

6. KAPITEL

DISKUSSION

Es sprechen zahlreiche Untersuchungen für die Existenz eines Liquorabflusses in das lymphatische System. CSERR ET AL. (1992) und KIDA ET AL. (1993) konnten zeigen, daß die Ratte bis zu 50% ihres Liquors durch die Lamina cribrosa in die lymphatischen Gefäße der Nasenschleimhaut und von dort weiter in die tiefen cervikalen Lymphknoten drainiert. Im Bereich des Spinalkanals wurde eine Liquordrainage in die lumbalen paraaortalen Lymphknoten beobachtet (BRIERLEY & FIELD, 1948; KIDA ET AL., 1993). Neuere Arbeiten konzentrierten sich vorwiegend auf die Darstellung eines Drainageweges mit Hilfe von artifiziell in den Subarachnoidalraum eingebrachten Substanzen. So wurde einerseits die Drainage von Farbstoffen (KIDA ET AL., 1993) und radioaktiv markierten Proteinen (BOULTON ET AL., 1997) und Zellen (OEHMICHEN ET AL., 1983) untersucht, andererseits machte man sich mit der Injektion unterschiedlicher Kontrastmittel neuere bildgebende Verfahren zunutze (HUNTER ET AL., 1995; BRINKER ET AL., 1997). Nur wenige Studien befassen sich mit der physiologischen Abräumfunktion der Lymphdrainage bei Schädelhirntraumen (OEHMICHEN ET AL., 1989; LÖWHAGEN ET AL., 1994). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Liquordrainage aus dem Subarachnoidalraum in die peripheren Lymphknoten der Ratte unter Verwendung eines Traumamodells. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf den zeitlichen Ablauf der Erythrozytendrainage in den unterschiedlichen Lymphknotenstationen gerichtet. Zusätzlich wurde im Rahmen einer Therapiestudie der Zusammenhang zwischen Hirndruck und Intensität der Erythrozytendrainage untersucht.

6.1. DIE LIQUORDRAINAGE IN DIE TIEFEN CERVIKALEN- UND LUMBALLEN PARAAORTALEN LYMPHKNOTEN

6.1.1. Das zeitliche Auftreten der Erythrozytendrainage in Beziehung zur Lokalisation

Im fünften Kapitel wurde geschildert, daß bereits 10 Minuten nach dem Trauma freie Erythrozyten im subkapsulären Sinus der tiefen cervikalen Lymphknoten zu erkennen waren. Erst ca. 16 Stunden später zeigten sich erstmals einzelne Erythrozyten in den lumbalen paraaortalen Lymphknoten. Die beobachtete zeitliche Verzögerung zwischen cervikalen und lumbalen Lymphknoten läßt sich mit den Erkenntnissen anderer Untersuchungen gut vereinbaren. KIDA ET AL. (1993) fanden nach der Injektion von 50 µl Tinte in die Cisterna magna von Ratten eine Schwärzung des Randsinus mit einer Verzögerung von sechs Stunden zwischen den lumbalen paraaortalen Lymphknoten und den tiefen cervikalen Lymphknoten, die bereits nach 30 Minuten eine Drainage der Tinte zeigten. Dazu muß man wissen, daß 30 Minuten die kürzeste untersuchte Überlebenszeit in der Arbeit von KIDA war. Es könnte sich somit schon früher Tinte in den Sinus der tiefen cervikalen Lymphknoten befinden. BRINKER ET AL. (1997) führten in einer Untersuchung an Ratten in der ersten Versuchsserie die intrazisternale Applikation von Röntgenkontrastmittel, in der zweiten die Injektion von Tinte über den gleichen Katheter durch. Sieben Minuten nach Infusionsbeginn erreichte das Kontrastmittel die Lamina cribrosa, 20 Minuten nach Infusion der Tinte wurden einzelne Farbpartikel in den cervikalen Lymphgefäßen beobachtet. Eine derartig schnelle Liquordrainage in die tiefen cervikalen Lymphknoten wurde auch bei anderen Tieren beobachtet. Drei bis fünf Minuten nach Injektion von Farbstoffen in den Liquor, konnte ARNOLD (1972) bereits makroskopisch die Injektion zarter Lymphgefäße am offenen Halssitus von Meerschweinchen beobachten. YAMAZUMI (1989) schildert die Drainage von Tinte aus dem Subarachnoidalraum in die tiefen cervikalen Lymphknoten von Kaninchen und fand die ersten Anzeichen für eine Drainage in den Lymphknoten bereits nach einer Minute. Ebenfalls eine Untersuchung an Kaninchen, jedoch unter Zuhilfenahme von radioaktiv markiertem Albumin, zeigte nach drei Stunden eine Anreicherung innerhalb der tiefen cervikalen Lymphknoten, bei Katzen und Schafen nach acht Stunden (YAMADA ET AL., 1991). Wie auch in der vorliegenden Arbeit, untersuchten OEHMICHEN ET AL. (1983) die Erythrozytendrainage in den tiefen cervikalen Lymphknoten, mit dem Unterschied, daß sie Kaninchen verwendeten

und radioaktiv markierte Erythrozyten intrazerebral appliziert. Nach einer Stunde wurden in den tiefen cervikalen Lymphknoten erstmals Erythrozyten beobachtet.

Wie in Abschnitt 2.1.2.1. erwähnt, gibt es Anhaltspunkte dafür, daß bei der Ratte ca. 50% des Liquors über die Lymphbahnen der Nasenschleimhäute in die tiefen cervikalen Lymphknoten drainiert werden (CSERR ET AL., 1992). Neuere Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe um M. Johnston, die sich überwiegend mit der volumetrischen Clearance des Liquors von Schafen nach Injektion von radioaktiv markiertem Humanalbumin befasst, zeigten einen Clearanceanteil der extrakraniellen Lymphgefäße von 48% (BOULTON ET AL., 1998). Dieses Ergebnis legt die Annahme nahe, daß eine große Ähnlichkeit zwischen den drainierenden Strukturen von Ratte und Schaf bestehen muß. Die von KIDA ET AL. (1993) geschilderten direkten Verbindungen zwischen dem Subarachnoidalraum im Bereich des Bulbus olfactorius und der Lymphgefäße der Nasenschleimhaut, in der Publikation als arachnoidale Kanäle bezeichnet (Abschn. 2.1.1.3.), stellen ein gutes anatomisches Korrelat für die dargestellte, umfangreiche Liquordrainage, wie sie bei der Ratte und beim Schaf vorgefunden wurde, dar. In der gleichen Arbeit wurden die propagierten Drainagewege in einem einfachen Schema

