Aus der Klinik für Neurochirurgie
(Prof. Dr. med. V. Rohde)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die lymphatischen Abflusswege
von Gehirn und Hypophyse im Mausmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Carolin Sophie Breymann
aus Lübbecke

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatterin: PD Dr. med. A. Gutenberg

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. J. Wilting

III: Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2016

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	5
1.1 Klinische Relevanz hirneigener „lymphatischer“ Abflusswege	5
1.1.1 Entzündliche und Autoimmunerkrankungen des ZNS	7
1.2 Periphere Lymphwege und deren Bedeutung	10
1.3 Passive Mechanismen der „zerebralen Lymphdrainage“	12
1.3.1 „Lymphabflussweg“ des CSF	12
1.3.2 „Lymphabflussweg“ der ISF	16
1.3.3 Verbindungen der Abflusswege für CSF und ISF	18
1.4 Aktive Abtransportmechanismen des Gehirns	19
1.4.1 Die Funktion von Makrophagen für den „zerebralen Lymphabfluss“	19
1.4.2 Die Rolle der Astrozyten im „zerebralen Lymphabflusssystem“	21
1.5 Gegenstand und Zielsetzung dieser Arbeit	22
 2. Material und Methoden	 24
2.1 Materialien	24
2.2 Tierversuch	26
2.2.1 Versuchstiere	26
2.2.2 Gruppenbildung	26
2.2.3 Versuchsanordnung und Durchführung	26
2.3 Gewebeaufbereitung und Präparateherstellung	28
2.3.1 Entnahme des Gewebes	28
2.3.2 Einbetten des Gewebes	28

2.3.3 Entkalken knochenhaltigen Gewebes	28
2.3.4 Kühlen des Gewebes	29
2.3.5 Schneiden des Gewebes	29
2.3.5.1 Schlittenmikrotom	29
2.3.5.2 Vorgehensweise	29
2.3.6 Anfertigen der Präparate (Strecken und Aufziehen)	30
2.3.7 Färben der Präparate	31
2.3.7.1 Die HE-Färbung	31
2.3.7.2 Durchführung der HE-Färbung	33
2.3.8 Konservieren der Präparate	34
2.4 Auswertung der Präparate	35
2.5 Erstellen der Präparatbilder	36
2.6 Anatomische Zuordnung	36
3. Ergebnisse	37
3.1 Score zur Bestimmung der Farbstoffintensität	37
3.2 Auswertung der Präparate	37
3.2.1 Versuchsgruppe Nase	37
3.2.1.1 Injektionsort Nase: 5 Minuten	37
3.2.1.2 Injektionsort Nase: 10 Minuten	39
3.2.2 Versuchsgruppe CSF	45
3.2.2.1 Injektionsort CSF: 2 Minuten	45
3.2.2.2 Injektionsort CSF: 5 Minuten	49
3.2.2.3 Injektionsort CSF: 10 Minuten	53
3.2.2.4 Injektionsort CSF: 20 Minuten	59

3.2.3 Versuchsgruppe Hypophyse	73
3.2.3.1 Injektionsort Hypophyse: 5 Minuten	73
3.2.3.2 Injektionsort Hypophyse: 10 Minuten	76
3.2.3.3 Injektionsort Hypophyse: 20 Minuten	79
3.2.3.4 Injektionsort Hypophyse: 30 Minuten	82
3.3 Anatomische und zeitliche Unterscheidung zwischen den Abflusswegen	89
4. Diskussion	94
4.1 Die anatomischen Abflusswege	94
4.1.1 Abflusswege des ZNS	94
4.1.2 Abflusswege der Hypophyse	99
4.1.3 Der Abflussweg der Nase als Kontrollroute	100
4.2 Dynamische Analyse und zeitlicher Verlauf der Drainagewege	100
4.3 (Para)vaskulärer versus zellulärer Transportmechanismus	104
4.3.1 Paravaskulärer Abfluss	104
4.3.2 Zellulärer Abtransport	106
4.4 Allgemeine Limitationen bei der Auswertung (Methodenkritik)	109
5. Schlussfolgerung	111
6. Zusammenfassung	112
7. Anhang	114
7.1 Abkürzungsverzeichnis	114
7.2. Abbildungsverzeichnis	115
7.3 Grafikverzeichnis	118

7.4 Tabellenverzeichnis	119
7.5 Legende zu den Ergebnis-Tabellen	121
8. Literaturverzeichnis	123

1. Einleitung

Die Verbindung vom zentralen Nervensystem (ZNS) zum extrakraniellen Lymphgefäßsystem wirft noch viele Fragen auf (WALTER et al. 2006). Das Gehirn weist keine herkömmlichen Lymphgefäße wie im restlichen Körper auf (BRADL und FLÜGEL 2002; WELLER et al. 2009), jedoch konnte eine wesentliche und immunologisch interessante Möglichkeit der „lymphatischen“ Drainage aus dem Gehirn hinaus zu den Lymphstationen des Halses aufgedeckt werden (WELLER et al. 2009). Sowohl der Liquor cerebrospinalis (CSF) als auch die interstitielle Flüssigkeit (ISF) fließen vollständig oder teilweise zu den zervikalen Lymphknoten (CSERR und KNOPF 1992; CSERR et al. 1992a; ABBOTT 2004) ab. Jedoch scheinen, insbesondere beim Menschen, beide Flüssigkeiten verschiedene Abflusswege aus dem Gehirn zu nutzen, wobei es Wechselbeziehungen von CSF und ISF gibt, die bei einer Drainagebeeinträchtigung unter Krankheitsprozessen an Bedeutung gewinnen können (WELLER et al. 2009).

1.1 Klinische Relevanz hirneigener „lymphatischer“ Abflusswege

Es existieren verschiedene zerebrale Krankheitsbilder, für deren Pathogenese und vor allem für deren Therapie eine genauere Kenntnis über die Drainagemöglichkeiten des Gehirns von Liquor, interstitieller Flüssigkeit und darin gelösten Bestandteilen von großer Bedeutung sind. So könnte der nasale Lymphabflussweg beispielsweise klinisch in der Onkologie interessant sein, da mitunter bei intrakraniellen Tumoren auf diesem Wege eine Metastasierung von neoplastischen Zellen zu den Lymphknoten des Halses für möglich gehalten wird (GONZÁLEZ et al. 1993).

Weiterhin sollte auch einer Behinderung des Abflusses der interstitiellen Hirnflüssigkeit durch Peptid-Ablagerungen von Amyloid- β (A β) in den Gefäßwänden in diesem Zusammenhang Beachtung geschenkt werden. Durch die Lage der Amyloid-Plaques in den Basalmembranen von zerebralen Arterien- und Kapillarwänden werden die „lymphatischen“ Abflusswege stark blockiert, sodass die Beseitigung der interstitiellen Flüssigkeit und von gelöstem A β behindert ist und sich die ISF möglicherweise perivaskulär im Gehirn zurückstauen bzw. ansammeln kann (ROHER et al. 2003). Die A β -Ansammlungen in den Blutgefäßen führen letztendlich dann insbesondere bei älteren Patienten zu

Krankheitsbildern wie der Cerebralen Amyloidangiopathie (CAA) oder dem häufig damit assoziierten Morbus Alzheimer.

Dabei scheint gerade auch das Versagen im Abbau dieses Proteins, das unter anderem im Gehirn gebildet wird, bei zerebralen Alterungsprozessen einen Hauptfaktor in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung darzustellen (WELLER et al. 2008).

Da das Ausmaß von schweren zerebralen Amyloid-Ablagerungen mit dem Grad der Demenz positiv korreliert, deutet eine Blockade von „Lymphabflusswegen“ für die ISF und somit auch darin gelöstes A β auf eine potentiell große Bedeutung in der Alzheimer-Pathogenese hin (Neuropathology Group of the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study 2001; WELLER et al. 2009).

Pathologische Gefäßveränderungen, die z.B. durch Amyloid- β -Einlagerungen oder auch bei der Arteriosklerose entstehen, gehen mit einer Versteifung der Gefäßwand einher, die zu einer Reduktion der (anterograden) Pulswellenamplitude führt. Folglich wird auch die Höhe der retrograd reflektierenden, die „Lymphdrainage“ antreibenden Welle beeinträchtigt. Eine Behinderung und Verminderung des perivaskulären Abflusses aus dem Gehirn könnte die Folge sein (SCHLEY et al. 2006). Es existieren außerdem Hinweise, dass eine intakte Innervation der blutführenden Gefäße für eine suffiziente Drainage der ISF oder auch Molekülen wie A β benötigt wird (BEACH et al. 2000; BEACH 2008).

Wenn es gelingt, die Abflussrouten für die Drainage der ISF eindeutig zu bestimmen, könnte deren Beeinflussung die zukünftige Therapie von Krankheitsbildern wie dem Morbus Alzheimer (oder der Multiplen Sklerose) verbessern.

Außerdem scheint der Abflussweg des CSF über die nasalen Lymphbahnen eine bedeutende Rolle für das Immunsystem des ZNS und dessen Immunantworten einzunehmen (CARSON et al. 1999; HICKEY 2001; PASHENKOV et al. 2003). Der „Lymphabfluss“ aus dem ZNS hat sowohl Konsequenzen für die Neuroimmunologie als auch für das Gleichgewicht der neuronalen Umgebung des Gehirns (ABBOTT 2004). So konnte gezeigt werden, dass nach der Injektion von Antigenen in den Subarachnoidalraum anschließend eine Antikörperproduktion in den zervikalen Lymphknoten zu beobachten war (CSERR et al. 1992a; XIAO und LINK 1998), die mit den im restlichen Körper vorkommenden Immunantworten vergleichbar war (CSERR und KNOPF 1992). Intrazerebral injizierte Antigene wurden von CSERR et al. (1992a) in den B-Zell-Arealen der tiefen Hals-Lymphknoten beschrieben. Interessanterweise konnten nach versuchsweise durchgeführter Injektion von aus dem Knochenmark stammenden dendritischen Zellen in den Liquor der Seitenventrikel diese antigenpräsentierenden Immunzellen nur in den B-Zell-Follikeln von zervikalen Lymphknoten entdeckt werden,

jedoch nicht in anderen lymphatischen Organen (HATTERER et al. 2006). HOCHMEISTER et al. (2008) zeigten außerdem, dass in das Striatum eingespritzte dendritische Zellen, die zuvor in Knochenmark- und Mikroglia-Kulturen differenziert wurden, in geringen Mengen das ZNS über den Blutfluss verlassen und in mesenteriale Lymphknoten und die Milz einwandern konnten. Auch für die humorale Immunantwort scheinen die Lymphknoten des Halses, neben der Milz und dem Blutserum, wichtig zu sein (HARLING et al. 1989; CSERR et al. 1992b).

