

**Aus dem Institut für Normale und Pathologische Physiologie  
der Philipps-Universität Marburg  
Leiter: Prof. Dr. Dr. J. Daut**

---

**Autonomes Nervensystem und Immunabwehr:  
Bedeutung der noradrenergen Innervation für die  
Migration von Splenozyten in die Milz.**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von**

**Mirjam Trudewind  
aus Bochum**

**Marburg 2004**

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität  
Marburg am 27.05.2004  
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Maisch  
Referent: PD Dr. Rogausch  
Correferent: Prof. Dr. Weihe

## Zusammenfassung:

Sowohl „naive“ wie auch „memory“ T-Lymphozyten haben beim Menschen und bei Säugetieren nur eine kurze Verweildauer im Blutkreislauf und wandern in lymphatisches und nicht-lymphatisches Gewebe ein. Bei sekundären Immunorganen wie den Peyer'schen Plaques der Darmwand und den Lymphknoten geschieht dies über kleine Blut- und Lymphgefäße, bei der Milz jedoch ausschließlich über die Blutbahn. Daher spielt die Regulation der Milzdurchblutung eine zentrale Rolle bei der Zellaufnahme in dieses Organ – eine Tatsache, die besondere Bedeutung dadurch bekommt, dass die Milz pro Tag etwa die gleiche Menge von Lymphozyten aufnimmt wie zusammengenommen alle lymphatischen Gewebe, die durch den ductus thoracicus drainiert werden.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, zwei Aspekte der Emigration von Leukozyten aus dem Blut in die Milz zu untersuchen: einerseits wird der Einfluss der Innervation und damit der Regulation der Durchblutung und andererseits der Einfluss von bakteriellem Endotoxin (LPS von *e. coli*) und damit die Bedeutung einer Immunstimulation der Milz auf die Zellaufnahme aus dem Blut geprüft. Die noradrenerge Innervation der Milz adressiert in erster Linie die glatte Gefäßmuskulatur, die von 60 – 80% der Fasern erreicht wird (20-30% gehen an T-Zellen der weißen Pulpa), so dass diese Gruppe von Experimenten, in der Eingriffe in die autonome Innervation der Milz vorgenommen wurden, im wesentlichen die Bedeutung des Blutkreislaufs für die Zirkulation von Zellen reflektiert. Zu den vielfältigen Wirkungen von bakteriellem Endotoxin gehört die Stimulation von B- und T-Lymphozyten, die Produktion von Interleukin-1 (IL-1 $\beta$ ) und die Heraufregulation von Adhäsionsmolekülen, so dass diese Gruppe von Experimenten, in der das Immunsystem mit LPS stimuliert wurde, die Bedeutung von lokalen molekularen Faktoren für die Zellaufnahme in die Milz widerspiegelt. Die Untersuchungen fanden an narkotisierten WKY-Ratten statt, bei denen die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Splenozyten aus dem Blut in die Milz über einen Zeitraum von maximal 24 Stunden gemessen wurde.

Die hauptsächlichen Ergebnisse sind:

1. Die Stimulation des Empfängertieres mit LPS 6 Stunden vor der Injektion von markierten Spenderzellen führt zu einer signifikant erhöhten Aufnahme von Leukozyten aus dem Blut in die Milz.
2. Nach lokaler Ausschaltung der noradrenergen Innervation durch chirurgische Durchtrennung des Milznerven kommt es ebenfalls zu einer signifikant erhöhten Zellaufnahme; diese kommt der Aufnahme nach Immunstimulation gleich.
3. Im Gegensatz zur lokalen Ausschaltung der Milzinnervation kommt es nach genereller Ausschaltung der sympathisch-noradrenergen Übertragung durch Entleerung der präsynaptischen vesikulären Speicher mittels Reserpin zu einer signifikant geringeren Aufnahme von Leukozyten aus dem Blut in die Milz im Vergleich zu den Kontrollen.
4. Sowohl bei Stimulation durch LPS als auch nach den Denervierungen ist die Milzdurchblutung auf das 2,5 fache der Ruhedurchblutung gesteigert, die Durchblutung anderer parenchymatöser Organe im Kreislauf und das Herzminutenvolumen sind unverändert. Bei systemischer Denervierung wird jedoch im Gegensatz zur lokalen Denervierung die Durchblutung auch in anderen großen parenchymatösen Organen erhöht, so dass der prozentuale Anteil der Milzdurchblutung am Herzminutenvolumen gleich oder sogar geringer als unter Kontrollbedingungen ist.
5. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass eine vermehrte lokale Durchblutung und das damit verbundene erhöhte Zellangebot die Zellaufnahme in die Milz fördern. Eine generelle Vasodilatation im Blutkreislauf dagegen führt zu einer Umverteilung im Blutkreislauf auf Kosten der Milzdurchblutung und wirkt sich nachteilig auf die Zellaufnahme in dieses Organ aus. Diese Ergebnisse zeigen, dass neben lokalen molekularen Mechanismen auch hämodynamische Faktoren wesentlich an der Regulation der Aufnahme von zirkulierenden Leukozyten aus dem Blut in die Milz beteiligt sind.

6. Praktische Bedeutung haben diese Befunde in Situationen, in denen eine generelle Vasodilatation auf Kosten der Durchblutung von sekundären Immunorganen geht, wie es z. B. bei Hochleistungssportlern der Fall ist, bei denen eine Durchblutungssteigerung großer Muskelgruppen kombiniert ist mit einer Verminderung der Milzdurchblutung; eine erhöhte Infektanfälligkeit ist in dieser Situation bekannt. Ähnliche Befunde werden in der Literatur nach alpha-adrenerger Stimulation z. B. beim physischen oder psychischen Stress berichtet, wo die Milzdurchblutung aufgrund der dichten noradrenergen Innervation überproportional stärker abnimmt als in anderen sympathisch innervierten Organen.

7. Die Bedeutung von Adhäsionsmolekülen als Vermittler für den Mechanismus der Zellemigration und die Bedeutung von Chemokinen werden durch die vorliegenden Ergebnisse nicht in Frage gestellt; jedoch wird die Bedeutung der autonomen Regulation für die Definition der Rahmenbedingungen, unter denen molekulare Mechanismen wirksam werden können, herausgestellt.

## Inhaltsverzeichnis:

Zusammenfassung	S. 3
Inhaltsverzeichnis	S. 6
Verzeichnis der Abkürzungen	S. 10
<b>I. Einleitung</b>	<b>S. 10</b>
I.1. Wege der Lymphozyten bei der Zirkulation zwischen Blut und Lymphe	S. 11
I.2. Unterschiede und Ablauf der Lymphozyten- Rezirkulation	S. 12
I.3. Antransport von Lymphozyten zu den lymphatischen Organen	S. 14
I.4. Bedeutung der Adhäsionsmoleküle	S. 16
I.5. Zusammenspiel von Endothel, Leukozyten und Chemokinen bei der Emigration	S.17
I.6. Bedeutung der sympathischen Innervation für die Verteilung der Lymphozyten und die Immunantwort	S. 18
I.7. Die Rolle der Milz für die Lymphozytenmigration	S. 23
I.8. Fragestellung	S. 25
<b>II. Material und Methoden</b>	<b>S. 26</b>
<b>A) Materialien und Geräte</b>	
II.1. Chemikalien und Lösungen -zur Herstellung der Zellsuspensionen – zur Markierung von Splenozyten – zur Zellzählung und Vitalitätsprüfung-	S. 26
II.2. Geräte	S. 28

## **B) Methoden und Versuchsdurchführung**

II.3. Herstellung von Zellsuspensionen aus einer Spendermilz	S.28
II.4. Markierung der Zellen	S. 29
II.5. Versuchsgruppen	S. 30
II.6 Durchführung und Auswertung der Untersuchungen (Herstellung von Splenozytensuspensionen der Empfängermilz – experimentelle Prüfung der Methode zur Markierung von Splenozyten – Markierung von Splenozyten für die Flowcytometrie – Bestimmung von Zellzahlen im Cytospot-	S. 32

<b>II.7. Statistische Methoden</b>	<b>S. 37</b>
------------------------------------	--------------

## **III. Ergebnisse**

III.1. Leukozytensubpopulationen der Spender- und Empfängermilz	S. 38
III.2. Blutgase und basale Kreislaufparameter der Empfängertiere	S. 40
III.3. Aufnahme von Zellen in die Milz unter basalen Bedingungen	S. 42
III.4. Aufnahme von Zellen aus dem Blut in die Milz nach Endotoxin	S. 45
III.5. Aufnahme von Zellen aus dem Blut in die Milz nach Durchtrennung des Milznerves.	S. 48
III.6. Aufnahme von Zellen aus dem Blut nach systemischer Ausschaltung noradrenerger Einflüsse	S. 50
III.7. Zusammenfassung der Ergebnisse	S. 54

<b>IV. Diskussion</b>	S. 56
IV.1. Diskussion der Wirkung von Endotoxin auf die Zellimmigration	S. 57
IV.2. Bedeutung der sympathischen Innervation der Milz für die Zellimmigration.	S. 59
IV.3. Bedeutung der lokalen Milzperfusion für die Zellimmigration	S. 60
IV.4. Einfluss der Verteilung des Herzminutenvolumens auf die Zellimmigration in die Milz	S. 63
IV.5. Mögliche Einflüsse von Noradrenalin auf die Zellmobilität	S. 68
IV.6. Schlußfolgerungen	S. 71
Theoretische Bedeutung der Befunde	S. 72
Praktische Bedeutung der Befunde	S. 74
<b>V. Literaturverzeichnis</b>	S. 76
<b>VI. Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>	S. 84
<b>VII. Danksagung</b>	S. 85
<b>VIII. Tabellen</b>	S. 86



## Verzeichnis der Abkürzungen:

A.	Arteria, Arterie
ACT	Ammoniumchlorid-Tris-Puffer
CD	cluster of differentiation
DT	ductus thoracicus
HEV	hochendotheliale Venulen
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
Ig	Immunglobulin
IL-1	Interleukin-1 $\beta$
i.v.	intravenös
LFA-1	Integrin $\alpha$ -Kette; entspricht CD 11a
LN	Lymphknoten
LPAM-1	$\alpha_4\beta_7$ – Integrin – Heterodimer
Mac-1	Integrin- $\alpha$ -Kette; entspricht CD11b
MECA	monoclonaler Antikörper, der mit LN-Adressinen reagiert
MEL-14	Antikörper gegen L-Selectin (CD62L)
NA	Noradrenalin
PALS	periarteriöläre lymphatische Hülle/Scheide
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFC	plaque forming cells
PP	Peyer'sche Plaques (Platten) der Darmwand
TNF	tumor necrosis factor
V	Vena, Vene
WKY	Wistar Kyoto – Rattenstamm

## **I. EINLEITUNG:**

Die Einbettung von Zellen der Immunabwehr in lymphatische Organe fördert die Effektivität derjenigen Abläufe, die an einer spezifischen Immunantwort beteiligt sind. Innerhalb dieser Organe wird ein Mikromilieu geschaffen, das wesentlich zum geregelten Ablauf einer Immunantwort beiträgt. Die charakteristische morphologische Struktur der sekundären Immunorgane darf jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass diese sich in einem ständigen Umbau befinden und eine hohe Fluktuation von Zellen innerhalb der morphologischen Strukturen stattfindet, weil viele der dort angesiedelten Zellen zwischen Blut und Gewebe zirkulieren. Das gilt nicht nur für die Einwanderung von neugebildeten Zellen aus dem Knochenmark und gereiften Zellen aus dem Thymus in sekundäre Immunorgane wie Milz, Lymphknoten, Peyersche Platten und andere Strukturen des Immunsystems, sondern auch für antigenpräsentierende Zellen wie z. B. die dendritischen Zellen. Die ständige Wanderung von lymphoiden Zellen durch den Organismus stellt eine der Säulen zur effektiven Immunüberwachung des Organismus dar (Gemsa et al., 1991). Die Intensität des Umbaus von lymphatischen Organen lässt sich an einer Zahl ablesen: täglich verlassen etwa  $5 \times 10^{11}$  Lymphozyten das Blut und die gleiche Anzahl kehrt wieder dorthin zurück (Pabst 1989). Es besteht allerdings ein Unterschied bezüglich des Migrationsverhaltens zwischen Zellen der spezifischen und der unspezifischen Abwehr: Granulozyten und Monozyten als typische Vertreter der angeborenen zellulären Immunabwehr verlassen in der Regel im Gegensatz zu Lymphozyten das Gewebe nicht mehr, in das sie eingewandert sind.

Die Wege, auf denen Lymphozyten rezirkulieren, sind das Blut- und das Lymphgefäßsystem. Die einzelnen lymphatischen Gewebe sind über Lymphgefäße miteinander verbunden, über die ein Teil der Zellen die Lymphknoten verlässt, um auf der Suche nach Antigenen zu zirkulieren. So kann gewährleistet werden, dass die "richtige" Zelle auf "ihr" Antigen trifft.

Einen Sonderfall unter den lymphatischen Organen stellt die Milz dar, die nur an das Blutgefäßsystem angeschlossen ist, keine effektive Lymphdrainage besitzt und darauf spezialisiert ist, im Blut zirkulierendes und schwach opsonisiertes antigenes Material zu bearbeiten.

Die Zellzusammensetzung von lymphatischen Organen ist also durch eine hohe Fluidität gekennzeichnet, die weit über das hinausgeht, was wir an zellulären Umbauvorgängen aus anderen parenchymatösen Organen wie Leber, Darm oder Nieren kennen. Im folgenden gebe ich eine Zusammenfassung der wesentlichen Faktoren, die für die Rezirkulation von Lymphozyten zwischen Blut und Gewebe eine Bedeutung haben, bevor ich die besondere Situation der Zellmigration für die Milz darstelle.

### **I.1. Wege der Lymphozyten bei der Zirkulation zwischen Blut und Lymphe**

Während ihrer Zirkulation werden die Zellen mit dem Blut durch den Körper transportiert. Dabei kommen sie an den Venolen der lymphatischen Organe vorbei. In den Venolen der Lymphknoten und der Peyer'schen Plaques ( PP ) befinden sich spezialisierte Endothelien, die von ihren Entdeckern Gowans und Knight "high endothelial venules" (HEV) genannt wurden (Gowans and Knight 1964). Diese Autoren beschrieben erstmals, wie die Lymphozyten an den Endothelzellen andocken und in das Gewebe emigrieren. Sie beobachteten, dass sich die Lymphozyten, unterschieden nach ihrer Größe, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der i.v. Injektion im ductus thoracicus ( DT) wiederfinden ließen. Die kleinen Lymphozyten erscheinen erstmals nach 2-3 Stunden und danach mit einem Peak nach 24 Stunden im DT und damit früher und in größerer Zahl als die großen Lymphozyten, die Plasmazellen ähneln. Die letzteren finden sich vor allem in der Darmwand außerhalb der PP wieder.

Wenn nach der Injektion von markierten Lymphozyten mit der Kanülierung des Ductus gewartet wird, kommt es zu einer Vermischung der injizierten Zellen mit den körpereigenen. Dadurch, dass der DT kanüliert wird, kann es

zu einer Beeinflussung des Messergebnisses kommen: wenn er über mehrere Tage kanüliert wird und Lymphe ohne Re-Infusion entnommen wird, dann vermindert sich nicht nur die Menge der Lymphozyten im DT, sondern auch in den Lymphknoten. Werden die Zellen des ductus jedoch wieder intravenös re-infundiert, so nimmt auch die Zahl der Zellen im ductus wieder zu. Auf diese Weise konnten Gowans und Knight zeigen, dass eine Verbindung zwischen Blut und Lymphsystem besteht und es sich somit um ein zusammenhängendes System handelt, was Voraussetzung für die Rezirkulation der Zellen ist.

## **I.2. Unterschiede und Ablauf der Lymphozyten-Rezirkulation**

Der Weg, den die Zellen nehmen, ist nicht zufällig, sondern zeigt Unterschiede im Emigrationsverhalten der Zellen in Abhängigkeit von der Differenzierung, der Klasse und des Ortes des ersten Antigenkontaktes (Lakey Berg et al., 1989). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Zellen ein "topographisches Gedächtnis" haben (Hamann et al., 1989). Bei einer Aktivierung in vivo wandern Lymphozyten aus den PP in die Darmwand, während aktivierte Zellen aus den peripheren Lymphknoten anfangs vor allem in die Lunge, nach 24 Stunden in die Leber wandern und einen geringen Eingang in Lymphknoten, PP und Milz finden. Werden die Zellen allerdings in vitro aktiviert, verhalten sich alle Lymphozyten wie die Zellen aus den Lymphknoten. Damit wurde ein unterschiedliches Verhalten von aktivierten Lymphozyten einerseits und reifen, aber "naiven" Lymphozyten andererseits postuliert: nicht aktivierte, "ruhende" Lymphozyten wandern aus dem Blut in die sekundären Lymphorgane Milz, Lymphknoten und PP, sowie in geringerem Maße in nicht lymphoide Organe wie die Lunge und die Leber ein, um von dort über die Lymphe des DT oder auf direktem Weg wieder ins Blut zu gelangen ( Hamann and Rebstock, 1993).

Aus diesen Experimenten hat sich das folgende "klassische" Modell für die Re-zirkulation von Lymphozyten herausgebildet:

***“Klassische” Modellvorstellung der Lymphozytenmigration:***

Reife “naive” Lymphozyten

wandern aus dem Blut (vorwiegend über HEV)  
in lymphatische Organe (Milz, LN, PP)  
und kehren über efferente Lymphbahnen und den d. thoracicus ins Blut  
zurück.

Aktivierte Lymphozyten

wandern in nicht-lymphatische Organe (Lunge, Leber, Haut)  
und erreichen später über afferente Lymphbahnen die Lymphknoten oder  
andere sekundäre Immunorgane (je nach “mucosa-Typ” oder “nicht-mucosa-  
Typ” des Homing)

Diese Modellvorstellung wird durch den Befund unterstützt, dass 90% der Zellen in den efferenten Lymphbahnen naive T-Lymphozyten sind, während 90% der Zellen in afferenten Lymphbahnen memory-T-Lymphozyten darstellen.

Im Gegensatz zu dieser Vorstellung stehen andere experimentelle Befunde. Es zeigte sich bei der Untersuchung des homing-Verhaltens von ruhenden Lymphozyten, dass hohe Mengen von “naiven” Zellen nach 30 Minuten in der Lunge zu finden sind, unabhängig davon, ob sie intravenös oder in den linken Ventrikel injiziert worden waren, so dass ein spezifischer Mechanismus zur Sequestration von Zellen an einem bestimmten Ort und keine zufällige Aufnahme im ersten zu passierenden Kapillarbett anzunehmen ist (Pabst und Binns, 1989). Außerdem scheint es sich bei diesen Zellen bevorzugt um T-Lymphozyten zu handeln. Sie bilden einen leicht mobilisierbaren pool, da sie zwar mit der Gefäßwand assoziiert sind, aber das Gefäß nicht verlassen. Auch das homing in der Leber scheint eine physiologische und selektive Ursache zu haben, da dort viele CD8<sup>+</sup> Zellen zu finden sind, die sich in den Blutgefäßen befinden, am Endothel adhären und nicht abgebaut werden. In der Milz finden sich bis zu 40 % der injizierten Zellen, was einen deutlich höheren Anteil ausmacht als im DT. Hinzu kommt, dass die Zellen

die Milz schneller verlassen als einen Lymphknoten, sowie alle über die Randzone eindringen, sich dann jedoch in Kompartimente verteilen.

Westermann et al. beschrieben das Migrationsverhalten der B-, T-Helfer- und der zytotoxischen T- Lymphozyten (Westermann et al., 1989 und 2001). Diese Zellen brauchen unterschiedlich lange, um zwischen Blut und DT zu zirkulieren. Für die Untersuchung nahmen sie Zellen aus dem DT, die ins Blut injiziert wurden. Die Zellen nehmen nach ungefähr einer Stunde im Blut ab, während sie in der Milz und im Knochenmark zunehmen und dort nach dem peak in der ersten Stunde auch weniger werden. In den PP und den mesenterialen LN nehmen sie über 24 Stunden zu. Die Zellen zirkulieren also mehrfach an den HEV vorbei, bevor sie die Blutbahn verlassen, wobei sie sich nach der ersten Emigration nochmals durch erneute Zirkulation neu verteilen. Dabei zeigen die verschiedenen Zelltypen eine organspezifische Verteilung. Es finden sich mehr T-Zellen im Blut, der Milz und den mesenterialen Lymphknoten, während sich im Knochenmark und in den Peyer Plaques mehr B-Zellen finden. Die zytotoxischen T-Zellen erscheinen später im DT, was vermutlich durch die langsamere Aufnahme in den mesenterialen Lymphknoten verursacht wird. Dies wird als ein Anzeichen für eine funktionsorientierte Verteilung der Zellen aufgefasst. Werden die Tiere vorher splenectomiert, erhöht sich die Anzahl der zirkulierenden Zellen, was auf eine Funktion der Milz als Zwischenspeicher hinweist.

### **I.3. Antransport von Lymphozyten zu den lymphatischen Organen**

In den vorausgegangenen Abschnitten wurde berichtet, wie rezirkulierende Zellen über Blut- und Lymphgefäße in sekundäre Immunorgane gelangen. Während in den efferenten Lymphgefäßen über 90% der Zellen den naiven Phänotyp zeigen, sind in der afferenten Lymphe vor allem memory-Zellen zu finden. Dieser Unterschied lässt sich einerseits durch die unterschiedlichen Funktionen erklären, welche diese Zellen erfüllen. Erstere befinden sich auf "Patrouillie", also auf der Suche nach Antigenen, die ihnen in den Lymphknoten präsentiert werden können, während die letzteren nach oder

während einer Immunreaktion in den drainierenden Lymphknoten gelangen. Allerdings ist es fraglich, ob man aus den beobachteten Eintrittspforten für die Zellen – die naiven Zellen gelangen größtenteils über die HEV in die LN – auf getrennte Wege schließen kann oder ob die Unterschiede nicht durch unterschiedliche Migrations- und Proliferationsgeschwindigkeiten verursacht sind, oder ob es sich möglicherweise um nach der Emigration veränderte Phänotypen handelt (Westermann et al., 1996). Das aktuelle Konzept über das Migrationsverhalten von Lymphozyten sieht so aus:

***Aktuelles Konzept der Lymphozytenmigration:***

Reife “naive” Lymphozyten und aktivierte Lymphozyten

durchqueren kontinuierlich lymphatische und nicht-lymphatische Organe

innerhalb der Organe wird über Verbleib oder Rezirkulation der Zellen entschieden

“naive” kehren über die efferente Lymphe und den d. thoracicus ins Blut zurück;

“aktivierte” Zellen akkumulieren in den Organen, wo sie ihre Funktion ausüben.