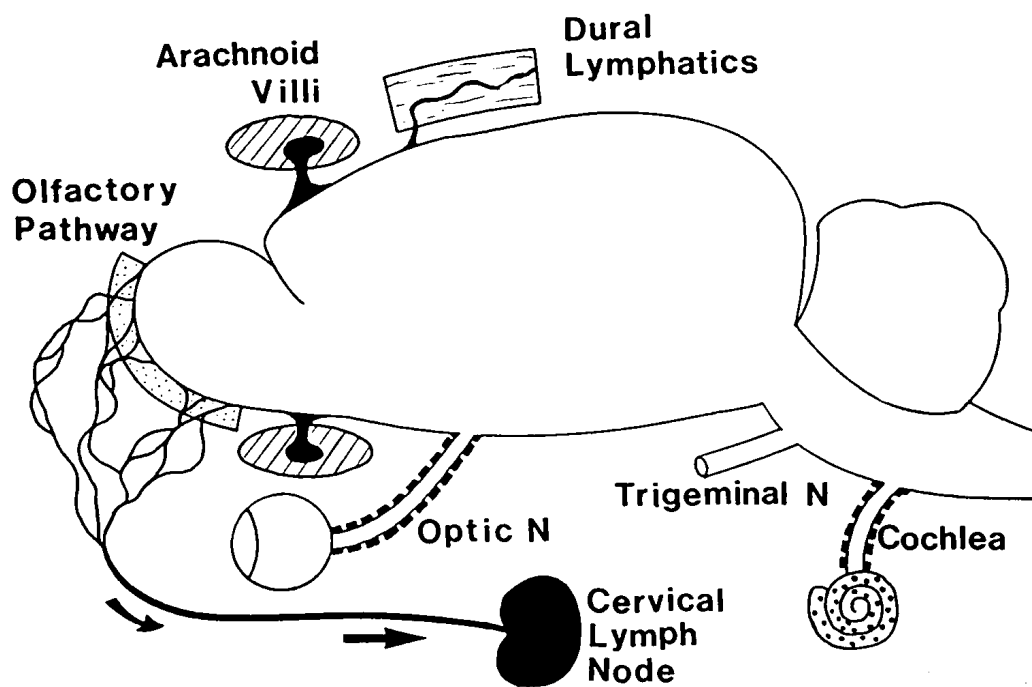


Fig. 14: Schema der Drainagewege des Liquors aus dem Subarachnoidalraum in das Lymphsystem (KIDA ET AL., 1993).

zusammengefasst (Fig. 14). Ergänzend soll noch eine Arbeit von LI ET AL. (1996) Erwähnung finden. Diese chinesische Forschungsgruppe konnte mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie und einem bildverarbeitenden Computersystem kleinste Öffnungen, in der Größenordnung von 0.33-2.98 μm , auf menschlichen Hirnhäuten identifizieren. Diese feinen Öffnungen, die im Anordnungsmuster der Lamina cribrosa teilweise sehr ähnlich sind, könnten für die Lymphdrainage des Liquors eine Rolle spielen, wenngleich die mittlere Größe der Öffnungen für den Durchtritt von Erythrozyten zu klein erscheint. Die Existenz des von JACKSON ET AL. (1979) und ERLICH ET AL. (1986) favorisierten Drainageweges entlang des Perineuralraumes durch die Lamina cribrosa hindurch, findet zwar in der ultrastrukturellen Untersuchung von GOMEZ ET AL. (1985) mit Meerrettichperoxidase Bestätigung, scheint aber für die Erklärung von größeren Flüssigkeitsbewegungen in die Lymphgefäße der Nasenschleimhaut eher ungeeignet (KIDA ET AL., 1993). Es sprechen also verschiedene Argumente, einschließlich der Ergebnisse der vorgeliegenden Arbeit, dafür, daß sich die Liquordrainage in die cervikalen Lymphknoten durch eine größere Menge und Geschwindigkeit auszeichnet und deshalb eine besondere Rolle in der Liquordrainage einnimmt.

Die Erythrozytendrainage in den lumbalen paraaortalen Lymphknoten findet später und in geringeren Mengen statt als im Bereich der cervikalen Lymphknoten. Unserer Ansicht nach könnten die folgenden Punkte für die zeitliche Verzögerung zwischen den beiden Lymphknotenstationen verantwortlich sein:

- Es wäre denkbar, daß eine Kompartimentierung des Subarachnoidalraumes einen gerichteten Liquorfluß und damit auch eine zeitliche Verzögerung erzeugt. YAMADA ET AL. (1991) konnten bei der Drainage von radioaktiv markiertem Albumin einen stärkeren Nachweis in den ipsilateral zur intrakraniellen Injektionsseite gelegenen tiefen cervikalen Lymphknoten verzeichnen. Nach der Injektion von Tinte in den cranialen Subarachnoidalraum wurde die drainierte Tinte in den tiefen cervikalen Lymphknoten beider Seiten vorgefunden (KIDA ET AL., 1993). Bei unseren Untersuchungen zeigte sich ebenfalls in den tiefen cervikalen Lymphknoten beider Seiten eine Erythrozytendrainage. Die lumbalen paraaortalen Lymphknoten wurden nur auf der rechten Seite präpariert. GREITZ (1993) untersuchte mittels Kernspintomographie und Radionuklid-Zisternographie

den Liquorfluß beim Menschen. Auf Grund der Ergebnisse findet sich die höchste Flußgeschwindigkeit des Liquors in einem Kompartiment ausgehend vom Foramen magnum hinauf zu den suprasellären Zisternen und abwärts in Richtung thoracolumbalen Bereich. GREITZ (1993) teilt den Subarachnoidalraum in fünf Kompartimente bezüglich der Flußgeschwindigkeit des Liquors auf. Einen Bereich mit hoher Flußgeschwindigkeit auf der Höhe von Hirnstamm und Rückenmark, zwei Kompartimente mit niedriger Flußgeschwindigkeit an oberen und unteren Ende des Subarachnoidalraumes und zwei jeweils dazwischen liegenden Kompartimenten mit mittlerer Flußgeschwindigkeit. Die Flußrichtungen verlaufen im cervikalen und thorakolumbalen Bereich nach anterior, im oberen und mittleren thorakalen Bereich nach posterior. Wenn man die Erkenntnisse von GREITZ (1993) auf die Ratte überträgt, resultiert daraus, daß der vom Hirnstamm ausgehende pulsatile Liquorfluß nach cranial der Drainage von Erythrozyten in den spinalen Subarachnoidalraum entgegenwirkt und somit eine zeitliche Verzögerung erzeugen könnte (1993).

- Die Erythrozyten müssen einen längeren Weg bis in den lumbosakralen Bereich des spinalen Subarachnoidalraumes zurücklegen. BRIERLEY ET AL. (1948) fanden nach etwa sechs Stunden die in den cranialen Subarachnoidalraum injizierte Tinte im gesamten spinalen Subarachnoidalraum wieder. Bereits nach vier Stunden wurde Tinte in der Nasenschleimhaut beobachtet. Unsere Untersuchungen zeigten ebenfalls eine zeitliche Differenz zwischen Auftreten von Erythrozyten in den tiefen cervikalen- und den lumbalen paraaortalen Lymphknoten. Das Auftreten von Tinte in den lumbalen paraaortalen Lymphknoten selbst, beobachtete BRIERLEY erstmals bei einer Überlebenszeit von 17 Stunden nach Injektion der Tinte in den lateralen Ventrikel. Dies unterstützt das in der vorliegenden Arbeit ermittelte Zeitintervall von 16 bis 24 Stunden. Demnach scheint der Weg aus dem spinalen Subarachnoidalraum zu den lumbalen paraaortalen Lymphknoten mehr Zeit in Anspruch zu nehmen, als die mit der Liquorzirkulation zurückgelegte Strecke aus den Seitenventrikeln bis in den spinalen Subarachnoidalraum.
- Die zeitliche Differenz spricht dafür, daß sich die Austrittspforten der Erythrozyten aus dem Subarachnoidalraum betreffend der beiden Lymphknotenstationen wahrscheinlich in der Morphologie und damit auch in der Flußgeschwindigkeit des Liquors unterscheiden.