Diese Betrachtungen basieren auf der Annahme, dass die Antigene mit dem Liquor über den olfaktorischen Abflussweg zu den Lymphknoten gelangt sind, auch wenn die genauen Informationen zu den anatomischen Verhältnissen hierfür noch nicht eindeutig bestimmt werden konnten (WALTER et al. 2006).

Da auch gelöste Antigene in den perivaskulären Abschnitten abfließen, könnten diese Drainagewege auch bei neuroimmunologischen Erkrankungen, wie beispielsweise der Multiplen Sklerose (MS), eine wichtige Funktion haben (CARARE et al. 2008). Bereits gut untersucht ist die Antikörper-Produktion in zervikalen Lymphknoten, nachdem Antigene in das Hirngewebe oder den Liquor injiziert wurden (CSERR und KNOPF 1992, GALEA et al. 2007). Im Gegensatz hierzu konnten HARLING et al. (1989) eine deutliche Abnahme in der Antikörper-Bildung nach einer Lymphadenektomie von Hals-Lymphknoten in ihren Versuchen an Ratten feststellen.

1.1.1 Entzündliche und Autoimmunerkrankungen des ZNS

Typische entzündliche Krankheitsbilder des ZNS stellen beispielsweise die Meningokokken-Infektionen dar, die als Meningitis sowohl bei Kindern als auch bei jungen Erwachsenen weltweit eine hohe Morbidität und Mortalität verursacht (ROUPHAEL und STEPHENS 2012; CAESAR et al. 2013). Sie wird durch das aerobe, gramnegative Bakterium *Neisseria meningitidis* verursacht, das eingekapselt in Form von Diplokokken auftritt (ROUPHAEL und STEPHENS 2012). Für diese als Tröpfcheninfektion übertragenen Bakterien existiert ausschließlich der menschliche Körper als einziges Erregerreservoir (SOKOLOWSKI und TARGOWSKI 2012; CAESAR et al. 2013).

Neben den entzündlichen ZNS-Erkrankungen gibt es auch die Gruppe der autoimmun bedingten Krankheitsbilder des ZNS wie z.B. die Multiple Sklerose (MS) oder auch die Autoimmun-Hypophysitis.

Bei der MS handelt es sich um eine demyelinisierende, neurologische Autoimmunerkrankung des ZNS mit steigender Inzidenz und Prävalenz (CASTROP et al. 2013), insbesondere bei Frauen (KREMENTSOV und TEUSCHER 2013). Dabei spielt die Mikroglia, die die ansässigen Makrophagen des ZNS repräsentiert und deren Zellen zum mononukleär-phagozytären System (MPS) gehören (BOURETTE und MOUCHIROUD 2008), eine wichtige Rolle: sie ist nicht nur an der neuronalen Entwicklung aktiv beteiligt, sondern auch an der Beseitigung von Krankheitserregern und Zelltrümmern (KAUSHIK und BASU 2013). Wenn die mikroglialen Zellen infolge von sowohl neurodegenerativen Krankheiten, wie z.B. dem Morbus Alzheimer, als auch von entzündlichen, zentralnervösen Prozessen wie der MS chronisch aktiviert werden, führt dies zu einer generalisierten Hochregulierung von verschiedenen Signalmolekülen im Hirngewebe wie pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (KAUSHIK und BASU 2013).

Aktuelle Forschungsergebnisse vermuten außerdem einen Zusammenhang zwischen Gen-Polymorphismen des Vitamin D-Stoffwechselweges mit einer potentiellen Prädisposition für MS. Bereits nachgewiesene immunmodulatorische Funktionen des Vitamin D haben möglicherweise einen günstigen Einfluss auf die Senkung des Erkrankungsrisikos für MS (KRIZOVA et al. 2013).

Nach GUTENBERG et al. (2006) handelt es sich bei der primären Hypophysitis um eine Entzündung der Hypophyse, insbesondere des größeren endokrinen Anteils des Hypophysenvorderlappens, der Adenohypophyse. Die primäre Hypophysitis stellt ein eigenes Krankheitsbild dar, das von der Gl. pituitaria selbst ausgeht und leitet sich nicht von Infektionen oder benachbarten Affektionen der Hypophyse ab. Dabei zeigt sich neben einer Beeinträchtigung der hypophysären Funktionen und der Zerstörung des adenohypophysären Parenchyms auch ein Infiltrat aus Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen, mitunter auch neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (THODOU et al. 1995). Zu den neurologischen Symptomen gehören unter anderem Cephalgie und visuelle Störungen, die durch Kompression der Meningen bzw. des Chiasma opticum entstehen (LANDEK-SALGADO et al. 2010). Weitere häufige Symptome zeigen sich in einer Vergrößerung der Gl. pituitaria und einer Insuffizienz der Adenohypophyse (partieller oder totaler Hypopituitarismus), Sehstörungen in Form von Doppelbildern (Diplopie) oder insbesondere bei Schwangeren in einer Erhöhung des Prolaktinspiegels im Blut (Hyperprolaktinämie) (THODOU et al. 1995).

Diese Entzündung der Hypophyse ist zwar eine seltene Erkrankung, wird aber zunehmend beobachtet. Nicht zuletzt durch ihren schwer einschätzbaren, variablen Krankheitsverlauf, der Entwicklungen von Spontanheilungen sowie ernste Komplikationen bis hin zum Tod

umfassen kann, wurde die Hypophysitis für die Differentialdiagnostik von raumverdrängenden, pathologischen Veränderungen in der Region der Sella turcica immer wichtiger (GUTENBERG et al. 2006).

Da das Krankheitsbild der Hypophysitis radiologisch sehr dem des Hypophysenadenoms ähnelt, kann eine eindeutige Diagnosestellung nur über eine histologische Untersuchung erfolgen (THODOU et al. 1995). Histopathologisch werden drei verschiedene Subtypen der primären Hypophysitis beschrieben: die lymphozytäre (80%), die granulomatöse (15%) und die xanthomatöse Form (5%), wobei die lymphozytäre Hypophysitis (LH) vermutlich nach klinischen und labortechnischen Aspekten eine Autoimmunerkrankung darstellt und mit 80% am häufigsten auftritt (GUTENBERG et al. 2005). Neben der primären Entzündungsform gibt es auch die sekundäre Hypophysitis, die jedoch im Gegensatz zur primären vom benachbarten Gewebe der Hirnanhangsdrüse ausgeht.

Die Pathogenese der Autoimmunhypophysitis ist bisher jedoch weitestgehend ungeklärt. Insbesondere die LH betrifft häufiger Frauen als Männer im Verhältnis von 5-8:1 (HASHIMOTO et al. 1997; DURÁN et al. 2001). Außerdem scheint ein Zusammenhang zwischen der LH und einer bestehenden oder gerade beendeten Schwangerschaft zu bestehen (30%), so wie auch viele Autoimmunkrankheiten sich in ihren Verläufen deutlich während einer Schwangerschaft verändern können (GUTENBERG et al. 2006; LANDEK-SALGADO et al. 2010). So scheint es nach einer Studie von GUTENBERG et al. (2006) Zusammenhänge mit anderen Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise dem juvenilen Diabetes mellitus (früher Typ-1-Diabetes), der Wegener-Granulomatose, der Psoriasis oder auch der Hashimoto-Thyreoiditis zu geben. Diese traten nur bei Patienten auf, die an einer LH, nicht an den anderen histologischen Subformen der Hypophysitis erkrankt waren.

Die Therapie der LH kann derzeit nur symptomatisch erfolgen. Konservativ ist dies mit Glucocorticoiden (BERESSI et al. 1994; KRISTOF et al. 1999), Immunsuppressiva (Azathioprin) oder Zytostatika (Methotrexat) möglich (LECUBE et al. 2003; LEUNG et al. 2004). Außerdem kann die vergrößerte Hypophyse operativ verkleinert (HONEGGER et al. 1997; BUXTON und ROBERTSON 2001) oder mittels Radiotherapie behandelt werden (SELCH et al. 2003).

Aufgrund der noch unverstandenen Pathogenese einschließlich der unbekannten Autoantigene, häufig gestellter Fehldiagnosen bzw. Verwechslungen mit dem Hypophysenadenom und nicht zuletzt damit verbundenen schwierigen bzw. nicht kausalen Therapiemöglichkeiten hat die Erforschung der Autoimmun-Hypophysitis eine hohe klinische Relevanz. Das Wissen um den lymphatischen Abfluss aus der Hypophyse könnte einen wesentlichen Schritt zur Lösung der Frage um die Autoantigene der LH darstellen, da in den

unmittelbar assoziierten Lymphknoten gezielte Untersuchungen zu den präsentierten Autoantigenen durchgeführt werden könnten.

1.2 Periphere Lymphwege und deren Bedeutung

Das periphere lymphatische System des menschlichen Körpers besteht neben dem lymphatischen Gefäßnetz außerdem aus den Lymphknoten und den lymphatischen Organen und spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort.

In den primären lymphatischen Organen, wie dem Thymus und dem Knochenmark, differenzieren sich aus lymphatischen Stammzellen (Vorläuferzellen) ausgereifte, jedoch noch „naive“ Effektorzellen, die B- und T-Lymphozyten (WEIH und CAAMAÑO 2003).

Die primären Immunantworten werden in den sekundären lymphatischen Organen eingeleitet, zu denen neben der Milz und den regionalen Lymphknoten auch die Peyer-Plaques des Darmtraktes, die Tonsillen und das Nasen-assoziierte lymphatische Gewebe (NALT) gehören (RANDALL et al. 2008). Daneben existieren weitere Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT), wie das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (GALT) und das Bronchus-assoziierte lymphatische Gewebe (BALT), die als in der Mukosa verteilte Anhäufungen von lymphatischem Gewebe angeordnet sind und für die lokalen Immunreaktionen an der Schleimhautoberfläche zuständig sind (ELMORE 2006).

Die sekundären Lymphorgane bieten im Gegensatz zu den primären eine Umgebung, die es Lymphozyten erlaubt, mit akzessorischen Zellen, mit Antigenen und auch untereinander zu kommunizieren und aufeinander einzuwirken und dadurch antigen-spezifische primäre Immunantworten anzustoßen (WEIH und CAAMAÑO 2003). Tertiäre lymphatische Gewebe stellen ektopische Ansammlungen von lymphoiden Zellen dar, die erst im Erwachsenenalter entstehen. Sie stellen Reaktionen auf Umwelteinflüsse dar, die mit chronischen Entzündungsprozessen nach mikrobiellen Infektionen, Abstoßungsreaktionen von Transplantaten oder Autoimmunerkrankungen einhergehen (RUDDLE und AKIRAV 2009).

