selektin bei negativem Endothel, in zwei Meningitis-Fällen konnte auf den Astrozyten keine Expression von P-Selektin nachgewiesen werden. In neun Meningitis-Fällen waren sowohl das Endothel als auch die Astrozyten positiv. Bei durchgeführtem Chi-Quadrat-Test in der Meningitis Gruppe mit Fisher's Exact Test war $p = 0,045$ ($p < 0,05$). Einzelheiten sind in Tab. 3 und 4 wiedergegeben.

				Astrozyten		insgesamt
				negativ	positiv	
Non-Meningitis	Endothel	negativ	<i>n</i>		2	2
			% Endothel		100,0%	100,0%
			% Astrozyten		25,0%	25,0%
			% insgesamt		25,0%	25,0%
		positiv	<i>n</i>		6	6
			% Endothel		100,0%	100,0%
			% Astrozyten		75,0%	75,0%
			% insgesamt		75,0%	75,0%
		insgesamt	<i>n</i>		8	8
			% Endothel		100,0%	100,0%
			% Astrozyten		100,0%	100,0%
			% insgesamt		100,0%	100,0%
Meningitis	Endothel	negativ	<i>n</i>	2	1	3
			% Endothel	66,7%	33,3%	100,0%
			% Astrozyten	100,0%	10,0%	25,0%
			% insgesamt	16,7%	8,3%	25,0%
		positiv	<i>n</i>	0	9	9
			% Endothel	,0%	100,0%	100,0%
			% Astrozyten	,0%	90,0%	75,0%
			% insgesamt	,0%	75,0%	75,0%
		insgesamt	<i>n</i>	2	10	12
			% Endothel	16,7%	83,3%	100,0%
			% Astrozyten	100,0%	100,0%	100,0%
			% insgesamt	16,7%	83,3%	100,0%

Tab. 3: Kreuztabelle zur Expression von P-Selektin auf Endothelzellen und Astrozyten der Großhirnrinde

Chi-Quadrat-Test

		Analysiert	Exact Significance (2-sided)
Non-Meningitis	<i>n</i>	8	
Meningitis	Fisher's Exact Test <i>n</i>	12	,045

Tab. 4: Ergebnis des Fisher's Exact Test zur Expression von P-Selektin auf Endothelzellen und Astrozyten der Großhirnrinde (*p* 0,045)

4.3.2. Vergleich der Expression von P-Selektin auf Endothelzellen der Großhirnrinde mit der Expression von P-Selektin auf Astrozyten des Großhirnmarkes

Es wurden 18 Fälle untersucht (elf Meningitis-Fälle, sieben Non-Meningitis-Fälle). In der Gruppe der Non-Meningitis-Fälle, exprimierten in sechs Fällen die Astrozyten des Großhirnmarkes P-Selektin, davon zwei Non-Meningitis-Fälle bei negativem Endothel, vier Non-Meningitis-Fälle bei positivem Endothel der Großhirnrinde. In einem Non-Meningitis-Fall wurde keine Anfärbung der Astrozyten bei positivem Endothel nachgewiesen. In der Meningitis-Gruppe konnte der Nachweis einer P-Selektin Expression bei acht Meningitis-Fällen auf den Astrozyten bei gleichzeitig positivem Endothel erbracht werden. In drei Meningitis-Fällen waren sowohl die Astrozyten als auch die Endothelzellen negativ. Nach Berechnung von Chi-Quadrat-Test und Fisher's Exact Test ergab sich für die Meningitisgruppe $p=0,006$.

Einen Überblick geben Tab. 5 und 6.

				Astrozyten		insgesamt
				negativ	positiv	
Non-Meningitis	Endothel	negativ	<i>n</i>	0	2	2
			% Endothel	,0%	100,0%	100,0%
			% Astrozyten	,0%	33,3%	28,6%
			% insgesamt	,0%	28,6%	28,6%
		positiv	<i>n</i>	1	4	5
			% Endothel	20,0%	80,0%	100,0%
			% Astrozyten	100,0%	66,7%	71,4%
			% insgesamt	14,3%	57,1%	71,4%
		insgesamt	<i>n</i>	1	6	7
			% Endothel	14,3%	85,7%	100,0%
			% Astrozyten	100,0%	100,0%	100,0%
			% insgesamt	14,3%	85,7%	100,0%
Meningitis	Endothel	negativ	<i>n</i>	3	0	3
			% Endothel	100,0%	,0%	100,0%
			% Astrozyten	100,0%	,0%	27,3%
			% insgesamt	27,3%	,0%	27,3%
		positiv	<i>n</i>	0	8	8
			% Endothel	,0%	100,0%	100,0%
			% Astrozyten	,0%	100,0%	72,7%
			% insgesamt	,0%	72,7%	72,7%
		insgesamt	<i>n</i>	3	8	11
			% Endothel	27,3%	72,7%	100,0%
			% Astrozyten	100,0%	100,0%	100,0%
			% insgesamt	27,3%	72,7%	100,0%

Tab. 5: Kreuztabelle zur Expression von P-Selektin auf Endothelzellen der Großhirnrinde und auf Astrozyten des Großhirnmarkes

Chi-Quadrat-Test

		Analysiert	Exact Significance (2-sided)
Non-Meningitis	Fisher's Exact Test	7	1,000
	<i>n</i>		
Meningitis	Fisher's Exact Test	11	,006
	<i>n</i>		

Tab. 6: Ergebnis des Fisher's Exact Test zur Expression von P-Selektin auf Endothelzellen der Großhirnrinde und auf Astrozyten des Großhirnmarkes (p 0,006)

4.3.3. Vergleich der Expression von P-Selektin auf Endothelzellen der Großhirnrinde (Cor) mit der Expression von P-Selektin auf Endothelzellen des Kleinhirns (Crbl)

15 Fälle (neun Meningitis-Fälle, sechs Non-Meningitis-Fälle) wurden untersucht. In der Gruppe der Non-Meningitis-Fälle exprimierten Endothelzellen des Kleinhirns in zwei Fällen P-Selektin, während auf den Endothelzellen der Großhirnrinde kein P-Selektin nachweisbar war. In drei Non-Meningitis-Fällen war das Endothel der Großhirnrinde positiv bei negativem Endothel des Kleinhirns. In nur einem Non-Meningitis-Fall konnte sowohl auf dem Endothel der Großhirnrinde als auch auf dem Endothel des Kleinhirns P-Selektin nachgewiesen werden. Im Meningitis-Kollektiv waren in zwei Fällen die Endothelzellen des Kleinhirns negativ bei fehlender P-Selektin Expression der Endothelzellen des Großhirns. In sieben Meningitis-Fällen waren die Endothelzellen des Kleinhirns und des Großhirns bei Meningitis positiv angefärbt. Den Ergebnissen von Chi-Quadrat-Test und Fisher's Exact Test folgend ergab sich für die Meningitis-Gruppe $p=0,028$.