KIDA ET AL. (1993) sprechen in ihrer Arbeit von arachnoidalen Kanälen, die den Subarachnoidalraum und die Lymphgefäße der Nasenschleimhaut direkt miteinander verbinden und somit eine schnelle Passage von drainierten Korpuskeln aus dem Liquorraum in das lymphatische System zulassen. BRIERLEY ET AL. (1948) beobachteten nach der Injektion von Tinte in den kranialen Subarachnoidalraum feine schwarze Kanälchen, die proximal der spinalen Nervenwurzelganglien in das umgebende Gewebe ziehen. Die genauen anatomischen Strukturen, die den spinalen Subarachnoidalraum mit Lymphgefäßen außerhalb des Duralsackes verbinden, bedürfen jedoch noch weiterer ultrastruktureller Untersuchung. MCCABE ET AL. (1968) haben sich die anatomischen Verhältnisse im subarachnoidalen Winkel des Spinalraumes genauer angesehen. Sie beschreiben jedoch keine Kanäle oder Wege, die eine Liquordrainage aus dem Duralsack in die umgebenden Lymphgefäße unterstützen würden.

Weitere Publikationen fanden ebenfalls Anhaltspunkte für eine Verbindung zwischen spinalen Subarachnoidalraum und paravertebralen Lymphknoten. Die Arbeitsgruppe um M. Johnston konnte mittels der Applikation eines radioaktiven Tracers (^{125}I -HSA) in den lumbalen Subarachnoidalraum die Drainage des Tracers in das periphere Lymphsystem darstellen. Dabei wurde in den lumbalen und den intercostalen Lymphknoten die größte Menge Radioaktivität nachgewiesen (BOULTON ET AL., 1996). Wie in Abschnitt 2.1.1.4. beschrieben, gelang MIURA ET AL. (1998) mit Hilfe einer enzymhistochemischen Methode die Markierung von epiduralen Lymphgefäßen an der Wirbelsäule von Makakenaffen. Zusätzlich injizierten sie Karbonpartikel in den spinalen Subarachnoidalraum und fanden diese in den mit der 5'Nukleotidase markierten epiduralen Lymphgefäßen wieder.

6.1.2. Zusammenhang zwischen Hirndruck und Erythrozytendrainage in das extrakranielle Lymphsystem

BRINKER ET AL. (1997) zeigten anhand von dynamischen Aufzeichnungen einer Videokamera, die mit einem Operationsmikroskop gekoppelt wurde, daß sowohl der atemabhängige intrathorakale Druck, als auch ein erhöhter intrakranieller Druck einen Einfluß auf die Liquordrainage der tiefen cervikalen Lymphknoten haben und sie verstärken kann. In einer Untersuchung von BOULTON ET AL. (1998) wurden bei Schafen Katheter in beiden Seitenventrikeln, in der Cisterna magna, in den cervikalen Lymphgefäßen und in der Vena

jugularis plaziert. Dann wurde die Drainage von markiertem Albumin in die cervikalen Lymphknoten mit der Höhe des ICP in Relation gesetzt. So konnte bei einem Tier bei einer Steigerung des ICP von 20 cm/H₂O auf 30 cm/H₂O ein Anstieg des cervikalen Lymphflusses von 5,82 ml/h auf 18,04 ml/h beobachtet werden. Auch in älteren Studien konnte gezeigt werden, daß nach Steigerung des Liquordruckes der Lymphfluß im Bereich der tiefen cervikalen Lymphknoten ansteigt. MCCOMBE ET AL. (1982) infundierten mit radioisotopenhaltigen Serumalbumin (RISA) angereicherten künstlichen Liquor in Ventrikel und Cisterna magna. Bei einem ICP um 20 mm/Hg konnte diese Arbeitsgruppe eine Erhöhung der RISA-Konzentration unter anderem im Bereich des Bulbus olfactorius und in den tiefen cervikalen Lymphknoten nachweisen. LOVE ET AL. (1984) stellten nach Infusion von künstlichem Liquor in die Cisterna magna von narkotisierten Katzen eine Steigerung des Lymphflusses in den cervikalen Lymphgefäßen fest. Bei unserem Versuchsablauf lag der ICP der Ratten vor dem Trauma (*Controlled Cortical Impact Injury*) zwischen 3 und 8 mm/Hg. Der Hirndruck der Ratte liegt unter normalen Bedingungen bei 4 mm/Hg (JACKOWSKI ET AL., 1990). Vier bis sechs Stunden nach dem Trauma stieg der Hirndruck auf Werte zwischen 10 und 15 mm/Hg. In der Versuchsserie 3 wurde im Rahmen der Untersuchung von potentiell neuroprotektiven Substanzen, in diesem Fall ein NMDA-Rezeptor-Antagonist (Aptiganel HCl), der ICP von behandelten Tieren, mit dem von der Kontrollgruppe nach 24 Stunden verglichen. Die Ratten, die 15 Minuten nach dem trauma Aptiganel HCl intravenös appliziert bekamen, wiesen einen ICP von 25 mm/Hg auf, bei den Tieren der Kontrollgruppe stieg der ICP auf bis zu 32 mm/Hg (KROPPESTEDT ET AL., 1998). Wie im Abschnitt 5.3.2. geschildert, fanden wir beim Durchmustern der Schnitte der tiefen cervikalen Lymphknoten von Cerestat® behandelten Ratten und aus der Kontrollgruppe deutliche Unterschiede in der Menge der Erythrozyten, die in die Lymphsinus drainiert wurden. Die vorgefundene Mengendifferenz bezüglich der drainierten Erythrozyten korreliert gut mit den jeweils gemessenen ICP. Zum einen lassen sich unsere Ergebnisse mit den Erkenntnissen der oben zitierten Publikationen gut vereinbaren, darüberhinaus erhärtet sich die Annahme, daß die in den Lymphsinus beobachteten Erythrozyten, die nicht markiert sind, aus dem durch das CCII verursachten subarachnoidalen Hämatom stammen.