Daneben ist das periphere lymphatische System auch verantwortlich für die Regulation von Entzündungsvorgängen, der intestinalen Aufnahme von Lipiden, für die Homöostase der interstitiellen Flüssigkeit sowie den Rücktransport von extravasaler Flüssigkeit und Makromolekülen in die Blutgefäße, der Lymphdrainage (HONG et al. 2004; SCHOPPMANN 2005; BUTLER et al. 2009; WEITMAN et al. 2013).

Sowohl das Blutgefäßsystem als auch das Lymphsystem erfüllen aufeinander abgestimmte Aufgaben bei der Reabsorption von Flüssigkeiten und der Perfusion der verschiedenen Gewebe (HONG et al. 2004).

Das periphere Lymphgefäßsystem, das parallel zum venösen Gefäßsystem verläuft, besteht aus einem hierarchisch angeordneten Netzwerk von blind endenden Lymphkapillaren und sammelnden Lymphgefäßen, die beide von lymphatischen Endothelzellen ausgekleidet werden (PLANAS-PAZ und LAMMERT 2013). Durch die niedrigen hydrostatischen Druckverhältnisse in den lymphatischen Kapillaren, die interzellulär lockeren Zellverbindungen und die Verankerung in der umgebenden extrazellulären Matrix (EZM) ist es möglich, dass extravasales Blutplasma aus dem interstitiellen Gewebe in die Lymphgefäße übertreten kann. Über größere lymphatische Sammelgefäße, die intravasale bikuspidale, rückflussverhindernde Klappen enthalten, wird schließlich die Plasmaflüssigkeit aus den Lymphkapillaren aufgenommen und über die Lymphknoten in die Blutzirkulation weitergeleitet (PLANAS-PAZ und LAMMERT 2013).

Die regionalen Lymphknoten, die entlang von lymphatischen Gefäßen lokalisiert sind, nehmen Antigene und Antigen-präsentierende Zellen der nicht-lymphatischen Organe auf (RANDALL et al. 2008).

Daneben ist das lymphatische System auch in viele pathologische Prozesse eingebunden, wie z.B. in die Entstehung von Lymphödemen. Auch Tumorzellen nutzen die Lymphbahnen als Metastasierungswege (BUTLER et al. 2009). Die Lymphangiogenese, die Neubildung von Lymphgefäßen aus bereits vorhandenen lymphatischen Gefäßstrukturen, und die Änderung der Gefäßeigenschaften des lymphatischen Systems sind mit pathologischen Vorgängen verbunden, die neben der Metastasenbildung auch die Bildung von Aszites oder die Entstehung einer portalen Hypertension bei verschiedenen Lebererkrankungen darstellen können (CHUNG und IWAKIRI 2013).

Dennoch werfen die peripheren Lymphwege im Vergleich zum Blutgefäßsystem noch viele Fragen auf, wie beispielsweise die Regulation der Entwicklung und die Funktion des lymphatischen Systems (HONG et al. 2004). Auch ist die Rolle des Lymphsystems in verschiedenen Krankheitsprozessen - außer der Tumormetastasierung - noch wenig verstanden (XING und JI 2008). Hier ist noch intensive Forschungsarbeit erforderlich.

Das Lymphsystem ist Teil des Immunabwehrsystems des Körpers. Die afferenten Lymphgefäße erfüllen essentielle Funktionen des Immunsystems, indem sie Zellen, wie z.B. Leukozyten sowie in der Lymphe transportierte Antigene zu den drainierenden Lymphknoten fördern (RUSSO et al. 2013).

So stellt beispielsweise die Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen wie den dendritischen Zellen (DC) den Beginn der adaptiven Immunantwort dar. Dabei gelangen die Zellen von den Geweben der Peripherie zu den drainierenden Lymphknoten (PLATT und RANDOLPH 2013). Dendritische Zellen sind z.B. in der Haut vorhanden, wo sie Antigene aufnehmen und über das lymphatische System zu den Lymphknoten befördern. Daran anschließend werden die Antigene den T-Zellen präsentiert (RUSSO et al. 2013).

1.3 Passive Mechanismen der „zerebralen Lymphdrainage“

1.3.1 „Lymphabflussweg“ des CSF

Der CSF wird vom Plexus choroideus und seinen spezialisierten Zellen des Ependyms gebildet und fließt über die untereinander verbundenen Kammern des Hirn-Ventrikelsystems in den Subarachnoidalraum ab (WELLER 1998; JOHANSON et al. 2008, KILLER 2013). Von dort aus gelangt er größtenteils weiter über die Zotten und Pacchioni-Granulationen der Arachnoidea in die Wände der venösen Sinus durae matris und über diese schließlich in das Blut (WELLER 1998). Der physiologisch vorhandene Subarachnoidalraum wird von der Leptomeninx encephali, der so genannten weichen Hirnhaut, gebildet, die hirnwärts liegt und sich aus der Spinnwebhaut (Arachnoidea encephali) und der feinen Hirnhaut (Pia mater encephali) zusammensetzt. Die harte Hirnhaut, auch als Dura mater encephali oder Pachymeninx encephali bezeichnet, stellt die äußerste Bindegewebsschicht der drei Meningen dar und ist an der Bildung des Spatium subarachnoideum nicht beteiligt.

Mit der Drainage des CSF, den dafür verantwortlichen anatomischen Strukturen und dem funktionellen Zweck beschäftigten sich schon verschiedene Arbeitsgruppen. Häufig wird die Absorption des CSF über die Arachnoidal-Zotten genannt, jedoch werden auch alternative Wege für den Abfluss des Hirnwassers vom Subarachnoidalraum zum peripheren Lymphgefäßsystem diskutiert (WELLER et al. 1992; BRINKER et al. 1997; MOLLANJI et al. 2001). Diese weiteren Routen haben Bezug zu Bereichen um die Hirnnerven, wobei es Hinweise für einen der Hauptdrainagewege gibt, der entlang der Hirnbasis an den Fila olfactoria der Geruchsnerven zur Nase verläuft (JOHNSTON 2003; ZAKHAROV et al. 2004). Es existieren verschiedene Thesen zu diesem Zusammenhang, z.B. werden subarachnoidale Kanäle entlang der olfaktorischen Nerven vermutet, die in direkter Verbindung zu den

nasalen Lymphbahnen stehen (KIDA et al. 1993; BRINKER et al. 1997). BRADBURY und WESTROP (1983) dagegen verstehen unter diesen Kanälen eine diskontinuierliche Verbindung zu den Lymphgefäßen, die aber zu dem interstitiellen Raum der nasalen Schleimhaut geöffnet sind, sodass der Liquor so die Lymphbahnen erreichen kann. Eine weitere Möglichkeit der direkten oder indirekten Drainage des CSF in die nasalen Lymphgefäße besteht möglicherweise in einer direkten Beziehung des Subarachnoidalraumes mit dem perineuralen Bereich um die olfaktorischen Nervenfasern (ERLICH et al. 1986; LOWHAGEN et al. 1994; KIDA et al. 1995). Zudem existieren auch Hinweise dazu, dass Lymphozyten im CSF einen Transportweg aus dem Gehirn über die Lamina cribrosa zur nasalen Mukosa und in die Hals-Lymphknoten nutzen können (GOLDMANN et al. 2006).

Abb. 1: Übersicht über die Liquorzirkulation.

(entnommen aus: SCHÜNKE M et al. 2006, S. 194: Mit freundlicher Genehmigung des Georg Thieme Verlags)

Abb. 2a: Frontalschnitt: Detailansicht des Subarachnoidalraumes mit den Pacchioni-Granulationen.

(entnommen aus: SCHÜNKE M et al. 2006, S. 189: Mit freundlicher Genehmigung des Georg Thieme Verlags)

Abb. 2b: Schema: Feinbau der Leptomeninx mit ihrem Spaltraum (Subarachnoidalraum).

(entnommen aus: SCHÜNKE M et al. 2006, S. 189: Mit freundlicher Genehmigung des Georg Thieme Verlags)

Das meiste physiologische und anatomische Wissen bezüglich der „Lymphabflusswege“ für den CSF und die ISF aus dem Gehirn ist aus Tierversuchen bekannt (CARARE et al. 2008; JOHANSON et al. 2008). So wurde zum Beispiel der CSF-Abfluss über das Siebbein in die Schleimhaut der Nase mit Microfil-Tracern unter anderem an Schweinen, Schafen und Affen untersucht (JOHNSTON et al. 2004). Die Erkenntnisse über liquorführende „Lymphabflusswege“ entlang duraler „Lymphbahnen“ und über kraniale und spinale Nerven wurden dagegen bei Experimenten an Ratten ermittelt (CSERR und KNOPF 1992; KIDA et al. 1993).

Hiernach gibt es entscheidende Unterschiede bei Mensch und Tier:

Ratten z.B. haben eine CSF-Bildungsrate von 3-5 μ l in der Minute (DAVSON et al. 1987). Die Menge des CSF umfasst beim Menschen 140 ml, wobei mit 30 ml nur ein kleiner Anteil davon im Ventrikelsystem vorliegt und der restliche Hauptanteil von 110 ml im Subarachnoidalraum verteilt ist (BERGSNEIDER 2001). Dabei werden minütlich 350 μ l Liquor im menschlichen Ventrikelsystem produziert (DAVSON et al. 1987), also die 70- bis 110-fache Menge im Vergleich zu einem Rattengehirn. Mit durchschnittlich 1450 g wiegt ein menschliches Gehirn jedoch das über 700-Fache eines Rattengehirns, welches etwa nur 2g leicht ist. Bezogen auf die Hirngröße produziert der Mensch im Vergleich also deutlich weniger CSF in der Minute als das Nagetier.

Vergleicht man den Abfluss des CSF mit Hilfe von radioaktiv markiertem Albumin, so kann bei der Mehrzahl von Tieren bis zu 47% dieses Tracers in den zervikalen Lymphknoten nachgewiesen werden (CSERR und KNOFF 1992). Auch BOULTON et al. (1999) konnten ebenfalls an ausgewachsene Ratten zeigen, dass der Hauptanteil von injiziertem humanem Serum-Albumin (HSA) in die anterioren tiefen Halslymphknoten und in die lumbalen Lymphknoten drainiert.

Der Rest des CSF wird entweder unmittelbar über die Arachnoidalzotten in das Blut abgegeben (BRADBURY und WESTROP 1983; CSERR und KNOFF 1992; BOULTON et al. 1998) oder von Blutgefäßen im Gehirnparenchym aufgenommen (GREITZ 2007). Bei Tierversuchen an Schafen und Nagern wurde beobachtet, dass ein Großteil des CSF über die Lamina cribrosa des Os ethmoidale und die nasalen Lymphgefäße zu den zervikalen Lymphknoten gelangt (CSERR und KNOFF 1992; KIDA et al. 1993; JOHNSTON et al. 2004).