Dieses Konzept wird durch den Befund unterstützt, dass das Migrationsverhalten von „naiven“ und „aktivierten“ Lymphozyten nicht dem organspezifischen Muster des „klassischen“ Konzeptes folgt und dass beide Zellsorten in beträchtlicher Zahl sowohl durch lymphatische wie auch nicht-lymphatische Organe zirkulieren.

#### **I.4. Bedeutung der Adhäsionsmoleküle**

Die Unterschiede im homing-Verhalten der Leukozyten können durch Studien mit Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle der Endothelzellen, der mononucleären Zellen, sowie der Lymphozyten genauer untersucht werden. Dabei konnten mindestens drei Erkennungssysteme der HEV beschrieben werden, nämlich für periphere LN, PP und entzündete Synovialis (Lakey Berg et al., 1989). Durch Blockierung dieser einzelnen Oberflächenstrukturen, die anfangs nach ihren Antikörpern benannt wurden, zeigten sich zwei Hauptgruppen. Das durch den MEL-14-Antikörper beschriebene Antigen auf den Lymphozyten der Maus blockiert die Bindung der Lymphozyten an die HEV der peripheren LN, während die Bindung an HEV in der Mucosa durch Hermes-Antikörper und durch LPAM-1 in der Maus und VLA-4 im Menschen die Bindung an das HEV der PP und anderes mucosa-lymphoides Gewebe verhindern und dabei das homing in den anderen Gewebetyp unbeeinflusst lassen (Hamann und Thiele, 1989). Es konnte gezeigt werden, dass die MEL-14 und Hermes Antigene während der Differenzierung der Lymphozyten reguliert werden und so die Spezifität der Lymphozyten determinieren. Außerdem kommt es zu einem Verlust der MEL-14-Antigene bei voller Aktivierung, so dass ein Verbleib der Zellen im Gebiet der Immunantwort gewährleistet ist, während eine geringe Aktivierung die Expression fördert und so die Migration in das betroffene Gewebe erhöht. Treten die Lymphozyten in den ruhenden Zustand über, wird MEL-14 wieder exprimiert. Ein weiteres Oberflächenmolekül der T-Zellen ist das LFA-1, das nur einen gewebsunspezifischen Einfluß auf die Bindung an HEV hat und bei Antikörperbesetzung die Bindung noch möglich bleibt. Jedoch ist diese abhängig von der von den Lymphozyten exprimierten Menge an MEL-14. Je niedriger diese ist, um so größer ist die Hemmung. Außerdem scheint LFA-1 wichtig für das homing in der Lunge zu sein.

Die zweite große Gruppe von Oberflächenmolekülen findet sich auf den HEV, die mit den Rezeptoren der Lymphozyten in Verbindung treten. Auch hier gibt es gewebspezifische Moleküle. So besetzten die MECA-89 und -367 antigene Strukturen auf mucosa-lymphoiden HEV, während MECA-79



Antigene auf HEV in mesenterialen LN erkennt. Aber auch in den Venolen der Haut, die an einer chronischen Entzündung erkrankt ist, finden sich MECA-79- Antigene, so dass geschlossen werden kann, dass es zu einer Induktion der Liganden gekommen ist. Durch das Zusammenspiel der Oberflächenmoleküle auf Lymphozyten und Endothel kommt es zu einer gewebstypischen, den möglichen fremden Antigenen entsprechenden Zusammensetzung.

Eine besondere Stellung nimmt die Milz ein. Bei Blockierung der Homing-Rezeptoren sowohl der Lymphozyten als auch des Endothels mit Antikörpern kommt es immer noch zu einer Migration in die Milz, so dass man von einer HEV-unabhängigen Migration ausgeht (Pabst et al., 1989).

#### **I.5. Zusammenspiel von Endothel, Leukozyten und Chemokinen bei der Emigration**

Die Emigration der Zellen verläuft in mehreren Schritten (Springer, 1994). So wird durch Selectine auf den Leukozyten und dem Endothel eine lose Bindung der Leukozyten hergestellt, so dass die Zellen am Endothel entlang "rollen". Bei den beteiligten Selectinen handelt es sich um das L-Selectin, das auf allen Leukozyten außer den memory-Zellen exprimiert wird, um das P-Selectin, das in den Endothel- und Plättchen-Granula gespeichert und nach Induktion durch Entzündungsmediatoren auf die Membran gebracht wird, um neutrophile Granulozyten und Monozyten zu binden, sowie das E-Selectin, das auf dem Endothel nach Induktion durch IL-1, TNFalpha und Lipopolysaccharide induziert wird. Am Endothel kommt es zu einer Konzentrationsdifferenz von Chemokinen, Chemoattraktanten, die z. T. Leukozyten-spezifisch sind, und somit zu einer Richtungsvorgabe für die Leukozytenmigration sorgen. Durch das "rolling" erhalten die Leukozyten mehr Zeit auf die Chemokine zu reagieren. Zusätzlich scheinen die Chemokine die Adhäsivität der im weiteren wichtigen Integrine Mac-1 und LFA-1 durch Konformationsänderung zu erhöhen. Zusätzlich wird Mac-1

vermehrt exprimiert. Dies ermöglicht eine schnelle Regulierung der Adhäsion, was für den Beginn der Immunantwort bedeutend ist.

Auf dem Endothel befinden sich die ICAM-1, -2, und -3, die zur Gruppe der Immun-Globuline gehören. Auch sie sind durch Chemokine induzierbar und binden LFA-1 und Mac-1. Erst durch Blockierung aller drei ICAM's wird die T-Zellantwort unterdrückt.

Das durch den Antikörper MECA-367 beschriebene Immunglobulin Mad-CAM1 der PP bindet zwei Integrine und das L-Selektin, das für das Rollen der Leukozyten wichtig ist.

Nachdem eine feste Bindung erreicht ist, lösen die Lymphozyten die Endothelbarriere auf und emigrieren ins Gewebe.

## **I.6 Bedeutung der sympathischen Innervation für die Verteilung der Lymphozyten und die Immunantwort**

Es zeigt sich, dass nur ein kleiner Teil (ca. 25%) der Lymphozyten, die an das HEV binden, tatsächlich aus dem Blut emigriert. Tun sie dies aber, zeigen sie in den lymphoiden Organen ein spezifisches Verteilungsmuster. Die Verteilung der Lymphozyten in verschiedene Kompartimente steht in engem Zusammenhang mit der noradrenergen Innervation der Organe. K. Bulloch konnte 1985 zeigen, dass die Nervenfasern des Sympathikus zusammen mit den Blutgefäßen in die Organe eindringen und sich dort zum Teil mit diesen verzweigen und Plexus bilden (Bulloch, 1985). Dort regulieren sie durch die parakrine Wirkung auf die Gefäße den Blutfluss (Jänig, 1988). Die Durchblutung lymphatischer Organe ist nicht nur als Transportmedium für Substrate, sondern auch für die Bereitstellung der Zellen von Bedeutung. Außerdem wird postuliert, dass die Wirkung der Transmitter auf die Immunzellen selbst eine funktionelle Bedeutung hat, da T-Zellen sich an den Nervenenden orientieren und synapsenähnliche Kontakte bestehen (Felten et al., 1987). In der Milz verteilen sich die Nervenfasern in der weißen Pulpa, der periarteriolen lymphatische Scheide (PALS) und der Randzone, also in den T-Zellarealen, während sie sehr selten in den Follikeln, dann allerdings

mit einem T-Zellcluster, gefunden werden. Zu den T-Zellen kommen in der PALS und in der Randzone die erwähnten synaptischen Kontakte zustande. Auch in den Lymphknoten und im Gastrointestinaltrakt ist der Zusammenhang zwischen sympathischen Nervenendigungen und Kompartimenten gegeben (Weihe et al., 1991). Die Bedeutung der räumlichen Nähe zeigt sich in der postpartalen Entwicklung von Milzinnervation und Zellverteilung. Wird durch Thymektomie die Einwanderung von T-Zellen in die Milz verhindert, kommt es nach anfänglicher Ausbreitung der Nerven zum Rückgang dieser, während sie sich im Alter von selbst zurück bilden. Werden die Lymphozyten der Milz durch Cyclophosphamid vernichtet, verdichten die Nerven sich um die übriggebliebenen Zellen in den PALS (Felten et al., 1987; Madden et al. 1991 und 1995).

Untersucht man Nacktmäuse (nu/nu und nu/+ Mäuse) nach der Geburt, so findet man keinen Unterschied im Gehalt von Noradrenalin ( NA ) in der Milz (Besedovsky und del Rey, 1987). Während er danach im Verlauf von 7 Tagen bei den nu/+ Mäusen sinkt, bleibt er bei nu/nu erhöht. Injiziert man aber T-Effektor-Zellen oder transplantiert einen Thymus, so fällt der NA-Gehalt wie bei den nu/+. Werden Tiere nach der Geburt sympathektomiert, wirkt sich dies verstärkend auf die Immunantwort aus, während eine Sympathektomie beim Adulten die Immunantwort hemmt (del Rey und Besedovsky, 1981). Dies deutet auf eine gegenseitige Abhängigkeit der Entwicklung im Immunsystem und in der Milzinnervation hin und lässt auf einen, das Immunsystem in seiner Ausreifung regulierenden Effekt des Sympathikus schließen. Einen weiteren Hinweis auf einen Zusammenhang bietet die Beobachtung, dass keimfrei gehaltene Tiere eine geringere Menge an IgG sowie ein geringeres Milz- und Thymusgewicht haben, während sie einen höheren NA-Gehalt in Milz und Nebenniere aufweisen als die Kontrolltiere, deren NA-Gehalt 30-40% niedriger ausfällt (del Rey und Besedovsky, 1982).

Der NA-Gehalt der Milz ist nicht nur bedeutend für die Entwicklung des Immunsystems nach der Geburt, sondern spielt in der Regulation der

Immunantwort eine wichtige Rolle. Dies zeigt sich unter anderem im NA-Gehalt und im NA-Umsatz pro Gramm Gewebe, wobei die Milz direkt nach dem Hypothalamus kommt. Die Angaben über NoradrenalinKonzentrationen stammen aus dem Labor, in dem diese Arbeit durchgeführt wurde, die Angaben über den Noradrenalinumsatz stammen aus der Literatur (zit. u.a. in Rogausch et al., 1995 und 1997):

Tabelle I.1:

Organ:	Noradrenalin- gehalt (ng/g)	NA-Umsatz (ng/h * g)
Cortex	134 ± 7	32
Hypothalamus	1.119 ± 15	158
Lunge	50 ± 2	3
Diaphragma	122 ± 4	18
Leber	45 ± 2	9
Milz	977 ± 21	61

Im Verlauf einer Immunantwort ändert sich der NA-Gehalt der lymphoiden Organe, während er in anderen Organen gleich bleibt (del Rey und Besedovsky, 1982; Besedovsky und del Rey, 1996). Diese Veränderung verläuft zeitgleich mit der Zunahme der PFC in der Milz. Während die Immunreaktion zunimmt, sinkt der NA-Gehalt, um dann wieder anzusteigen und so die Immunreaktion zu bremsen. Dieser Zusammenhang zeigt sich deutlich beim Vergleich von high- und low-responder-Tieren, da bei den high-respondern nach Stimulation die Menge der PFC größer ist und der Abfall des NA-Gehalts länger andauert als bei low-respondern, bei denen sich der NA-Pegel früher normalisiert.

Durch die Wirkung der Catecholamine werden Signale zur Zellproliferation und Zellwanderung vermittelt. So wirkt Adrenalin sowohl proliferationsfördernd als auch –hemmend, in Abhängigkeit vom Zelltyp, der Konzentration und dem Zeitpunkt, zu dem es injiziert und auf die Zellen wirken konnte (Madden et al., 1995).

Alle diese Befunde weisen auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen sympathischem Nerven-system und Immunsystem hin.

Es darf aber nicht vergessen werden, dass 75 – 80% der noradrenergen Innervation nicht den Kontakt mit Lymphozyten sucht, sondern den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur reguliert. Felten und seine Mitarbeiter haben dies eindrucksvoll mit Hilfe der Anfärbung von Tyrosinhydroxylase-positiven Nervenfasern nach-gewiesen (Felten et al., 1987). Es ist daher zu fragen, ob das autonome Nervensystem nicht auch einen Einfluß auf die Wanderung und das homing der Lymphozyten hat. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Erhöhung des Catecholamin-Spiegels durch eine Infusion von Noradrenalin oder psychischer und physischer Stress, zu einer Leukozytose, also einer Zunahme der Zellen, vor allem von NK-Zellen, im peripheren Blut führen (Carlson et al.,1997). Diese Leukozytose lässt sich durch Blockade der  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren verhindern. Die Quelle dieser Zellen wird in der Literatur widersprüchlich behandelt (Review bei: Benschop et al., 1996). Trotzdem ist zu erwähnen, dass viele Arbeiten auf eine wichtige Rolle der Milz bei der Mobilisation der Lymphozyten hinweisen (Carlson et al., 1997; Nielsen et al., 1997).

Andere Literaturbefunde zeigen, dass das homing über die Fähigkeit der Lymphozyten an Endothel zu binden durch Catecholamine verändert wird (Carlson et al., 1996). Durch Vorbehandlung der zu injizierenden Zellen mit Catecholaminen kann eine höhere Migration in Milz und Lymphknoten verursacht werden. Die Ursache könnte in einer Desensibilisierung der Zellen durch herunterregulierte Rezeptoren liegen. Wenn das Empfängertier sympathektomiert wurde, wandern die Lymphozyten vermehrt in die Lymphknoten, werden aber Zellen eines denervierten Tieres injiziert, findet

man weniger Zellen in den lymphoiden Organen, was durch eine erhöhte Rezeptordichte erklärt wird. All dies deutet auf eine hemmende Wirkung der Catecholamine auf die Dauer der Ansiedlung in lymphoiden Organen und die Auslösung der Emigration aus diesen Organen hin. Eindeutige Beweise fehlen jedoch zur Zeit und ebenso ungeklärt sind die beteiligten Mechanismen, mit deren Hilfe noradrenerge Wirkungen das Migrationsverhalten von Lymphozyten beeinflussen können.

Eine Möglichkeit scheint in der Anwesenheit von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren auf der Oberfläche von Lymphozyten zu bestehen. Es wird berichtet, dass eine Verminderung von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren durch eine Vorbehandlung der Lymphozyten mit Catecholaminen die Bindung der Zellen an das Endothel verringert. Bei dieser Interaktion bleiben die endothelialen Adhäsionsmoleküle unbeeinflusst (Binns et al., 1992; Carlson et al., 1996).

Lymphozyten besitzen abhängig von der Subpopulation und vom Grad ihrer Aktivierung  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren, deren Dichte wie auch sonst im Körper reguliert wird. Bei langanhaltender Stimulation durch Catecholamine werden sie herunterreguliert, während die akute, kurzfristige Stimulation zu einer Zunahme vor allem der  $\beta_2$ -Rezeptordichte führt, da diese auch den Effekt in den Zellen vermitteln. Die in vivo-Infusion von  $\beta_2$ -Agonisten verursacht eine relative Leukozytose, vor allem durch Zunahme von NK- und Ts/c-Zellen. Diese Veränderung ist durch  $\alpha_1$ -Agonisten nicht auslösbar. Bei splenektomierten Individuen kommt es zu einer geringeren Rezeptorzunahme, was entweder durch den fehlenden Austausch von Subsets zwischen Milz und Blut oder durch spezifische Auswanderung aus der Milz verursacht sein kann (Van Tits et al., 1990). Die Subpopulationen haben zwar nicht signifikante, jedoch deutlich zu beobachtende Unterschiede in der Rezeptorverteilung. Nach Stimulation des Immunsystems kommt es zu einer Zunahme der Rezeptordichte, die zu einer Hemmung der Proliferation und der Sekretion führt. Jedoch ist auch eine Erhöhung der Immunantwort der zytotoxischen T-Lymphozyten und der

Antikörperproduktion der PFC durch Stimulation der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Rezeptoren erzeugbar (Livnat et al., 1985).

Die Lymphozyten besitzen aber nicht nur Rezeptoren für Catecholamine, sondern auch für Zytokine, Cortikosteroide und diverse Hormone. Außerdem können sie Hypophysenhormone bilden. Dies lässt auf vielfältige Verbindungen von neurokrinen, endokrinen und Immun- Funktionen schließen. Besedovsky beschreibt den Einfluß von Hypophysenhormonen auf die Immunantwort, der sich durch eine supprimierte Immunantwort bei Fehlen bestimmter Hormone zeigt (Besedovsky et al., 1997). Prinzipiell unterscheidet er dabei zwischen lokalen, peripheren Regulationsmechanismen, wie sie z. B. bei der Interaktion zwischen autonomer Innervation von Immunorganen und der "eigentlichen" immunologischen Funktion dieser Organe beobachtet wird ("short loop regulation"), und Mechanismen, die das Zentralnervensystem einschließen ("long loop regulation"). Zu den "long-loop-Regulationen" gehören nicht nur die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, sondern auch zentrale neuronale Antworten. So verändert sich z. B. bei einer spezifischen Immunantwort der Neurotransmittergehalt im Hypothalamus; dort sinkt, ausgelöst durch Zytokine wie Interleukin-1, der NA-Gehalt. Die elektrische Aktivität v.a. im Hypothalamus ist erhöht (del Rey et al., 1981). Man kann also von einem vernetzten Zusammenspiel der verschiedenen Systeme ausgehen. Somit ist die Regulation des Immunsystems nicht nur eine "interne" Angelegenheit, sondern wird durch Veränderungen im neuronalen wie auch im endokrinen System beeinflusst und übt selbst Einfluss auf diese Systeme aus.

### **I.7. Die Rolle der Milz für die Lymphozytenmigration**

In den obigen Abschnitten wurden die vielfältigen Einflüsse auf die Lymphozytenmigration dargestellt. Dabei dienen die HEV als Erkennungsmoleküle für die lymphatischen Organe und entzündlich verändertes Gewebe. Die Milz bildet eine Ausnahme, denn hier finden sich

keine HEV; die Migration in die Milz folgt also anderen, bisher ungeklärten Mechanismen. Andererseits ist die Milz ein wichtiges lymphatisches Organ, da hier nicht nur alte, verbrauchte Erythrozyten herausgefischt werden und unreife junge Erythrozyten heranreifen, sondern auch Antigene phagozytiert und Antikörper gebildet werden, das heißt, dass auch hier Abwehrvorgänge der unspezifischen und über Makrophagen vermittelten Art stattfinden und spezifische Immunantworten mit Ausbildung von Sekundärfollikeln und Keimzentren ausgeführt werden.

Zu diesen klassischen Abwehrvorgängen kommt die Lymphozytenwanderung als weitere wichtige Komponente der Immunabwehr hinzu und hier hat die Milz eine ganz zentrale Funktion, denn die Hälfte aller aus dem Blut emigrierenden Leukozyten durchwandert täglich die Milz. In der vorliegenden Arbeit konzentriere ich mich daher auf die Frage, welche Faktoren die Lymphozytenwanderung in die Milz regulieren.

Es wird vermutet, dass die sympathische Innervation in der Milz Einfluss auf die Verteilung und Migration der Lymphozyten hat, da es einerseits eine spezifische Lokalisation der noradrenergen Innervation und andererseits eine spezifische Verteilung der B- und T-Zellen in Kompartimente um die Nervenendigungen gibt.

Eine Kompartimentierung der noradrenergen Innervation und eine spezifische Verteilung von Zellen in B- und T-Zell-Areale weist jedoch nicht nur die Milz auf. Derartiges findet sich z. B. auch in Lymphknoten. Eine Besonderheit der Milz ist aber ihr hoher Gehalt an Noradrenalin, der die Dichte der sympathischen Innervation widerspiegelt. Abgesehen vom Neben-nierenmark hat die Milz den höchsten Noradrenalingehalt unter den peripheren Organen und der Noradrenalinumsatz ist etwa 4-6 mal höher als z. B. in der Leber (siehe Tab. I.1). Daher spielt in der vorliegenden Arbeit die Frage nach der Bedeutung der noradrenergen Innervation für die Zellwanderung in die Milz eine zentrale Rolle.



## **I.8. Fragestellung**

In den obigen Ausführungen wurde dargestellt, dass die Durchblutung den einzigen Weg darstellt, auf dem Lymphozyten in die Milz gelangen können, während in Lymphknoten neben den spezialisierten Blutgefäßen (HEV) afferente Lymphgefäße dem Antransport von Zellen dienen. Daher stellt der Blutfluß in der Milz den entscheidenden Parameter für die Zellaufnahme in dieses Organ dar. Da die Durchblutung der Milz in erster Linie durch sympathische, noradrenerge Einflüsse geregelt wird, wird die Arbeitshypothese aufgestellt, dass die lokale Milzperfusion und deren Anteil am Herzminutenvolumen bedeutsam für die Aufnahme von Lymphozyten aus dem Blut in dieses Organ sind. Eine noradrenerge Aktivierung z. B. während physischem oder psychischem Stress könnte eine Reduktion der Milzdurchblutung und dadurch eine verminderte Zellaufnahme aus dem Blutkreislauf in dieses Organ verursachen. Diese Arbeitshypothese wird in den folgenden Experimenten geprüft, indem einerseits die sympathische Innervation der Milz unterbrochen wird und andererseits in einem kliniknahen Modell generell der sympathische Vasokonstriktorentonus durch Verwendung eines Sympathicolytikums ausgeschaltet wird.

Im Vergleich zur Bedeutung des rein konvektiven Antransportes von Zellen durch den Blutkreislauf wird der Einfluss einer Aktivierung des Immunsystems mittels bakteriellem Endotoxin (Lipopolysaccharid von E. coli; LPS) untersucht, da angenommen wird, dass durch LPS die Zellaufnahme unter Mitwirkung von lokalen molekularen Mechanismen erhöht wird.