Tab. 7 und 8 geben einen Überblick.

				Endothel Crbl		insgesamt
				negativ	positiv	
Non-Meningitis	Endothel Cor	negativ	<i>n</i>	0	2	2
			% Endothel Cor	,0%	100,0%	100,0%
			% Endothel Crbl	,0%	66,7%	33,3%
			% insgesamt	,0%	33,3%	33,3%
		positiv	<i>n</i>	3	1	4
			% Endothel Cor	75,0%	25,0%	100,0%
			% Endothel Crbl	100,0%	33,3%	66,7%
			% insgesamt	50,0%	16,7%	66,7%
		insgesamt	<i>n</i>	3	3	6
			% Endothel Cor	50,0%	50,0%	100,0%
			% Endothel Crbl	100,0%	100,0%	100,0%
			% insgesamt	50,0%	50,0%	100,0%
Meningitis	Endothel Cor	negativ	<i>n</i>	2	0	2
			% Endothel Cor	100,0%	,0%	100,0%
			% Endothel Crbl	100,0%	,0%	22,2%
			% insgesamt	22,2%	,0%	22,2%
		positiv	<i>n</i>	0	7	7
			% Endothel Cor	,0%	100,0%	100,0%
			% Endothel Crbl	,0%	100,0%	77,8%
			% insgesamt	,0%	77,8%	77,8%
		insgesamt	<i>n</i>	2	7	9
			% Endothel Cor	22,2%	77,8%	100,0%
			% Endothel Crbl	100,0%	100,0%	100,0%
			% insgesamt	22,2%	77,8%	100,0%

Tab. 7: Kreuztabelle zur Expression von P-Selektin auf Endothelzellen der Großhirnrinde (Cor) und des Kleinhirns (Crbl)

Chi-Quadrat-Test

		Analysiert	Exact Significance (2-sided)
Non-Meningitis	Fisher's Exact Test	6	,400
	<i>n</i>		
Meningitis	Fisher's Exact Test	9	,028
	<i>n</i>		

Tab. 8: Ergebnis des Fisher's Exact Test zur Expression von P-Selektin auf Endothelzellen der Großhirnrinde (Cor) und des Kleinhirns (Crbl) ($p = 0,028$)

4.3.4. Vergleich der Expression von P-Selektin auf Astrozyten der Großhirnrinde (Cor) mit der Expression von P-Selektin auf Astrozyten des Kleinhirns (Crbl)

Auch hier wurden 17 Fälle untersucht (neun Meningitis-Fälle, acht Non-Meningitis-Fälle). Bei dem Non-Meningitis-Kollektiv zeigten alle acht Fälle eine Expression von P-Selektin auf den Astrozyten der Großhirnrinde (Cor) und des Kleinhirns (Crbl). In der Meningitis-Gruppe exprimierten in sieben Meningitis Fällen die Astrozyten der Großhirnrinde und des Kleinhirns P-Selektin, während in zwei Meningitis-Fällen diese in beiden Arealen negativ gewertet wurden. Chi-Quadrat-Test und Fisher's Exact Test berechnen für das Meningitis-Kollektiv $p=0,028$.

Näheres zeigen Tab. 9 und 10.

				Astrozyten Crbl		insgesamt
				negativ	positiv	
Non-Meningitis	Astrozyten Cor	positiv	<i>n</i>		8	8
			% Astrozyten Cor		100,0%	100,0%
			% Astrozyten Crbl		100,0%	100,0%
			% insgesamt		100,0%	100,0%
	insgesamt		<i>n</i>		8	8
			% Astrozyten Cor		100,0%	100,0%
			% Astrozyten Crbl		100,0%	100,0%
			% insgesamt		100,0%	100,0%
Meningitis	Astrozyten Cor	negativ	<i>n</i>	2	0	2
			% Astrozyten Cor	100,0%	,0%	100,0%
			% Astrozyten Crbl	100,0%	,0%	22,2%
			% insgesamt	22,2%	,0%	22,2%
		positiv	<i>n</i>	0	7	7
			% Astrozyten Cor	,0%	100,0%	100,0%
			% Astrozyten Crbl	,0%	100,0%	77,8%
			% insgesamt	,0%	77,8%	77,8%
	insgesamt		<i>n</i>	2	7	9
			% Astrozyten Cor	22,2%	77,8%	100,0%
			% Astrozyten Crbl	100,0%	100,0%	100,0%
			% insgesamt	22,2%	77,8%	100,0%

Tab. 9: Kreuztabelle zur Expression von P-Selektin auf Endothelzellen der Großhirnrinde (Cor) und des Kleinhirns (Crbl)

Chi-Quadrat-Test

		Analysiert	Exact Significance (2-sided)
Non-Meningitis	<i>n</i>	8	
Meningitis	Fisher's Exact Test		,028
	<i>n</i>	9	

Tab. 10: Ergebnis des Fisher's Exact Test zur Expression von P-Selektin auf Endothelzellen der Großhirnrinde (Cor) und des Kleinhirns (Crbl) (*p* 0,028)

4.3.5. Vergleich der Expression von P-Selektin auf Astrozyten des Großhirnmarkes mit der Expression von P-Selektin auf Oligodendrozyten des Großhirnmarkes

Analysiert wurden 20 Fälle (zwölf Meningitis-Fälle, acht Non-Meningitis-Fälle). Bei den Non-Meningitis-Fällen zeigte sich in allen acht Fällen eine Expression von P-Selektin auf den Oligodendrozyten des Großhirnmarkes. Die Astrozyten waren in sieben Non-Meningitis-Fällen positiv, während in einem Non-Meningitis-Fall die Astrozyten negativ gewertet wurden. In der Meningitis-Gruppe konnte in fünf Meningitis-Fällen keine Expression von P-Selektin auf den Oligodendrozyten nachgewiesen werden, davon in vier Fällen bei gleichzeitig negativen Astrozyten. In sieben Meningitis-Fällen zeigten sich die Oligodendrozyten und die Astrozyten positiv. Durchgeführter Chi-Quadrat-Test und Fisher's Exact Test erbrachte $p=0,01$.