Ratten wurde in die Cisterna magna, dem subarachnoidalen Raum zwischen dem Cerebellum und der Medulla spinalis, Indian Ink als Marker in den Liquor injiziert, der daraufhin entlang der Unterseiten der Bulbi olfactorii, über nasale Lymphbahnen bis zu den tiefen zervikalen Lymphknoten verfolgt werden konnte (KIDA et al. 1993). Es konnte außerdem eine direkte Verbindung zwischen dem Subarachnoidalraum und Lymphbahnen nachgewiesen werden, die die Foramina der Lamina cribrosa durchliefen und sich neben den olfaktorischen Nerven in die Submukosa der Nase fortsetzten. Dabei erreichte der gefärbte CSF die zervikalen Lymphknoten über die nasale Route innerhalb von 30 Minuten, in den lumbalen Lymphknoten konnte der Farbstoff über die Spinalflüssigkeit schließlich im Verlauf von 6 Stunden nachgewiesen werden (KIDA et al. 1993).

Wurde Indian Ink über dem Scheitel (Vertex) zwischen den Hirnhemisphären in den CSF eingespritzt, gelangte der Farbstoff über periarterielle CSF-Kanäle zum Circulus arteriosus Willisii und schließlich über die Arteria ethmoidalis zu den Unterflächen der olfaktorischen Bulbi (WELLER et al. 1992; ZHANG et al. 1992).

Dagegen scheinen die Drainagemechanismen des Liquors beim Menschen, vor allem im Erwachsenenalter, andere zu sein: Der Großteil des Liquor-Abflusses erfolgt direkt über die Zotten der Spinnwebhaut und deren Pacchionische Granulationen in das venöse Blutgefäßsystem (DAVSON et al. 1987, JOHANSON et al. 2008). Die Arachnoidalzotten des Menschen erstrecken sich in ähnlicher Weise wie bei der Ratte durch die Siebplatte des Os ethmoidale und hauptsächlich dorsal entlang der Bulbi olfactorii bis in die Submukosa der Nase mit enger Beziehung zu dort liegenden Venen (KIDA et al. 1993; DJUANDA et al. 1998). Außer den typischen gefäßfreien Ausstülpungen der Arachnoidea (Granulationes

arachnoideales), die sich in die venösen Blutleiter der harten Hirnhaut (Dura mater) einstülpen, wurden auch kleinere dieser arachnoidalen Aussackungen in venösen Blutgefäßen von Menschen und Primaten gefunden, die kraniale Nerven (KELSEY and WELLER (*unveröffentlichte Beobachtung*), zitiert aus WELLER et al. 2009), aber auch thorakale und lumbale Spinalnerven umgaben (WELCH und POLLAY 1963; KIDO et al. 1976).

Die „lymphatische“ Drainage über die Nase scheint beim Menschen nach bisherigem Kenntnisstand nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (DJUANDA et al. 1998). So konnte an Leichen veranschaulicht werden, dass nur eine geringe Menge von postmortal gefärbtem CSF auch in die Nasenschleimhaut gelangen konnte (ZWILLINGER 1912; JOHNSTON et al. 2004). Jedoch können weder Aussagen über die CSF-Rate, die beim Menschen nasal abfließt und die Lymphknoten im Halsbereich erreicht, noch über die genaue Menge Liquor, die über kleine Zotten der Arachnoidea in die submukösen Venen der Nase abfließt, gemacht werden (DJUANDA et al. 1998).

Möglicherweise ist aber dieser nasale Lymphabfluss für Neugeborene wiederum bedeutsam, da sich die Arachnoidalzotten und Pacchioni-Granulationen, insbesondere im Sinus sagittalis superior, postpartal erst noch entwickeln müssen (DAVSON et al. 1987; GREITZ 2007; JOHANSON et al. 2008). Diese These, dass der nasale Lymphweg in jungem Lebensalter die primäre Abflussmöglichkeit darstellt, konnte auch in einem Versuch mit neugeborenen Lämmern bestätigt werden, denen ebenfalls noch die Entwicklung der Arachnoidalzotten fehlte (PAPAICONOMOU et al. 2002). Somit muss im Säulingsalter ein alternativer Weg für den Abfluss des CSF diskutiert werden. Möglicherweise ist der nasale Drainageweg wichtiger für Neugeborene als für Erwachsene (ZWILLINGER 1912).

1.3.2 „Lymphabflussweg“ der ISF

Die interstitielle Flüssigkeit (ISF) leitet sich von Bestandteilen des Blutes, aber auch vom Gewebestoffwechsel selbst ab (ABBOTT 2004).

Sie entspricht der Interzellularflüssigkeit anderer Körpergewebe, jedoch besteht durch die Blut-Hirn- und die Blut-ISF-Schranke eine engmaschige Kontrolle über den Eintritt gelöster Stoffe in das Zentralnervensystem und somit eine Besonderheit zu den restlichen Geweben des Organismus (ABBOTT 2004; BECHMANN et al. 2007). Die interstitielle Gehirnflüssigkeit wird bei der Ratte schätzungsweise mit einer Durchflussrate von 0,1-0,3 µl in der Minute gebildet, die vor allem entlang von Axonabschnitten und über perivaskuläre Zwischenräume abfließt (ABBOTT 2004).

Die Abflusswege, über die die ISF und gelöste Substanzen der ISF abtransportiert werden, sind weniger gut beschrieben als die Drainagerouten, denen der CSF folgt (CARARE et al. 2008). Allerdings unterscheidet sich der „Lymphabfluss“ des ZNS von dem aller anderen Organe (WELLER et al. 2009). So besitzen Organe, wie z.B. die Lunge oder der Darm, eindeutig von Blutgefäßen zu unterscheidende, dünnwandige Lymphbahnen, die überschüssige Gewebsflüssigkeit aufnehmen und zu den zugehörigen regionalen Lymphknotengruppen weiterleiten (WILLIAMS 1995; WELLER et al. 2009). Die Lymphdrainage von Zellen wie Lymphozyten oder Makrophagen, aber auch von Tumorzellen, Gewebsdetritus und Krankheitserregern zu den Lymphknoten wird durch Filtrationsdruck, die Kontraktion benachbarter Muskulatur und schließlich durch die Pulswelle benachbarter arterieller Gefäße gewährleistet (WILLIAMS 1995; SCHLEY et al. 2006; WELLER et al. 2009). Die schnelle Beseitigung von injizierten Testmarkern war nur bei lebenden Versuchstieren (Mäusen) zu beobachten, sodass für den Abfluss der ISF und deren Bestandteilen ein nur unter vitalen Bedingungen vorhandener Antrieb existieren muss (CARARE et al. 2008). Dabei scheint nach SCHLEY et al. (2006) die jeder eigentlichen arteriellen Pulsation entgegengesetzt gerichtete Reflektionswelle außerdem den Transport von „Lymphflüssigkeit“ und deren Bestandteilen anzutreiben. Zur Vermeidung eines Rückflusses wird außerdem eine Art Ventilmechanismus während der nach anterograd gerichteten Pulsation postuliert, wie beispielsweise eine konformative Anpassung der Gefäßwandstrukturen während und nach der Pulswelle (SCHLEY et al. 2006).

Jedoch ist unklar, ob die gelösten Substanzen der ISF im perivaskulären Gewebe an der Schädelbasis abgeführt werden oder ob sie über die Wände der Carotiden zu den zervikalen Lymphknoten gelangen (WILLIAMS 1995).

SZENTISTVANYI et al. (1984) injizierten Ratten einen radioaktiv markierten Albumin-Indikator in verschiedene Hirnareale. Anschließend konnten sie diesen in der Adventitia von Arterien der Leptomeninx und im Subarachnoidalraum nachweisen. Über das perineurale Gewebe des N. olfactorius gelangten außerdem Teile der radioaktiven Substanz zu retropharyngeal gelegenen Lymphknoten.

Beim Menschen können durch das natürlicherweise vorkommende Peptid β -Amyloid ($A\beta$) die „lymphatischen“ Abflusswege, die in der Nähe der Gefäße liegen, skizziert werden (WELLER et al. 1998; WELLER et al. 2008). Es konnten beispielsweise in frühen Stadien der Cerebralen Amyloidangiopathie (CAA) $A\beta$ -Ablagerungen in den Basalmembranen von Arterien- und Kapillarwänden beobachtet werden, welche dieselbe Verteilung aufwiesen wie die bei Mäusen intrazerebral injizierten, fluoreszierenden Indikatoren (PRESTON et al. 2003; CARARE

et al. 2008; WELLER et al. 2008). Daraus lässt sich schließen, dass Aß als ein natürlicher Marker für die gefäßnahe Drainage der ISF und darin gelösten Substanzen angesehen werden kann (WELLER 2008).

CARARE et al. (2008) konnten zeigen, dass der Abtransport von in das Gehirn injizierten Molekülen wie Dextran und Ovalbumin in zwei Phasen ablaufen kann; anfangs durch Diffusion in die Extrazellularräume und anschließend über einen perivaskulären Weg entlang der Basalmembranen von Arterien und Kapillargefäßen.

1.3.3 Verbindungen der Abflusswege für CSF und ISF

Im menschlichen Gehirn fließt der CSF zu den Lymphknoten entweder über nasale Lymphbahnen ab oder direkt über die Zotten und Pacchioni-Granulationen der Arachnoidea. Die ISF und ihre Bestandteile laufen dagegen perivaskulär von arteriellen und kapillären Gefäßwänden des Hirngewebes zu den Hals-Lymphknoten. Darüber hinaus scheint es Hinweise auf Verbindungen dieser „lymphatischen“ Drainagewege zu geben (WELLER et al. 2009).

So konnte GOLDMANN (1909) bereits vor 100 Jahren zeigen, dass der Farbstoff „Tryptan blue“, in das Gefäßsystem injiziert, aufgrund der Blut-Hirn-Schranke (BHS) nicht in das Gehirngewebe eindringen konnte. Nach Injektion in das Ventrikelsystem konnte aber beobachtet werden, dass sich der Farbstoff im Parenchym ausbreitete (GOLDMANN 1913).

Demnach ist es dem CSF anscheinend möglich, die liquorführenden Ventrikel zu verlassen, jedoch können Substanzen aus den hirneigenen blutführenden Gefäßen normalerweise nicht durch die BHS in das Hirngewebe gelangen.

Die ISF ist durch Schichten glatter Muskelzellen, die Adventitia der Blutgefäße und eine dünne Ummantelung der Leptomeninx vom CSF getrennt (WELLER et al. 2009). Zum einen trennt die Pia mater den Subarachnoidalraum vom darunter liegenden Gehirn, zum anderen separiert sie so auch den Liquorraum von den mit interstitieller Flüssigkeit gefüllten Arealen (ALCOLADO et al. 1988; HUTCHINGS und WELLER 1986; KRAHN 1982; WELLER 2005; ZHANG et al. 1990). Die Barrierefunktion der Pia mater, die aus einer dünnen Lage von Zellen zusammengesetzt ist, besteht z.B. für feine Schwebstoffe und auch Zellen wie Erythrozyten. Jedoch hat es nicht den Anschein, dass sie ein Einwandern von Makrophagen verhindern kann (KRAHN 1981).