## II. Material und Methoden

### **A) Materialien und Geräte:**

#### **II.1. Chemikalien und Lösungen:**

##### Zur Herstellung der Zellsuspension:

Hanks Salt Solution Seromed® Fa. Biochrom KG Berlin

Ammoniumchlorid-tris-Puffer ( ACT ) zur Lyse von Erythrozyten. Diese

Lösung wird aus 2 Stammlösungen hergestellt:

Lösung 1 = 0,16 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( 8,55 g / l )

Lösung 2 = 0,17 M Tris, pH 7,65 (10,285 g / 0,5 l)

ACT= 9 ml Lösung 1 + 1 ml Lösung 2; einstellen  
auf pH 7,2

10 ml – Spritzen Fa. Braun, Melsungen

Edelstahlsieb und Nylonfilter 200  $\mu\text{m}$  und 100  $\mu\text{m}$

Tubes á 12 ml, Falcon, Fa. Becton Dickinson N.J., USA

Eppendorfpipetten

Pasteurpipetten

Fixierung der Zellen mit Formaldehyd 3%

##### Für die Fluoreszenzmarkierung von Splenozyten:

PKH26-GL, Fa. Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA

Fetales Kälberserum ( FCS ) 100 % und 5 %, Gibco,

Karlsruhe

Complete medium: 91,5 ml RPMI 1640, Fa. Gibco

0,5 ml Mercapto-Ethanol 0,1 M, Fa. Merck

1 ml Glutamin, Fa. Gibco

1 ml Streptomycin/Penicillin 10.000 I.E., Serva

1 ml Hapes 0,1 M, Serva

5 ml FCS

Pipetten á 10 ml, Falcon, Fa. Becton Dickinson, N.J.,

USA

Tubes á 12 ml und 6 ml

Für die Flowcytometrie:

Alle Antikörper wurden von Pharmingen / Becton Dickinson GmbH geliefert, Regionalvertretung Deutschland in 22335 Hamburg.

Zur Markierung von B-Lymphozyten:

CD45RA (direkt mit FITC markiert); OX-33; reagiert mit einem Anteil des CD45-Moleküls, das auf B-Lymphozyten gefunden wird.

Zur Markierung von T-Lymphozyten:

CD5 (direkt mit PE markiert); OX-19; vorhanden auf Thymozyten und peripheren T-Lymphozyten, aber nicht auf natural killer Zellen und  $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor-tragenden intestinalen intraepithelialen Lymphozyten. Bei Ratten haben B-Lymphozyten kein CD5<sup>+</sup>.

Zur Markierung von CD4<sup>+</sup>-Zellen;

OX-38; direkt mit FITC markiert.

Zur Markierung von CD8<sup>+</sup>-Zellen;

341 reagiert mit der  $\beta$ -Kette des CD8; direkt mit FITC markiert.

Zur Markierung von Makrophagen;

HIS36; direkt mit PE markiert; reagiert mit dem ED-2-Antigen, das auf Gewebsmakrophagen, aber nicht auf Monozyten zu finden ist.

Zur Markierung von natural killer Zellen;

NKP-P1A; 10/78; direkt mit FITC markiert; reagiert mit NK-Rezeptor P1A, der auf allen NK-Zellen, aber auch einer kleinen Untergruppe von T-Lymphozyten sitzt.

Material für die Zellzählung / Vitalitätsprüfung:

Türk's Lösung, Fa. Merck, Darmstadt

Trypanblau (0.4%), Fa. Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA

Material zur Vorbereitung der Suspensionen für die Cytozentrifuge:

PBS Dulbeccos's, Gibco BRL, Karlsruhe

Äther; Ethanol; Objektträger, Firmen Menzel Gläser und Marienfeld

Löschpapier für die Cytozentrifuge, Fa. Schleicher & Schuell, Dassel

Eppendorfpipetten

## **II.2. Geräte:**

sterile Bench, Nuaire Class II Typ A/B3

Kühlzentrifuge Hettich Universal 30 RF

Wasserbad GFL 1083

Zentrifuge CR 312 Jouan

Lichtmikroskop Leica DMLS zur Zählung von Erythrozyten und Leukozyten

Diavert m. Fluoreszenzzusatz zur Zählung der fluoresz. Zellen, Leitz, Wetzlar

Cytozentrifuge, Cytospin, Fa. Shandon Southern

Fluoreszenzmikroskop Axioskop zur Zählung der fluoresz. Zellen, Fa. Zeiss

Vortexer VF2, Fa. Janke und Kunkel

Durchflußzytometer mit Argonlaser der Firma Becton Dickinson

## **B) Methoden und Versuchsdurchführung:**

### **II.3. Herstellung von Zellsuspensionen aus einer Spendermilz**

Die Milz eines Spendertieres wurde in Hanks bei 4°C aufgenommen und unter sterilen Bedingungen zu einer Suspension verarbeitet. Dazu wurde das Gewebe in zwei Portionen mittels eines Spritzenkolbens durch ein Sieb gerieben, und durch 200 µm und 100 µm Nylonfilter gedrückt. Anschließend wurde die Suspension mit Hanks auf jeweils 10 ml aufgefüllt und bei 4°C mit 1500 U für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen und die Zellen wurden in jeweils 10 ml ACT resuspendiert und bei 37°C für 3 Minuten im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden sie abermals bei 4°C mit 1500 U für 10 Minuten zentrifugiert. Es folgte die Resuspension des Pellet in Hanks mit anschließender Zentrifugation wie gehabt. Das Pellet wurde in 12 ml Hanks aufgenommen und die Zellzahl (zw. 116.400.000 und 248.400.000) und die Anzahl der toten Zellen (zw. 13 und 15%) in der Neubauerkammer ausgezählt.

#### **II.4. Markierung der Zellen**

Um die Zeit der Zellen in der gestoppten Farblösung zu verkürzen, wurde der Färbvorgang von 2 Personen unter sterilen Bedingungen so durchgeführt, dass einer färbte und der andere die Reaktion stoppte.

Gefärbt wurde bei Raumtemperatur wie folgt: 5 µl Dye wurden in ein Polypropylenröhrchen mit rundem Boden gegeben, 995 µl Diluent C wurden zugegeben und vermischt. Zwischen 161 und 370 µl der vorher hergestellten Zellsuspension, die 40.000.000 Zellen enthielten, wurden in ein zweites Röhrchen gegeben und 1 ml Diluent C wurde zugegeben. Dann wurden die Zellen mit einer Pasteurpipette vorsichtig in die Farblösung pipettiert und durch wiederholte Aspiration vermischt. Während der zweiminütigen Inkubationszeit wurde das Röhrchen vorsichtig geschwenkt. Die Reaktion wurde nach 2 Minuten durch Zugabe von 2 ml FCS gestoppt und die Zellen wurden nochmals 1 Minute inkubiert. Dann wurden 8 ml complete medium zugegeben und die Zellen bei 4°C und im Dunklen bis zur Zentrifugation aufbewahrt. Da nicht mehr als 40.000.000 Zellen in einer Probe gefärbt werden konnten, wurden 18 bis 20 Proben gefärbt, so dass der gesamte Vorgang ungefähr 90 Minuten dauerte.

Anschließend wurden die Lösungen bei 20°C mit 1500 U für 20 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde abgehoben, die Zellen in PBS resuspendiert, in 2 neue Röhrchen überführt und mit PBS auf 12 ml aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation bei 20°C mit 1500 U für 10 Minuten. Der Überstand wurde abgehoben und die Zellen in 2 ml PBS resuspendiert, wobei verklumpte, tote Zellen in den Spitzen der Eppendorfpipetten zurückblieben. Die Zellzahl (zwischen 65.400.000 und 15.200.000) und die Vitalität (zwischen 8 und 18% Tote) wurden ermittelt. Jeweils 1 ml der Zellsuspension und 1 ml PBS wurden in eine Spritze aufgezogen (entspricht zwischen 7.600.000 und 32.700.000 Zellen pro Spritze) und im Dunklen bei 4°C bis zur Injektion aufbewahrt.

## II.5. Versuchsgruppen

Es gab 3 Versuchsvariablen:

- a) die Zeit, in der die Leukozyten zirkulieren konnten,
- b) die noradrenerge Denervierung und
- c) die Stimulation der Empfängertiere mit LPS.

Daraus ergeben sich folgende Versuchsgruppen:

	Zellaufnahme in die Milz 15 min. nach Zellinjektion	Zellaufnahme in die Milz 6 Std. nach Zellinjektion	Zellaufnahme in die Milz 24 Std. nach Zellinjektion
Tiere mit intakter sympathischer Innervation	n = 5	n = 5	n = 5
Lokale Denervierung der Milz	n = 4	n = 5	n = 4
Generelle sympathisch-noradrenerge Denervierung	n = 5	n = 5	n = 5
Vorbehandlung mit LPS bei intakter Innervation	n = 6		

Die Zellen wurden zeitlich parallel jeweils einem denervierten und einem Kontroll-Tier mit Zellen derselben Suspension infundiert und die Organe nach derselben Zirkulationszeit entnommen. Bei den Tieren der 15 Minuten- und der 6-Stunden-Gruppe wurden die Zellen über den A. carotis-Katheter in den linken Ventrikel infundiert, um die Zellen direkt allen Organen gleichmäßig zur

Verfügung zu stellen. Die Tiere der 24-Stunden-Gruppe erhielten die Zellen über den V. jugularis-Katheter, da die Zellen, die in der Lunge hängen bleiben, diese innerhalb dieser Zeit wieder verlassen haben.

In der mit LPS vorbehandelten Versuchsgruppe wurden die Tiere wie oben beschrieben vorbehandelt und ihr Immunsystem mittels Injektion von LPS stimuliert. Die gefärbten Zellen wurden nach 6 Stunden injiziert. Nach 15 Minuten wurden die Tiere getötet, um einen direkten Einfluß des LPS auf die Zellen zu minimieren.

#### *Vorbereitung der Empfängertiere:*

Es wurden 60 männliche WKY-Ratten von der Firma Harlan Winkelmann, Borchem verwendet. Sie hatten ein Körpergewicht von 75-150g. Die Daten von 4 Tieren konnten nicht ausgewertet werden (2x ungenügende operative Denervierung der Milz abzulesen am Noradrenalingehalt der Organe; 1 Sekundärheilung an der Bauchwunde; 1 Narkosezwischenfall). Zur Ausschaltung der Funktion der sympathisch-noradrenergen Innervation wurden zwei unterschiedliche Methoden verwandt: die lokale chirurgische Denervierung der Milz oder die systemische Ausschaltung der noradrenergen Innervation mit Hilfe von Reserpin.

Die lokale chirurgische Denervierung der Milz wurde unter tiefer Anästhesie mit Pentobarbital-Na (Nembutal; 60 mg/kg Körpergewicht) durchgeführt. Zunächst wurde eine mediane Laparatomie durchgeführt, die Milz mit Hilus und zuführenden Blutgefäßen und Nerven bis hinter die große Krümmung des Magens freigelegt. Die A. lienalis wurde auf eine Länge von 10 – 15 mm von Adventitia befreit und der zwischen Arterie und Vene liegende Nerv auf der gleichen Strecke und Länge durchtrennt. Um eventuelle verborgene Nervenfasern auf der Gefäßoberfläche zu zerstören, wurden die Wände von Arterie und Vene mit 10 %iger Phenollösung bestrichen. Danach wurde die Bauchdecke zweilagig verschlossen und den Tieren eine Erholungszeit von 5 – 7 Tagen gegeben. Nach dieser Zeit war die NA-Konzentration in der Milz auf 10 – 15 % des Normalwertes reduziert.

Bei der zweiten Methode wurde die noradrenerge sympathische Übertragung durch Entleerung vesikulärer neuronaler Speicher für NA unterbrochen. Dies geschah durch eine Injektion von Reserpin in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht 24 Stunden vor der Injektion der markierten Spenderzellen. Auch hierbei wurde der NA-Gehalt der Milz auf 10 – 15 % des Normalwertes reduziert.

In der Gruppe der Tiere, in der das Immunsystem mit Hilfe von LPS stimuliert werden sollte, erhielten die Tiere Endotoxin von E. coli in einer Dosis von 10 µg/kg Körpergewicht intravenös 6 Stunden vor der Injektion der Zellen.

Die Injektion der markierten Spenderzellen erfolgte in orientierenden Vorversuchen über die V. jugularis, später dann über einen Katheter, der von der A. carotis aus in den linken Herzventrikel vorgeschoben war.

#### *Injektion der Zellen:*

Die 2 ml mit den gefärbten Zellen (zwischen 32.700.000 und 7.600.000) wurden auf Raumtemperatur angewärmt und innerhalb von 2 Minuten kontinuierlich in den linken Ventrikel bzw. in die V. jugularis parallel jeweils eines denervierten und eines Kontrolltieres injiziert. Die Tiere des ersten Untersuchungszeitpunktes wurden nach Ablauf von 15 Minuten noch in der Narkose durch 1 ml Nembutal i.a. getötet. Die Tiere des zweiten Zeitpunktes wurden 6 Stunden nach der Injektion der Zellen mit 1 ml Nembutal i.p. getötet und die Milz zur Messung der Zellaufnahme und des NA-Gehaltes entnommen. Die Tiere des 3. Zeitpunktes wurden 24 Std. später getötet.

## **II.6. Durchführung der Untersuchungen**

### *Organentnahme:*

Es wurde die Milz entnommen und in vorher mit 4 ml PBS gefüllte und gewogene Petrischalen aufgenommen und als ganzes und als zu verarbeitender Teil gewogen. Anschließend wurde ein Teil der Milz in



flüssigem Stickstoff für die spätere Catecholaminbestimmung eingefroren, aus dem Rest wurde eine Splenozytensuspension hergestellt.

*Messung der Organdurchblutung:*

In einer zweiten Versuchsserie, deren Ergebnisse anderweitig publiziert sind (Rogausch et al., 2003) und in dieser Arbeit nur in die Diskussion einbezogen werden, wurde parallel zur Messung der Zellaufnahme in die Milz die Organdurchblutung mit Hilfe der Mikro-Sphere-Methode gemessen. Hierzu wurden ebenfalls WKY-Ratten verwendet. Nachdem Blutdruck und Pulsfrequenz der narkotisierten Tiere für mindestens 30 Minuten stabil waren und arterielle Werte des  $pO_2$  und  $pCO_2$  im Normbereich lagen, wurde über den Katheter im linken Ventrikel die Suspension der Mikrospheres (0,5 ml mit  $3,5 \times 10^5$  der  $15 \mu m$  Polystyrene-Spheres) mit einer Geschwindigkeit von 0,4 ml/sec infundiert. Gleichzeitig wurde über den Katheter, der über den Weg der A. femoralis in der abdominalen Aorta lag, eine Referenzblutprobe mit demselben Pumpenvolumen abgezogen. Aus der Konzentration der Spheres in der Referenz ( $C_{ref}$ ), ihrer Zahl in der Milz ( $C_O$ ), dem Milzgewicht ( $W_O$ ) und dem Volumen der Referenzprobe pro Zeit ( $Q_{ref}$ ) wurde die Organdurchblutung nach folgender Formel berechnet:

$$Q_O = 100 Q_{ref} ( C_O / C_{ref} \times W_O )$$

*Herstellung der Splenozytensuspension aus der Empfängermilz:*

Zu den oben erwähnten Zeitpunkten, also entweder 15 min., 6 Stunden oder 24 Stunden nach der Infusion der mit dem Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellsuspension, wurden die Organe des Versuchs- und des Kontrolltieres parallel genauso zu einer Suspension verarbeitet, wie es oben für die Milz des Spendertieres für die Zellsuspensionen beschrieben worden ist. Der Überstand wurde aufbewahrt, um sicherzustellen, dass darin keine Zellen enthalten waren. Außerdem wurden jeweils 0,5 ml der Suspension vor Filterung durch die Nylonfilter abgenommen und die Zahl der Leuko- und Erythrozyten bestimmt.

### *Experimentelle Prüfung der Methode zur Markierung von Splenozyten:*

Da der Diluent C zelltoxisch ist, wurde die optimale Inkubationszeit durch eine Versuchsreihe ermittelt, in der die Zellen 1 bis 5 Minuten nur im Diluent inkubiert wurden, bevor die Zellvitalität bestimmt wurde. Aufgrund dieser vorbereitenden Versuchsreihe wurde für alle folgenden Zellpräparationen eine Inkubationszeit von 2 Minuten festgelegt. Zum Färben der Zellen wurden Verdünnungsreihen hergestellt, um die beste Farbkonzentration für die beste Vitalität der Zellen und die stärkste Fluoreszenz zu ermitteln. Dazu wurden Farbstoffkonzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  (entspricht 10  $\mu\text{l}$  Dye und 990  $\mu\text{l}$  Diluent C und 40.000.000 Zellen, die in zwischen 370  $\mu\text{l}$  und 161  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension enthalten waren und in 1 ml Diluent C aufgenommen wurden), 2,5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  verwendet. Die Einwirkung des Farbstoffes wurde durch Zugabe von FCS gestoppt. Die Vitalität wurde direkt, nach 1 und nach 2 Stunden bestimmt. Dazu wurden die Zellen in der gestoppten Farblösung auf Eis aufbewahrt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde die Farbtintensität überprüft. Die Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  Dye (das entspricht 5  $\mu\text{l}$  Dye und 995  $\mu\text{l}$  Diluent C, sowie 1 ml Diluent C und zw. 370  $\mu\text{l}$  und 161  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension) erwies sich als günstigste. Da der Farbstoff außerdem Ethanol enthält, wurde eine Lösung gesucht, die Zellen schont. Hanks stellte sich als günstig heraus. Außerdem wurden die Zellen entgegen der Anleitung des Herstellers nicht zentrifugiert, um in Diluent C resuspendiert zu werden, sondern der entsprechenden Zellmenge in Hanks wurde der Diluent zugegeben, um die Zelltoxizität nicht durch mechanische Beanspruchung und verlängerte Einwirkzeit des Diluent zu verstärken. Die Zellen im Diluent C wurden dem Dye/ Diluent-C-Gemisch zugeführt und durch vorsichtiges Aspirieren vermischt. Es wurden 8 ml complete medium zugegeben, um die Dichte des FCS zu vermindern, außerdem wurde im ersten Gang 20 Minuten lang zentrifugiert, da bei kürzeren Zeiten Zellen verloren gingen. Zusätzlich wurden die Waschgänge reduziert, um die mechanische Belastung und den Zellverlust zu minimieren.

### *Markierung der Splenozytensuspensionen für die Flow-Cytometrie (FCM):*

Die Analyse der Lymphozytensubpopulationen mit Hilfe der FCM erfolgte in 4 hauptsächlichen Schritten:

- Herstellung der Zellsuspensionen
- Zellzählung
- Antikörpervorbereitung
- Messung

### *Herstellung der Zellsuspensionen für die FCM:*

Vorbereitend werden in der sterilen Bench das Metallsieb zur Gewebehomogenisierung, 3 Tubes, die Nylonnetze und einige Infusionsnadeln, deren Spitze abgeschnitten ist, gelagert. Das ACT-Medium wird aus 9 Teilen der Stammlösung 1 und 1 Teil der Stammlösung 2 hergestellt (die Zusammensetzung der Stammlösungen ist im Kapitel „Methoden“ eingangs beschrieben worden). Der frisch entnommene Gewebeanteil der Milz wird eisgekühlt in PBS gelagert und dann mit dem Stempel einer Spritze so leicht wie möglich in das ACT-Medium ausgestrichen. Eine Vorhomogenisierung kann durch mehrfaches Aufziehen und anschließende Entleerung einer Pasteur-Pipette erleichtert werden. Diese Suspension wird durch die Nylonfilter gegeben und das Volumen auf 10 ml mit ACT ergänzt. Zur Lyse der Erythrozyten wird die Probe für 4 Minuten bei 37 °C inkubiert; danach wird sie bei 4 °C für 10 Minuten bei 1.000 x g zentrifugiert, der Überstand wird abgehoben und das Pellet mit PBS auf 10 ml aufgefüllt und aufgerührt, erneut zentrifugiert und schließlich in 2 ml PBS suspendiert. Diese Suspension wird von Zelltrümmern dadurch gereinigt, dass sie über Baumwollfäden herabläuft, die in eine Pasteurpipette eingelegt sind. Die fertige Suspension wird bei 4 °C in PBS gelagert.

### *Zellzählung:*

Mit Türks Lösung wird die Gesamtzahl der Zellen, mit Trypanblau der Anteil der toten Zellen unter dem Mikroskop in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

#### *Antikörpervorbereitung:*

Für Verdünnungen der Antikörper 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 und 1:20 werden die entsprechenden Tubes vorbereitet. 450 µl der Zellsuspension werden mit 50 µl der Antikörperverdünnungen gemischt und im Dunkeln auf Eis für 20 – 30 Minuten inkubiert. Danach werden die Proben zentrifugiert, der Überstand abgehoben und das Pellet nach einmaligem Waschen mit FACS-Puffer in 250 µl FACS-Puffer resuspendiert.

#### *Messung:*

Die Messung der Zahl und Subpopulationen von fluoreszenz-markierten Zellen wurde in einem Durchflußzytometer der Firma Becton Dickinson gemessen und mit Hilfe einer Cytometrie-Software von DAKO ausgewertet (FlowMATE für Windows, Version 2.0c; DAKO Diagnostika GmbH, 22004 Hamburg).

#### *Fixierung der Zellen:*

Nach dem letzten Schritt der Suspensionsherstellung erfolgte die Resuspendierung der Zellen in 1 ml PBS und die Zugabe von 100 µl Formaldehyd 3%. Es folgte eine Inkubationszeit von 4 Minuten. Danach wurde mit 10 ml PBS aufgefüllt, bei 4°C mit 1.500 U für 10 Minuten zentrifugiert, das Pellet in 4 ml PBS aufgenommen und mittels Türk's Lösung die Zellzahl bestimmt.

#### *Bestimmung von Zellzahlen im Cytospot:*

Die Cytospots wurden innerhalb der nächsten 2 Tage nach der Fixierung hergestellt. Dazu wurden so viele Zellen in 5,2 ml PBS suspendiert, daß pro Spot zwischen 3.000.000 und 7.000.000 Zellen in 200 µl der Lösung enthalten waren. Diese wurden auf markierten und beschrifteten Objektträgern in die Cytozentrifuge gegeben und 6 Minuten lang bei 550 U zentrifugiert.

Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen wurde im Fluoreszenzmikroskop Gesichtsfeld für Gesichtsfeld ausgezählt. Dabei wurde durch Kontrolle im Durchlicht sichergestellt, daß es sich bei den fluoreszierenden Partikeln um Zellen und nicht um Staub handelte. Gezählt wurden nur Zellen, deren Konturen zu erkennen waren und bei denen auszuschließen war, daß die Fluoreszenz durch aufgelagerte Staubpartikel oder Zelltrümmer verursacht war. Es erfolgten Wiederholungszählungen, bei denen die Abweichungen höchstens 10% betrugten. Es fiel auf, daß die Zelldichte der einzelnen Cytospots variierte, deshalb wurde die Anzahl der gesamten Zellen im Durchlichtmikroskop ermittelt. Dazu wurden mehrere Ausschnitte pro Präparat in einer Doppelbestimmung ausgezählt, der Mittelwert errechnet und die Gesamtzahl mittels eines PC-Programmes, das die Fläche der Spots und der Ausschnitte berücksichtigt, berechnet. Zur Auswertung kamen nur Präparate, deren Zellen gleichmäßig verteilt waren.