Die Ergebnisse werden in Tab. 11 und 12 präsentiert.

				Oligodendrozyten		insgesamt
				negativ	positiv	
Non-Meningitis	Astrozyten	negativ	<i>n</i>		1	1
			% Astrozyten		100,0%	100,0%
			% Oligodendrozyten		12,5%	12,5%
			% insgesamt		12,5%	12,5%
		positiv	<i>n</i>		7	7
			% Astrozyten		100,0%	100,0%
			% Oligodendrozyten		87,5%	87,5%
			% insgesamt		87,5%	87,5%
		insgesamt	<i>n</i>		8	8
			% Astrozyten		100,0%	100,0%
			% Oligodendrozyten		100,0%	100,0%
			% insgesamt		100,0%	100,0%
Meningitis	Astrozyten	negativ	<i>n</i>	4	0	4
			% Astrozyten	100,0%	,0%	100,0%
			% Oligodendrozyten	80,0%	,0%	33,3%
			% insgesamt	33,3%	,0%	33,3%
		positiv	<i>n</i>	1	7	8
			% Astrozyten	12,5%	87,5%	100,0%
			% Oligodendrozyten	20,0%	100,0%	66,7%
			% insgesamt	8,3%	58,3%	66,7%
		insgesamt	<i>n</i>	5	7	12
			% Astrozyten	41,7%	58,3%	100,0%
			% Oligodendrozyten	100,0%	100,0%	100,0%
			% insgesamt	41,7%	58,3%	100,0%

Tab. 11: Kreuztabelle zur Expression von P-Selektin auf Astrozyten und Oligodendrozyten des Großhirnmarkes

Chi-Quadrat-Test

		Analysiert	Exact Significance (2-sided)
keine Meningitis	<i>n</i>	8	
Meningitis	Fisher's Exact Test		,010
	<i>n</i>	12	

Tab. 12: Ergebnis des Fisher's Exact Test zur Expression von P-Selektin auf Astrozyten und Oligodendrozyten des Großhirnmarkes (*p* 0,01)

4.3.6. Vergleich der Expression von P-Selektin auf Oligodendrozyten des Großhirnmarkes mit der Expression von P-Selektin auf Endothelzellen des Hirnstammes

Es wurden elf Fälle miteinander verglichen (sieben Meningitis-Fälle, vier Non-Meningitis-Fälle). Alle Oligodendrozyten des Großhirnmarkes waren bei den vier Non-Meningitis-Fällen positiv, wobei nur in zwei Non-Meningitis-Fällen auch das Endothel des Hirnstammes P-Selektin exprimierte. Bei Meningitis wurde in vier Fällen P-Selektin auf den Oligodendrozyten exprimiert, in drei Fällen nicht. Bei den drei Meningitis-Fällen mit Nicht-Expression von P-Selektin auf den Oligodendrozyten war auch keine Expression von P-Selektin auf dem Endothel nachweisbar. Bei den vier Meningitis-Fällen mit positiven Oligodendrozyten, waren auch die Endothelzellen positiv zu werten. Chi-Quadrat-Test und der berechnete Fisher's Exact Test ergaben $p=0,029$.

Einen Überblick geben Tab. 13 und 14.

				Endothel		insgesamt
				negativ	positiv	
Non-Meningitis	Oligodendrozyten	positiv	<i>n</i>	2	2	4
			% Oligodendrozyten	50,0%	50,0%	100,0%
			% Endothel	100,0%	100,0%	100,0%
			% insgesamt	50,0%	50,0%	100,0%
	insgesamt		<i>n</i>	2	2	4
			% Oligodendrozyten	50,0%	50,0%	100,0%
			% Endothel	100,0%	100,0%	100,0%
			% insgesamt	50,0%	50,0%	100,0%
Meningitis	Oligodendrozyten	negativ	<i>n</i>	3	0	3
			% Oligodendrozyten	100,0%	,0%	100,0%
			% Endothel	100,0%	,0%	42,9%
			% insgesamt	42,9%	,0%	42,9%
		positiv	<i>n</i>	0	4	4
			% Oligodendrozyten	,0%	100,0%	100,0%
			% Endothel	,0%	100,0%	57,1%
			% insgesamt	,0%	57,1%	57,1%
	insgesamt		<i>n</i>	3	4	7
			% Oligodendrozyten	42,9%	57,1%	100,0%
			% Endothel	100,0%	100,0%	100,0%
			% insgesamt	42,9%	57,1%	100,0%

Tab. 13: Kreuztabelle zur Expression von P-Selektin auf Oligodendrozyten des Großhirnmarkes und auf Endothel des Hirnstammes

Chi-Quadrat-Test

		Analysiert	Exact Significance (2-sided)
Non-Meningitis	<i>n</i>	4	
Meningitis	Fisher's Exact Test <i>n</i>	7	,029

Tab. 14: Ergebnis des Fisher's Exact Test zur Expression von P-Selektin auf Oligodendrozyten des Großhirnmarkes und auf Endothel des Hirnstammes (*p* 0,029)

4.4. Expression von LFA-1

LFA-1 (CD 11a) ließ sich in allen Hirnarealen (Großhirnrinde, Großhirnmark, Kleinhirn, Hirnstamm) immunhistochemisch nur auf Entzündungszellen nachweisen. Eine Expression auf anderen Zellen des ZNS wurde nicht beobachtet.

Die Expression von LFA-1 auf den Entzündungszellen des Kleinhirns wurden statistisch mit dem Ausprägungsgrad des entzündlichen Infiltrates bei neun Meningitis-Fällen in Beziehung gesetzt.

Dies wird im Folgenden vorgestellt: Bei geringer Ausprägung des entzündlichen Infiltrates zeigten in zwei Meningitis-Fällen die Entzündungszellen eine Expression von LFA-1. In sieben Fällen mit mäßiger bis starker Ausprägung des entzündlichen Infiltrates wurden die Entzündungszellen als negativ bewertet. Hierzu wurde Chi-Quadrat-Test und Fisher's Exact Test berechnet, dies ergab $p=0,028$.