Daß ein erhöhter intrakranieller Druck den Abfluß von im Liquor befindlichen Partikeln, folglich auch des Liquors selbst, in die cervikalen Lymphgefäße und -knoten forciert, wurde

diskutiert. Die Ursache für diesen Sachverhalt läßt sich an verschiedenen pathophysiologischen Überlegungen festmachen. Zum einen ist bekannt, daß nach einem stattgehabten subarachnoidalen Hämatom die Resorption von Liquor in den arachnoidalen Granulationen durch die Einlagerung von Erythrozyten - wenn auch nur temporär - blockiert wird. Der Übertritt von intakten Erythrozyten in den sagitalen Sinus wurde nicht beobachtet (ELLINGTON & MARGOLIS, 1969; ALKSNE & LOVINGS, 1972; TORVIK ET AL., 1978). Zum anderen wäre es möglich, daß bei einer steigenden Liquormenge, wie es bei der Infusion von artifiziellm Liquor der Fall ist (MCCOMBE ET AL., 1982; LOVE ET AL., 1984), die arachnoidalen Granulationen ab einem gewissen Punkt nicht mehr in der Lage sind, diese Flüssigkeitsmengen abzuführen, so daß der Anteil des Abflußweges in das cervikale Lymphsystem an der gesamten Liquordrainage zunimmt. Dies ist wiederum von der Anzahl der bei der jeweiligen Spezies beobachteten arachnoidalen Granulationen abhängig. Daß die Ausprägung von arachnoidalen Granulationen beim Menschen besonders zahlreich ist und dadurch vermutlich alternative Abflußwege in den Hintergrund treten, wurde in Abschnitt 2.1.2.1. erläutert. CASLEY-SMITH ET AL. (1975) konnten zeigen, daß sich durch die Unterbindung der cervikalen Lymphgefäße von Kaninchen und Ratten bei allen Tieren ein Hirnödem auslösen läßt. Durch die Lymphstauung werden die perivaskulären Räume, die normalerweise gar nicht oder nur sehr schwer abgrenzbar sind, sowohl intra-, als auch extrakranial entlang der Carotis interna sichtbar. Somit sprechen einige Ergebnisse für einen Zusammenhang zwischen dem intrakraniellen Druck und der Liquordrainage in die tiefen cervikalen Lymphknoten.

6.1.3. Die Verwendung von Erythrozyten als Marker der Liquordrainage

Die Frage, ob die propagierten Wege der Liquordrainage in die untersuchten Lymphknoten für Erythrozyten passierbar sind, spielt für die vorliegende Arbeit eine fundamentale Rolle. Von SIMMONDS (1952) durchgeführte Untersuchungen an Kaninchen und Katzen zeigten, daß nach Injektion von Erythrozyten in die Cisterna magna diese durchaus in die tiefen cervikalen Lymphknoten gelangen. KENNADY (1967) und MCQUEEN ET AL. (1972) fanden bei ihren Experimenten zur Erythrozyten-Clearance im Subarachnoidalraum bei Hunden ähnliche Anhaltspunkte. OEHMICHEN ET AL. (1979, 1983) untermauerten diese Erkenntnis später, indem sie radioaktiv makierte Leukozyten, Makrophagen und Erythrozyten nach intrazerebraler Injektion in den tiefen cervikalen Lymphknoten von Kaninchen vorfanden. Unsere

Untersuchungen sprechen dafür, daß Erythrozyten auch bei der Ratte einen geeigneten Marker für die Liquordrainage in die tiefen cervikalen Lymphknoten darstellen.

Unsere Beobachtung, daß auch Erythrozyten aus dem spinalen Subarachnoidalraum in die lumbalen paraaortalen Lymphknoten drainiert werden, wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Im Gegenteil, BRIERLEY ET AL. (1948), die eine Drainage von subarachnoidal injizierter Tinte in die lumbalen paraaortalen Lymphknoten vorfanden, konstatieren, daß nur Partikel mit einer maximalen Größe von 1,5 µm in die beschriebenen Lymphknoten drainiert werden können. Erythrozyten haben etwa einen Durchmesser von 8,4 µm. Es müssen also offensichtlich auch größere Partikel aus dem Subarachnoidalraum des Rückenmarkkanales in die lumbalen paraaortalen Lymphknoten gelangen. Zum Vergleich: die bei KIDA ET AL. (1993) verwendete indische Tinte wird mit einem Durchmesser von 20-50 nm (Fa. Rotring, Deutschland) angegeben. MIURA ET AL. (1998) wählten als Farbstoff Karbonpartikel mit einem Durchmesser von 21 nm (Mitsubishi, CH 40). Bei den Farbstoffen handelt es sich um wesentlich kleinere Partikeldurchmesser, so daß die drainierten Erythrozyten nach oben eine Grenzgröße bezüglich der Passagegängigkeit darstellen könnten. Ohne genauere anatomische Erkenntnisse bezüglich der Austrittsporten aus dem ZNS bleibt dies nur eine Vermutung.

Die Höhe des intrakraniellen Druckes scheint eine nicht unerhebliche Rolle für die Liquordrainage in periphere Lymphgefäße zu spielen (Abschn. 6.2.2.). Auf Grund der Nutzung von körpereigenen Erythrozyten als Marker entfällt die Punktion des Subarachnoidalraumes und damit auch die Entstehung eines artifiziell erhöhten intrakraniellen Druckes durch die Infusion von Flüssigkeit. Die Dura bleibt bei dem verwendeten Traumamodell völlig intakt, so daß es durch das Trauma selbst zu einem erhöhten intrakraniellen Druck kommen kann, was auch meistens geschieht (KROPPESTEDT ET AL., 1998).

Zum Schluß sei noch erwähnt, daß auch bei der Frage nach der Liquordrainage in den arachnoidalen Granulationen eine Darstellung des Drainageweges mit Hilfe von Erythrozyten als eine Art natürlichen Tracer versucht wurde (KIDA & WELLER, 1993). Dabei konnten keine Erythrozyten beim Verlassen der arachnoidalen Granulationen beobachtet werden (Vergl. Kap. 2.1.1.2.).