#### **II.7. Statistische Methoden:**

Standardfehler und Standardabweichung wurden mit einem Computerprogramm berechnet (Excel für Windows 5.0). Beim statistischen Vergleich der Ergebnisse wurde einerseits der T-Test angewandt, zur Überprüfung der Signifikanz bei kleinen Stichproben wurde zusätzlich der Mann-Whitney-Test heran-gezogen. Die meisten Ergebnisse der Signifikanzberechnung stimmen in beiden Methoden überein.

### III. Ergebnisse

Im folgenden Ergebnisteil werden zunächst die Ausgangsbedingungen für die Experimente dargestellt, nämlich die Zusammensetzung der Splenozytensuspension der Spendertiere, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert und den unterschiedlich vorbehandelten Empfängertieren injiziert wurden und die Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen der Milz von Empfängertieren (§ III.1.). In den darauf folgenden Abschnitten schildere ich die Ergebnisse der Aufnahme dieser markierten Zellen in die Milz der Empfängertiere nach der Aktivierung von deren Immunsystem durch LPS (§ III.2, § III.3. und § III.4.). Anschließend werden die Ergebnisse zusammengestellt, die den Einfluß einer noradrenergen sympathischen Denervierung auf die Zellmigration in die Milz mit und ohne Immunstimulation durch Endotoxin zeigen (§ III.5, §III.6. und § III.7.).

#### III.1. Leukozytensubpopulationen der Spendermilz und der Empfängermilz

Die am Versuchstag einem Spendertier entnommene Milz dient in allen Experimenten der Gewinnung von Zellen, die je zur Hälfte einem Kontrolltier und einem denervierten oder anderweitig vorbehandelten Tier infundiert werden. Die Zusammensetzung dieser Zellpopulationen ist in der folgenden Tabelle aufgelistet. Die Mittelwerte dieser Tabelle basieren auf den Daten der Organe von 8 Spendertieren.

Tab. III.1: Leukozytenpopulationen der injizierten Zellen:						
Zelltyp	CD 45RA+	CD 5+	CD 4+	CD 8+	NK *	MPh *
% Mittel	47,5	37,0	23,5	12,8	18,0	3,4
± SD	2,0	1,5	1,0	0,5	0,8	0,5

NK = natural killer cells; MPh = Macrophagen

Die Zusammensetzung der Leukozytensubpopulationen der Empfängertiere ist in der Tabelle III.2 aufgelistet und basiert auf der Analyse von 5 Organen pro Gruppe. Die Zusammensetzung der Splenozytenpopulationen ist bei den Empfängertieren 7 Tage nach der lokalen chirurgischen Denervierung der Milz, bzw. deren Kontrollen ("Schein-OP"), und 24 Stunden nach der Injektion von Reserpin, bzw. deren Kontrollen ("Kontroll-Inj."), mit Hilfe der Flow-Cytometrie bestimmt worden. In jeder Versuchsgruppe sind die jeweiligen Mittelwerte von 6 Tieren zusammen mit dem SE aufgelistet ( NK = natural killer cells; MPh = Macrophagen ).

Tab. III.2: Leukozytenpopulationen der Empfängermilzen:				
	<b>"Schein-OP"</b>	<b>Lokale Denerv.</b>	<b>Kontroll-Inj.</b>	<b>Reserpin-Inj.</b>
CD 45RA+	46,5 ± 1,5	45,0 ± 1,0	44,5 ± 1,0	44,0 ± 1,0
CD 5+	33,0 ± 2,0	35,5 ± 1,5	36,5 ± 1,0	35,5 ± 0,8
CD 4+	22,0 ± 0,5	22,0 ± 0,5	22,5 ± 0,5	22,5 ± 0,5
CD 8+	10,5 ± 0,5	10,7 ± 0,5	13,5 ± 0,8	13,4 ± 0,8
NK	18,5 ± 0,8	18,8 ± 0,6	11,2 ± 1,5	12,2 ± 1,0
MPh	3,8 ± 0,3	4,2 ± 0,5	3,5 ± 0,3	5,1 ± 1,2

Diese Zusammenstellung ergibt keinen Hinweis auf signifikante Unterschiede in der Verteilung der hauptsächlichen Leukozyten-Subpopulationen der Empfängertiere.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass nach lokaler oder systemischer Unterbrechung der sympathisch-noradrenergen Übertragung keine Veränderung der Zusammensetzung der Leukozyten-Subpopulationen im Vergleich zu den Kontrolltieren und den Spendertieren auftritt.

### **III.2. Blutgase und basale Kreislaufparameter der Empfängertiere**

Im vorausgegangenen Abschnitt wurde die zelluläre Zusammensetzung der Milz von normalen und denervierten Tieren dargestellt, um einen Eindruck von den Ausgangsbedingungen für die nachfolgenden Experimente zu gewinnen. Zu den zu kontrollierenden Ausgangsbedingungen gehören außerdem Kreislaufparameter wie der arterielle Blutdruck, Sauerstoffgehalt und die Kohlendioxydkonzentration im arteriellen Blut. Gerade der arterielle Blutdruck kann durch systemische Hemmung der noradrenergen Übertragung nach Gabe von Reserpin gesenkt werden. In der Tat wurde Reserpin früher auch zur Therapie des arteriellen Bluthochdrucks eingesetzt und daher hätte es in den in dieser Arbeit geschilderten Experimenten zu einer Absenkung des Blutdrucks nach Reserpingabe kommen können. Dies ist aber nicht der Fall und die entsprechenden Daten für Blutdruck und Pulsfrequenz sind in der Tab. III.3 zusammengestellt. Die Tabellen III.4 und III.5 listen die Daten für die arteriellen Blutgase und den Hämoglobingehalt des Blutes auf. Aus diesen Tabellen ergibt sich kein Anhaltspunkt dafür, dass die Sauerstoffzufuhr zur Milz durch den Eingriff in das autonome Nervensystem vermindert oder vergrößert ist. Es besteht auch kein Anzeichen für eine Hypo- oder Hyperventilation. Der arterielle  $p\text{CO}_2$  ist in allen Versuchsgruppen gleich und eine eventuelle, durch die Narkose bedingte vermehrte oder verminderte Produktion von  $\text{CO}_2$  ist nicht vorhanden, so dass man angesichts des normalen arteriellen  $p\text{CO}_2$  von einer normalen Ventilation ausgehen kann.

Überraschenderweise ist der arterielle Blutdruck nach der Reserpinbehandlung nicht signifikant gegenüber den Kontrolltieren vermindert. Zwar kann der arterielle periphere totale Widerstand dennoch reduziert sein, was durch eine Anpassung des Herzminutenvolumens kompensiert worden sein könnte. Diese Möglichkeit wird nahegelegt durch die signifikante Steigerung der Pulsfrequenz.



Zusammengefaßt zeigen diese Befunde, dass Blutgase, Blutdruck und Hämoglobingehalt des Blutes sich bei denervierten Tieren nicht signifikant von den Kontrolltieren unterscheiden.

**Tab. III.3: Blutdruck und Pulsfrequenz der Versuchstiere.**

	Kontrollen		Denervierung der Milz		Unterbrechung der NA-ergen Übertragung	
	Pulsfrequenz (min <sup>-1</sup> )	Art. Blutdruck (mmHg)	Pulsfrequenz (min <sup>-1</sup> )	Art. Blutdruck (mmHg)	Pulsfrequenz (min <sup>-1</sup> )	Art. Blutdruck (mmHg)
<b>Mittel</b>	<b>399</b>	<b>103,5</b>	<b>400,00</b>	<b>103,0</b>	<b>472,33***</b>	<b>96,2</b>
SD	23	7,3	19,92	7,9	15,04	6,8
SE	9	3,0	8,13	3,2	6,14	2,8

\*\*\* = p < 0,001 gegenüber den Kontrollen

**Tab. III.4. Hämoglobingehalt des Blutes der Versuchstiere:**

<i>Hämoglobinkonzentration des Blutes (g/dl)</i>	Kontrollen	Lokale Denervierung der Milz	Unterbrechung der NA-ergen Übertragung
Mittel	<b>14,21</b>	<b>13,92</b>	<b>13,20</b>
SD	0,81	0,82	0,59
SE	0,33	0,33	0,24

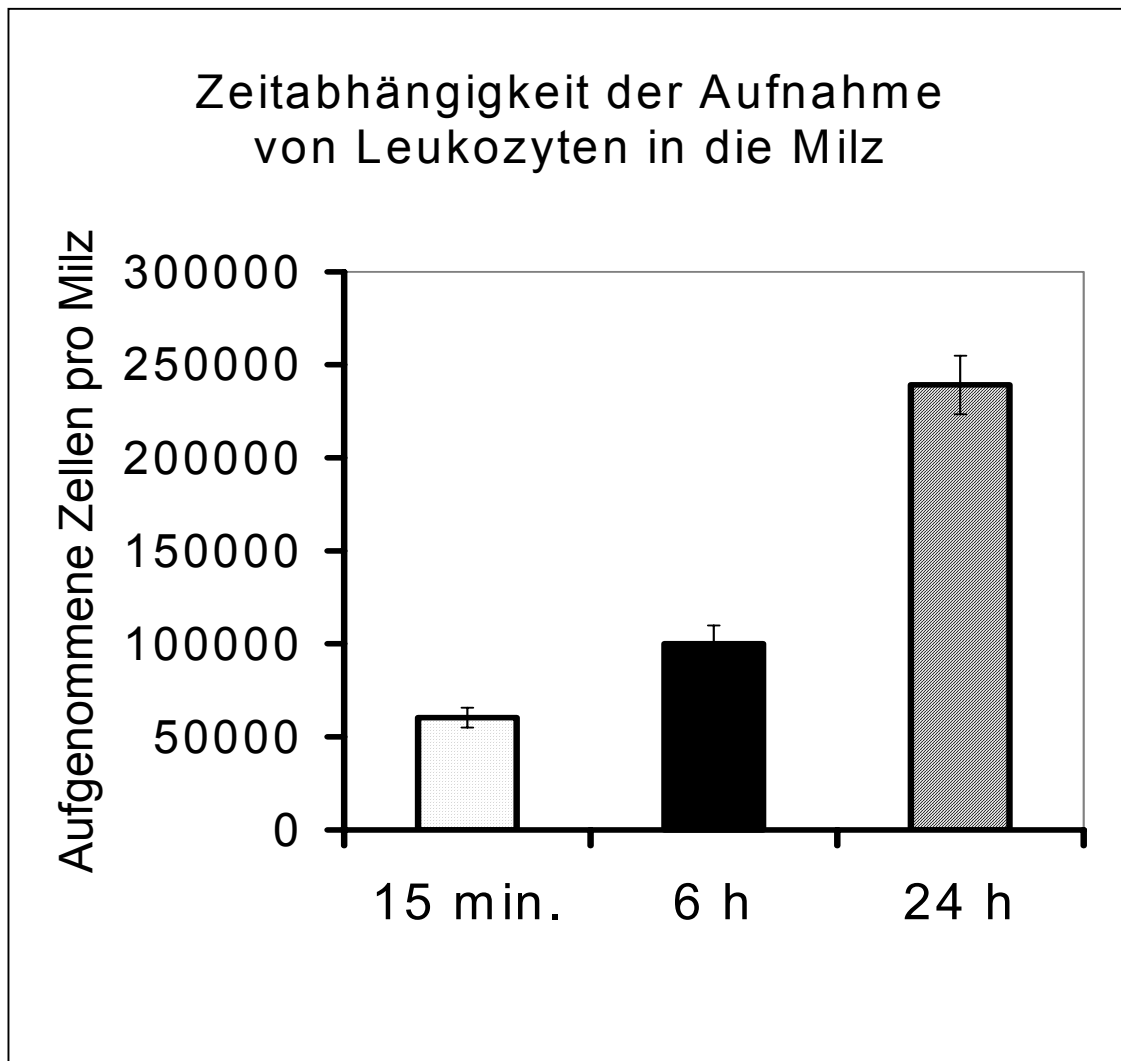
**Tab. III.5: Blutgase.**

	Kontrollen		Denervierung der Milz		Unterbrechung der NA-ergen Übertragung	
	Art. pO <sub>2</sub> (mm Hg)	Art. pCO <sub>2</sub> (mmHg)	Art. pO <sub>2</sub> (mm Hg)	pCO <sub>2</sub> (mmHg)	Art. pO <sub>2</sub> (mm Hg)	pCO <sub>2</sub> (mmHg)
<b>Mittel</b>	<b>95,8</b>	<b>40,3</b>	<b>96,5</b>	<b>40,2</b>	<b>95,2</b>	<b>40,7</b>
SD	3,1	2,1	1,5	1,9	2,3	1,7
SE	1,3	0,8	0,6	0,8	1,0	0,7

### **III.3. Aufnahme von Zellen in die Milz unter basalen Bedingungen**

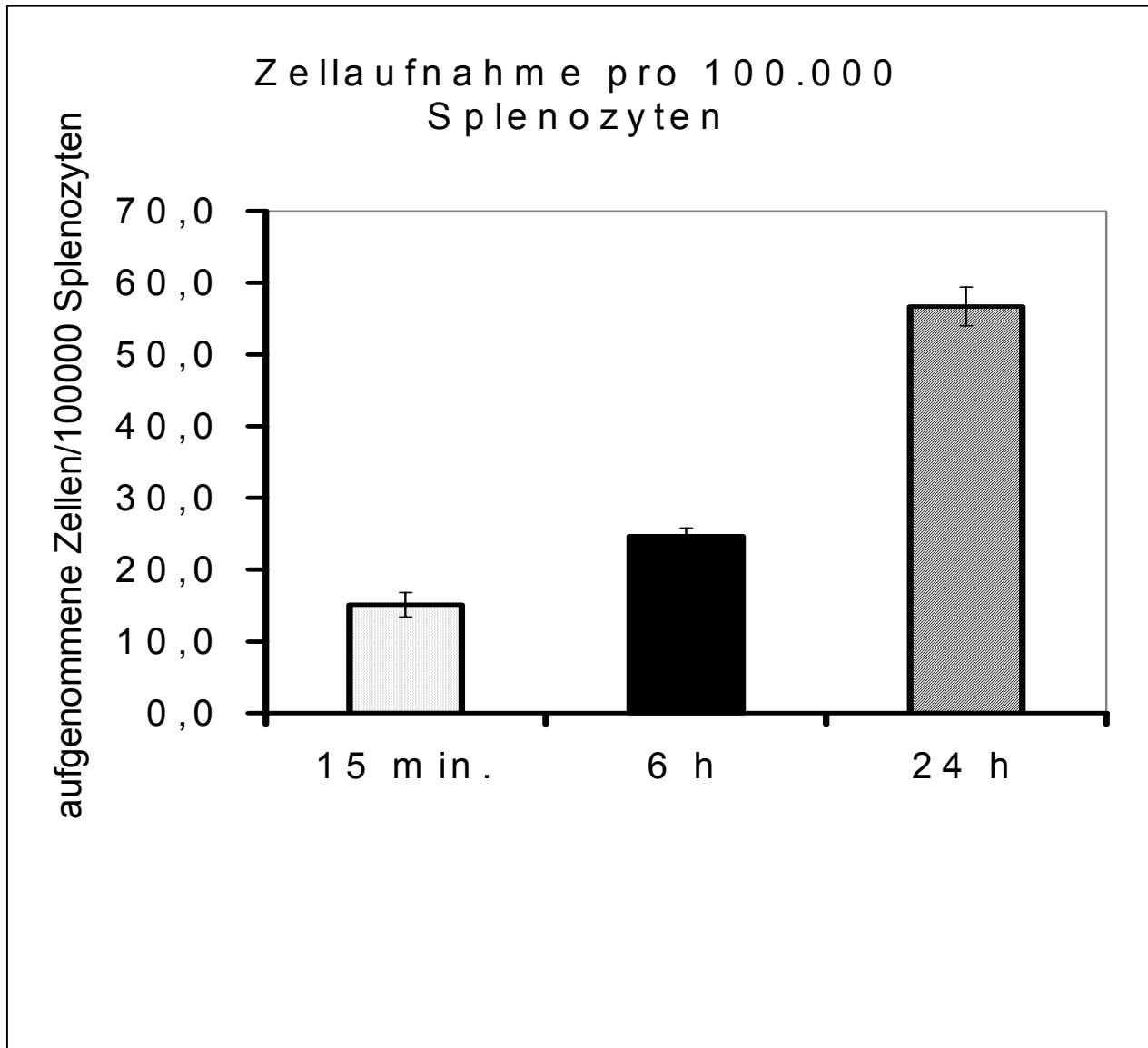
Wie im Kapitel Methoden bereits dargestellt, wurde die Anzahl der mit dem Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen für die gesamte Milz aus der Anzahl der in den Cytospots gefundenen markierten Zellen und der Anzahl pro Milz berechnet. Die Ergebnisse dieser Messungen sind im Tabellenanhang aufgelistet; die Abb. III.1 zeigt die Mittelwerte der Zellaufnahme pro Milz 15 min. sowie 6 Std. und 24 Std. nach der Zellinjektion.

Wenn man die Anzahl der Zellen, die aus dem zirkulierenden Blut in die Milz aufgenommen werden, auf die Menge der injizierten Splenozyten bezieht, dann finden sich 15 min. nach der Zellinjektion 5,8 ‰ in der Milz wieder, nach 6 Stunden sind es 10,6 ‰ und nach 24 Stunden 21,6 ‰. Dieser Verlauf lässt darauf schließen, dass der wesentliche Anteil der Zellextraktion aus dem Blut in den ersten Stunden passiert, in denen etwa die Hälfte der nach 24 Stunden extrahierten Zellen in der Milz zu finden ist. Um die Berechnung der Zellaufnahme in die Milz unabhängig von der Organgröße zu machen, werden die in die Milz aufgenommenen fluoreszierenden Zellen auf die Menge pro 100.000 Splenozyten berechnet. Das Ergebnis ist in der Abbildung III.2 graphisch dargestellt und bestätigt den eben geschilderten Befund, dass sich innerhalb der ersten 6 Stunden nach der Zellinjektion etwa 50 % der nach 24 Stunden gefundenen Zellen in der Milz befinden.



**Abbildung III.1.**

*Fluoreszenz-markierte Splenozyten eines Spendertieres wurden bei einem Empfängertier in den linken Ventrikel infundiert. Die Emigration der Zellen aus der Blutbahn in die Milz wurde nach 15 Minuten, 6 Stunden und 24 Stunden gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von jeweils 6 Tieren pro Zeitpunkt.*



**Abbildung III.2.**

*Die Zahl der in die Milz aufgenommenen Zellen wird in dieser Abbildung in Relation zur Gesamtzahl der Splenozyten gesetzt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte  $\pm$  SD von jeweils 6 Experimenten pro Zeitpunkt.*

#### **III.4. Aufnahme von Zellen aus dem Blut in die Milz nach Endotoxin**

Eine Stimulation des Immunsystems mit LPS hat vielfältige Effekte, zu denen eine Stimulation der Expression von Adhäsionsmolekülen, Aktivierung von B- und T-Lymphozyten und eine vermehrte Produktion von parakrinen Substanzen wie IL-1 $\beta$ , Stickstoffmonoxyd und Produkten aus dem Arachidonsäure-Stoffwechsel gehören. Die zuletzt genannten Substanzen sind auch gefäßwirksame Mediatoren. Nach der Messung der Zellaufnahme in die Milz unter basalen Bedingungen, die im vorangegangenen Abschnitt dargestellt wurde, wird jetzt geprüft, in welchem Umfang die Extraktion von Zellen aus dem Blutkreislauf in die Milz durch die Stimulation mit LPS verändert wird. In den folgenden Abschnitten III.5. und III.6. wird dann die Frage der Beteiligung des autonomen Nervensystems an der Zellaufnahme aus dem Blut in die Milz behandelt. Um eine Aktivierung der injizierten Zellen im Empfängertier durch Endotoxin zu vermeiden, wurde die Zellaufnahme nur 15 Minuten nach der Zellinjektion gemessen und auf die Messung der Zellaufnahme in die Milz nach 6 und nach 24 Stunden verzichtet. LPS wurde dem Empfängertier in einer Dosierung von 10  $\mu\text{g}$  pro kg Körpergewicht 6 Stunden vor der Injektion von markierten Spenderzellen intravenös injiziert und es wurden die Organe von 6 Empfängertieren untersucht und die Daten dieser Tiere mit denjenigen der Kontrollgruppe verglichen.