Genauere Angaben finden sich in Tab. 15 und 16.

				Entzündungszellen		insgesamt
				negativ	positiv	
Meningitis	Ausprägung d. entzündlichen Infiltrates	gering	<i>n</i>	0	2	2
			% Ausprägung	,0%	100,0%	100,0%
			% Entzündungszellen	,0%	100,0%	22,2%
			% insgesamt	,0%	22,2%	22,2%
		mäßig	<i>n</i>	6	0	6
			% Ausprägung	100,0%	,0%	100,0%
			% Entzündungszellen	85,7%	,0%	66,7%
			% insgesamt	66,7%	,0%	66,7%
		stark	<i>n</i>	1	0	1
			% Ausprägung	100,0%	,0%	100,0%
			% Entzündungszellen	14,3%	,0%	11,1%
			% insgesamt	11,1%	,0%	11,1%
	insgesamt		<i>n</i>	7	2	9
			% Ausprägung	77,8%	22,2%	100,0%
			% Entzündungszellen	100,0%	100,0%	100,0%
			% insgesamt	77,8%	22,2%	100,0%

Tab. 15: Kreuztabelle zur Expression von LFA-1 auf Entzündungszellen des Kleinhirns unter Berücksichtigung des Ausprägungsgrades des entzündl. Infiltrates

Chi-Quadrat-Test

		Analysiert	Exact Significance (2-sided)
Meningitis	Fisher's Exact Test		,028
	<i>n</i>	9	

Tab. 16: Ergebnis des Fisher's Exact Test zur Expression von LFA-1 auf Entzündungszellen des Kleinhirns unter Berücksichtigung des Ausprägungsgrades des entzündl. Infiltrates (*p* 0,028)

4.5. Expression von VCAM-1

Ein Nachweis einer VCAM-1 (CD 106) Expression gelang nur in einem einzigen Meningitis-Fall auf Endothelzellen von Gefäßen des Großhirnmarkes. Es konnte weder in dem entzündlich veränderten noch in dem Kontrollmaterial in irgendeinem Hirnareal oder auf irgendeinem Zelltyp VCAM-1 Immunpositivität nachgewiesen werden.

5. Diskussion

5.1. Histologie der Meningitisfälle

Bereits 2000 zeigte eine Studie des Hamburger Institutes für Rechtsmedizin die Histomorphologie von 20 an Hirnhautentzündung Verstorbenen sehr detailliert auf [38]. Entsprechende histomorphologische Befunde konnten auch in dieser Studie erhoben werden. Bei den 17 Fällen im Zeitraum 1995-2004 an Meningitis Verstorbenen herrschte der Typ der Haubenmeningitis vor. Am häufigsten wurde ein granulozytäres Infiltrat gefunden. In zehn von 17 Fällen wurden zusätzlich Enzephalitis, Thrombosierungen und/oder Vaskulitiden gefunden. Die in der Rechtsmedizin obduzierten Meningitistoten zeigten keinen Hinweis für Komplikationen, wie Hirnabszesse und Einblutungen ins Hirngewebe, die auf einen längeren Verlauf der Erkrankung deuten würden. Die nachgewiesene Ausbreitung der Entzündung von den Hirnhäuten auf das Hirngewebe und die Gefäße ist ein weiterer Hinweis für den meist foudroyant-letalen Verlauf der Meningitis und unterstützt die Ergebnisse klinischer Studien [24].

5.2. Mikrobiologie der Meningitisfälle

In zwölf von 17 Fällen (71%) wurde eine Erregerkultur nach Abstrich im Rahmen der Obduktion angelegt. Der häufigste nachgewiesene Erreger war *Streptokokkus pneumoniae* ($n=8$), dies wurde durch das Mikroskopieren gramgefärbter Schnitte bestätigt (hier in zehn von 17 Fällen Nachweis grampositiver Diplokokken). Pneumokokken sind nach Meningokokken die zweithäufigsten Erreger für bakterielle Meningitiden, aber zeigen von den für letal verlaufende Hirnhautentzündungen verantwortlichen Erregern die höchste Letalität – bis zu 30% [13]. *E.coli* war in einer Kultur der Abstriche anzüchtbar. Dieser Erreger vom Kapseltyp K1 ist besonders für Meningitiden von Säuglingen und Immunsupprimierten verantwortlich. Von den 1951 gemeldeten Meningitiserkrankungen

2000 in Deutschland wurde nur in drei Fällen *E.coli* K1 nachgewiesen, die Letalität lag bei 16,7% [30]. Bei der Neugeborenen-Meningitis durch *E.coli* wird bereits von einer Übertragung im Mutterleib ausgegangen [10]. Eine differenzierte Bestimmung des Kapseltyps wurde nicht durchgeführt, so dass in diesem Fall eine Kontamination nicht auszuschließen ist.

5.3. Expression von P-Selektin

Die Expression von P-Selektin (CD 62P) konnte sowohl im Meningitis-Kollektiv als auch in der Gruppe der Non-Meningitis-Fälle in allen Hirnarealen beobachtet werden. Dabei ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Lokalisation der Entzündung und der Stärke der P-Selektin-Expression erarbeiten.

P-Selektin wurde gleichermaßen auf Endothelzellen, Astrozyten, Oligodendrozyten, Körnerzellen und Entzündungszellen nachgewiesen, dabei lag nicht nur eine nukleäre Expression sondern auch eine zytoplasmatische Expression vor.

Im Vergleich der P-Selektin-Expression auf Endothelzellen mit der Expression auf Astrozyten der Großhirnrinde fiel auf, dass in dem Meningitiskollektiv P-Selektin geringer auf Astrozyten exprimiert wurde als in der Kontrollgruppe. Im statistischen Vergleich der Expression von P-Selektin auf Endothelzellen des Kortex mit Astrozyten des Großhirnmarkes war auffällig, dass während der Hirnhautentzündung die Expression von P-Selektin auf Astrozyten weniger wurde. Die Korrelation zwischen der Expression von P-Selektin auf Endothelzellen der Großhirnrinde mit der auf Endothelzellen des Kleinhirns zeigte eine verstärkte Expression von P-Selektin auf den Endothelzellen während der Entzündung unabhängig von der Hirnregion. In der Gegenüberstellung der astrozytären Expression von P-Selektin im Kleinhirn und im Kortex war auffällig, dass in 20% der Fälle bei Hirnhautentzündung keine Expression nachzuweisen war, aber das nicht-entzündliche Material P-Selektin exprimierte. Vergleicht man im Großhirnmark die Expression von P-Selektin auf den Astrozyten mit der Expression auf den Oligodendrozyten, zeigt sich, dass in