Es ist nur wenig darüber bekannt, wie viel von der interstitiellen Flüssigkeit in den CSF abfließt (SHOESMITH et al. 2000).

SZENTISTVANYI et al. (1984) ermittelten an Ratten eine ISF-Rate von 10-15%, die in den CSF drainiert. WELLER et al. (2009) halten beim Menschen das Auftreten eines ähnlichen Ausmaßes des Abflusses für möglich.

Nach neueren Forschungsergebnissen tritt ein großer Teil des subarachnoidalen CSF entlang von arteriellen Gefäßen in das Gehirngewebe ein und rezirkuliert dort (ILIFF et al. 2012, ILIFF et al. 2013). Dort tauscht er sich mit der ISF aus, dessen Beseitigung wiederum entlang paravenöser Wege aus dem Hirn erfolgt. Dabei konnten mittels dynamischer Magnetresonanztomographie (MRT) die Rezessus der Gl. pinealis und der Gl. hypophysialis neben dem Bulbus olfactorius als Hauptknoten(punkte) für den Zufluss identifiziert werden (ILIFF et al. 2013). Diesen Austausch-Prozess bezeichneten ILIFF et al. (2013) in einer neueren Arbeit als „CSF-ISF-Exchange“ oder auch „Glymphatic System“. Das paravaskuläre, anatomisch vermutlich das gesamte Gehirn umfassende System ermöglicht neben dem Austausch der beiden Flüssigkeiten auch die Beseitigung von darin gelösten Substanzen und entstandenen Abfallprodukten aus dem Gehirn. ILIFF et al. (2013) stellten daraufhin die These auf, dass es bei Störungen des Abflusses zur Ausfällung von A β -Plaques und zum Fortschreiten einer neurodegenerativen Erkrankung wie dem Morbus Alzheimer kommen könnte, da auch die Abräumung von Molekülen wie Amyloid- β von der ungehinderten Funktion des „glymphatischen“ Abflusssystems abhängt. Somit könnte das sogenannte „Glymphatische System“ eine Schlüsselposition für die Eliminierung von A β und die Einschätzung dieser Erkrankung einnehmen (ILIFF et al. 2012).

1.4 Aktive Abtransportmechanismen des Gehirns

1.4.1 Die Funktion von Makrophagen für den „zerebralen Lymphabfluss“

Zellen des Immunsystems in peripheren Geweben bewegen sich zügig vom Ort der Entzündung zu ortsständigen Lymphknoten für die Präsentation ihrer Antigene. Bislang scheinen nach CARARE et al. (2008) um zerebrale Blutgefäße lokalisierte Makrophagen Substanzen oder versuchsweise injizierte Farbmoleküle phagozytieren zu können. Durch im Tierversuch ausgelöste Entzündungsherde in den Gehirnen von Mäusen konnten ANDERSSON et al. (1992) jedoch keine zur Peripherie analoge Drainage von Makrophagen oder Entzündungszellen über paravaskuläre Abflusswege aus dem Gehirn zu den Lymphknoten feststellen.

Auch CARARE et al. (2008) versuchten durch Ko-Injektion von LPS eine Makrophagen-Migration entlang paravaskulärer Drainagewege aus dem Gehirn nachzuweisen. Neben lokalen Entzündungen (ANDERSSON et al. 1992) bestand jedoch kein messbarer Abfluss der LPS, woraufhin die Vermutung geäußert wurde, dass Makrophagen oder auch gelöste Substanzen keine paravaskulären Drainagewege aus dem Gehirn nutzen (CARARE et al. 2008).

Perivaskulär lokalisierte Makrophagen im Gehirn sind allerdings in der Lage, Substanzen oder auch versuchsweise injizierte Farbmoleküle aus dem CSF oder der interstitiellen Gehirnflüssigkeit zu phagozytieren. Es bestehen nach CARARE et al. (2008) keine Hinweise darauf, dass diese Zellen des Immunsystems diese Partikel auch aus dem Gehirn eliminieren und weiter in die extrazerebrale Peripherie transportieren können.

So konnten in um Hirngefäße lokalisierten Makrophagen Anteile von fluoreszierenden Tracern gefunden werden, die in die linke Hirnhemisphäre stereotaktisch injiziert wurden. In den perivaskulären Anteilen waren diese bis zu sieben Tage lang nachweisbar. Bei Versuchen mit Indian Ink als Farbtracer konnten sogar Zeiträume von bis zu zwei Jahren verzeichnet werden (ZHANG et al. 1992). Auch neuere Versuche konnten eine Aufnahme von in die Ventrikel injizierten Markern durch gefäßnahe Makrophagen bestätigen, was das mögliche Übertreten des CSF in perivaskuläre Bereiche wahrscheinlicher macht (BECHMANN et al. 2001). In den Versuchen von CARARE et al. (2008), bei denen Mäusen intrazerebral leuchtende Homoglykane gespritzt wurden, konnte 30 Minuten nach der Injektion das fluoreszierende Dextran in als Makrophagen identifizierten Zellen beobachtet werden, die sich um Kapillaren und Arterien herum aufhielten und den Marker phagozytiert hatten. In den interstitiellen Bereichen des Hirngewebes und innerhalb der Basalmembranen von Arterien war ebenfalls Dextran vorhanden, jedoch nicht in den Wänden der Kapillargefäße. Auch nach drei und 24 Stunden konnten neben punktuellen Marker-Partikeln in arteriellen Gefäßwänden z.B. des Cortex noch punktierte Dextran-Ablagerungen im gefäßumgebenden Gewebe gefunden werden (CARARE et al. 2008). Es konnten auch punktförmige Ablagerungen von einem anderen Tracer (Ovalbumin) nach 24 Stunden in Zellen entdeckt werden, die sich sowohl in arteriellen Gefäßwänden des Gehirnparenchyms als auch in den Geweben der Leptomeninge befanden. Durch die enge Gefäß-Beziehung und die Anfärbbarkeit spezieller Makrophagen-Marker konnten diese Zellen schließlich ebenfalls als perivaskuläre Makrophagen identifiziert werden. So konnte CARARE zeigen, dass Marker-Moleküle entweder bereits in der Nähe der Einstichstelle (hier: Striatum) im zerebralen Gewebe phagozytär aufgenommen werden können oder auch vor der Aufnahme durch

Makrophagen das Gehirn über die Blutgefäße der weichen Hirnhaut verlassen haben, um dann phagozytiert zu werden (CARARE et al. 2008).

Makrophagen phagozytierten auch fluoreszierende Mikrosphären 24 Stunden nach erfolgter Injektion. Diese befanden sich perivaskulär zwischen der Außenseite der Gefäßwände und der Basalmembran der Membrana limitans glialis perivascularis, einer von Astrozyten gebildeten Grenzmembran, die die Kapillargefäße umgibt. Die Basalmembranen der Kapillaren und der astrozytären Membran sind physiologischerweise miteinander verbunden sind.

Jedoch verließen die Makrophagen nach CARARE et al. (2008) nicht das Gehirn und brachten die Farbstoff-Partikel nicht in das periphere Gewebe, sodass die um die Blutgefäße lokalisierten Spalten keine Pfade für Teilchen oder auch Zellen wie Makrophagen oder Entzündungszellen andeuten. Stattdessen spielen vermutlich migrierende gelöste Antigene, die das Gehirn verlassen können, eine wichtigere Rolle bezüglich der Privilegierung des hirneigenen Immunsystems (WELLER 1998; GALEA et al. 2007). Nach CARARE et al. (2014) scheint außerdem auch ein rezeptorvermittelter Eintritt von entzündungsauslösenden Zellen in das Gehirn durch die Bluthirnschranke begünstigenden Einfluss auf die cerebralen immunologischen Reaktionen zu haben.

1.4.2 Die Rolle der Astrozyten im „zerebralen Lymphabflusssystem“

ILIFF et al. (2012) fanden heraus, dass der paravaskuläre und interstitiale Abfluss auch transglial durch die Aquaporin-4-Kanäle (AQP4) von Astrozyten unterstützt wird, die so auch den gründlichen Abtransport von Molekülen wie A β unterstützen.

Die überlappend liegenden Endigungen (end feet) der Astrozyten umhüllen nach MATHIISEN et al. (2010) die intrazerebralen Blutgefäße und erstrecken sich nahezu über den gesamten Blutkreislauf im Bereich des hirneigenen Kapillargebietes. Vermutlich besteht deren Aufgabe darin, so den Zugang für Substanzen von größerem Molekulargewicht zum interstitiellen Gewebe zu begrenzen. Der bereits erwähnte paravaskuläre und im Interstitium stattfindende CSF-ISF-Austausch geht über diese, die zerebralen Kapillargebiete einhüllenden, astrozytären Enden (MATHIISEN et al. 2010; ILIFF et al. 2012). Ob ein Tracer, der in den Subarachnoidalraum eingebracht wurde, in das Parenchym des Gehirns einströmen kann, hängt von seinem Molekulargewicht ab (ILIFF et al. 2012). So haben enge, ~20 nm kleine Spalträume zwischen den Astrozytenfortsätzen nach ILIFF et al. (2012) eine siebähnliche Funktion, die nur Partikel bis zu einer Größe von ~20 nm durch die BHS hindurch treten

lassen. Beispielsweise kann Ovalbumin (2-3 nm) durch die BHS gelangen (ILIFF et al. 2012), größeren Molekülen wie dem Dopamin ist dies jedoch unter normalen Bedingungen nicht möglich (GOLDSTEIN et al. 2012).

1.5 Gegenstand und Zielsetzung dieser Arbeit

Im Gegensatz zum übrigen Körper existiert für das Gehirn nach bisherigem Kenntnisstand keine Versorgung mit regulären Lymphgefäßen. Obwohl hierzu bereits vielfach Untersuchungen mit dem Ergebnis eines alternativen Drainagesystems durchgeführt wurden, sind die genauen anatomischen Abflusswege, die der CSF und die ISF verfolgen, noch nicht vollständig erfasst. Die vorliegende Arbeit versucht, der Frage der Anatomie der „zerebralen Lymphabflusswege“ näher zu kommen.

Erstens sollte versucht werden, die Bedeutung einer hirneigenen Lymphdrainage für neurodegenerative Erkrankungen wie z.B. den Morbus Alzheimer zu klären, für dessen Entstehung und Progression unter anderem eine Störung im hirneigenen „Lymphabflusssystem“ vermutet wird. Das Verstehen und Aufdecken dieser Prozesse ist insbesondere auch für die Therapiemöglichkeiten klinisch interessant.