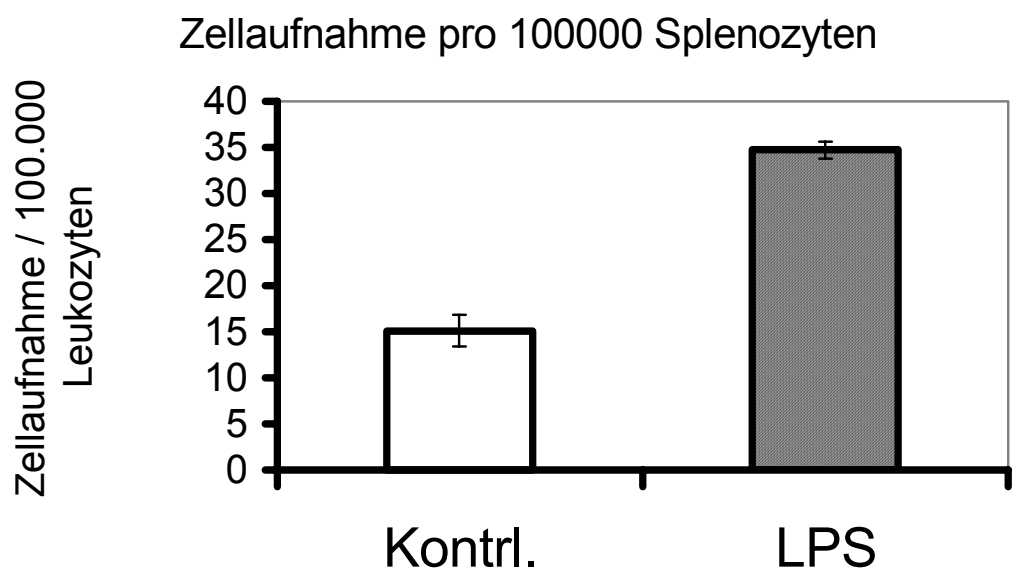
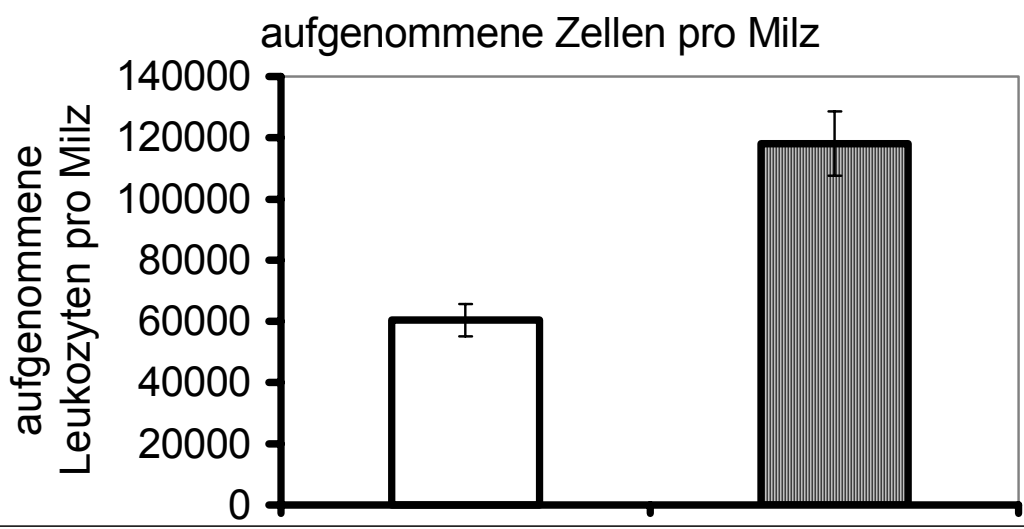
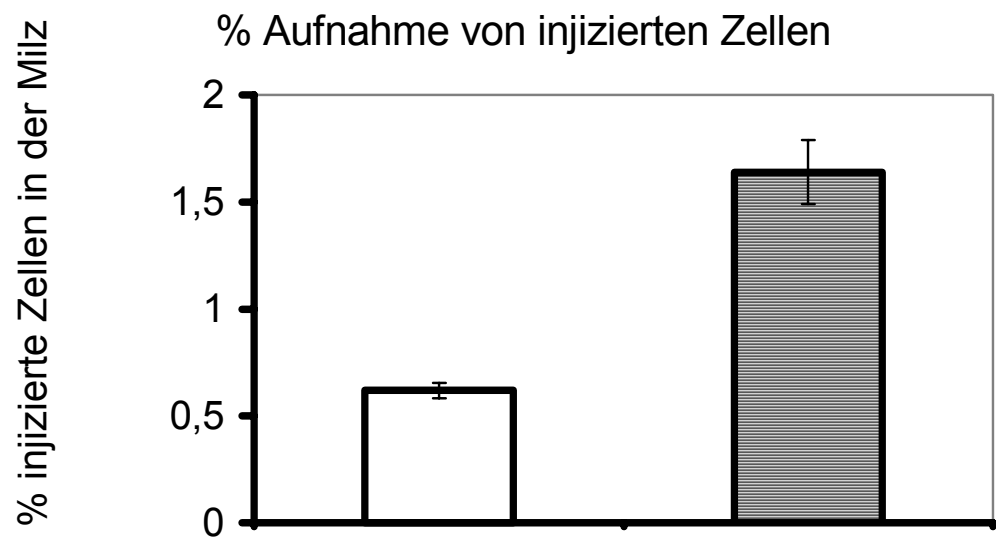
Die basalen Parameter wie arterieller Blutdruck, Blutgase und Hämoglobingehalt des Blutes sind gegenüber den Kontrollen unverändert. Die zelluläre Zusammensetzung der Empfängermilz ändert sich nicht in Bezug auf die im Abschnitt III.1. genannten Leukozyten-Subpopulationen innerhalb von 6 Stunden nach der Endotoxininjektion, wie in einer parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Dissertation gezeigt wurde (Zwingmann, 2002). Die Ergebnisse zeigen, dass sich 15 min. nach der Injektion der mit dem Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen im Durchschnitt 118.110 Zellen in der Milz bei den mit LPS stimulierten Tieren gegenüber 60.413 Zellen bei den Kontrolltieren befanden. Diese Werte sind im M-W-Test signifikant ( $p=0,006$ ). Berechnet man die Zahl der aus dem Blut in die Milz aufgenommenen Zellen auf jeweils 100.000 Splenozyten, dann finden sich im

Mittel 34,7 Zellen bei den stimulierten Tieren im Vergleich zu 15 Zellen bei den Kontrolltieren. Diese Unterschiede sind sowohl im t-Test ( $p < 0,001$ ) als auch im M-W-Test ( $p < 0,006$ ) signifikant. (Abbildung III.3)

Bezogen auf die Anzahl der injizierten Zellen werden bei Tieren, deren Immunsystem mit LPS stimuliert worden ist, ebenfalls mit 1,64 % im Vergleich zu 0,579 % der Kontrollen signifikant mehr Zellen als bei den Kontrolltieren in die Milz aufgenommen (t-Test:  $p < 0,001$ , M-W-Test:  $p < 0,006$ ) (Abb. III.6.).

Zusammengefaßt lässt sich sagen, dass eine Milz, die 6 Stunden vor der Zellinjektion mit Endotoxin stimuliert worden ist, signifikant mehr Zellen aus dem zirkulierenden Blut aufnimmt als eine Milz unter basalen Bedingungen. Da Endotoxin nicht nur die Expression von Adhäsionsmolekülen stimuliert, sondern auch die Produktion anderer parakriner Substanzen fördert, von denen einige gefäßaktiv und durchblutungsfördernd wirken, wird im folgenden Abschnitt der Einfluß der noradrenergen Innervation auf die Zellaufnahme in die Milz untersucht.

**Abbildung III.3: Zellaufnahme aus dem Blut in die Milz nach Stimulation mit LPS (folgende Seite) :**



### **III.5. Aufnahme von Zellen aus dem Blut in die Milz nach Durchtrennung des Milznerves**

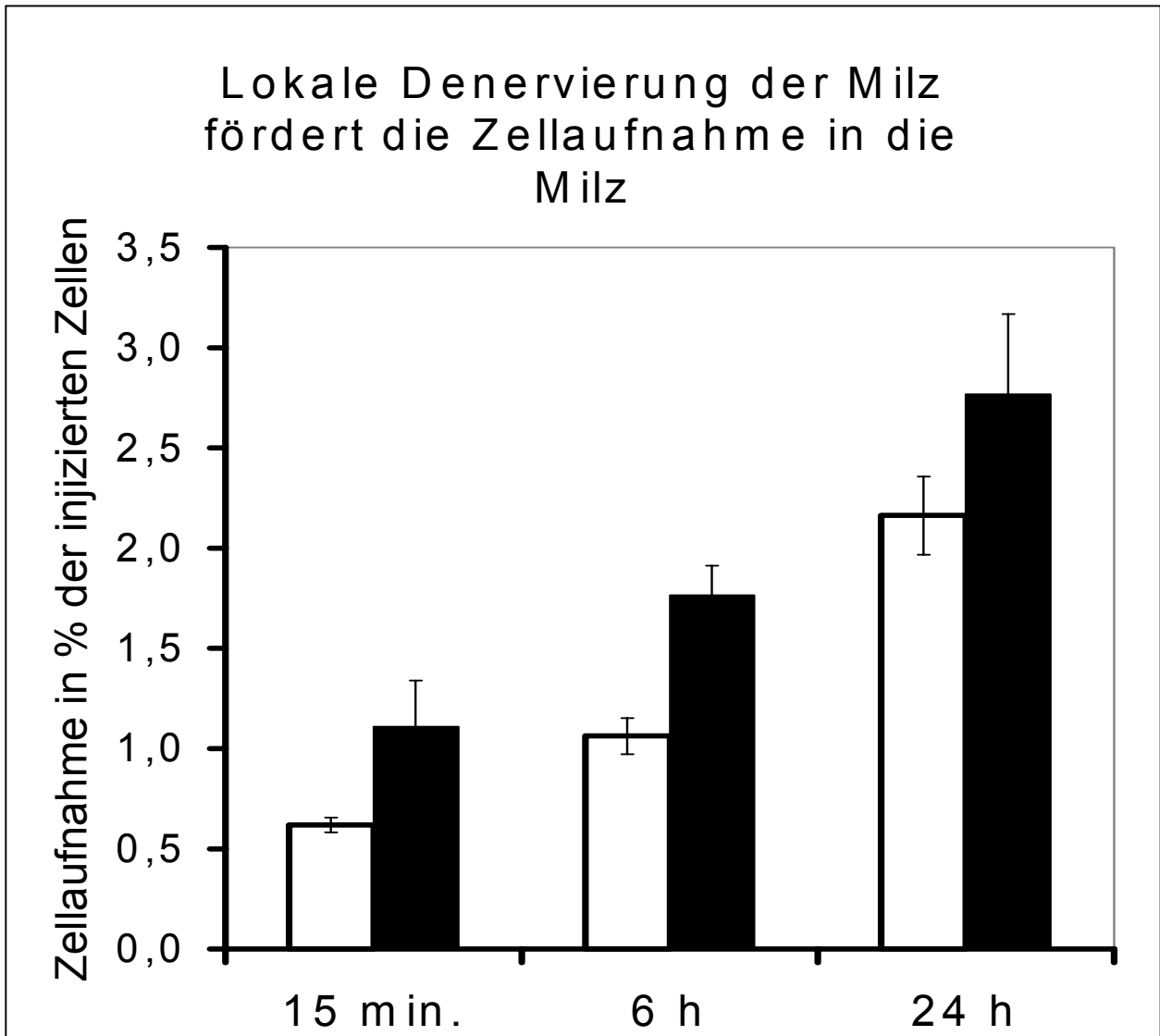
Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die chirurgische Denervierung der Milz die Aufnahme von Zellen aus dem Blut in vergleichbarem Umfang fördert wie die Stimulation durch Endotoxin, die im vorausgegangenen Abschnitt dargestellt wurde.

Bei den Tieren mit chirurgisch entfernter Milzinnervation finden sich im Durchschnitt nach 15 min. 100.083 Zellen pro Organ, was signifikant mehr ist als bei den Kontrolltieren ( t-Test:  $p < 0,05$ , M-W-Test:  $p < 0,076$  ). Mit 138.455 Zellen nach 6 Std. finden sich ebenfalls im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant mehr Leukozyten in der denervierten Milz ( t-Test:  $p < 0,05$ ; M-W-Test:  $p < 0,076$  ).

Untermauert wird dieses Ergebnis durch die Berechnung der Zahl von aufgenommenen Leukozyten pro 100.000 Splenozyten. Bei der Gruppe mit lokal denervierter Milz finden sich nach 15 min. im Mittel 49,6 Zellen pro 100.000 Splenozyten, was im Vergleich mit den Kontrollen einen signifikanten Unterschied darstellt ( t-Test:  $p < 0,001$ ; M-W-Test:  $p < 0,076$  ). Nach 6 Std. erscheinen 59,5 gefärbte Zellen pro 100.000 in der Milz, somit signifikant mehr als bei den Kontrollen ( t-Test:  $p < 0,001$ ; M-W-Test:  $p < 0,076$  ). Nach 24 Std. sind 73,95 Zellen zu finden. Hier ist der Unterschied zu den Kontrolltieren nicht mehr signifikant.

Berechnet man die Zellaufnahme aus dem Blut in die Milz als Anteil der injizierten Zellen, dann finden sich nach Denervierung der Milz nach 15 min. 11,1 ‰ der gefärbten Zellen in der Milz, also fast doppelt so viele wie bei den Kontrolltieren ( t-Test:  $p > 0,05$ ; M-W-Test:  $p < 0,014$  ). 6 Stunden nach der Injektion sind 1,77 % der injizierten Zellen in der Milz zu finden, hier mit signifikanten Unterschieden zu den Kontrolltieren ( t-Test:  $p < 0,01$ ; M-W-Test:  $p < 0,009$  ).





**Abbildung III.4.** *Die autonome Innervation der Milz wurde chirurgisch durch Durchtrennung der Milzinnervation unterbrochen. Nach 5 – 7 Tagen sind dadurch die sympathischen Neurone soweit degeneriert, dass der Noradrenalingehalt auf etwa 10 % des Ausgangswertes abgefallen ist. Zu diesem Zeitpunkt wird die Aufnahme von Zellen aus dem Blut in die Milz gemessen. Die dargestellten Werte stellen die Mittelwerte der Kontrolltiere (weiß) und der lokal denervierten (schwarz)  $\pm$  SD dar.*

**III.6. Aufnahme von Zellen aus dem Blut nach systemischer  
Ausschaltung noradrenerger  
Einflüsse**

Die experimentelle chirurgische Denervierung der Milz stellt eine artifizielle Situation dar, die wohl selten in der Praxis vorkommen dürfte. Daher wird in einem weiteren experimentellen Ansatz untersucht, ob eine Ausschaltung der noradrenergen sympathischen Innervation, wie sie nach systemischer Gabe von Sympathicolytika auftreten kann, zu ähnlichen Veränderungen der Zellaufnahme wie die isolierte Denervierung der Milz führt. Hierzu wurden die präsynaptischen vesikulären Speicher für Noradrenalin mit Hilfe von Reserpin entleert, wie es im Methodenteil beschrieben worden ist. Das Ergebnis dieser Behandlung ist in der nachfolgenden Tabelle III.6 aufgeführt. Beide Methoden der Milzdenervierung, d.h. die isolierte Entfernung des Milznerven und die generelle Ausschaltung der noradrenergen Übertragung, führen zu einem fast vollkommenen Verlust der noradrenergen Innervation, was an der etwa 95 – 98 %-igen Reduktion des lienalen Noradrenalingehaltes ablesbar ist (Tab. III.6).

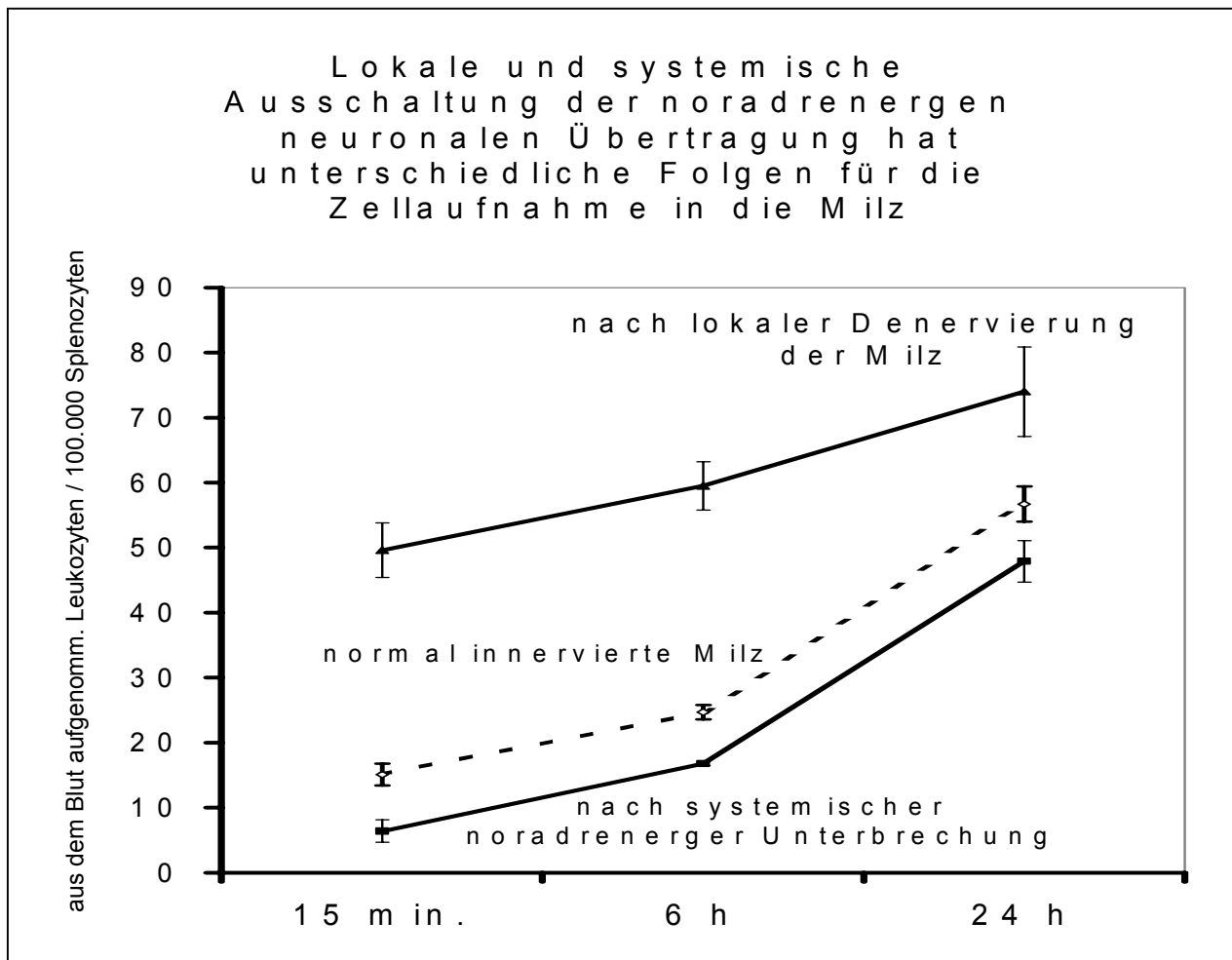
Tab. III.6: Noradrenalingehalt der Milz ( ng/g )			
	<b>Kontrolle</b>	<b>Lokale Denervierung</b>	<b>Systemische NA-x</b>
	<b>n</b>		
	452	12	0
	439	30	38
	394	0	0
	368	41	0
	311	0	20
	512	0	6
Mittel	<b>412,7</b>	<b>13,8</b>	<b>10,7</b>
SD	64,3	16,2	15,5
SE	26,2	6,6	6,3

Obwohl das Ausmaß des Verlustes der noradrenergen Innervation der Milz nach Entfernung des Milznerven und nach Entleerung der noradrenergen vesikulären Speicher ein vergleichbares Ausmaß annimmt, sind die Konsequenzen für die Aufnahme von Leukozyten aus dem Blut in die Milz gegensätzlich. Während die lokale Denervierung zu einer Steigerung der Zellaufnahme führt, die derjenigen nach Immunstimulation mit Endotoxin gleichkommt, führt die Entleerung der noradrenergen Vesikel zu einer Reduktion der Zellaufnahme. Dies zeigen die folgenden Befunde.

Die mit Reserpin behandelten Tiere weisen 15 min. nach der Zellinjektion mit durchschnittlich 23.370 aus dem Blut aufgenommenen Zellen eine signifikant niedrigere Aufnahme auf als die Kontrolltiere ( t-Test  $p < 0,001$ , M-W-Test  $p 0,009$  ). Auch im Vergleich zu den lokal denervierten Tieren finden sich hier signifikant weniger Zellen ( t-Test:  $p < 0,001$ , M-W-Test:  $p 0,014$  ). 6 Stunden nach der Injektion können im Mittel 64.657 Zellen nachgewiesen werden, d.h. signifikant weniger als bei den Kontrollen ( t-Test:  $p < 0,001$ , M-W-Test:  $p 0,009$  ); dasselbe gilt für den Vergleich mit den lokal denervierten Tieren ( t-Test:  $p < 0,001$ , M-W-Test:  $p 0,009$  ). Auch nach 24 Std. sind mit einer durchschnittlichen Anzahl von 211.474 weniger Zellen zu finden als bei den Kontrolltieren und lokal denervierten, dieser Unterschied ist jedoch nicht mehr signifikant ( t-Test:  $p > 0,05$ , M-W-Test:  $p 0,465$  für den Vergleich mit den Kontrollen, bzw. für den Vergleich mit den chirurgisch denervierten Tieren: t-Test:  $p > 0,05$ , M-W-Test:  $p 0,624$  ).

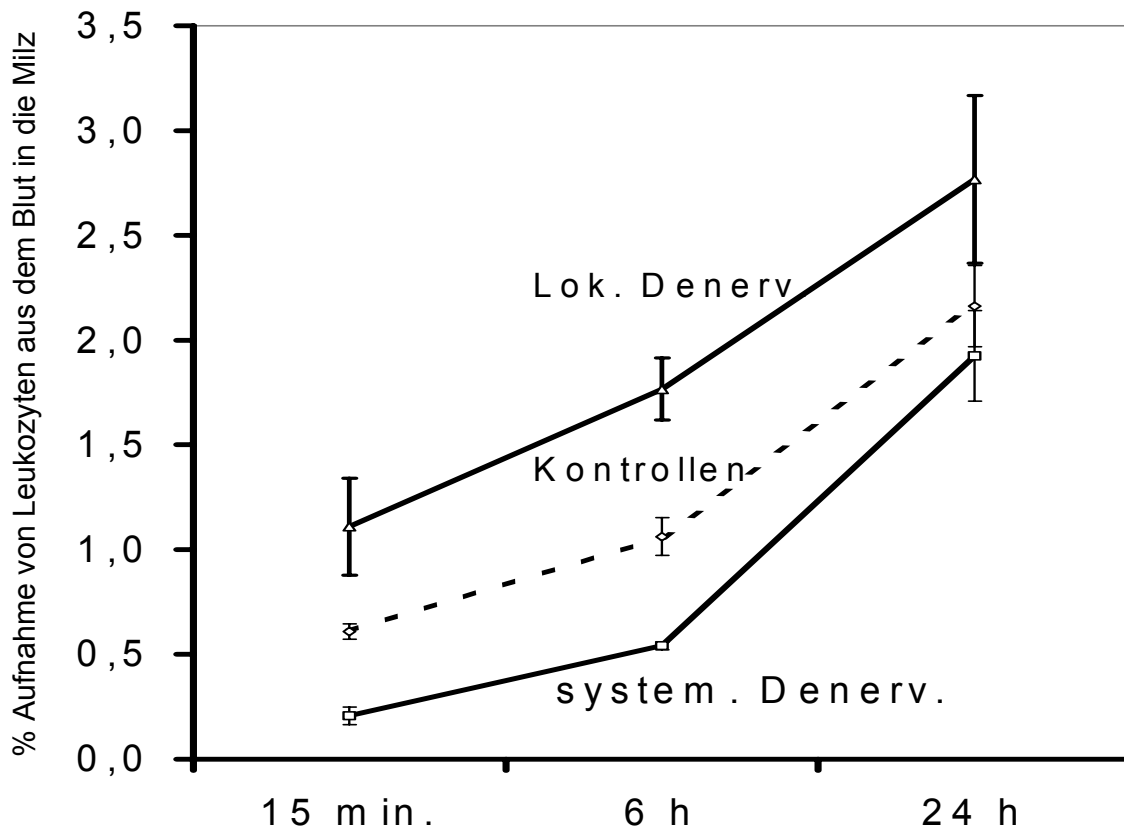
Berechnet man nicht nur die Zahl der aufgenommenen Zellen pro Milz, sondern die Anzahl aufgenommener Zellen pro 100.00 Splenozyten, dann sind es bei den mit Reserpin behandelten Tieren mit 6,36 / 100.000 signifikant weniger als bei den Kontrollen mit intakter Milz-innervation ( t-Test:  $p < 0,01$ , M-W-Test:  $p 0,028$  ) und als bei den Tieren mit chirurgisch denervierter Milz ( t-Test  $p < 0,001$ , M-W-Test:  $p 0,014$  ); auch noch nach 6 Std. sind mit 16,8 / 100.000 signifikant weniger Zellen als bei den Kontrolltieren ( t-Test:  $p < 0,01$ , M-W-Test:  $p 0,009$  ), als auch bei den lokal

denervierten Tieren zu finden ( t-Test:  $p < 0,001$ , M-W-Test:  $p = 0,009$ ). Sogar nach 24 Stunden ist die Zahl der aufgenommenen Zellen mit 47,9 Zellen pro 100.000 Splenozyten noch geringer als die der normalinnervierten, diese Unterschiede sind nicht mehr signifikant. Jedoch besteht gegenüber den Tieren mit lokaler Milzdenervierung ( t-Test:  $p < 0,05$ , M-W-Test:  $p = 0,05$ )(Abbildung III.5) weiterhin ein signifikanter Unterschied.