der Gruppe der Non-Meningitis-Fälle die Expression von P-Selektin auf den Astrozyten und auf den Oligodendrozyten stärker ausgeprägt war, als auf diesen beiden Zelltypen der Meningitis-Fälle. Stellt man einen Zusammenhang zwischen der Expression von P-Selektin auf Oligodendrozyten der Großhirnrinde mit Endothelzellen des Hirnstammes her, bemerkt man in der Meningitisgruppe eine weniger starke Expression von P-Selektin auf Oligodendrozyten als in der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass P-Selektin bei einer zum Tode führenden Hirnhautentzündung auf Endothelzellen stärker exprimiert wurde, aber auf Astrozyten und Oligodendrozyten weniger stark nachzuweisen war, als in den Hirnen der Non-Meningitis-Gruppe.

Untersuchungen zur Expression von P-Selektin an humanem Meningitismaterial liegen bis jetzt nicht vor und Studien an entzündlich veränderten humanen Materialien sind selten. Die meisten Versuche zur Expression von P-Selektin basieren auf Tierversuchen.

P-Selektin (CD 62P) ist sehr wichtig für die Leukozyten-Endothel-Interaktion und initiiert das sogenannte Rolling. Schon länger ist bekannt, dass die Selektine bei Entzündungsprozessen vom Endothel verstärkt exprimiert werden [14] und die Migration von Leukozyten ins betroffene Gewebe unterstützen. Dies konnten unsere Ergebnisse bestätigen. Eine frühere Studie beschreibt, dass P-Selektin bei Entzündungen des ZNS nicht für die Rekrutierung von Entzündungszellen über die Bluthirnschranke verantwortlich ist [7]. Nach einer neueren Untersuchung ist die Expression von P-Selektin von den induzierenden Zytokinen abhängig [4].

Eine mögliche Expression von CD 62P auf aktivierten Astrozyten nach Schlaganfällen ist beschrieben worden [15], allerdings wurden zu der P-Selektin-Expression auf Astrozyten und Oligodendrozyten bei Entzündungen des ZNS noch keine Aussagen gemacht. Was natürlich fragwürdig ist, warum die Stützzellen des ZNS weniger P-Selektin exprimieren, wenn sie

eigentlich im Entzündungsprozess aktiviert sein sollten? Eine Möglichkeit ist, dass in diesem Fall die P-Selektin-Expression auf den Astrozyten und Oligodendrozyten ähnlich wie bei der Leukozytenrekrutierung über die Bluthirnschranke abhängig ist von einem bestimmten Zusammenspiel der Zytokine, welches bei rapid progressiven Entzündungsprozessen möglicherweise gestört ist. Eine andere These ist, dass die Zellen eine gewisse Grundaktivität aufweisen [9], sich diese während der initialen Entzündung steigert und zu einem späteren Zeitpunkt wieder unter das Ausgangsniveau abflacht.

5.4. Expression von LFA-1

Die Expression von LFA-1 (CD 11a) konnte nur auf Entzündungszellen nachgewiesen werden. LFA-1 konnte nicht auf anderen Zellen der vier definierten Hirnareale nachgewiesen werden. Im nicht-entzündlichen Gewebe wurden keine Zellen angefärbt.

Korreliert man die Expression von LFA-1 auf Leukozyten mit dem Ausprägungsgrad des entzündlichen Infiltrates, so fällt auf, dass die Entzündungszellen bei mäßig bis starker Ausprägung des entzündlichen Infiltrates kein LFA-1 exprimierten, während bei geringer Anzahl inflammatorischer Zellen im Gewebe diese positiv angefärbt waren.

Untersuchungen zur Expression von LFA-1 an humanem Meningitismaterial liegen bis jetzt nicht vor und Studien an entzündlich veränderten humanen Materialien sind die Ausnahme. Die meisten Versuche zur Expression von LFA-1 basieren auf Tierversuchen.

Eine Studie an Knock-Out Mäusen hat gezeigt, dass das Fehlen von LFA-1 zu einer erhöhten Mortalität und häufigeren Septikämie führt [27]. Ein angeborener Mangel an CD 11a wurde bis dato selten beschrieben. Es ist ein eigenständiges Krankheitsbild und gilt als angeborene Immunschwäche [32]. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass eine Modulation der Expression dieser Adhäsionsmoleküle wichtig für den Ablauf immunologischer Prozesse ist [34]. In den Fällen mit niedriger LFA-1 Expression auf den Entzündungszellen ist der Ausprägungsgrad des entzündlichen Infiltrates mäßig bis stark. Von einer Immunschwäche

kann in diesen Fällen eher nicht ausgegangen werden, aber vielleicht findet eine Modulation und Herunterregulierung von LFA-1 statt, so dass eine weitere Extravasation von Entzündungszellen in das betroffene Gewebe verhindert wird.

5.5. Expression von VCAM-1

Ein Nachweis einer VCAM-1 (CD 106) Expression gelang nur in einem einzigen Meningitis-Fall auf Endothelzellen des Großhirnmarkes. Außer in diesem einen Fall wurden weder Endothelzellen noch andere Zellen des ZNS angefärbt. Eine Korrelation zwischen der Expression von VCAM-1 der Meningitis-Gruppe und der Kontrollgruppe ließ sich nicht feststellen.

Untersuchungen zur Expression von VCAM-1 an humanem Meningitismaterial liegen bis jetzt nicht vor und Studien an entzündlich veränderten humanen Materialien sind selten. Die meisten Versuche zur Expression von VCAM-1 basieren auf Tierversuchen.

Eine aktuelle Studie zeigt unter anderem eine erhöhte Konzentration von VCAM-1 im Liquor bei an Meningitis erkrankten Patienten, was hauptsächlich auf eine Diffusion durch die bei Infektion des ZNS durchlässige Bluthirnschranke zurückgeführt wurde [21].

In früheren Studien wurde gezeigt, dass die orale Infektion von Mäusen mit *Toxoplasma gondii* eine Enzephalitis mit einer starken Aktivierung des Hirngewebes hervorruft. Dabei wird auch verstärkt VCAM auf Endothelzellen nachgewiesen. Allerdings wird in diesem Projekt nicht differenziert, um welches VCAM es sich handelt [5].