Tab. 8: Übersicht über bisher verwendete Marker

Verwendete Marker	Spezies	Autoren	Besonderheiten
<u>Farbstoffe:</u>			
Indische Tinte	Kaninchen	Brierley et al., 1948	Dynamische Videoaufzeichnung
	Kaninchen	Yamazumi et al., 1989	
	Ratte	Kida et al., 1993	
	Ratte	Brinker et al., 1997	
Karbonpartikel-Injektion / Kortex	Kaninchen & Katze	Casley-Smith et al., 1976	Provokation eines Hirnödems durch Ligation der Lymphgefäße am Hals
Karbonpartikel-Injektion / Cisterna magna	Makakenaffen	Miura et al., 1998	Enzymhistochemische Darstellung der spinalen epiduralen Lymphgefäße
<u>Markierte Proteine:</u>			
¹²⁵ I-HSA / Lat. Ventrikel	Kaninchen	Bradbury et al., 1981	Blockade der Lamina cribrosa mit Kaolin oder Cyanoacrylat
	Kaninchen	Bradbury et al., 1983	
^{99m} Tc-Technetium-Albumin	Ratte	Widner et al., 1987	Untersuchung der Tracerverteilung in den perivaskulären Räumen des Gehirnes
Rhodamin-Albumin	Ratte	Ichimura et al., 1990	
Evans blue-Albumin			
Gold-Albumin			
¹²⁵ I-HSA / Capsula int. & Mittelhirn	Kaninchen	Yamada et al., 1991	
¹²⁵ I-HSA / Laterale Ventrikel bds.	Schaf	Boulton et al., 1996	
	Schaf	Boulton et al., 1997	
	Schaf	Boulton et al., 1998 a/b	
<u>Unmarkierte Proteine:</u>			
HSA-Infusion / Lateraler Ventrikel	Ratte	Harling-Berg et al., 1989	Messung der HSA-Antikörperproduktion in den TCL mit ELISA
<u>Markierte Zellen:</u>			
Radioaktiv markierte Erythrozyten	Kaninchen	Kennady et al., 1967	Immunisierung der TCL mit Schafs-Erythrozyten
		Mc Queen et al., 1974	
		Oehmichen et al., 1983	
Schafs-Erythrozyten	Maus	Widner et al., 1988	
<u>Unmarkierte Zellen:</u>			
Erythrozyten aus intrakraniellen Blutungen / Sektionsgut	Mensch	Oehmichen et al., 1989	
	Mensch	Löwhagen et al., 1994	
Erythrozyten aus intrakraniellen Blutungen nach exp. SHT (CCII)	Ratte	Wolf et al., 1998	
<u>Kontrastmittel:</u>			
Nanopartikuläres Kontrastmittel Isovist 300	Kaninchen	Hunter et al., 1995	CT-Untersuchung Konventionell
	Ratte	Brinker et al., 1997	
<u>Szintigrafie:</u>			
⁵¹ Cr-EDTA	Kaninchen, Katze & Schaf	Bradbury & Cole, 1980	
^{99m} Tc-Technetium-antimony sulfide	Kaninchen	Pile-Spellman et al., 1984	
<u>Sonstige Partikel:</u>			
Ferritin / Laterale Ventrikel bds.		Ehrlich et al., 1986 Ehrlich et al., 1989	Messung nach artifizieller Erhöhung des ICP
Dextran	Kaninchen	McComb et al., 1982	
	Katze	Love & Leslie, 1984	
Horseradish peroxidase	Ratte	Szentivanyi et al., 1984	
	Kaninchen	Gomez et al., 1985	

6.1.4. Zuverlässigkeit der Zuordnung von Drainagegebieten

In Abschnitt 2.2.1.3 wurde erläutert, welche Lymphknoten nach dem Stand der Forschung welche Geweberegionen drainieren. Diese Zuordnung der sogenannten Tributargebiete zu ihren jeweiligen Lymphknoten wurde in einer Untersuchung an Rohnratten von ALOGNINOVA ET AL. (1995) mit Hilfe von Farbinjektionen in die unterschiedlichen Körperregionen erschöpfend untersucht. Einige Lymphknotenstationen sind inkonstant und insbesondere der Verlauf der Lymphgefäße unterliegt häufig Normvarianten. Desweiteren wird bei hintereinandergeschalteten Lymphknoten gelegentlich ein segmentales Überspringen beobachtet. Die Existenz von parallelgeschalteten Lymphknoten erhöht einerseits die Anzahl der Filterstationen, die mit einem Antigen

Kontakt bekommen, andererseits resultiert daraus eine diffusere Ausbreitung von drainierten Partikeln (KUBIK & FÖLDI, 1989), welche eine große Bedeutung für die Metastasierungswege entlang der Lymphgefäße hat. Solche Erkenntnisse relativieren die in der vorliegenden Untersuchung dargestellten Ergebnisse. Zum Beispiel wurden bei einem traumatisierten Tier in unserer Studie zwei tiefe cervikale Lymphknoten im oberen Bereich des Halses vorgefunden, von denen ein Lymphknoten sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch völlig frei von Erythrozyten war, der benachbarte Lymphknoten aber eine deutliche Erythrozytendrainage aufwies. Doch in Anbetracht der wesentlich geringeren Anzahl an Lymphknoten bei der Ratte und der großen Anzahl an aussagekräftigen Studien über die

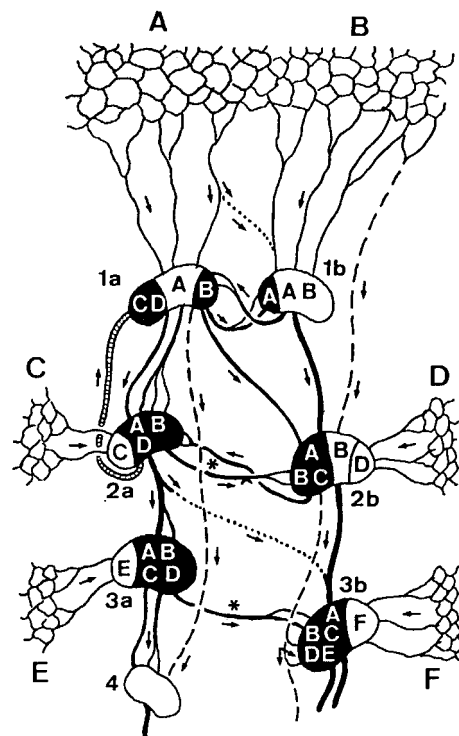


Fig. 15 Die schematische Darstellung soll die möglichen Verbindungen zwischen den Lymphknoten der unterschiedlichen Tributargebiete verdeutlichen. Das Vorliegen von Anastomosen afferenter Gefäße (punktierte Linie) und Kollateralen (gestrichelte Linien) kann zu einer Transposition der primären Lokalisation führen. Kollateralen können an mehreren Knoten vorbeilaufen, so daß ein segmentales Überspringen zustandekommen kann. Durch internodale Verbindungen werden die einzelnen Knoten zusätzlich parallel geschaltet. Es entsteht eine strickleiterartige Parallelverbindung (*), aus der häufig reziproke Verbindungen resultieren. Selten bestehen von zentral gelegenen Lymphknoten ausgehende rückläufige Verbindungen zu peripheren Lymphknoten (schraffiertes Gefäß). Trotz konstanter Verbindungen, wie wir sie in Abschnitt 2.2.1.2 geschildert haben, sollte die Variabilität durch die oben geschilderten Strukturen nicht unterschätzt werden. (KUBIK & FÖLDI, 1989)

Bedeutung der tiefen cervikalen Lymphknoten als regionale Lymphknoten des Gehirnes glauben wir, daß die vorliegenden Ergebnisse repräsentativ für die Liquordrainage sind. Zusätzlich zeigen Arbeiten, wie die von GRUNTZIG ET AL. (1979), bei der die Lymphdrainage des Auges genauer untersucht wurde, daß trotz der großen Variabilität des Lymphsystems scharfe Trennlinien zwischen benachbarten Tributärgebieten existieren. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß die vordere Kammer und der Subkonjunktivalraum in die Lymphnoduli mandibulares und cervicales superficiales¹⁴ drainieren, dagegen finden sich mit Technetium markierte Kolloide, die in Glaskörper oder Retrobulbärraum injiziert wurden, in den Lymphnoduli cervicales profundi wieder ().