**Abbildung III.5. Aufnahme von Leukozyten aus dem Blut in die Milz nach lokaler oder systemischer Unterbrechung der sympathisch-noradrenergen Innervation. Mittelwerte  $\pm$  SD von 4- 6 Tieren pro Meßzeitpunkt und Bedingung.**

Lokale und systemische  
Unterbrechung der noradrenergen  
Übertragung haben gegensätzliche  
Auswirkungen auf die Zellaufnahme  
in die Milz



**Abbildung III.6.**

***In dieser Abbildung ist der prozentuale Anteil von Zellen dargestellt, der von der Gesamtzahl aller infundierten, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen in die Milz der normal innervierten oder denervierten Milz aufgenommen wurde. Für jeden Meßzeitpunkt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von 4-6 Tieren dargestellt.***

Berechnet man die Zahl der in die Milz aufgenommenen Zellen im Verhältnis zur Zahl der injizierten Zellen, dann finden sich bei den mit Reserpin behandelten Tieren nach 15 min. mit 2,1 ‰ signifikant weniger der fluoreszierenden Zellen in der Milz als bei den Kontrolltieren ( t-Test:  $p < 0,001$ , M-W-Test:  $p = 0,009$  ), und auch signifikant weniger als bei den lokal denervierten Tieren wieder ( t-Test:  $p < 0,001$ , M-W-Test:  $p = 0,014$  ). Mit 5,407 ‰ findet sich nach 6 Std. noch immer ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen ( t-Test:  $p < 0,001$ , M-W-Test:  $p = 0,009$ ) und zu den lokal denervierten Tieren ( t-Test:  $p < 0,001$ , M-W-Test:  $p = 0,009$  ). Nach 24 Std. sind es mit 19,2 ‰ nicht mehr signifikant weniger Zellen als bei den anderen beiden Gruppen (Abbildung III.6).

### **III.7 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Zusammengefaßt zeigen die hier vorgestellten Daten, dass LPS die Aufnahme von Zellen aus dem Blutkreislauf in die Milz fördert, was durch eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen verursacht sein könnte. Nach Denervierung der Milz durch Durchtrennung des Milznerven messe ich allerdings eine ebenso stark stimulierte Aufnahme von Zellen aus dem Blut in die Milz wie nach der Gabe von Endotoxin. Daher dürften außer einer erhöhten Zahl von Adhäsionsfaktoren zusätzlich noch andere Faktoren für die Zellaufnahme aus dem Blut in die Milz mitverantwortlich sein. Da die fehlende sympathische Innervation zum überwiegenden Teil den Zustand der arteriellen Blutgefäße und die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur betrifft, wird in der folgenden Diskussion eine gesteigerte Milzdurchblutung für die vermehrte Zellaufnahme aus dem Blut in die Milz ursächlich in die Überlegungen einbezogen.

Eine zweite Form der Milzdenervierung, die systemische Ausschaltung der Noradrenalinfreisetzung und damit der Informationsübertragung im sympathischen Nervensystem mit Hilfe von Reserpin führt im Gegensatz zur ausschließlich lokalen Denervierung zu einer Reduktion der Zellaufnahme in die Milz. Beide Formen der Milzdenervierung gehen mit einer ca. 95%igen

Reduktion der NoradrenalinKonzentration in der Milz einher und bewirken demnach einen gleich ausgeprägten Verlust noradrenerger sympathischer Aktivität in diesem Organ. Im Gegensatz zur lokalen Denervierung führt die Gabe von Reserpin zu einer Abnahme des Tonus von Blutgefäßen nicht nur in der Milz, sondern auch in anderen parenchymatösen, sympathisch innervierten Organen und damit zu einer Umstellung des Blutkreislaufes. Diese Umstellung ist in den geschilderten Experimenten u.a. ablesbar an der signifikanten Steigerung der Pulsfrequenz zur Aufrechterhaltung des arteriellen Blutdrucks bei reduziertem peripherem arteriellem Gefäßwiderstand. Die Bedeutung der Kreislaufumstellung für die Zellaufnahme aus dem Blut in die Milz wird ebenfalls in der folgenden Diskussion reflektiert.

## IV. Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen zur Zellmigration haben sich auf die Milz konzentriert, weil sie von der Zellmasse das größte lymphatische Organ des Körpers ist; dorthin wandern täglich genauso viele Lymphozyten ein wie in alle anderen lymphatischen Organe zusammengenommen (Pabst und Westermann, 1991). Ab- und Antransport von Zellen erfolgen dabei ausschließlich über die Blutbahn und nicht zusätzlich über Lymphwege, wie es in den Lymphknoten der Fall ist, so dass die Kopplung an den Blutkreislauf eine wesentliche Grundlage für die immunologische Funktion der Milz ist. Die wichtigsten Ergebnisse der Experimente sind:

1. eine Immunstimulation mit bakteriellem Endotoxin fördert die Aufnahme von zirkulierenden Leukozyten aus dem Blut in die Milz;
2. auch ohne Immunstimulation wird nach einer lokalen Unterbrechung der sympathischen Innervation der Milz eine vermehrte Aufnahme von zirkulierenden Zellen aus dem Blut in dieses Organ gemessen, die ähnlich hoch ist wie nach Immunstimulation mit Endotoxin;
3. sowohl Endotoxin als auch die lokale Unterbrechung der sympathischen Innervation der Milz erhöhen nicht nur die Zellaufnahme, sondern auch die Durchblutung der Milz;
4. systemische Unterbrechung der sympathischen neuronalen Übertragung verringert hingegen die Zellaufnahme in die Milz, obwohl der Noradrenalinegehalt in der Milz in gleichem Umfang wie bei der Unterbrechung der lokalen sympathischen Innervation abnimmt;
5. die Regulation der Milzdurchblutung schafft im Rahmen des Blutkreislaufs die Randbedingungen, unter denen eine Zelleinwanderung in die Milz stattfinden kann;

Aus diesen Ergebnissen wurden die Schlußfolgerungen gezogen,  
-dass eine Erhöhung der lokalen Durchblutung eine wichtige Voraussetzung für die Aufnahme von Leukozyten aus dem Blut in den extravasalen Raum darstellt;



-dass eine generelle Steigerung der Durchblutung der peripheren Organe, wie sie bei pharmakologischer Behandlung auftreten kann, sich nachteilig für die Aufnahme von Leukozyten aus dem Blut in die Milz auswirken kann.

Diese Befunde und die daraus abgeleiteten Ergebnisse sollen in der folgenden Diskussion in der oben dargestellten Reihenfolge diskutiert werden.

#### **IV.1. Diskussion der Wirkung von Endotoxin auf die Zellmigration**

Das von mir verwendete Endotoxin ( LPS ) stammt aus E. coli und führt bei Ratten ab einer Dosis von 1.000 µg/kg Körpergewicht zu einem septischen Schock. Die in den geschilderten Experimenten verwandte Dosis beträgt 1/100 davon und führt zu keinerlei Schocksymptomatik, die sich in einem Abfall des Blutdrucks und einer Zentralisierung des Kreislaufs äußern würde. Dagegen wirkt diese Dosis von LPS bei Ratten als Immunstimulans. Nach Verabreichung von 10 µg LPS / kg Körpergewicht werden B- und T-Lymphozyten gleichermaßen stimuliert und innerhalb von 45 Minuten ist die IL-1mRNA signifikant erhöht (Rogausch et al., 1997). Die Konzentration des Proteins, des IL-1β, ist in der Milz nach 1 Stunde um das 2,5-fache erhöht, wenn man die Werte pro 100.000 Splenozyten berechnet. Zu den vielfältigen Wirkungen von IL-1β gehört die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen in lymphatischen Organen und die Stimulation der Expression in nicht-lymphatischem Gewebe (Pabst und Binns, 1989). Daher wird dieses Zytokin mit seinen pro-inflammatorischen Eigenschaften als wichtiger Mediator lokaler akuter Entzündungsvorgänge angesehen. Besonders in der Milz ist nach Injektion von Endotoxin in einer Dosis von 1 – 10 µg/kg Körpergewicht eine Durchblutungssteigerung um das 2-3-fache des Ruhewertes beschrieben worden (Rogausch et al., 1995).

In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass eine ausschließliche Steigerung der Durchblutung ohne vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen zu einer gleich starken Steigerung der Zellaufnahme

aus dem Blut in die Milz führt wie die Induktion von IL-1 $\beta$  und die möglicherweise dadurch verursachte Induktion von Adhäsionsmolekülen mit Hilfe von Endotoxin.

Im Prinzip fördern die beiden genannten Vorgänge, die durch IL-1 $\beta$  induziert werden, nämlich die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen und die Steigerung der Durchblutung der Milz, den Zustrom und das Angebot von Zellen aus dem Blut in dieses Organ.

Es gibt jedoch einige Einschränkungen gegen die Allgemeingültigkeit dieser Aussage; denn im Gegensatz zu Lymphknoten oder Peyerschen Plaques besitzt die Milz keine hoch-endothelialen Venulen ( HEV ), die als Orte der Zellaufnahme aus dem Blut angesehen werden könnten. Das in der Einleitung dargestellte, in erster Linie für Lymphknoten gültige „Mehrschritt-Programm“ der Aufnahme von Zellen aus dem Blut ins Gewebe (Springer, 1994) kann deshalb nicht ohne Vorbehalte auf die Milz übertragen werden. Die Aufgabe von HEV's könnten eventuell Fibroblasten übernehmen, die in der Marginalzone der Milzfollikel gefunden werden und engen Kontakt mit Lymphozyten halten. Diese Fibroblasten sind negativ für P-Selectin ( = CD 62P ) und E-Selectin ( = CD 62 E), welche wichtige Adhäsionsmoleküle in HEV's sind; diese Zellen sind aber positiv z.B. für das vasculäre Zell-Adhäsions-Molekül VCAM-1. Möglicherweise spielen diese Fibroblasten eine Rolle für die Aufnahme von Leukozyten in die weiße Pulpa (Steiniger et al., 2000 und 2001).

Neuere Befunde sprechen dafür, daß Zelladhäsionsmoleküle in erster Linie den Weg kennzeichnen, auf dem Leukozyten aus dem Blut ins Gewebe einwandern können. Es ist bisher nicht bewiesen, dass eine Selektion von Lymphozyten-Subpopulationen an der Schranke vom Blut zum Gewebe stattfindet, sondern es ist viel wahrscheinlicher, dass Adhäsionsmoleküle die Mechanismen bereitstellen, mit Hilfe derer Lymphozyten aus dem Blut in das umliegende Gewebe geleitet werden. Möglicherweise wird erst innerhalb der einzelnen Gewebe eine Verteilung auf B- und T-zellreiche Areale vorgenommen; über den weiteren Verbleib der Zellen, deren Auswanderung

oder eventuell auch über die Überführung in die Apoptose wird wahrscheinlich innerhalb der Organe entschieden (Westermann und Pabst, 1996).

Wenn man die Konsequenzen aus diesen Befunden zieht, dann haben Adhäsionsmoleküle und Durchblutung eine ähnliche Funktion: beide setzen die Rahmenbedingungen für die Aufnahme von Zellen aus dem Blut in den extravasalen Raum und limitieren den Antransport von Leukozyten aus dem Blut ins Gewebe – die Blutzufuhr dadurch, dass bei erhöhter Durchblutung mehr Zellen angeboten werden, die Adhäsionsmoleküle dadurch, dass bei verstärkter Expression mehr Zellen aufgenommen werden können.

Da also nicht nur die Regulation von Adhäsionsmolekülen, sondern auch die Zellzufuhr über den arteriellen Blutstrom die Zellaufnahme in die Milz beeinflussen dürften, muss als nächstes diskutiert werden, wie man sich den Befund erklären kann, dass nach einer Unterbrechung der sympathischen Innervation der Milz und der damit verbundenen Steigerung der Durchblutung eine Erhöhung der Zellaufnahme in die Milz in gleichem Umfang auftritt wie nach Immunstimulation mit Endotoxin.

#### **IV.2. Bedeutung der sympathischen Innervation der Milz für die Zellimmigration.**

Der wesentliche Mechanismus zur Regulation der Milzdurchblutung liegt in der – durch noradrenerge Nervenendigungen vermittelten – Vasokonstriktion. Diese Nerven treten am Hilus mit den Blutgefäßen in die Milz ein und verzweigen sich entlang der Arterien. Dabei umspinnen ca. 80% die Blutgefäße, wobei Noradrenalin als hauptsächlicher Transmitter freigesetzt wird (Felten et al., 1987). Die restlichen 15-20% der Nervenendigungen gehen synapsenähnliche Verbindungen mit den T-Lymphozyten in der weißen Pulpa ein, wo sie wahrscheinlich immunmodulatorische Funktionen ausüben. Die hauptsächliche sympathisch-noradrenerge Funktion besteht in der Regulation der Durchblutung.

Aus den Feststellungen, dass

1. der größte Anteil der pro Tag zirkulierenden Lymphozyten sich in der Milz wiederfindet,
2. das Blut den wesentlichen Weg für den An-und Abtransport der Zellen in die Milz darstellt,
3. der Tonus der Blutgefäße durch die sympathisch-noradrenergen Neurone reguliert wird,

wurde eingangs die Arbeitshypothese entwickelt, dass die Immigration der Zellen aus dem Blut in die Milz über die Kontrolle der Milzdurchblutung durch das autonome Nervensystem reguliert werden kann.

Diese Hypothese wurde in den vorliegenden Experimenten überprüft, indem die Aufnahme von markierten Leukozyten aus dem Blut in die Milz sowohl mit normaler, lokal unterbrochener, sowie systemisch unterbrochener noradrenerger Innervation untersucht wurde. Die Innervation wurde einerseits durch die chirurgische Durchtrennung des Milznerven, andererseits durch pharmakologische Entleerung der vesikulären Noradrenalinspeicher mit Hilfe von Reserpin unterbrochen.

Die erste Methode wurde gewählt, um nur die Milzdurchblutung und den lokalen Katecholaminspiegel zu verändern, während die zweite Methode gewählt wurde, um der klinischen Situation einer pharmakologischen Beeinflussung der autonomen Nerven näherzukommen.

Zunächst sollen die Ergebnisse der Zellaufnahme in die Milz nach Durchtrennung des Milznerven, also nach lokaler Denervierung dieses Organs diskutiert werden.

### **IV.3. Bedeutung der lokalen Milzperfusion für die Zellimmigration**

Nach lokaler Unterbrechung der sympathisch-noradrenergen Innervation kommt es zu einer Steigerung der Durchblutung um das 2,5-fache des Ruhewertes (Rogausch et al., 1997). Dies ist dadurch zu erklären, dass die sympathische Innervation der Milz vasokonstriktorisch wirkt. Nimmt man den

sympathischen Vasokonstriktorentonus weg, dann erfolgt eine Vasodilatation und die Steigerung der Durchblutung.

Eine Verdopplung der Milzdurchblutung findet man nicht nur nach Unterbrechung der Milzinnervation, sondern auch nach der Gabe von bakteriellem Endotoxin in einer Dosierung, wie ich sie in meinen Untersuchungen verwandt habe (10 µg/kg). Schon nach 45 min ist dieser Anstieg komplett und fällt somit mit dem Anstieg der Konzentration von IL-1β in der Milz zusammen. In der Tat wurde ein Zusammenhang zwischen der IL-1β-Produktion und der Durchblutungssteigerung gefunden. Der IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra) ist imstande, die Durchblutungssteigerung nach LPS komplett zu unterdrücken. In der nicht mit LPS stimulierten Milz ruft die Gabe von IL-1ra eine Verminderung der Durchblutung hervor, was darauf hinweist, daß die basale Produktion dieses Cytokins dem basalen vasokonstriktorisches sympathischen Blutgefäßtonus entgegenwirkt. Diese Befunde weisen auf die Besonderheiten der Durchblutungsregulation von lymphatischen Organen hin: während die Durchblutung anderer parenchymatöser Organe durch Gefäßnerven, Hormone und lokale parakrine Substanzen reguliert wird, zeigt die Durchblutung von lymphatischen Organen eine deutliche Abhängigkeit von der lokalen Zytokinproduktion. Das mag seine Ursache darin haben, dass hier die Produktion von Zytokinen am ausgeprägtesten ist; vor allen Dingen bewirkt dieser Prozeß die Kopplung der Organdurchblutung an die immunologische Funktion dieser Organe. Durch die vermehrte Durchblutung und das dadurch erhöhte Angebot von Sauerstoff und Substraten für den Zellstoffwechsel wird die für die Zellaktivierung notwendige Energie schon in der Anfangsphase einer Immunantwort bereitgestellt.

In diesem Zustand der gesteigerten Milzperfusion kommt es zu einer erhöhten Zellaufnahme in die Milz, wie die Befunde dieser Arbeit zeigen. Dies erscheint sinnvoll, da in der Milz den Zellen nur über die Blutbahn die Möglichkeit gegeben ist dort einzuwandern.

Diese Vorstellung wird durch die Kenntnisse über den Mechanismus der Zellemigration aus dem Blut unterstützt. Wichtige Parameter des Blutflusses

sind die physikalischen Größen Scherrate und Schubspannung. Sie entscheiden darüber, ob die Leukozyten sich im Zentralstrom des Blutes befinden oder entlang des Endothels transportiert werden (Rogausch, 1987). Bei der Scherrate handelt es sich um das Geschwindigkeitsgefälle über das laminare Strömungsprofil hinweg. Bei laminaren Strömungen im Blut bewegen sich die Erythrozyten im Zentralstrom, während sich ein aus Plasma bestehender Randsaum mit geringerer Geschwindigkeit entlang des Endothels bewegt. Leukozyten bewegen sich auf Grund ihrer im Vergleich zu den Erythrozyten etwa 1.000-fach höheren Viskosität am Rand des Blutstroms, nahe am Plasmarandsaum (Schmidt-Schönbein, 1977; Rogausch, 1978). Bei einer Verringerung der Scherrate, wie sie in den Kapillaren, den postkapillären Venulen und der roten Pulpa der Milz vorkommt, gelangen die Leukozyten in Kontakt mit dem Endothel. Dieser Vorgang wird als Margination bezeichnet (Gaetgens et al. 1985). Er wird durch die so genannte Geldrollenbildung der Erythrozyten verstärkt, wobei die Erythrozyten im Zentralstrom reversible Aggregate bilden, die die Leukozyten an den Rand und damit in die Nähe des Endothels drängen. Nun können die molekularen Kräfte der Adhäsionsmoleküle zwischen Endothel und Leukozyt wirken. Dabei kommt es zum Entlangrollen der Leukozyten am Endothel, wobei ein Teil der Zellen die Blutbahn verläßt und in das Gewebe emigriert. In der Milz scheint die Marginalzone der Follikel die Austrittspforte zu sein, von wo aus sich die Zellen in den für sie typischen Arealen verteilen: die B- Lymphozyten in die Follikel, die T- Lymphozyten in die periarteriolären lymphatischen Scheiden (PALS).

Zu den Besonderheiten der Milz, den fehlenden postkapillären Venulen mit hochzylindrischem Endothel, kommt ein anderer wichtiger Befund. Aus vitalmikroskopischen Studien ist bekannt, daß nicht jeder Leukozyt, der am Gefäßendothel adhärent geworden ist, auch emigriert (MacDonald et al., 1987). Von 10 Leukozyten, die in der Milz schon adhärent geworden sind, verlassen definitiv nur 4 – 6 Zellen die Blutbahn, die anderen nehmen weiter an der Rezirkulation teil.

Aus diesen Befunden folgt, daß die Margination mit nachfolgender Adhäsion zwar eine wichtige Voraussetzung der Emigration darstellt, jedoch handelt es sich hier nicht um einen mechanistischen Ablauf, der, einmal angestoßen, nicht unterbrochen werden kann. Besonders für die Milz gelten besondere Bedingungen für die Regulation der Zellaufnahme aus dem Blut. Im Zusammenhang mit den Befunden meiner Arbeit sind der Zelltransport über das Blut, der durch sympathisch-noradrenerge Nerven kontrolliert wird, und die lokalen Scherkräfte, die von der Kontrolle der Durchblutung abhängen, wichtige Voraussetzungen für den Kontakt der Lymphozyten mit den Regionen, an denen die Migration stattfindet. Eine Steigerung der örtlichen Durchblutung schafft die Voraussetzungen für einen vermehrten Antransport von Zellen und erhöht die Wahrscheinlichkeit des Zellkontaktes mit den Strukturen, die die Maschinerie zur Zellemigration bereitstellen, d.h. mit den die Emigration vermittelnden Adhäsionsmolekülen. Auf diese Weise läßt sich erklären, warum allein durch Erhöhung der Perfusion in meinen Experimenten eine Erhöhung der Zellaufnahme stattfand, die genau so groß war, als wenn die Zellaufnahme durch Immunstimulation mit Endotoxin gefördert worden wäre.

#### **IV.4. Einfluß der Verteilung des Herzminutenvolumens auf die Zellimmigration in die Milz**

Bei meinen Untersuchungen trat der unerwartete Befund auf, dass bei einer systemischen Ausschaltung des noradrenergen Vasokonstriktorentonus im gesamten Blutkreislauf ( mit Hilfe von Reserpin, das präsynaptische vesikuläre Speicher in sympathischen Nervenendigungen von Noradrenalin entleert ) weniger Lymphozyten in die Milz gelangen als nach lokaler Denervierung mit Hilfe der Durchtrennung des Milznerven. Sogar im Vergleich zur Zellaufnahme unter Kontrollbedingungen, d.h. im Vergleich zur normal innervierten Milz ist eine Reduktion der Zellaufnahme aus dem Blut zu beobachten. Dieser Befund ist deswegen vollkommen unerwartet, weil die Abnahme des Noradrenalingehaltes in der Milz und die dadurch bedingte

Steigerung der Milzdurchblutung bei beiden Denervierungsmethoden gleich groß ist. Aus Voruntersuchungen ist bekannt, dass die Milzdurchblutung sowohl bei lokaler, d.h. auf die Milz bezogener Unterbrechung, als auch bei genereller Ausschaltung des Sympathikus eine Steigerung auf das 2 ½-fache erfährt.