Zum zweiten soll die Vermutung gestützt werden, dass die Drainagewege des Gehirns für das zerebrale Immunsystem eine wichtige Funktion erfüllen, was bei autoimmunen Krankheitsprozessen und für deren Verständnis ebenfalls von großer Bedeutung ist.

Da durch die BHS eigentlich keine hirneigenen Proteine in die Lymphknoten gelangen und dort angezeigt werden können, dürfte es demnach normalerweise keine klassischen Autoimmunerkrankungen des Gehirns geben. Der genaue Mechanismus, wie dennoch eine Antigenpräsentation aus dem Gehirn im peripheren Lymphsystem erfolgen kann und warum es im Gehirn dennoch derartige Krankheitsbilder wie die MS oder die Autoimmun-Hypophysitis gibt, ist nur wenig verstanden und wichtiger Bestandteil der heutigen Forschung.

Drittens beschäftigt sich diese Arbeit damit, ob es anatomisch eine Art „lymphatischen Abflussweg“ aus der Hypophyse, genauer dem Hypophysenvorderlappen (HVL) gibt, und falls vorhanden, ob dieser sich von dem des Gehirns vielleicht in dem Sinne unterscheidet, dass der Abfluss von der Hypophyse wie embryologisch zu erwarten ist, über die Nase erfolgt.

Daneben sollen hier auch potentielle andere Funktionen dieses Systems diskutiert werden, über dessen Drainagewege der CSF, aber auch die ISF des Gehirns abfließen, wie z.B. die Möglichkeit eines schnellen Druckausgleichs im Falle einer Hirndrucksteigerung. Ist dieser zunächst grundsätzlich, und falls ja, überhaupt ausreichend schnell auf diesem Wege möglich?

Abschließend war für uns interessant zu ermitteln, ob es neben den passiven Abflusswegen auch einen zellulären, aktiven Abtransport von gelösten Substanzen aus dem Gehirn zu den Lymphknoten des Halses geben könnte. Neben den Astrozyten, die vermutlich in der Lage sind, den Eintritt verschiedener Substanzen in die zerebralen Blutgefäße zu selektieren, scheinen Makrophagen in der Lage zu sein, phagozytiertes Material aus dem Gehirn hinaus zu transportieren. Diese Arbeit beschäftigt sich auch damit, ob und wie schnell diese Zellen in der Lage sind, zu den zervikalen Lymphknoten zu gelangen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Geräte	
Shandon™ Excelsior™ ES Tissue Processor	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, DE)
Paraffin-Einbettssystem TBS 88	MEDITE GmbH (Burgdorf, DE)
Kühlplatte COP 30	MEDITE GmbH (Burgdorf, DE)
Objektträger-Strecktisch HI1220	Leica Biosystems GmbH (Nussloch, DE)
Mikroskop DM5000 B	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, DE)
Mikroskop Studio C, Nr. 29414	Hertel & Reuss Optik (Kassel, DE)
Bildbearbeitungssoftware Leica Application Suite (LAS Core)	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, DE)
Schlittenmikrotom Leica SM 2000R	Leica Biosystems GmbH (Nussloch, DE)
Wärmeschrank UNE 550 PA	MEMMERT GmbH & Co.KG (Schwabach, DE)
Kurzzeitmesser TR 118	GSG Geologie-Service GmbH (Oregon Scientific-Produkte) (Würzburg, DE)
Färberahmen, No. 2481	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG - "Assistent" (Sondheim/Rhön, DE)
Färbekästen mit Falzdeckel, No. 2480	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG - "Assistent" (Sondheim/Rhön, DE)
Rührstab, beiderseits verschmolzen, 150 x 5 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG - "Assistent" (Sondheim/Rhön, DE)
Drahtbügel zum Einsetzen des Färberahmens, No. 2482	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG - "Assistent" (Sondheim/Rhön, DE)
DUROPLAN® Petrischale, 80 x 20 mm	DURAN Group GmbH (Mainz, DE)
DUROPLAN® Petrischale, 100 x 20 mm	DURAN Group GmbH (Mainz, DE)
Sterioplan® Petrischale, 200 x 45 mm	DURAN Group GmbH (Mainz, DE)
Erlenmeyer-Kolben, weithalsig, DURAN®, Schott (200 ml)	DURAN Group GmbH (Mainz, DE)
Pinzette für Deckgläser 18/8 Stahl, gebogen	Bochem Instrumente GmbH (Weilburg, DE)
Präpariernadel, 18/10 Stahl, Typ 2 gebogen	Bochem Instrumente GmbH (Weilburg, DE)
Verbrauchsmaterialien und spezielles Material	
Stereotaxie-Instrument, Modell 900	David Kopf Instruments (Tujunga (CA), USA)
Diamantbohrer (Kopf-Ø 0,7 mm, Schaft-Länge 70 mm, Art.-Nr. 2851)	Nouvag USA Inc. (Lake Hughes (CA), USA)
30 Gauge Hamilton-Nadel	Hamilton Company (Reno (NV), USA)
Hamilton-Mikroliter-Spritze	Hamilton Company (Reno (NV), USA)
Microtome Blades Stainless Steel A35 „Superior“	FEATHER Safety Razor Co. (Osaka, JPN)
Adhäsions-Objektträger SuperFrost® Plus (25 x 75 x 1,0 mm, weiß)	Gerhard Menzel GmbH (Braunschweig, DE)
MENZEL-Deckgläser, 24 x 24 mm	Gerhard Menzel GmbH (Braunschweig, DE)
MENZEL-Deckgläser, 24 x 36 mm	Gerhard Menzel GmbH (Braunschweig, DE)

MENZEL-Deckgläser, 24 x 48 mm	Gerhard Menzel GmbH (Braunschweig, DE)
MENZEL-Deckgläser, 24 x 60 mm	Gerhard Menzel GmbH (Braunschweig, DE)
Objektträgerkasten aus Holz, Typ 100	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH (Würzburg, DE)
Whatman™ 597 Filter Paper Circles (Diameter 240 mm)	GE Healthcare Life Sciences Europe GmbH (Freiburg, DE)
Lyra PRO NATURA Office 2511 Bleistift Härte: B 1340101	Johann Froescheis Lyra-Bleistift-Fabrik GmbH & Co. KG (Nürnberg, DE)
Labormarker	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda Königshofen, DE)
Pinsel Meisterklasse S 55 Gr. 4	Pelikan Vertriebsgesellschaft mbH & Co. KG (Hannover, DE)
Pinsel Meisterklasse S 55 Gr. 5	Pelikan Vertriebsgesellschaft mbH & Co. KG (Hannover, DE)
Zellstofftupfer, 4 x 5 cm	Fuhrmann GmbH (Much, DE)
Untersuchungshandschuhe Nitril® NextGen® (puderfrei, unsteril), S (6 - 6,5)	Rösner-Mautby Meditrade GmbH (Kiefersfelden, DE)
Chemikalien und Reagenzien	
Indian Ink	Becton, Dickinson and Company (BD), (New Jersey (NJ), USA)
Formaldehydlösung 4%	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Mayers Hämalalaunlösung für die Mikroskopie	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Eosin G (gelblich) für die Mikroskopie	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
EMSURE® Essigsäure (Eisessig) 100%	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
EMPROVE® Salzsäure (HCl) 25%	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
HCl-Alkohol	Siehe 2.3.8.1 (Lösungs-Ansätze)
Aqua dest.	Durch die Universitätsklinik vorgehalten
Xylol	Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, NL)
Isoxylol	Siehe 2.3.8.1 (Lösungs-Ansätze)
Isopropylalkohol High Purity	CVH Chemie-Vetrieb GmbH & Co. Hannover KG (Hannover, DE)
Schnellentkalker new decalc®	MEDITE GmbH (Burgdorf, DE)
DePeX Einbettmedium für Histologie	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, DE)
2,2,2-Tribromethanol (Avertin)	Sigma-Aldrich (St. Louis (MO), USA)

Tab. 1: Übersicht der Materialien, Chemikalien und Reagenzien

2.2 Tierversuch

Alle Tierversuche wurden in der Abteilung für Immunologie und Pathologie der Johns Hopkins University (Direktor: Prof. Dr. Noel Rose) durchgeführt. Diese wurden im Rahmen des NIH-Grants (an Prof. P. Caturegli) unter der Nummer DK08351 genehmigt. Die Versuche wurden in allen Anteilen von PD Dr. med. Angelika Gutenberg im Jahre 2007 durchgeführt.

2.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden insgesamt 36 Mäuse aus institutsinterner Zucht im Alter von 6 Wochen bis 12 Monaten verwendet. Hierbei wurden gezielt Mäuse unterschiedlichster Zuchtstämme (SJL/J, CBA und C57BL6) eingeschlossen.

2.2.2 Gruppenbildung

Zum Vergleich der Lymphabflusswege aus Gehirn, Hypophyse und Nase wurden 3 Gruppen an Tieren gebildet, welche für die unterschiedlichen Injektionsorte des Farbstoffes Indian Ink vorgesehen waren.

Injektionsort	Anzahl Tiere gesamt	2 Minuten	5 Minuten	10 Minuten	20 Minuten	30 Minuten
Nase	2	-	1	1	-	-
CSF	19	1	6	5	7	-
Hypophyse	15	-	2	4	4	5

Tab. 2: Übersicht über die verschiedenen Tiergruppen

2.2.3 Versuchsanordnung und Durchführung

Alle Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 2,2,2-Tribromoethanol (Avertin) (100 µl/10g Körpergewicht) anästhesiert. Die Überprüfung der adäquaten Narkosetiefe erfolgte anhand der Auslösbarkeit des Fluchtreflexes nach Induktion eines Schmerzreizes an der Fußsohle.

Für intrakranielle (intraventrikuläre und intrahypophyseale) Injektionen erfolgte die Positionierung der Tiere im Stereotaxie-Instrument (David Kopf Instruments, Modell 900, Tujunga, USA). Mit einem Skalpell erfolgte die Inzision der Kopfhaut in der Mittellinie. Die darunter liegende Faszie und das Perikranium wurden mit einem Skalpell und einer feinen Pinzette freipräpariert. Die Kalotte wurde mit einem sterilen Tupfer getrocknet, um die Schädelnähte rechtsseitig besser sichtbar zu machen. Sagittalnaht, Bregma und Lambda dienten als Orientierungspunkte. Die Position des Schädels wurde adjustiert, so dass sich Bregma und Lambda auf der gleichen horizontalen Ebene befanden. Die Trepanation wurde mit einem im Stereotaxie-Instrument geführtem 0,7-mm-Diamantbohrer durchgeführt. Die Applikation des Farbstoffs erfolgte mittels einer stereotaktisch geführten 30 Gauge Hamilton-Nadel und Hamilton-Mikroliter-Spritze (Hamilton Company, Reno, USA). Für die intraventrikuläre Injektion diente als Zielpunkt das rechte Vorderhorn des Seitenventrikels. Hierfür wurden folgende Stereotaxie-Koordinaten verwandt: 1 mm rechts lateral und 1 mm dorsal des Bregmas, 1,8 mm Tiefe ab Duraniveau.