Unser Meningitiskollektiv ist hauptsächlich an foudroyant verlaufenden Hirnhautentzündungen verstorben. P-Selektin wurde viel stärker exprimiert als VCAM-1. Möglich ist eine heftige Initialreaktion von VCAM-1 sehr früh bei Infektionen, die später nicht mehr nachzuweisen ist, oder eine gedämpfte VCAM-1 Reaktion, wenn P-Selektin stark exprimiert wird und bereits viele Leukozyten eingewandert sind. Die These, dass ständig eine

Grundaktivität von Endothel vorhanden ist [9], konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden, allerdings bezieht sich die vorhandene Studie zu diesem Thema auf Endothelzellen in der Lunge.

5.6. Schlussfolgerungen

Untersuchungen zur Expression von endothelialen und leukozytären Adhäsionsmolekülen in humanem Meningitismaterial liegen bis jetzt nicht vor und Studien an entzündlich veränderten humanen Materialien sind bisher eher die Ausnahme. Die meisten Versuche zur Expression von P-Selektin, LFA-1 und VCAM-1 basieren auf Tierversuchen.

Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass bei Meningitis-Fällen mit foudroyant letalem Verlauf *Streptokokkus pneumoniae* den Haupterreger darstellt, die Entzündung meist auf den Bereich der Haube lokalisiert und durch ein granulozytäres Infiltrat gekennzeichnet ist. In fast 60% der Meningitisfälle wurden Kennzeichen für fulminant verlaufende Infektionen, wie Vaskulitis, Thrombosierungen und Enzephalitis beobachtet. Dies bestätigt die Aussagen vorangegangener Studien [13,26,38]. Die Expression von P-Selektin im Meningitiskollektiv gegenüber den Non-Meningitis-Fällen ist auf den Endothelzellen verstärkt ausgeprägt, auf den Astrozyten und Oligodendrozyten dagegen herabgesetzt. LFA-1 wurde in unserer Studie nur bei geringer Ausprägung der entzündlichen Infiltrates auf den Leukozyten exprimiert, bei starker bis mäßiger Invasion der Entzündungszellen aber nicht. VCAM-1 wurde nur in einem Meningitis-Fall auf Endothel exprimiert.

Adhäsionsmoleküle sind für den Ablauf entzündlicher Prozesse von großer Bedeutung, sie regulieren durch Zytokine beeinflusst das Einwandern von Entzündungszellen in das von Bakterien besiedelte Gewebe. Dabei ist der zeitliche Ablauf dieser Kaskade von großer Bedeutung. Eine zu starke Invasion von Leukozyten schädigt das Gewebe durch freigesetzte Mediatoren, eine zu späte oder zu schwache Invasion schädigt das betroffene Gewebe durch die Aktivität der Bakterien. Astrozyten und Oligodendrozyten sind kein direkter Bestandteil

der Bluthirn-Schranke, das Endothel der Hirngefäße durchaus schon. In unserer Studie war auffällig, dass bei Meningitis die Expression von P-Selektin auf den Endothelzellen verstärkt, auf Astrozyten und Oligodendrozyten jedoch herabgesetzt war. Möglicherweise werden nur jene Bereiche bei Entzündungen des ZNS hochreguliert, die direkt in den Prozess der Leukozyteninvasion integriert sind, so dass die Barrierefunktion der Bluthirnschranke ansonsten intakt bleibt. Dagegen spricht die Aussage, dass P-Selektin keine Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten über die Bluthirnschranke spielen soll [7]. Diese Studie beschränkt sich allerdings auf autoimmune Prozesse des ZNS, für akute bakterielle Infektionen kann dies anders sein. Nach Schlaganfällen wurde eine erhöhte Expression von P-Selektin auf Astrozyten festgestellt [15]. In unserer Studie scheint es bei Entzündung eine Herunterregulierung der CD62P-Expression auf Astrozyten und Oligodendrozyten zu geben. Möglicherweise ist für den narbigen Umbau des Gewebes nach einer Ischämie P-Selektin wichtig, während es in der akuten Infektion dem Gewebe eher schadet. Über eine vormals beschriebene Grundaktivität von Adhäsionsmolekülen [9] lässt sich in unserer Studie bzgl. der Expression auf den Zellen des ZNS keine signifikante Aussage machen. Bei mäßig bis starker Infiltration von Leukozyten war keine LFA-1 Expression auf den eingewanderten Entzündungszellen nachzuweisen, bei schwacher Invasion war diese gesehen worden. Geht man von einer möglichen Schutzfunktion aus, könnte diese Herunterregulierung eine weitere Ausbreitung ins Gewebe mindern. Bei fulminanten Infektionen könnte es aber auch Zeichen einer Art Überforderung für den Zellstoffwechsel sein, in dessen Folge vielleicht kein LFA-1 mehr metabolisiert werden kann. Eine Modulation der LFA-1 Expression scheint einen wichtigen Einfluss auf den immunologischen Abwehrprozess zu haben [27,32,34]. Die These von Modulationen in der Expression der Adhäsionsmoleküle im zeitlichen Verlauf eines entzündlichen Prozesses erschwert die immunhistochemische Begutachtung. In unserer Studie finden sich hauptsächlich Meningitis-Fälle nach Infektionen, die rasch zum Tode geführt

haben. Möglicherweise hat dies Einfluss auf die fragliche Modulation. In dieser Studie ließ sich keine signifikante Expression von VCAM-1 im Meningitisgewebe nachweisen. Entweder findet im ZNS keine Expression von VCAM-1 statt, oder VCAM-1 konnte in der relativ kurzen Zeit des entzündlichen Prozesses unseres Kollektivs noch nicht oder nicht mehr exprimiert werden. Der erstgenannte Aspekt steht im Gegensatz zu einer Studie, die eine erhöhte VCAM-1 Liquorkonzentration mit dem Zusammenbruch der Bluthirnschranke in Zusammenhang bringt [21]. Das Kollektiv dieser genannten Studie ist an zeitlich länger bestehenden Entzündungen des ZNS erkrankt.