Die beiden Denervierungsmethoden unterscheiden sich jedoch in ihrer Wirkung auf den Gesamtblutkreislauf. Während die lokale Durchtrennung des Milznervs zu einer auf die Milz beschränkten Vasodilatation und damit zu einer Zunahme des Blutflusses führt, wird durch die generelle Ausschaltung sympathisch-vasokonstriktorischer Einflüsse eine Vasodilatation in allen Organen mit noradrenerg versorgten Blutgefäßen verursacht. Um so erstaunlicher ist die Steigerung der Milzdurchblutung um das 2 ½ -fache wie bei den lokal denervierten Tieren, weil nicht nur die Milz, sondern auch die anderen Organe verstärkt durchblutet werden. Nach Abschluß dieser Arbeit wurden in dem Labor, in dem diese Arbeit entstand, Messungen durchgeführt, die inzwischen auch publiziert sind und die zeigen, dass dies durch ein erhöhtes Herzminutenvolumen gewährleistet wird, wodurch der Blutdruck konstant gehalten wird (Rogausch et al., 2000 und 2003). Diese Befunde waren bei der Durchführung meiner Versuche noch nicht bekannt, jedoch wurde bei meinen Experimenten immer auch der arterielle Blutdruck gemessen. Ein normaler Blutdruck und normale arterielle Blutgase waren Voraussetzungen für die Durchführung der Versuche; der trotz genereller Vasodilatation normale Blutdruck und die erhöhte Herzfrequenz waren schon in meinen Versuchen Hinweise auf die Erhöhung des Herzminutenvolumens zur Stabilisierung des arteriellen Blutdrucks.

Vor dem Hintergrund dieser Befunde lassen sich nun meine Ergebnisse besser interpretieren. Das normale Herzminutenvolumen einer 300 g schweren WKY-Ratte beträgt etwa  $54 \pm 6$  ml/min. Bei einer Durchblutung der Milz von etwa 1 ml/min. beträgt demnach der Anteil der Milzdurchblutung am Herzminutenvolumen ca. 2 %. Bei Tieren, deren Milz infolge der



chirurgischen Unterbrechung des Milznerven denerviert war, verdoppelt sich die Durchblutung der Milz und steigt auf etwa 2 – 2,5 ml/min. an, ohne dass sich dabei das Herzminutenvolumen signifikant verändert. Nach lokaler Denervierung der Milz steigt also der Anteil der Milzdurchblutung am gesamten Herzminutenvolumen von 2 % auf 4 % an. Bei systemischer Ausschaltung des sympathisch-noradrenergen Vasokonstriktoren-tonus steigt das Herzminutenvolumen auf 90 – 125 ml/min an. Obwohl die Milzdurchblutung von 1 ml/min durch die systemische Ausschaltung der noradrenergen sympathischen Übertragung auf etwa 2 ml/min angestiegen ist, beträgt der Anteil der Milzdurchblutung unter diesen Umständen nur 2 % des Herzminuten-volumens. Bezogen auf das Herzminutenvolumen ändert sich also bei systemischer Ausschaltung des sympathischen Vasokonstriktoreinflusses der Anteil der Milzdurchblutung am Herzminutenvolumen nicht. Diese Überlegungen zeigen, daß bei der normal innervierten Milz der Kontrolltiere und bei den mit Reserpin behandelten Tieren jeweils 2 % des Herzminutenvolumens auf die Milz entfallen; bei den Tieren mit lokal denervierter Milz jedoch sind es 4 %. Die Zahl der pro Minute mit dem arteriellen Blut in die Milz transportierten Zellen ist also nur nach lokaler Erhöhung der Milzdurchblutung erhöht. Dasselbe gilt für die Durchblutungssteigerung der Milz nach LPS: Endotoxin erhöht die Durchblutung primär in lymphatischen Organen, nicht aber in anderen, weitaus größeren Gefäßgebieten wie der Skelettmuskulatur oder der Leber und der Nieren, so dass der Anteil der Milzdurchblutung am Herzminutenvolumen nach Endotoxingabe von 2 % auf 4 % genauso wie nach chirurgischer Denervierung der Milz ansteigt. Die Tatsache, dass unter diesen Bedingungen die Zellaufnahme in die Milz ansteigt, ist ein starker Hinweis auf die Bedeutung der Perfusion für die Funktion der Milz.

Während genereller Vasodilatation im Blutkreislauf gelangt von dem gesteigerten Herzminutenvolumen nur ein kleiner Anteil in die Milz, der größere Rest versorgt die parenchymatösen Organe wie z.B. Muskulatur oder die Leber (Golenhofen, 1962). In diesem Zusammenhang fällt nun auf, dass

es trotz einer lokalen Durchblutungssteigerung der Milz bis auf das 2,5-fache bei systemischer Denervation zu keiner Vermehrung, sondern teilweise sogar zu einer verminderten Zellaufnahme in die Milz kommt. In dieser Situation führt die generelle Vasodilatation aller noradrenerg innervierten Organe zu einer Verteilung der Zellen über die gesamte Fläche der perfundierten Organe. Dabei sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Leukozyt die Milz passiert und mit den aufnehmenden Strukturen Kontakt aufnimmt. Bedenkt man nun, dass nicht alle adhären Zellen auch emigrieren, wird dieses Phänomen der geringeren Zellaufnahme verständlich.

Nach einiger Zeit werden die Zellen der Zirkulation erneut zur Verfügung gestellt und können der Milz angeboten werden und emigrieren. So ließe sich auch die Annäherung der Leukozytenzahlen zwischen den einzelnen Gruppen nach 24 Stunden erklären, die jetzt keine signifikanten Unterschiede mehr aufweisen.

Obwohl nicht-lymphatische Organe unter physiologischen Bedingungen kaum Lymphozyten aufnehmen, könnte eine verstärkte Zirkulation der Zellen durch diese Organe die Chance vermindern, mit denjenigen Strukturen der Milz in Kontakt zu kommen, die eine Emigration von Lymphozyten aus dem Blut vermitteln. Eine vermehrte Zirkulation der Zellen durch die großen parenchymatösen Organe des Organismus könnte die Ursache dafür sein, dass ich nach systemischer Vasodilatation keine erhöhte Aufnahme von Zellen in die Milz gefunden habe.

In einem grob vereinfachten Modell sind die Resultate, die sich aus meinen Befunden ergeben, als Schema auf der folgenden Seite dargestellt:

**Zellangebot an die Milz über das Herzminutenvolumen unter Normalbedingungen:**

Herzminuten-  
Volumen  
(ca. 50 ml/min.)  
ca.  $10^7$  Zellen/min.

Anteil Milz am HMV:  
1 ml/min. = 2 % → 1x Zellen

Anteil sonstige Organe am HMV:  
49 ml/min. = 98 %

---

**Zellangebot an die Milz über das Herzminutenvolumen bei erhöhter Milzdurchblutung nach lokaler Denervierung:**

Herzminuten-  
Volumen  
(ca. 50 ml/min.)  
ca.  $10^7$  Zellen/min.

**Anteil Milz am HMV:**  
**2 ml/min. = 4 % → 2x Zellen**

Anteil sonstige Organe am HMV:  
48 ml/min. = 96 %

---

**Zellangebot an die Milz über das Herzminutenvolumen bei erhöhter Milzdurchblutung nach systemischer Vasodilatation::**

Herzminuten-  
Volumen  
(ca. 100 ml/min.)  
ca.  $10^7$  Zellen/min.

Anteil Milz am HMV:  
2 ml/min. = 2 % → 1x Zellen

Anteil sonstige Organe am HMV:  
98 ml/min. = 98 %

#### **IV.5. Mögliche Einflüsse von Noradrenalin auf die Zellmobilität**

Verschiedene Arbeiten beschreiben den Einfluß der Catecholamine auf die Regulation des Immunsystems. Del Rey und Besedovsky beschreiben die Zunahme der Plaque-forming-cells (PFC) in der Milz nach Denervierung, sowie den Abfall des Noradrenalin-Gehaltes während einer Immunreaktion verbunden mit dem Anstieg der PFC und damit den regulierenden Eingriff auf die Immunantwort (del Rey und Besedovsky, 1982). Im Verlauf der Immunantwort ändern sich in den lymphoiden Organen die Catecholamin-Konzentrationen, so dass hier ein regulierender Einfluss auf das Immunsystem zu sehen ist.

In meinen Experimenten können Einflüsse von Endotoxin auf die Zellen der Spendertiere ausgeschlossen werden, da diese allesamt keinerlei immunstimulierenden Maßnahmen unterworfen waren und die Organentnahme zur Gewinnung von Spenderzellen bei allen Versuchen unter denselben Bedingungen stattfand. Jedoch könnten die Empfängertiere, die 6 Stunden vor der Zellinjektion LPS erhielten, die injizierten Zellen verändern. Eine 6-stündige Wartezeit reicht aus, um die Expression von Adhäsionsmolekülen heraufzuregulieren. Die Dauer von 15 min nach Zellinjektion ist jedoch zu kurz, um die injizierten Zellen der Spendertiere zu verändern. Daher wurde bei den Versuchen mit LPS die Zellaufnahme in die Milz nur 15 min nach der Zellinjektion, nicht aber nach 6 und 24 Stunden gemessen.

Auf den in der Literatur beschriebenen Einfluß der Catecholamine will ich ausführlicher eingehen.

##### *Catecholamine als Chemoattraktanten:*

Die Bedeutung der Catecholamine wird deutlich, wenn man sich die Versorgung der lymphoiden Organe, speziell der Lymphknoten und der Milz, anschaut. Sympathisch-noradrenerge Nerven treten in den Hili entlang der Blutgefäße in LN und Milz ein und verzweigen sich im Parenchym, wo sie z.T. synapsenartige Verbindungen zu den Lymphozyten ( v.a. T-Zellen ) eingehen

(Felten, 2000). Auf diese Weise können noradrenerge Einflüsse direkt auf die Zellen wirken. Schon in der Entwicklung der Milzkompartimente stellen die sympathisch-noradrenergen Nerven eine Leitschiene für die T-Lymphozyten dar.

Freigesetzte Catecholamine bewirken in der Milz nicht nur eine Vasokonstriktion, sondern auch eine Mobilisierung und Auswanderung von Splenozyten aus der Milz in den Blutkreislauf (Rogausch et al., 1999). Dies scheint bei den Lymphozyten über  $\beta_2$ - und bei den Granulozyten über  $\alpha$ -Rezeptoren vermittelt zu werden ( Kappel, 1998 ). Die Auswanderung wird über Blockade der  $\beta$ -Rezeptoren mittels Propanolol vermindert. Im Blutkreislauf kommt es zu einer Subtypen-spezifischen Zunahme der Zellen, der  $CD8^+$ -Zellen und vor allem der NK-Zellen (Benschop et al., 1996; Carlson et al., 1997). Eine veränderte Rezeptorexpression, wie auch eine veränderte Antigenproduktion und unterschiedliche Rückkehr der Zellen zur baseline nach den erhöhten Catecholamin-Spiegeln wurde ebenfalls berichtet (Shinkai,1992).

Aus diesen Beobachtungen heraus könnte man den Umkehrschluß ziehen, dass das Fehlen von Catecholaminen nach Denervierung der Milz das Signal für die Einwanderung und für den Verbleib der Leukozyten in der Milz darstellt. Man müsste dabei annehmen, dass von den gerade in die Milz aufgenommenen markierten Zellen ein höherer Prozentsatz sofort wieder emigriert, wenn die Milz normal innerviert ist, als wenn die noradrenergen Speicher durch Denervierung entleert sind. Gegen diese Hypothese steht der Befund meiner Arbeit, dass lokale und systemische Denervierung zwar zu derselben Reduktion von NA in der Milz führen, dass jedoch die Zellimmigration in dem einen Fall erhöht, in dem anderen erniedrigt ist.

Es gibt Untersuchungen, dass Noradrenalin in vitro chemotaktisch und chemokinetisch wirkt, d.h. die Mobilität und die gerichtete Bewegung entlang eines Konzentrationsgefälles in die Richtung der höchsten Noradrenalinkonzentration fördert (Kempf, 1994). Versucht man, daraus ein Modell zu konstruieren, dann würde bei fehlendem NA in der Milz der Plasmaspiegel von NA im Blut die treibende Kraft für die Wanderung aus

dem Blut in das Gewebe darstellen. Diese Hypothese kann in dieser Arbeit nicht befürwortet oder verworfen werden, da die Plasmaspiegel von NA nicht gemessen wurden. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Plasmacatecholaminspiegel nach Gabe von Endotoxin in einer Dosierung, wie ich sie verwandt habe, innerhalb von 1 Stunde signifikant ansteigt (Besedovsky et al., 1996). Nach Gabe von Reserpin, das die vesikulären Speicher von NA entleert, sind nach 24 Stunden eher niedrige Werte zu erwarten. Dies ist ein Zeitpunkt, an dem die Speicher leer sind, das zirkulierende NA metabolisiert und ausgeschieden ist, was auch an der generellen Vasodilatation ablesbar ist. Ebenfalls sind 5-7 Tage nach der Durchtrennung des Milznerven normale NA-Spiegel im Blut zu erwarten. Geht man also davon aus, dass nur nach Endotoxin ein erhöhter Catecholaminspiegel im Blut, nicht aber nach Denervierung vorhanden ist, dann lässt sich nicht erklären, warum nach Erhöhung der Milzdurchblutung infolge der Durchtrennung des Milznervs genauso viele Zellen in die Milz aufgenommen werden wie nach Endotoxin und warum nach Reserpin weniger Zellen immigrieren als nach Endotoxin oder lokaler Milzdenervierung. Carlson und Madden haben nach Sympathektomie eine vermehrte Aufnahme von Lymphozyten in die Lymphknoten beschrieben (Carlson et al. 1997; Madden et al. 1991). Nach meinen Untersuchungen dürfte dafür weniger der Mangel an NA, als die Steigerung der Durchblutung verantwortlich sein, die durch den Wegfall der sympathisch-noradrenergen Vasokonstriktion verursacht ist, und zu einer Erhöhung des Zellantransportes führt. Der Befund, dass die Gabe von  $\beta$ -Antagonisten bei Sportlern die Sport-induzierte Leukozytose vermindert, weist darauf hin, dass Catecholamine eher an der Mobilisierung von Leukozyten als an der Regulation der Zellimmigration beteiligt sind.

Zusammengenommen legen diese Befunde nahe, dass Noradrenalin die Mobilisierung von Zellen aus der Milz fördert, dass aber eine Beeinflussung der Zellaufnahme durch direkte Einwirkung von NA auf zirkulierende Lymphozyten *im adulten Organismus* zur Zeit nicht bewiesen werden kann.

Während also die Bedeutung eines Abfalls der Catecholaminkonzentration in der Milz als Stimulus für eine vermehrte Einwanderung von Zellen in die Milz ungeklärt bleibt und eher unwahrscheinlich ist, ist der erhöhte Blutfluss imstande, sowohl bei den denervierten Tieren, als auch nach Stimulation mit LPS die Zunahme der Zellimmigration in die Milz zu erklären.

#### **IV.6. Schlußfolgerungen:**

- 1. eine Erhöhung der lokalen Durchblutung stellt eine wichtige Voraussetzung für die Aufnahme von Leukozyten aus dem Blut in den extravasalen Raum dar.**
- 2. Eine generelle Steigerung der Durchblutung der peripheren Organe, wie sie bei pharmakologischer Behandlung auftreten kann, kann sich nachteilig für die Aufnahme von Leukozyten aus dem Blut in die Milz auswirken.**

Der Begriff „Neuroimmunologie“ beschreibt den Zusammenhang zwischen Funktionen zweier Systeme, des Immunsystems und des Nervensystems. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass wesentliche Wirkungen des autonomen Nervensystems auf das Immunsystem über die Regulation des Blutkreislaufs vermittelt werden. Dadurch dass die sympathisch-noradrenerge Innervation von sekundären Immunorganen in erster Linie der Regulation der Durchblutung dient, kann die Güte der Blutversorgung die Funktion dieser Organe beeinflussen. Das gilt in besonderem Maß für die Milz, da dieses Organ eine besonders dichte noradrenerge Innervation hat und seine Funktion als Filter im arteriellen Blutkreislauf aufgefaßt wird.

Zu dieser Filterfunktion gehört die Aufnahme von Zellen, aber auch von löslichem, schwach opsonisiertem antigenem Material aus dem arteriellen Blutkreislauf. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass eine Steigerung der Durchblutung zu einer Verbesserung der Aufnahme von zirkulierenden Zellen aus dem Blutkreislauf führt.

Dieser Befund ist aus zwei Gründen nicht selbstverständlich:

a) bisher wurde angenommen, daß die Erkennung von Zellen über Adhäsionsmoleküle der entscheidende Schritt zur Aufnahme von Zellen aus dem Blut ist. In der Tat wird ja auch in dieser Arbeit eine signifikante Steigerung der Zellaufnahme nach Immunstimulation mit Hilfe von bakteriellem Endotoxin gefunden. Ohne dass die Bedeutung der Adhäsionsmoleküle für die Abwicklung der einzelnen Schritte von der Haftung von Zellen am Endothel bis zur Einwanderung ins Gewebe mit Hilfe von molekularen Kräften in Frage gestellt wird, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass auch ohne Heraufregulation von Adhäsionsmolekülen allein durch eine lokale Verbesserung der Durchblutung, d.h. eine Erhöhung des Zellangebotes, eine gesteigerte Aufnahme von Zellen ins Gewebe erreicht werden kann, die derjenigen gleichkommt, die nach Endotoxin auftritt.

b) Nicht jede Durchblutungssteigerung führt zu einer vermehrten Aufnahme von Zellen, sondern es kommt auf die Relation der lokalen Durchblutung zum Herzminutenvolumen an: bei einer vorwiegenden Durchblutungssteigerung in Organen außerhalb der Milz werden ein großer Teil des Herzminutenvolumens und damit ein großer Teil der im Blut zirkulierenden Zellen an diesem Organ vorbeigeleitet und es kommt in diesem Zustand der Vasodilatation in den großen Gefäßgebieten außerhalb der Milz zu keiner Steigerung oder sogar zu einer Verminderung der Aufnahme von Zellen aus dem Blut in die Milz.

### **Theoretische Bedeutung der Befunde:**

In der aktuellen Diskussion über die Mechanismen, die für die Aufnahme von zirkulierenden Leukozyten aus dem Blut in lymphatische Organe verantwortlich sind, ist das lange Zeit gültige Konzept, das spezifische Erkennungs- und Auswahlvorgänge für eine Lymphozyten-Subtyp-spezifische Zellaufnahme aus dem Blut fordert, deutlich modifiziert worden (Macckay et al., 1988; Westermann und Pabst, 1996). Zumindest in der Milz fehlen hochendotheliale Venulen. Stattdessen könnten andere molekulare Strukturen, die in der extrazellulären Matrix oder in Fibroblasten verankert



sind, eine weniger spezifische Aufnahme von Zellen in dieses Organ vermitteln (Pabst und Binns, 1989; Steiniger et al., 2001). Der überraschende Befund der hier vorgestellten Experimente, dass allein die Erhöhung der Organdurchblutung ohne gleichzeitige Immunstimulation und ohne gleichzeitige Veränderung der Zahl von Adhäsionsmolekülen imstande ist, die Zahl der in die Milz aufgenommenen Zellen aus dem Blut in gleichem Umfang zu steigern wie nach Immunstimulation, weist auf die Bedeutung rein physikalischer Faktoren für die Zellaufnahme hin. Offensichtlich ist die Anzahl der angebotenen Zellen eine Größe, die die Anzahl der aufgenommenen Zellen limitieren kann und die durch eine eventuelle Erhöhung der Anzahl von Adhäsionsmolekülen nicht kompensiert werden kann.

### **Praktische Bedeutung der Befunde**

#### **a) während einer Immunantwort:**

Es ist bekannt, dass schon wenige Stunden nach Induktion einer spezifischen humoralen Immunantwort eine Erhöhung der Durchblutung lymphatischer Organe auftritt. Diese Erhöhung ist schon nach 1 – 2 Stunden signifikant, also lange vor dem Zeitpunkt, an dem die Produktion von Antikörpern beginnt (Herman et al., 1976; Drayson et al., 1981). Die Milz ist darauf spezialisiert, im Blut zirkulierendes antigenes Material, nicht nur Zellen, sondern auch schwach opsonierte lösliche Antigene zu sequestrieren und die vorliegenden Befunde lassen darauf schließen, dass durch diese Durchblutungssteigerung nicht nur die Aufnahme von Zellen, sondern auch generell von zirkulierendem antigenem Material gefördert wird.

Trotz der vielfältigen Untersuchungen zum Einfluß der Catecholamine auf das Immunsystem, ist der Zusammenhang noch nicht geklärt; es werden immer wieder neue Aspekte im Zusammenspiel von Neurotransmittern und Immunsystem beobachtet. Häufig bleibt dabei die Beachtung der Durchblutung außen vor, obwohl diese eine existentielle Grundlage für den Transport der Leukozyten zu den lymphatischen Organen darstellt. Aus diesem Grund liegt der Schwerpunkt der Interpretation auf der

Durchblutungsveränderung als Hauptursache der veränderten Leukozytenmigration. Da die Wirkung der Catecholamine auf die Zellen des Immunsystems ein großes Spektrum aufweist, ist nicht auszuschließen, dass es hier zu zusätzlichen Interaktionen kommt.

### **b) in alltäglichen und in klinischen Situationen**

Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse könnten in Situationen eine praktische Bedeutung gewinnen, in denen eine Mehrdurchblutung großer parenchymatöser Organe im Körper auftritt, die auf Kosten der Milzdurchblutung geht oder an der die Milzdurchblutung nicht entsprechend teilnimmt. Eine derartige Situation findet man z.B. während starker körperlicher Belastung, wie sie im Hochleistungssport auftritt. Durch die gesteigerte sympathische Aktivierung nimmt beim Langstreckenlauf die Milzdurchblutung ab; gleichzeitig findet sich eine Verdopplung der Muskeldurchblutung (Sexton und Poole, 1995). Die Muskelmasse beträgt ein Vielfaches der Milz und entsprechend hoch ist die Blutmenge, die bei starker physikalischer Beanspruchung durch diese Organe fließt und entsprechend gering ist in dieser Situation die Blutmenge, die der Milz zugeführt wird (Laughlin et al., 1987 und 1988). Die erhöhte Infektanfälligkeit von Hochleistungssportlern hat sicher vielfältige Ursachen; aber die eingeschränkte Funktion der Milz, ihre Aufgabe als Filter für zirkulierendes antigenes Material zu funktionieren, könnte dazu beitragen. Diese Schlußfolgerung wird durch meine Ergebnisse und durch Befunde aus der Literatur unterstützt, dass nach anhaltender  $\alpha$ -adrenerger Stimulation, wie sie während physischem oder psychischem Stress auftritt, die Zahl der Leukozyten im Blut ansteigt und in der Milz abnimmt (Stevenson et al., 2001).  $\alpha$ -adrenerge Stimulation verringert die Milzdurchblutung und dürfte sich dadurch nachteilig auf die Sequestrierung von zirkulierenden Zellen, aber auch von Antigenen auswirken.