Für die intrahypophyseale Injektion diente als Zielpunkt die rechte Seite des Hypophysenvorderlappens. Hierfür wurden die folgenden Stereotaxie-Koordinaten verwandt: 1,3 mm dorsal und 0,2 mm rechts lateral des Bregmas, 6,3-6,5 mm Tiefe ab Duraniveau.

Für die intranasale Injektion wurden die Tiere auf dem Rücken platziert und der Farbstoff vorsichtig frei Hand in den hintersten erreichbaren Teil der Nasenschleimhaut über das rechte Nasenloch appliziert.

Als Farbstoff zur Injektion wurde der schwarze Farbstoff Indian-Ink (BD, USA) unverdünnt verwendet.

Nach Erreichen der Zielpunkte für die Farbstoff-Injektionen wurden in die Nasenschleimhaut und in den rechten Seitenventrikel insgesamt 5 µl Farbstoff, in die Hypophyse insgesamt 2 µl Farbstoff über die Mikroliter-Spritze manuell langsam über 1 Minute infiltriert. Die Kanüle wurde hiernach für eine weitere Minute am Zielort belassen und anschließend langsam zurückgezogen.

Die Euthanasie der Mäuse erfolgte bei allen Tieren über eine Eröffnung des rechten Vorhofs nach 2, 5, 10, 20 oder 30 Minuten.

2.3 Gewebeaufbereitung und Präparateherstellung

2.3.1 Entnahme des Gewebes

Bei allen Tieren wurden sofortig nach Euthanasie neben dem Hirngewebe und der Hypophyse auch die Nase sowie die Halsweichteile inklusive der zervikalen Lymphknoten entnommen und in 4%igem Formalin über 24 Stunden fixiert.

2.3.2 Einbetten des Gewebes

Das in Formalin fixierte Gewebe wurde vorsichtig in Kassetten verbracht und in Paraffinwachs eingebettet. Dabei wurde auf die Entkalkung des Gewebes bewusst verzichtet, um ein Auswaschen des Farbstoffes aus den verschiedenen Gewebeanteilen zu vermeiden.

2.3.3 Entkalken knochenhaltigen Gewebes

Bevor die Knochengewebe enthaltenden Blöcke gekühlt und geschnitten werden konnten, mussten die Präparate manuell entkalkt werden. Dazu wurde in eine kleine Petrischale (DUROPLAN® Petrischale 80 x 20 mm, DURAN Group GmbH) etwas Schnellentkalker (new decalc®, MEDITE GmbH) gefüllt, sodass der Boden der Petrischale bedeckt war. Anschließend wurden die entsprechenden Blöcke mit der Schnittseite nach unten nacheinander für ca. 10-15 Minuten Einwirkzeit in den Schnellentkalker gelegt. Die Dauer richtete sich dabei auch nach dem erkennbaren Knochengehalt der Gewebeprobe. Dadurch konnte der Knochen in der oberflächlichen Schicht angelöst werden und aus dem nun schneidbaren Gewebe konnten intakte Paraffinschnitte gewonnen werden. Nach dem Entkalkungsvorgang wurde analog zu den knochenfreien Blöcken verfahren, indem die Blöcke auf einer Kühlplatte gekühlt und anschließend geschnitten wurden, bis die nächste kalkhaltige Schicht des Gewebes erreicht wurde und keine brauchbaren Gewebeschnitte mehr gewonnen werden konnten. Darauf folgte eine erneute Vorbereitung mit dem Entkalken in der Petrischale, einem Kühlvorgang und dem erneuten Anfertigen von Schnitten. Dieser aufwendige und zeitintensive Vorgang wiederholte sich solange, bis die jeweiligen Gewebeproben vollständig in jeweils eine Schnittserie zerlegt waren. Dabei konnten pro Schneideprozess jeweils vier bis fünf intakte Schnitte des jeweiligen Gewebes gewonnen werden.

2.3.4 Kühlen des Gewebes

Die fertigen mit den Einbettkapseln verbundenen Paraffinblöcke wurden zunächst für ca. fünf Minuten mit der Wachsseite nach unten auf eine Kühlplatte gelegt. Das ungekühlte Paraffin konnte mit dem Mikrotom nicht gut und insbesondere nicht ausreichend dünn geschnitten werden. Durch den Kühlvorgang drang oberflächlich Wasser in das fixierte Gewebe ein, sodass dieses etwas aufquoll und sich anschließend besser schneiden ließ. Zu langes Kühlen sollte jedoch vermieden werden, da hierdurch Risse in der oberen Paraffinschicht entstehen können und sich das Gewebe vom Einbettmaterial lösen kann. Das Schneiden von vollständigen Gewebeschnitten kann hierdurch erschwert oder auch unmöglich werden, sodass daraufhin der entsprechende Block erneut eingeschmolzen und eingebettet werden müsste, bevor er wieder weiter bearbeitet werden könnte.

2.3.5 Schneiden des Gewebes

2.3.5.1 Schlittenmikrotom

Um ausreichend dünne, lichtmikroskopische Schnitte herstellen zu können, sind spezielle Schneideapparate erforderlich. Schlittenmikrotome erlauben feine Schnittdicken und Serienschnitte bei gleichmäßigen Schnitttiefen von 0,5-60 μm .

Da die gewünschte Schnittdicke hier 7 μm betrug, wurden die Paraffin-Blöcke hierfür alle mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms vom Typ Leica SM 2000R (Leica Biosystems GmbH) geschnitten. Der Block wurde in das Mikrotom über einen Blockträger eingespannt. Die Mikrotomklinge (Microtome Blades Stainless Steel A35 „Superior“, FEATHER Safety Razor Co.) befand sich in einem auf Schienen gleitenden Schlitten, mit dem sie über den Block gleiten und die Schnitte abtrennen konnte. Durch das automatische Anpassen der Blockhöhe nach jedem Schnitt wurde die gleichbleibende Schichtstärke der Paraffinschnitte sichergestellt.

2.3.5.2 Vorgehensweise

Nachdem ein Block ausreichend gekühlt war, wurde er in das Mikrotom eingespannt und in allen Richtungen des Raumes ausgerichtet, sodass sich die Schneide des Mikrotommessers gleichmäßig über den Paraffinblock bewegen konnte. Anschließend wurde mit der Klinge die Oberfläche des Blockes geglättet, damit diese überall und gleichmäßig über den Block gleiten

konnte. Daraufhin wurden Gewebeschnitte mit einer einheitlichen Schnitttiefe von 7 µm angefertigt, von denen jeder dritte Schnitt in einer großen, mit kaltem Wasser gefüllten Petrischale (Steriplan® 200 x 45 mm, DURAN Group GmbH) aufgefangen wurde. Da in den meisten Gewebeproben knöcherne Strukturen vorhanden waren, konnte die Schnittdicke nicht dünner gewählt werden. Durch die harten, kalkhaltigen Gewebsanteile wären die Gewebeschnitte ansonsten (trotz manueller Entkalkung) während des Schneidevorgangs zerrissen. Um die ausgewählten Schnitte unbeschädigt in die Schale einbringen zu können, wurden diese mit zwei Pinseln der Größen 4 und 5 (Meisterklasse S55, Pelikan Vertriebsgesellschaft GmbH & Co. KG) vorsichtig von der Messerschneide abgenommen und auf der Wasseroberfläche abgelegt und langsam entfaltet. Die übrigen Paraffinschnitte wurden verworfen. Nach dem Schneiden von ca. 10-12 Schnitten wurde der Paraffinblock durch die Bearbeitung schließlich zu warm und daraufhin erneut gekühlt. Durch das parallele Kühlen und Schneiden mehrerer Blöcke konnte die Wartezeit während des Kühlens effektiv genutzt werden. Alle Blöcke wurden komplett geschnitten, um den gesamten Verlauf des im Gewebe vermuteten Farbstoffes beim späteren Mikroskopieren und Auswerten verfolgen zu können.

2.3.6 Anfertigen der Präparate (Strecken und Aufziehen)

Durch den Schneidevorgang waren die Gewebeschnitte gestaucht. Um einen möglichst gleichmäßigen und überlagerungsfreien Schnitt zu erhalten, mussten die im Wasser der Petrischale schwimmenden Schnitte zunächst auf einen vorher beschrifteten Objektträger (Adhäsions-Objektträger SuperFrost® Plus, Gerhard Menzel GmbH) mit Hilfe eines Pinsels der Größe 4 aufgezogen werden. Die Beschriftung der Objektträger enthielt dabei die Angaben zur Block-Nr., zur Jahreszahl, zur Objektträger-Nr. und die Art der Färbung; z.B.: „1 07/09, III HE“. Anschließend wurden sie an diesem klebend schräg in eine mit 60 °C warmem Wasser gefüllten Petrischale (DUROPLAN® Petrischale 100 x 20 mm, DURAN Group GmbH) auf dem Objektträger-Strecktisch (HI1220, Leica Biosystems GmbH) hineingehalten, in dieser erwärmt und langsam gestreckt. Danach wurde das überschüssige Wasser von Objektträger und Schnitt mit Hilfe von feuchtem Filterpapier (Whatman™ 597 Filter Paper Circles, GE Healthcare Life Sciences Europe GmbH) durch vorsichtiges Abtupfen entfernt und der Objektträger kurz auf die Wärmeplatte zum Fixieren des Schnittes gehalten. Auf die Objektträger wurden jeweils je nach Präparatgröße drei bis vier Paraffinschnitte des entsprechenden Präparates aufgezogen und diese anschließend in einen Färberahmen

(Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG - "Assistent") einsortiert, der maximal 19 Objektträger fasste. Sobald ein Färberahmen vollständig besetzt war, wurde dieser in einen Paraffinschrank (UNE 550 PA, MEMMERT GmbH & Co.KG) bei 60 °C für 10-15 Minuten zum Abschmelzen und Lösen des Paraffins von den Objektträgern gestellt, da dieses für den nachfolgenden Färbeprozess entfernt werden musste.

2.3.7 Färben der Präparate

2.3.7.1 Die HE-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine in der Routinediagnostik etablierte Färbemethode, die eine gute Übersicht aller erkennbaren Strukturen ermöglicht. Das Hämatoxylin existiert natürlicherweise im Blauholzbaum. Um es als Farbstoff verwenden zu können, muss es jedoch zunächst zu Hämalun verarbeitet werden. Die dann entstandene Lösung färbt alle basophilen Strukturen blau, insbesondere die Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure (DNA) und auch die Ribonukleinsäure (RNA) der Ribosomen auf dem endoplasmatischen Retikulum. Auch Knorpel und Knochen färben sich blau an.