DRINKER ET AL. (1933) haben in einer Untersuchung der poplitealen Lymphknoten von Hunden die Frage nach deren Filterkapazität von Erythrozyten in den Mittelpunkt gestellt. Im Tributärgebiet applizierte Erythrozyten (26400/cmm) wurden fast vollständig in den Lymphknotensinus festgehalten, nur eine geringe Anzahl (200-400/cmm) konnte im efferenten Lymphgefäß gezählt werden. Daraus läßt sich ableiten, daß der größte Anteil der durch die Lymphgefäße drainierten Erythrozyten nur bis zur ersten Lymphknotenstation gelangen. Dieser Sachverhalt spielt eine größere Rolle für den Einfluß der Wundversorgung im Bereich der Schädeltrepanation auf die Erythrozytendrainage in den tiefen cervikalen Lymphknoten.

¹⁴ Entsprechen nach der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nomenklatur den Lymphnoduli submandibulares und parotidici (Abschn. 2.2.1.2.).

6.2. ERYTHROZYTEN-MAKROPHAGEN INTERAKTIONEN

6.2.1. Der zeitliche Ablauf der Erythrozytenbindung

Innerhalb kürzester Zeit nach Erscheinen von Erythrozyten in den Sinus der tiefen cervikalen Lymphknoten können erste Erythrozyten-Makrophagen Interaktionen beobachtet werden. In Abschnitt 5.2.4.1. wurde beschrieben, daß in den Lymphknotensinus, deren Präparate 10 Minuten nach dem Trauma gewonnen wurden, bereits erste an Makrophagen angelagerte Erythrozyten sichtbar sind. Es fällt auf, daß kaum Erythrozyten den Weg in das Lymphknotenparenchym finden, sondern ausschließlich von Sinusmakrophagen gebunden werden. Selbst die Phagozytose von Erythrozyten durch unmittelbar benachbarte *sinus lining cells* bleibt aus. OEHMICHEN ET AL. (1980, 1982) schildern in ihren Untersuchungen eine ähnlich schnelle Anhaftung und die unmittelbar darauffolgende Inkorporation der Erythrozyten von sinusoidalen Phagozyten der marginalen und medullären Zone der Lymphknotensinus. Die Anhaftung erfolgte bereits eine Stunde nach Injektion autologer Erythrozyten in paratracheale cervikale Lymphknoten von Kaninchen. Ebenso wird bei OEHMICHEN ET AL. (1982) weder eine Phagozytose durch *sinus lining cells*, noch das Vordringen von Erythrozyten in das angrenzende Lymphknotenparenchym beobachtet. Die drainierten Erythrozyten bleiben also mehr oder weniger isoliert in den sinusoidalen Räumen. Nach neun Stunden konnten OEHMICHEN ET AL. (1982) die ersten Zeichen für den Abbau von Erythrozytenhämoglobin zu Hämosiderin in einzelnen Zellen nachweisen. Wir fanden am zweiten Tag post trauma zum ersten Mal ein geringes Vorkommen von Fe^{3+} -positiven Makrophagen. Zwischen drittem und fünftem Tag folgte eine deutliche Zunahme von bläulichem Eisenpigment innerhalb der Sinusmakrophagen in der Berlinerblau Reaktion, die auch nach 28 Tagen noch darstellbar war. Abweichend von den geschilderten Erkenntnissen fanden KETTLER (1936) und MASSHOFF (1947) frühestens nach vier Tagen ein Auftreten von Siderin nach subkutaner Applikation von Erythrozyten und deren Phagozytose im Lymphknoten. Der Transport der applizierten Erythrozyten aus dem subkutanen Bindegewebe in die lokalen Lymphknoten scheint mehr Zeit in Anspruch zu nehmen, als die Liquordrainage.

6.2.2. Der Blutlymphknoten - Modell für die Erythrozyten-Makrophagen-Interaktionen innerhalb des lymphatischen Systems

Blutlymphknoten lassen sich besonders einfach durch das außergewöhnlich zahlreiche Vorkommen von Erythrozyten innerhalb der Lymphsinus charakterisieren (CASTENHOLZ & CASTENHOLZ, 1996). Bei unseren Untersuchungen fiel auf, daß die an typischer Stelle gewonnenen Lymphknoten tatsächlich, wie von CASTENHOLZ & CASTENHOLZ (1996) beschrieben, mit Erythrozyten prall gefüllte Lymphsinus zeigen. Zusätzlich fanden wir, unabhängig von der Überlebenszeit der einzelnen Ratte, in jedem dieser mutmaßlichen Blutlymphknoten große Mengen an bräunlichem Hämosiderin. Daraus schlossen wir, daß in diesen Lymphknoten permanent Erythrozyten vorhanden sein müssen und diese folglich auch nicht mit der Erythrozytendrainage aus dem ZNS nach experimentellen Hirntrauma in Zusammenhang gebracht werden dürfen.

Es drängt sich die Frage auf, ob und inwiefern sich der Umgang von Makrophagen mit drainierten Erythrozyten im Sinus von Blutlymphknoten und normalen Lymphknoten unterscheiden. In vielen Arbeiten (LUK ET AL., 1973, NOPAJAROONSRI ET AL., 1974; KAZEEM ET AL., 1982; ABU-HILJEH ET AL., 1996) wird das Erscheinungsbild der Erythrozyten im Bereich der Lymphsinus und ihren Sinusmakrophagen als *Rosetten-Formation* bezeichnet. Die Rosetten-Formation besteht aus zwei Phänomenen: zum einen aus der Bindung von Erythrozyten an der Makrophagenoberfläche, und zum anderen aus dem Einschluß der Erythrozyten mittels Pseudopodien (*Makrophagenzellfortsätzen*) und damit auch aus der beginnenden Degradation (CASTENHOLZ & CASTENHOLZ, 1996). Es spricht nichts dagegen, daß sich der Degradationsprozess in den Blutlymphknoten nach dem in Kap. 2.2.6.1 dargestellten Schema (SASAKI, 1993) über den Ablauf der Erythrozytendegradation in Sinusmakrophagen richtet. An gleicher Stelle bereits erläutert, machen SCHROIT ET AL. (1984) Phosphatidylserine, die nach Beschädigung der Erythrozytenmembran zum Vorschein kommen sollen, für die Bindung an Sinusmakrophagen verantwortlich. Da wir, wie es auch KAZEEM ET AL. (1982) bei Blutlymphknoten beschreiben, eine zunehmende Deformierung und Veränderung der typischen Tellerform der Erythrozyten vorwiegend in den tieferen Lymphsinus beobachten konnten, scheint eine Beschädigung der Erythrozytenmembran auf dem Weg aus dem subkapsulären Sinus in die tiefer gelegenen Sinusanteile wahrscheinlich. In diesem Bereich nimmt das Vorkommen von Sinusmakrophagen, die bereits Erythrozyten