6. Zusammenfassung

Untersuchungen zur Expression endothelialer und leukozytärer Adhäsionsmoleküle bei bakterieller Meningitis an humanem Autopsiematerial liegen bisher nicht vor. In dieser Studie wurden 17 Meningitis-Fälle und zehn Non-Meningitis-Fälle bezüglich der Expression der endothelialen und leukozytären Adhäsionsmoleküle P-Selektin, LFA-1 und VCAM-1 auf verschiedenen Zelltypen des Zentralnervensystems (ZNS) miteinander verglichen und die Histomorphologie und das Erregerspektrum des Meningitiskollektivs evaluiert. Dabei wurde eine neue Methodik entwickelt und genutzt, die eine speziell für Entzündungen erarbeitete Modifikation der bereits beschriebenen *Tissue-Micro-Array-Technik* (TMA) darstellt. Als Haupterreger fulminant verlaufender Haubenmeningitiden wurde *Streptococcus pneumoniae* bestätigt. In Kombination mit einem rasch zum Tode führenden Verlauf der Erkrankung wurden histologisch Vaskulitis, Enzephalitis und Thrombosierungen der Subarachnoidalgefäße beobachtet. Die Expression der oben genannten Adhäsionsmoleküle war in den verschiedenen Gewebekollektiven unterschiedlich. Ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation der Entzündung und der Stärke der Expression ließ sich nicht feststellen. P-Selektin wurde auf allen Zelltypen nachgewiesen. Im Entzündungsprozess nahm die Expression von P-Selektin auf den Endothelzellen zu, während die Expression auf Astrozyten und Oligodendrozyten abnahm. LFA-1 konnte nur auf Leukozyten nachgewiesen werden. Die Expression von LFA-1 konnte nur bei geringer Infiltration von Entzündungszellen auf diesen beobachtet werden, bei mäßiger bis starker Invasion dagegen nicht. VCAM-1 wurde nur in einem einzigen Fall auf Endothelzellen nachgewiesen. Die Expression von VCAM-1 bei Meningitis zeigte keine signifikanten Unterschiede zu den Non-Meningitis-Fällen.

7. Literaturverzeichnis

1. Bonadics N, Vogt M (2005) Kulturnegative Meningokokkenmeningitis – keine Seltenheit? Schweiz Med Forum 5:1210-1214
2. Carlos TM, Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. Blood 84: 2068-2101
3. Choi JY, Akins PT (1999) Bacterial meningitis. In: Osenbach RK, Zeidman SM (eds.). Infection in Neurological Surgery. Lippincott Raven Philadelphia
4. Coisne C, Faveeuw C, Delplace Y, Dehouck L, Miller F, Cecchelli R, Dehouck B (2006) Differential expression of selectins by mouse brain capillary endothelial cells in vitro in response to distinct inflammatory stimuli. Neuroscience Letters 392: 216-220
5. Deckert-Schlüter M, Schlüter D, Hof H, Wiestler OD, Lassmann H (1994) Differential expression for ICAM-1, VCAM and their ligands LFA-1, Mac-1, CD 43, VLA-4 and MHC class II antigens in murine Toxoplasma encephalitis: a light microscopic and ultrastructural immunohistochemical study. J Neuropathol Exp Neurol 53: 457-468
6. Dodge PR, Swartz MN (1965) Bacterial meningitis – a review of selected aspects. II. Special neurologic problems, postmeningitic complications and clinicopathologic correlations. N Eng J Med 272: 1003-1010
7. Engelhardt B, Vestweber D, Hallmann R, Schulz M (1997) E- and P-Selectin are not involved in the recruitment of inflammatory cells across the bloodbrain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. Blood 90(11): 4459-4472
8. Ertel W, Morrison MH, Wang P, Zheng F, Ayala A, Chaudry ICH (1991) The complex patterns of cytokines in sepsis. Ann Surg 214: 141-148

9. Feuerhake F, Fuchsl G, Bals R, Welsch U (1998) Expression of inducible cell adhesion molecules in the normal human lung: immunohistochemical study of their distribution in pulmonary blood vessels. *Histochem Cell Biol* 110: 387-394
10. Frosch M (2003) Akute bakterielle Meningitis. Uni-Med Bremen
11. Hauck CR (2002) Cell adhesion receptors – signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 191: 55-62
12. Igarashi M, Gilmartin RC, Gerald B, Wilburn F, Jabbour JT (1984) Cerebral arteritis and bacterial meningitis. *Arch Neurol* 41:531-535
13. Isenberg H (1998) Meningitis im Kindesalter und Neugeborenenensepsis. Steinkopff Darmstadt
14. Janeway CA (2002) Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Aufl. 5
15. Kim JS (1996) Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. *J Neurol Sci* 137(2): 69-78
16. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G and Kallioniemi OP (1998) Tissue Microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4: 844-847
17. Love S (2001) Autopsy approach to infections of the CNS. In: Love S (ed.) *Neuropathology*. Springer Berlin Heidelberg New York, S. 1-50
18. Lukacs NW, Ward PA (1996) Inflammatory mediators, cytokines and adhesion molecules in pulmonary inflammation and injury. *Adv Immunol* 62: 257-307
19. Luscinskas FW, Ma S, Nusrat A, Parkos CA, Shaw SK (2002) Leukocyte transendothelial migration: a junctional affair. *Semin Immunol* 14: 105-113
20. Mann T (1980) Doktor Faustus. Das Leben des deutschen Tonsetzers Adrian Leverkühn erzählt von einem Freunde. Fischer Verlag, Frankfurt a.M., S.632-641

21. Mégarbane B, Marchal P, Marfaing-Koka A, Belliard O, Jacobs F, Chary I, Brivet FG (2004) Increased diffusion of soluble adhesion molecules in meningitis, severe sepsis and systemic inflammatory response syndrome without neurological infection is associated with intrathecal shedding in cases of meningitis. *Intensive Care Med* 30: 867-874
22. Nugent SK, Bausher JA, Moxon ER, Rogers MC (1979) Raised intracranial pressure: its management in *Neisseria meningitidis* meningoencephalitis. *Am J Dis Child* 133: 260-262
23. Osborn L (1990) Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 62: 3-6
24. Pfister HW (1989) Die komplizierte eitrige Meningitis des Erwachsenen: weiterhin hohe Letalität durch Vaskulitis und Hirndruck. *Nervenarzt* 60: 249-254
25. Pfister HW, Koedel U, Haberl RL, Dirnagl U, Feiden W, Ruckdeschel G, Einhaupl KM (1990) Microvascular changes during the early phase of experimental bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 10: 914-922
26. Pfister HW, Borasio GD, Dirnagl U, Bauer M, Einhaupl KM (1992) Cerebrovascular complications of bacterial meningitis in adults. *Neurology* 42: 1497-1504
27. Prince JE, Brayton CF, Fossett MC, Durand JA, Kaplan SL, Smith CW, Ballantyne CM (2001) The differential roles of LFA-1 and Mac-1 in host defense against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 166(12): 7362-7369
28. Quagliarello VJ, Long WJ, Scheld WM (1986) Morphologic alterations of the blood brain barrier with experimental meningitis in the rat. *J Clin Invest* 77: 1084-1095
29. Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M (2002) Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med* 30 (Suppl 5): 302-312
30. Robert-Koch-Institut (2001) Wichtige Infektionskrankheiten in Deutschland – zur Situation im Jahr 2000: Infektionen des Zentralnervensystems. *Epid Bull* 48: 365-369