Sicherlich hat der Organismus genügend Möglichkeiten, eine eingeschränkte Funktion der Milz unter Normalbedingungen zu kompensieren.

**c) Beitrag der dargestellten Untersuchungen zum Verständnis der Beziehung zwischen Immunsystem und dem autonomen Nervensystem:**

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass nicht nur sympathisch – noradrenerge Efferenzen die Immunfunktion der Milz beeinflussen, sondern dass umgekehrt die Aktivierung von Zellen in der Milz mit Hilfe von Endotoxin zu einer Hemmung der noradrenergen, gefäßverengenden Einflüsse und zu einer Zunahme der Milzperfusion und Erhöhung der Zellaufnahme aus dem Blut führt. Dadurch dass mit Hilfe von lokalen Mediatoren, unter denen IL-1 $\beta$  eine wichtige Rolle spielt, eine Durchblutungssteigerung und verbesserte Aufnahme von zirkulierendem Material aus dem Blut erreicht wird, werden die Voraussetzungen für die immunologische Tätigkeit der Milz geschaffen.

Im Wechselspiel zwischen autonomem Nervensystem und Immunsystem spielt bei der Milz der Blutkreislauf eine herausragende Rolle für die Funktion dieses Organs. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass nicht nur die lokale Durchblutung, sondern auch die Regulation des Gesamtkreislaufs über das autonome Nervensystem Einfluss auf die Zellimmigration in die Milz nehmen können.

## **V. Literaturverzeichnis:**

Benschop, R.J., Rodriguez-Feuerhahn, M., Schedlowski, M. (1996)  
Catecholamine-Induced Leukocytosis: Early Observations, Current Research,  
and Future Directions. *Brain, Behavior and Immunity* 10: 77-91

Besedovsky, H.O., del Rey, A., Sorkin, E., da Prada, M., Keller, H.H. (1979)  
Immunoregulation Mediated by the Sympathetic Nervous System. *Cellular  
immunology* 48: 346-355

Besedovsky, H.O., del Rey, A., Sorkin, E., Burri, R., Honegger, C.G.,  
Schlumpf, M., Lichtensteiger, W. (1987) T-Lymphocytes Affect the  
Development of Sympathetic Innervation of Mouse Spleen. *Brain, Behavior  
and Immunity* 1: 185-193

Besedovsky, H.O., del Rey, A. (1996) Immune-Neuro-Endocrine Interactions:  
Facts and Hypotheses. *Endocrine Reviews* Vol.17, No. 1, 64-102

Binns, R.M., Licence, S.T., Pabst, R. (1992) Homing of blood, splenic, and  
lung emigrant lymphoblasts: comparison with the behavior of lymphocytes  
from these sources. *Int. Immunol.* 4: 1011-1019.

Bullock, K. (1985) Neuroanatomy of Lymphoid Tissue: A Review. *Neural  
Modulation of Immunity* edited by R. Guillemin et al. (eds.), Raven press NY  
1985, S. 111-141

Carlson, S.L., Beiting, D.J., Kiani, C.A., Abell, K. M., McGillis, J.P. (1996)  
Catecholamines Decrease Lymphocyte Adhesion to Cytokine-Activated  
Endothelial Cells. *Brain, Behavior and Immunity* 10: 55-67

Carlson, S.L., Fox, S., Abell, K. (1997) Catecholamine Modulation of Lymphocyte Homing to Lymphoid Tissues. *Brain, Behavior and Immunity* 11: 307-320

del Rey, A., Besedovsky, H.O., Sorkin, E., da Prada, M., Arrenbrecht, S. (1981) Immunoregulation Mediated by the Sympathetic Nervous System, II. *Cellular Immunology* 63: 329-334

del Rey, A., Besedovsky, H.O., Sorkin, E., da Prada, M., Bondiolotti, G.P. (1982) Sympathetic immunoregulation: difference between high- and-low-responder animals. *Am. J. Physiol.* 242: 30-33

Drayson, M.T., Smith, M.E., Ford, W.L. (1981) The sequence of changes in blood flow and lymphocyte influx to stimulated rat lymph nodes. *Immunology* 44:125-133

Felten, D.L., Felten, S.Y., Bellinger, D.L., Carlson, S.L., Ackerman, K.D., Madden, K.S., Olschowki, J.A., Livnat, S. (1987) Noradrenergic Sympathetic Neural Interactions with the Immune System: Structure and Function. *Immunological Reviews* No. 100: 225-260

Felten, D.L. (2000) Neural influence on immune responses: underlying suppositions and basic principles of neural-immune signaling. *Prog. Brain Res.* 122: 381-389

Gaethgens, P., Ley, K., Pries A.R. (1985) Mutual interactions between leucocytes and microvascular blood flow. *Progr. Appl. Microcirc.* 7: 15 – 28

Gemsa, D., Kalden, J.R., Resch, K. (Hsg.) *Immunologie: Grundlagen – Klinik – Praxis.* Thieme, Stuttgart 1991, S. 2 – 15

- Golenhofen, K. (1962) Sustained dilatation in human muscle blood vessels under the influence of adrenaline. *J. Physiol.* 160: 189-199
- Gowans, J.L., Knight, E.J. (1964) The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. *Proc. Roy. Soc. B* vol.159: 257-282
- Hamann, A., Thiele, H.-G. (1989) Molecules and Regulation in Lymphocyte Migration. *Immunological Reviews* No.108:19-44
- Hamann, A., Rebstock, S., (1993) Migration of Activated Lymphocytes. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol 184:109-124
- Herman, P.G., Lyonnet, D., Fingerhut, R., Tuttle, R.N. (1976) Regional Blood Flow to the Lymph Node During the Immune Response. *Lymphology* 9: 101-104
- Jänig, W. (1988) Pre- and postganglionic vasoconstrictor neurons: differentiation, types, and discharge properties. *Annu. Rev. Physiol.* 50: 525-539
- Kappel, M., Poulsen, T.D., Galbo, H., Pedersen, B.K. (1998) Effects of elevated plasma noradrenaline concentration on the immune system in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 79: 93-98
- Kempf, M.-C. (1994) Das Migrationsverhalten von Lymphozyten unter dem Einfluß von Noradrenalin. Diplomarbeit im Fach Humanbiologie (Betreuerin Dr. A. del Rey), Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
- Lakey Berg, E., Goldstein, L.A., Jultila, M.A., Nakache, M., Picker, L.J., Streeter, P.R., Wu, N.W., Zhou, D., Butcher, E.U. (1989) Homing Receptors and Vascular Addressins: Cell Adhesion Molecules that Direct Lymphocyte Traffic. *Immunological Reviews* No.108:5-18

Laughlin, M.H., Armstrong, R.B., White, J., Rouk, K. (1982) A method for using microspheres to measure muscle blood flows in exercising rats. *J. Appl. Physiol.* 52: 1629-1635

Laughlin, M.H., Korthuis, R.J., Sexton, W.L., Armstrong, R.B. (1988) Regional muscle blood flow capacity and exercise hyperemia in high-intensity trained rats. *J. Appl. Physiol.* 64: 2420-2427

Livnat, S., Felten, S.Y., Carlson, S.L., Bellinger, D.L., Felten, D.L. (1985) Involvement of peripheral and central catecholamine systems in neural-immune interactions. *J. Neuroimmunol.* 10: 5 – 30

MacDonald, I.C., Ragan, D.M., Schmidt, E.E., Groom, A.C. (1987) Kinetics of cell passage through interendothelial slits into venous sinuses in rat spleen, analysed by in vitro microscopy. *Microvasc. Res.* 33: 118-134

Mackay, C.R., Kimpton, W.G., Brandon, M.R., Cahill, R.N. (1988) Lymphocyte subsets show marked differences in their distribution between blood and the afferent and efferent lymph of peripheral lymph nodes. *J. Exp. Med.* 167: 1755-1765

Madden, K. S., Livnat, S. (1991) Catecholamine Action and Immunologic Reactivity. *Psychoneuroimmunology*, Second Edition 283-310

Madden, K.S., Sanders, V.M., Felten, D.L. (1995) Catecholamine Influences and Sympathetic Neural Modulation of Immune Responsiveness. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 35: 417-448

Nielsen, H.B., Secher, N.H., Kristensen, J.H., Christensen, N.J., Espersen, K., Pedersen, B.K. (1997) Splenectomy impairs lymphocytosis during maximal exercise. *The American Physiological Society* pg 1847-1852

Pabst, R., Binns, R.M. (1989) Heterogeneity of Lymphocyte Homing Physiology: Several Mechanisms Operate in the Control of Migration to Lymphoid and Non-Lymphoid Organs in vivo. *Immunological Reviews* No.108:83-105

Pabst, R., Westermann, J. The unique role of the spleen and its compartments in lymphocyte migration. 38<sup>th</sup> Forum in Immunology pg. 339-342

Pabst, R., Westermann, J. (1991) *Scanning Microsc Dec. 5 (4): 1075-80*

Rogausch, H. (1978) Influence of Ca<sup>++</sup> on the red cell deformability and adaptation to spherizing agents. *Pflügers Arch. Europ. J. Physiol. 373: 43 – 47*

Rogausch, H. (1987) The apparent viscosity of aggregating and non-aggregating erythrocyte suspensions in the isolated perfused liver. *Biorheology 24: 163 – 171*

Rogausch, H., del Rey, A., Kabiersch, A., Besedovsky, H.O. (1995) Interleukin-1 increases splenic blood flow by affecting the sympathetic vasoconstrictor tonus. *Am. J. Physiol. 268: R902 – R908*

Rogausch, H., del Rey, A., Kabiersch, A., Reschke, W., Örtel, J., Besedovsky, H.O. (1997) Endotoxin impedes vasoconstriction in the spleen: role of endogenous interleukin-1 and sympathetic innervation. *Am. J. Physiol. 272: R2048 – R2054*



Rogausch, H., del Rey, A., Örtel, J., Besedovsky, H.O. (1999) Norepinephrin stimulates lymphoid cell mobilization from the perfused rat spleen via  $\beta$ -adrenergic receptors. *Am. J. Physiol.* 276: R724 – R730

Rogausch, H., Vo, N.T., del Rey, A., Besedovsky, H.O. (2000) Increased sensitivity of the baroreceptor reflex after bacterial endotoxin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 917: 165 – 168

Rogausch, H., Zwingmann, D., Trudewind, M., del Rey, A., Voigt, K.-H., Besedovsky, H.O. (2003) Local and systemic autonomic nervous effects on cell migration to the spleen. *J. Appl. Physiol.* 94: 469 – 475

Saito, M., Akiyoshi, M., Shimizu, Y. (1991) Possible role of the sympathetic nervous system in response to interleukin-1. *Brain Res. Bull.* 27: 305 – 308

Schmidt-Schönbein, H. (1977) Microrheology of erythrocytes and thrombocytes; blood viscosity and the distribution of blood flow in the microcirculation. In: *Handbuch der allgemeinen Pathologie* (H. Meesen, Hsg.), Springer, Berlin 1977

Sexton, W.L., Poole, D.C. (1995) Costal diaphragm blood flow heterogeneity at rest and during exercise. *Respir. Physiol.* 101: 171-182

Shinkai, S., Shore, S., Shek, P.N., Shephard, R.J. (1992) Acute Exercise and Immune Function, Relationship between Lymphocyte Activity and Changes in Subset Counts. *International Journal of Sports Medicine*, Vol 13, No 6: 452-461

Splenectomy Patient Care Committee of the Society for Surgery of the Alimentary Tract (SSAT) (1999) Practice guideline. *J. Gastrointest. Surg.* 3 : 218-219

Springer, T.A. (1994) Traffic Signals for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration: The Multistep Paradigm. *Cell* 76: 301-314

Steiniger, B., Barth, P. (2000) Microanatomy and function of the spleen. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 151 (III-IX) 1 – 101

Steiniger, B., Barth, P., Hellinger A. (2001) The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp: do fibroblasts guide lymphocyte immigration? *Am. J. Pathol.* 159: 501 – 512

Stevenson, J.R., Westermann, J., Liebmann, P.M., Hortner, M., Rinner, I., Felsner, P., Wofler, A., Schauenstein, K. (2001) Prolonged alpha-adrenergic stimulation causes changes in leukocyte distribution and lymphocyte apoptosis in the rat. *J. Neuroimmunol.* 120: 50-57

Van Tits, L.J.H., Michel, M.C., Grosse-Wilde, H., Happel, M., Eigler, F.-W., Soliman, A., Brodde, O.-E. (1990) Catecholamines increase lymphocyte (2-adrenergic receptors via a (2-adrenergic, spleen-dependent process *Am. J. Physiol.* 258: 191-202

Weihe, E., Nohr, D., Michel, S., Müller, S., Zentel, H.J., Fink, T., Krekel, J. (1991) Molecular anatomy of the neuro-immune connection. *Int. J. Neurosci.* 59: 1 – 23

Westermann, J., Willführer, K.U., Rothkötter, H.J., Fritz, F.J., Pabst, R. (1989) Migration Pattern of Lymphocyte Subsets in the Normal Rat and the Influence of Splenic Tissue. *Scand. J. Immunol.* 29: 193-201

Westermann, J., Pabst, R. (1996) How organ-specific is the migration of „naive“ and „memory“ T-lymphocytes? *Immunol. Today* 17: 278-282

Westermann, J., Ehlers, E.M., Exton, M.S., Kaiser, M., Bode U. (2001)  
Migration of naive, effector and memory T cells: implications for the  
regulation of immune responses. Immunol. Rev. 184: 20-37

Zwingmann-Cornelius, D. (2002) Einflüsse der noradrenergen Innervation auf  
die zelluläre Zusammensetzung, Zellaktivierung und Zytokinproduktion in  
lymphatischen Organen während einer spezifischen Immunantwort.  
Dissertation im Fach Humanbiologie des Fachbereichs Humanmedizin der  
Philipps Universität, Marburg 2002.

## **VI. Verzeichnis der akademischen Lehrer:**

Meine Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Christiansen, Daut, Engel, Feuser, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Habermehl, Happle, Hesse, Kälble, Kern, Klenk, Koolman, Kretschmer, Krieg, Lang, Lennartz, Mueller, Oertel, Renschmidt, Richter, Rogausch, Röhm, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schnabel, Schulz, Seifart, Steiniger, Stinner, Thomas, Vohland, Voigt, Weihe, Werner, Westermann, Wichert

Meine Lehrer in Oldenburg (akadem. Lehrkrankenhaus der Uni Göttingen) waren die Herren :

Bär, Halbfaß, Korenke, Müller, Reil, Seidenberg

## **VII. Danksagung:**

Ich möchte mich bei Herrn PD Dr. Heiner Rogausch für die Überlassung des Themas bedanken. Während der Arbeit an dieser Dissertation hatte er immer Zeit für Diskussionen und viele praktische Hilfen, hierfür gilt ihm vor allem großer Dank.

Ein besonderer Dank gilt Frau Sigrid Petzold für die viele praktische Hilfe und das immer offene Ohr.

Meinen Eltern danke ich für die Liebe und Zuwendung, die ich von ihnen erfahren habe.

Und Matthias, dafür dass es ihn gibt.

## VIII. Tabellarischer Anhang:

Experiment 15 min	15min ctrl PKH/100000	15 min Reserpin PKH/ 100000	15 min lokal PKH/100000
	11,91761	1,1308244	35,7
	14,332857	6,2539183	64,3
	9,7360125	2,646564	46,3
	17,415006	9,3469031	52,2
	21,871752	12,406599	
Mittel	<b>15,055</b>	<b>6,357</b>	<b>49,625</b>
SD	4,2590	4,1624	10,331
SE	1,9047	1,8615	5,166

6Std.	6Std. ctr. PKH/100000	6Std. Reserpin PKH/100000	6Std. lokal PKH/100000
	21,3	17	66,5
	29,5	17,1	50,6
	24,5	16,4	69,2
	25,5	15,6	64,2
	22,9	17,9	46,9
Mittel	<b>24,7</b>	<b>16,8</b>	<b>59,5</b>
SD	2,8	0,8	9,0
SE	1,1	0,3	3,7

24 Std.	24 Std ctrl PKH/100000	24 Std Reserpin PKH/ 100000	24 Std Lokal PKH/ 100000
	66,582816	45,036488	62,1
	60,871729	63,465537	106,6
	55,228388	41,662452	63,7
	47,624162	43,246511	63,4
	53,2344	46,246344	
Mittel	<b>56,708</b>	<b>47,931</b>	<b>73,95</b>
SD	6,506	7,922	18,86
SE	2,909	3,543	9,43

Experiment	15 min ctrl	15 min Reserpin	15 min lokal
15 min	PKH/ Milz	PKH/ Milz	PKH/Milz
	47670,439	3844,8029	75787
	60197,999	21263,322	147355
	44493,577	13973,858	84278
	71401,525	43650,037	92912
	78300,87	34118,146	
Mittel	<b>60412,882</b>	<b>23370,033</b>	<b>100083</b>
SD	13088,703	14147,519	27956,032
SE	5853,45	6326,963	13978,016

6Std.	6h ctr.	6h Reserpin	6h lokal
	PKH/ Milz	PKH/ Milz	PKH/ Milz
	77452	67366	134206
	144277	70083	135978
	81750	63332	127926
	101596	58446	142622
	95978	64057	151543
Mittel	<b>100211</b>	<b>64657</b>	<b>138455</b>
SD	23750	3936	8046
SE	9694	1607	3284

24 Std.	24 Std ctrl	24 Std Reserpin	24 Std lokal
	PKH/ Milz	PKH/ Milz	PKH/Milz
	206406,73	207167,84	110624
	200876,71	285594,92	374191
	231959,23	227060,36	218968
	247645,64	134064,18	283940
	308759,52	203483,91	
Mittel	<b>239129,566</b>	<b>211474,242</b>	<b>246930,75</b>
SD	38746,181	48603,5188	96081,087
SE	17327,82	21736,154	48040,54

Experiment 15 min	15 min ctrl PKH% inj	15 min Reserpin PKH% inj	15 min lokal PKH%inj
	0,6272426	0,0505895	1,05406
	0,6270625	0,2214929	2,04945
	0,4449358	0,1397386	0,63367
	0,5712122	0,3492003	0,69859
	0,626407	0,2729452	
Mittel	<b>0,5794</b>	<b>0,2068</b>	<b>1,1089</b>
SD	0,0706	0,1037	0,566
SE	0,0316	0,0464	0,283

6 Std.	6h ctr. PKH% inj	6h Reserpin PKH% inj	6h lokal PKH% inj
	0,7300	0,57	2,11
	1,2500	0,6089	1,87
	0,8812	0,5146	1,31
	1,1500	0,48	2,17
	1,3000	0,53	1,37
Mittel	<b>1,0622</b>	<b>0,5407</b>	<b>1,7660</b>
SD	0,2203	0,0447	0,3625
SE	0,0899	0,0182	0,1480

24 Std	24 Std ctrl PKH% inj	24 Std Reserpin PKH% inj	24 Std lokal PKH% inj
	1,7345103	1,7409063	0,95366
	1,7620764	2,5052186	3,22579
	2,4416761	2,3901091	2,99956
	1,9049665	1,0312629	3,88959
	2,9688416	1,9565761	
Mittel	<b>2,1624</b>	<b>1,9248</b>	<b>2,767</b>
SD	0,4771	0,5266	1,097
SE	0,213	0,2355	0,548



## PKH 6h n LPS

PKH/100tsd ctrl. LPS			PKH/Milz ctrl. LPS			PKH%inj ctrl. LPS		
1	36,8		1	127069		1	1,76	
2	36,2		2	108085		2	1,53	
3	36,1		3	148042		3	2,02	
4	35,6		4	150037		4	2,1	
5	33,3		5	85947		5	1,19	
6	30,2		6	89480		6	1,22	
<b>Mittel</b>	<b>34,7</b>	<b>Mittel</b>	<b>118110</b>		<b>Mittel</b>	<b>1,64</b>		
SD	2,3	SD	25659		SD	0,36		
SE	0,9	SE	10473		SE	0,15		

## p-Werte

	100.000		pro Milz		% injiziert	
	Mann-Whitney	T-Test	Mann-Whitney	T-Test	Mann-Whitney	T-Test
<b>Ctr/Res 15</b>	0,028	<0,01	0,009	<0,001	0,009	<0,001
<b>Ctr/lok 15</b>	0,014	<0,001	0,027	<0,05	0,014	>0,05
<b>Res/lok 15</b>	0,014	<0,001	0,014	<0,001	0,014	<0,001
<b>Ctr/Res 6</b>	0,009	<0,01	0,009	<0,001	0,009	<0,001
<b>Ctr/lok 6</b>	0,009	<0,001	0,076	<0,05	0,009	<0,01
<b>Res/lok 6</b>	0,009	<0,001	0,009	<0,001	0,009	<0,001
<b>Ctr/Res 24</b>	0,076	>0,05	0,465	>0,05	0,745	>0,05
<b>Ctr/lok 24</b>	0,086	>0,05	0,806	>0,05	0,221	>0,05
<b>Res/lok 24</b>	0,05	<0,05	0,624	>0,05	0,221	>0,05
<b>Ctr 15/ 6</b>	0,016		0,016		0,009	
<b>Ctr 15/ 24</b>	0,009		0,009		0,009	
<b>Ctr 6/ 24</b>	0,009		0,009		0,009	
<b>Res 15/ 6</b>	0,009		0,009		0,009	
<b>Res 15/ 24</b>	0,009		0,009		0,009	
<b>Res 6/ 24</b>	0,009		0,009		0,009	
<b>Lok 15/ 6</b>	0,221	>0,05	0,142	<0,05	0,086	>0,05
<b>Lok 15/ 24</b>	0,149	>0,05	0,043	<0,05	0,083	<0,05
<b>Lok 6/ 24</b>	0,806	>0,05	0,221	>0,05	0,221	>0,05
<b>Ctr/Ctr stim</b>	0,006	<0,001	0,006	>0,05	0,006	<0,001