gebunden haben, stark zu. Es ist demnach durchaus denkbar, daß erst die Freilegung von Phosphatidylserinen die Anhaftung der Erythrozyten an die Sinusmakrophagen ermöglicht. Ebenfalls ein Sachverhalt der für beide Lymphknotentypen Gültigkeit zu haben scheint. Während die sporadische Auseinandersetzung von normalen Lymphknoten mit drainierten Erythrozyten eher dem Abbau von ebendiesen zu dienen scheint, stellt sich die Frage nach dem Sinn von Lymphknoten in denen ständig eine große Menge Erythrozyten vorliegen. Die Vermutung, Blutlymphknoten könnten eine Kontrollinstanz bezüglich der immunologischen Aktivität gegenüber körpereigenen Erythrozyten darstellen, klingt plausibel. CASTENHOLZ & CASTENHOLZ (1996) diskutieren in ihrer Publikation die Möglichkeit einer parallel zur Phagozytose ablaufenden Emperipolesis und Antigenexpression von Erythrozyten. Daraufhin kann es zu Interaktionen zwischen Sinusmakrophagen und T4-Lymphozyten kommen, die dadurch die Oberflächeneigenschaften der phagozytierten Erythrozyten gelangen und somit auf diese Weise für die Suppression einer Antikörperbildung sorgen könnten (Fig. 16). Diese Funktion ist für den Erhalt der Selbsttoleranz in einem immunologischen System sehr wichtig und würde den bisher noch eher unzureichend verstandenen Blutlymphknoten einen neuen Stellenwert zuordnen.

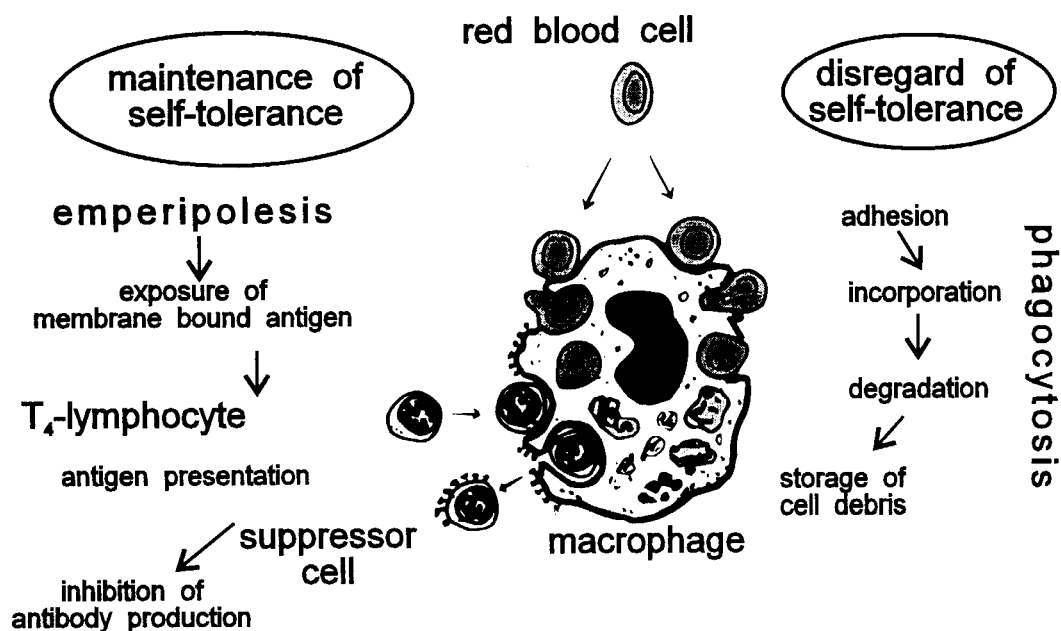


Fig. 16 Das vorliegende Diagramm stellt zwei verschiedene Interaktionsmechanismen zwischen Erythrozyten und Makrophagen innerhalb des Blutlymphknotens dar. Rechts ist die phagozytotische Aktivität des Makrophagen dargestellt, die aufgrund der Mißachtung von Selbsttoleranz gegenüber dem Erythrozyten die Degradation desselben nach sich zieht. Die linke Seite zeigt Prozesse, die mit der Erhaltung der Selbsttoleranz gegenüber körpereigenen Erythrozyten in Zusammenhang stehen. Dazu gehören die Emperipolesis und Antigenexpression des Erythrozyten innerhalb des Makrophagen, und die sequentielle Antigenpräsentation durch T4-Lymphozyten, die mit dem Makrophagen in Kontakt getreten sind. Auf diese Weise erlangt das Immunsystem ständig Information über Antigenstrukturen von Erythrozyten. Es ist nun in der Lage Suppressorfunktionen zu starten, die eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung von autoaggressiven Vorgängen gegen körpereigene Erythrozyten spielen und somit hämolytische Anämien verhindern (CASTENHOLZ & CASTENHOLZ, 1996).

6.3. METHODENDISKUSSION

6.3.1. Ist das *Controlled Cortical Impact Injury* eine geeignete Methode zur Simulation eines subarachnoidalen Hämatomes

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß das CCII bei unseren Versuchsreihen neben einem subarachnoidalen Hämatom auch Blutungen im Bereich des Marklagers verursacht hat (Abb. 13). In einem Überblick der experimentellen Schädelhirntraumata von POVLISHOCK (1997) wird in einer modifizierten Tabelle nach GENNARELLI (1994) deutlich, daß in jeder Gruppe der dargestellten Traumamodelle mindestens eine größere Genauigkeit bei der Reproduktion eines subarachnoidalen Hämatomes vorliegt. Andererseits kann ebenfalls in jeder der Gruppen eine, wenn auch nur gering ausgeprägte, intraparenchymale Blutung auftreten. Die Unterscheidung zwischen einer Drainage des intrazerebralen Interstitiums und des Subarachnoidalraumes, wie es in einer Publikation von WELLER (1998) dargestellt wurde, ist somit bei unseren Untersuchungen nicht möglich. Dies hat zur Folge das neben dem favorisierten Drainageweg im Bereich des Bulbus olfactorius auch der mögliche Weg entlang der perivaskulären Räume, also an den Gefäßeintrittspunkten des ZNS, in der zukünftigen Forschung unbedingt Berücksichtigung finden muß.

6.3.2. Operationstechnik

Bei einem von vier sham-operierten Tieren wurde eine große Anzahl Erythrozyten in den Sinus der tiefen cervikalen Lymphknoten vorgefunden. Dieser Befund könnte durch eine nicht sorgfältig genug durchgeführte Kraniotomie entstanden sein. Beim Auffräsen des Schädelknochens wurde der Hochgeschwindigkeitsbohrer kontinuierlich mit einer Kochsalzinfusion gekühlt. Trotz aller Sorgfalt zeigte die Histologie, daß bereits der Bohrvorgang durch Überhitzung ein, wenn auch nur geringfügiges Trauma, unter der geschlossenen Dura verursacht hat. Dabei könnte auch eine Subarachnoidalblutung kleinsten Ausmaßes, die aber bereits freie Erythrozyten in den Subarachnoidalraum gelangen läßt, entstehen. Andererseits wäre es denkbar, daß Erythrozyten in den Lymphsinus von sham-operierten Tieren aus einer Blutung stammen, die durch die Operationswunde im Bereich der Galea entstehen könnte. Es wurde jedoch nur in einem sham-operierten Tier eine größere Anzahl Erythrozyten gesehen (Abschn. 6.1.4.).