31. Robert-Koch-Institut (2005) Zur Situation bei ausgewählten Infektionskrankheiten in Deutschland: Invasive Meningokokken-Erkrankungen im Jahr 2004. *Epid Bull* 34: 307-313
32. Sabatino G, De Martino M, Chiarelli F, Paciocco D, Amerio G (1999) Leukocyte adhesion deficiency disorder in an infant. *Int J Immunopathol Pharmacol* 12(3): 139-142
33. Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP and Sauter G (1999) Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 5: 1966-1975
34. Semmrich M, Smith A, Feterowski C, Beer S, Engelhardt B, Busch DH, Bartsch B, Laschinger M, Hogg N, Pfeffer K, Holzmann B (2005) Importance of Integrin LFA-1 deactivation for the generation of immune responses. *J Exp Med* 201(12): 1987-1998
35. Sperhake JP, Tsokos M (2004) Pathological features of Waterhouse-Friderichsen syndrome in infancy and childhood. In: Tsokos M (Hrsg.) *Forensic Pathology Reviews* Vol.1, Humana Press Inc., Totowa, NJ, S. 219-231
36. Springer TA (1990) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314
37. Thomas C (2006) *Histopathologie*, 14. Aufl., Schattauer Verlag Stuttgart New York
38. Tsokos M, Matschke J, Cordes O, Heinemann A, Sperhake J, Koops E, Schulz F, Lockemann U, Püschel K (2000) Bakterielle Meningitis als Ursache des plötzlichen Todes – Phänomenologie, Histomorphologie und Erregerspektrum. *Rechtsmedizin* 10: 128-134
39. Tsokos M (2003) Fatal Waterhouse-Friderichsen syndrome due to *Ewingella americana* infection. *Am J Forensic Pathol* 24: 41-44
40. Tuomanen EI (1996) Molecular and cellular mechanisms of pneumococcal meningitis. *Ann NY Acad Sci* 797: 42-52

41. Tuomanen EI (1996) Entry of pathogens into the central nervous system. FEMS Microbiol Rev 18: 289-299
42. Vorbrodt AW, Dobrogowska DH (2003) Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. Brain Res Rev 42: 221-242
43. Wiethölter H (1995) Entzündliche Erkrankungen, In: Remmele U, Pfeiffer J, Schröder JM (Hrsg.) Pathologie, Bd.6: Neuropathologie, Muskulatur, Sinnesorgane, 2. Aufl. Springer Berlin Heidelberg New York, S. 122-156
44. Wolburg H, Lippoldt A (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. Vascul Pharmacol 38: 323-337

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen herzlich danken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre:

Mein ganz spezieller Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. M. Tsokos, der mir ermöglicht hat, im Rahmen meiner Dissertation am Aufbau einer neuen Untersuchungstechnik mitzuwirken. Seine unermüdliche Unterstützung und fachliche Kompetenz waren mir stets sicher, was die Realisation dieser Arbeit überhaupt ermöglichte. Durch ihn nehme ich nicht nur ein Mehr an medizinischem Fachwissen, sondern auch neue Ideen und viele Ratschläge auf meinen weiteren Lebensweg mit.

Ein besonderer Dank geht an die Assistenzärztin Frau Dr. U. Reichelt für ihre tatkräftige Hilfe und die reibungslose gute Zusammenarbeit von der Zusammenstellung der Meningitis-Arrays über die Hilfe bei der Immunhistochemie bis zur statistischen Auswertung dieser Arbeit. Für die neuropathologische Beurteilung der Meningitis-Histologien, sowie für die Hilfe bei der immunhistochemischen Auswertung möchte ich mich auch bei Herrn Dr. J. Matschke bedanken.

Herrn Professor G. Sauter und Herrn Professor K. Püschel möchte ich für die gute Zusammenarbeit zwischen dem Institut für Pathologie und dem Institut für Rechtsmedizin danken.

Herrn Professor G. Sauter gilt mein spezieller Dank, da er mir bei der Austestung der Antikörper eine große Hilfe war.

Ohne das enorme Engagement des Laborteams, allen voran Frau M. Mirlacher und Herrn Dr. R. Simon, hätte die Erstellung des Meningitis-Arrays und die immunhistochemischen Färbungen so nicht durchgeführt werden können, Ihnen allen gilt ein großes Dankeschön.

Diese Arbeit wurde gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (TS-86/4-1).

9. Lebenslauf

Name: Anna-Sophie Torke

Anschrift: Ostpreußenplatz 1
22049 Hamburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Telefonnummer: 040/69466510

e-mail: pignon@gmx.de

Geburtsdatum: 10. Oktober 1981

Geburtsort: Rendsburg

Eltern: Imanuel Christian Torke, Kaufmann
Gabriele Torke, geborene Meyer, kaufmännische
Angestellte

Schul Ausbildung: 1988 – 1992 Grundschule in Todenbüttel
1992 – 2001 Helene – Lange – Gymnasium
in Rendsburg

Schulabschluss: 29.06.2001 Abitur mit Note 1,5

Leistungskurse: Biologie, Geschichte

Berufsausbildung: seit 01.07.2001 bei der Bundeswehr als
Soldat auf Zeit zur
Ausbildung zum Sanitätsoffizier;
seit April 2002 freigestellt zum Studium
der Humanmedizin;
April 2004 Physikum mit Note 2;
Februar 2007 Beginn des Praktischen Jahres
in der Asklepios Klinik Barmbek

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:.....