6.3.3. Die Immunhistochemie im Lymphknoten

Zur besseren Darstellung der Lymphknotensinus wurde in der vorliegenden Untersuchung der Versuch unternommen, das Netzwerk aus rethelialen Zellen, das die Lymphknotensinus ausspannt, mit einem monoklonalen Antikörper gegen Desmoplakin hervorzuheben. Genauer gesagt wurde das Ziel verfolgt, die Zellhaften, auch *Complexus adhaerentes* genannt, zwischen den einzelnen rethelialen Zellen in paraffineingebetteten Rattenlymphknoten anzufärben. Wie bereits geschildert, gelang dies trotz der großzügigen Unterstützung durch das Immunhistologische Labor des Pathologischen Instituts der Martin-Luther-Universität, Halle, unter Professor R. Moll am Gewebe der Ratte nur unzureichend.(Abb. 4A/B). In der Literatur (SCHMELZ ET AL., 1994) ist die Darstellung der *Complexus adhaerentes* nur an aus Rattenlymphknoten gewonnenen Gefrierschnitten mittels Immunfluoreszenz beschrieben worden. Sowohl in der zitierten Veröffentlichung, als auch im Immunhistologischen Labor in Halle gelang die Anfärbung von Desmoplakin im paraffineingebetteten Lymphknoten nur am Gewebe des Menschen (Abb. 3A).

Nach mehrmaliger Überprüfung und Wiederholung der verwendeten immunhistologischen Methode, und nach Rücksprache mit Professor Moll, kamen wir zu der Annahme, daß sich die Epitope der *Complexus adhaerentes* im Rattenlymphknoten von denen im Lymphknoten des Menschen bezüglich der Fragilität bei der Formalinfixierung, oder auch bei der Paraffineinbettung mit großer Wahrscheinlichkeit unterscheiden. Um durch die Formalinfixierung vernetzte Epitope zu demaskieren, stehen verschiedene Andauungsmethoden zur Auswahl. Wir haben, wie in Abschnitt 4.4.1.1. geschildert, die proteolytische Andauung mit 0,001%igem Trypsin in Kombination mit der thermischen Andauung in der Mikrowelle verwendet (Pathologisches Institut, Martin-Luther-Universität, Halle, Prof. Moll). Trypsin spaltet vorwiegend in der Nachbarschaft der beiden Aminosäuren Arginin und Lysin, die beide besonders eifrig mit Formalin reagieren. Da das Desmoplakin an den Zellhaften, also außerhalb der Zellen, nachgewiesen werden sollte, ist die Empfindlichkeit gegen die Vernetzung durch Formalinfixierungen besonders ausgeprägt. Außerdem könnten durch überhöhte Temperaturen bei der Paraffineinbettung thermolabile Epitope beeinträchtigt worden sein. Trotz umfangreicher Bemühungen war es nicht möglich, die Ergebnisse mit Paraffinschnitten von Rattenlymphknoten durch die Andauungsprozeduren zu verbessern.

6.3.4. Auswahl der Überlebenszeiten

Auf Grund von organisatorischen Schwierigkeiten zwischen den am vorliegenden Projekt beteiligten Arbeitsgruppen, wurden bei manchen Tieren nicht alle relevanten Lymphknotenstationen entnommen. Die ausgewählten Zeitintervalle zwischen den einzelnen Überlebenszeiten müssten in nachfolgenden Studien den Erkenntnissen der vorliegenden Untersuchung angepaßt werden. Als Beispiel läßt sich das Zeitintervall zwischen 6 und 24 Stunden nennen, in dem erstmals das Auftreten von Erythrozyten in den lumbal paraaortalen Lymphknoten gezeigt werden konnte. In nachfolgenden Arbeiten sollten die ausgewählten Überlebenszeiten auf diesen Zeitraum fokussiert werden.

6.4. AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit konnten weitere Indizien für eine direkte Liquordrainage in das Lymphsystem aufgezeigt werden. Zu den genauen anatomischen Verhältnissen, sowohl im Bereich der Lamina cribrosa, als auch im Bereich der spinalen Meningen, kann in dieser Untersuchung keine Aussage getroffen werden. In der bereits zitierten Arbeit von EHRLICH ET AL. (1986) wurde die Lamina cribrosa von Kaninchen ultrastrukturell untersucht, ein plausibler Drainageweg konnte jedoch nicht gezeigt werden von. KIDA ET AL. (1993) kündigten in ihrer Veröffentlichung eine weiterführende ultrastrukturelle Aufarbeitung des von Ratten gewonnenen Materiales an. Die Enzymhistochemie ist eine Methode, die sich zur Markierung von Lymphgefäßen eignet. Eine Publikation von MIURA ET AL. (1998) setzte sich mit der Darstellung von Lymphgefäßen unter Zuhilfenahme von 5'-Nucleotidase im Bereich der spinalen Hirnhäute von Makakenaffen auseinander. Die Darstellung von Lymphgefäßen mit 5'-Nucleotidase könnte ebenfalls in der Submucosa der Nase und im epiduralen Bindegewebe des spinalen ZNS der Ratte angewendet werden. Auch ist noch nicht eindeutig geklärt, ob die perivaskulären Räume der intrazerebralen Gefäße Kontinuität mit den perivaskulären Räumen der extrazerebralen Gefäße besitzen. Die perivaskulären Räume könnten ein wichtiges Korrelat für die Liquordrainage in das Lymphsystem darstellen. Es besteht nach wie vor die Notwendigkeit, mehr Licht in die anatomischen Strukturen der Drainagewege zu bringen.

Anhand von Tieren, bei denen durch eine Medikamentengabe der ICP gegenüber den restlichen Tieren gesenkt wurde, konnten die Zusammenhänge zwischen ICP und Intensität

der Erythrozytendrainage aufgezeigt werden. Eine Blockierung der Lamina cribrosa, wie BRADBURY (1983) in einer Untersuchung an Kaninchen zeigen konnte, würde möglicherweise die Liquordrainage im Bereich der spinalen Meningen verstärken, so daß die Drainage eines Tracers deutlicher abgegrenzt werden könnte.

Die Zukunftsperspektive bei der Erforschung der Liquordrainage in die tiefen cervikalen Lymphknoten des Menschen stützt sich vorwiegend auf neue bildgebende Verfahren, welche durch die Entwicklung bessere Kontrastmittel zunehmend in der Lage sein werden, den geringen Liquorfluß in das Lymphsystem beim Menschen darstellen zu können.