Das Eosin ist eine rote, synthetische Färbelösung, die alle acidophilen Strukturen rötlich anfärbt. Dies sind vor allem die Proteine des Zellplasmas, aber auch Muskelfilamente und die Erythrozyten, die eine rot-orange Farbe annehmen.

Für die HE-Färbung der Präparate wurde für jeden Färberahmen nach folgendem Schema vorgegangen:

Färbeprotokoll		
Entparaffinieren	Xylol	5 Minuten
	Xylol	5 Minuten
	Xylol	5 Minuten
	Xylol	5 Minuten
	Isoxylol	1 Minute
Wässerung in absteigender Alkoholreihe	100 % Isopropylalkohol	4 Minuten
	100 % Isopropylalkohol	4 Minuten
	90 % Isopropylalkohol	3 Minuten
	70 % Isopropylalkohol	3 Minuten
	50 % Isopropylalkohol	3 Minuten
Spülen	Aqua dest.	
Färben	Mayers Hämalan (MERCK)	5 Minuten
Spülen	Aqua dest.	
Differenzieren	1% HCl-Alkohol	3 Sekunden
Bläuen/Wässern	Leitungswasser	10 Minuten
Gegenfärben	1% Eosin	5 Minuten
Spülen	Aqua dest.	
Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe	50 % Isopropylalkohol	3 Sekunden
	70 % Isopropylalkohol	3 Sekunden
	90 % Isopropylalkohol	3 Sekunden
	100 % Isopropylalkohol	3 Minuten
	100 % Isopropylalkohol	3 Minuten
	Isoxylol	3 Minuten
	Xylol	3 Minuten
	Xylol	3 Minuten
	Xylol	3 Minuten
	Xylol	3 Minuten
Eindecken der Schnitte mit DePeX		

Tab. 3: Färbeschema aus dem Institut für Neuropathologie, Universitätsmedizin Göttingen

Bei Mayers Hämalan (Merck KGaA) handelte es sich bereits um eine gebrauchsfertige Lösung. Für die Gegenfärbung mit Eosin G (Merck KGaA) musste die entsprechende Farblösung erst angesetzt werden, ebenso für die weiteren Bestandteile HCl-Alkohol, Isoxylol und Isopropylalkohol (CVH Chemie-Vetrieb GmbH & Co. Hannover KG).

Lösungs-Ansätze

1% Eosin:

100 g Eosin wurden mit 1000 ml 70%igem Isopropylalkohol angesetzt und gelöst. Anschließend musste die hergestellte Lösung filtriert werden. Vor Gebrauch wurde diese dann noch mit 2-3 Tropfen Essigsäure 100% (Merck KGaA) angesäuert. Das Ansäuern dient dabei der Kontrastverstärkung, da die Färbung sonst zu blass würde.

1% HCl-Alkohol:

Für den HCl-Alkohol mussten 1750 ml reiner Isopropylalkohol, 750 ml Aqua dest. und 25 ml Salzsäure 25% (Merck KGaA) angesetzt werden.

Isoxylol:

100 ml Xylol (Mallinckrodt Baker B.V.) wurden mit 100 ml Isopropylalkohol zu 200 ml Isoxylol gemischt. Dieses Volumen war jeweils für einen Färbekasten ausreichend.

Isopropylalkohol:

Für die prozentual verschieden zusammengesetzten Isopropyl-Lösungen musste Isopropylalkohol (CVH Chemie-Vetrieb GmbH & Co. Hannover KG) mit Wasser angesetzt werden, um Isopropylalkohol-Bäder der verschiedenen Konzentrationen zu erhalten. Beispielsweise wurden für eine 90%ige Isopropyl-Lösung Isopropylalkohol mit Wasser im Verhältnis 9:1 gemischt. Für die HE-Färbung waren für die auf- und die absteigende Alkoholreihe 50%ige, 70%ige, 90%ige und 100%ige Lösungen erforderlich.

2.3.7.2 Durchführung der HE-Färbung

Nachdem die mit den Schnitten versehenen Objektträger nach 10-15 Minuten im Wärmeschrank abgeschmolzen waren, wurden die Färberahmen in die Färbereihe für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung gestellt. Ein Färbevorgang dauerte hierbei pro Färberahmen etwa 75-80 Minuten.

Die Färbung erfolgte bei Raumtemperatur. Zu Beginn der Färbereihe wurden die Schnitte mit ihrem Färberahmen zum weiteren Entparaffinieren in Xylol gewaschen, um die nach dem Abschmelzen verbliebenen Paraffinreste auf den Objektträgern zu entfernen. Das Xylol befand sich in vier Färbekästen (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG - "Assistent"), in

denen die Färberahmen (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG - "Assistent") für jeweils 5 Minuten gespült wurden. Nach erfolgter Entparaffinierung wurden die Proben anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100% Isopropylalkohol, 100% Isopropylalkohol für jeweils 4 Minuten, 90% Isopropylalkohol, 70% Isopropylalkohol und 50% Isopropylalkohol für jeweils 3 Minuten) gewässert und für die folgenden Färbelösungen vorbereitet. Es folgte das Spülen in Aqua dest. und der erste Teil des Färbens mit Mayers Hämaunlösung für 5 Minuten. Danach folgte eine erneute Spülung in Aqua dest., bevor die Schnitte für 3 Sekunden in 1% HCl-Alkohol differenziert wurden, um überschüssiges Hämaun zu entfernen. Das nachfolgende Bläuen erfolgte für 10 Minuten in Leitungswasser, um den typischen blauen Farbton zu erzielen und zu fixieren. Daran schloss sich die Gegenfärbung der Proben mit 1% Eosin und nachfolgender erneuter Spülung in Aqua dest. zur Entfernung von Farbüberschüssen an. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe wurde dann das Gewebe der Schnitte wieder entwässert. Dies geschah zunächst schnell jeweils für 3 Sekunden in den Schritten 50% Isopropylalkohol, 70% Isopropylalkohol und 90% Isopropylalkohol, bevor die Färberahmen dann für jeweils 3 Minuten im 100% Isopropylalkohol verblieben. Abschließend folgte das Klären in vier mit Xylol gefüllten Färberahmen für je 3 Minuten. Mit diesem letzten Schritt war der Färbeprozess abgeschlossen und die Schnitte waren für die Konservierung vorbereitet.

2.3.8 Konservieren der Präparate

Nach erfolgter HE-Färbung mussten die Objektträger zur dauerhaften Erhaltung abschließend mit einem Eindeckmedium fixiert werden. Hierfür wurde unter einem Abzug gearbeitet und die einzudeckenden Objektträger mit einer Pinzette (Bochem Instrumente GmbH) aus dem Xylol-haltigen Färberahmen entnommen. Xylol-Überschüsse wurden mittels Zellstofftupfern (Fuhrmann GmbH) vorsichtig entfernt und die Objektträger danach auf ein Filterpapier gelegt. Anschließend wurden dann die Deckgläser (Gerhard Menzel GmbH) mit Hilfe eines Rührstabes aus Glas mit etwas DePeX Eindeckmittel (SERVA Electrophoresis GmbH) bestrichen. Es handelt sich bei DePeX um ein Einschlußharz auf Kunstharzbasis. Die Größenauswahl (24 x 24 mm, 24 x 36 mm, 24 x 48 mm oder 24 x 60 mm) der Deckgläschen erfolgte dabei je nach Ausdehnung der Schnitte auf dem Objektträger. Das präparierte Deckglas wurde nun mit einer Seite schräg auf den noch feuchten Objektträger angelegt und dann langsam auf das Gewebe aufgelegt. Durch das schräge Auflegen konnte die Luft zwischen dem gefärbten Schnitt und dem Deckglas entweichen und Lufteinschlüsse wurden

weitestgehend vermieden. Traten dennoch kleine Luftblasen unter dem Deckglas auf, konnte mit einer Präpariernadel (Bochem Instrumente GmbH) die überschüssige Luft unter dem Deckglas zu den Rändern des Objektträgers noch herausgedrückt und entfernt werden. Je nach Größe hätten Luftansammlungen auf dem Gewebe ansonsten die Beurteilung erschwert bzw. diese verhindert. Das entsprechende Präparat war danach luftdicht und dauerhaft/beständig auf dem Objektträger fixiert.

2.4 Auswertung der Präparate

Die Auswertung der Schnitte erfolgte am Mikroskop (Studio C, Nr. 29414, Hertel und Reuss Optik) aufsteigend in den Vergrößerungen 5:1, 10:1, 45:1 und 100:1. Jeder Gewebeblock umfasste nach dem abgeschlossenen Vorgang der Präparateherstellung unterschiedlich viele Objektträger, da die Paraffinproben vorher unterschiedlich viel Gewebe enthielten. Insgesamt entstanden aus den 101 Gewebeproben 2893 Objektträger, die meistens jeweils drei Schnitte enthielten. Manchmal fasste ein Objektträger aber bei besonders großen Gewebeproben nur zwei, bei besonders kleinen Gewebeanteilen auch bis zu vier Schnitte. Die vollständig gefärbten Objektträger mit den Serienschnitten wurden blockweise untersucht. Es wurde anfangs von den Objektträgern, die einem Block zuzuordnen waren, jeder dritte Schnitt von der kleinsten bis zu größten Vergrößerung begutachtet. Dabei wurden die verschiedenen Gewebe- und Organanteile durchgemustert und das Auftreten von Farbstoff tabellarisch dokumentiert. Es wurden folgende Strukturen je nach Anschnitt und Auftreten auf das Vorhandensein von Färbemittel untersucht:

- das Großhirn
- das Cerebellum
- das gesamte Ventrikelsystem mit dem Liquor cerebrospinalis
- die Adeno- und Neurohypophyse
- das Stammhirn und Rückenmark
- die Spinalnerven
- der Bulbus olfactorius und dessen Verbindung zur Nase
- die Mukosa der Nase mit den Nasenmuscheln
- der N. opticus
- die Gl. lacrimalis
- das Auge

- die superfiziellen zervikalen Lymphknoten
- die tiefen zervikalen Lymphknoten
- das Bindegewebe
- die Muskulatur des Halses und Kopfes
- die Vagina carotica
- Drüsengewebe der Speicheldrüsen
- das braune und weiße Fettgewebe
- die Gl. thyroidea
- die Eingeweide des Halses mit Trachea und Ösophagus
- freie Zellen (Makrophagen) und Lymphgefäße in der Peripherie

Nicht alle der genannten Gewebe waren in jedem Präparatblock bzw. Schnitt vorhanden. Der Farbstoff konnte in den verschiedenen Gewebeanteilen in unterschiedlicher Quantität gefunden werden, z.B. im Liquor cerebrospinalis oder auch in den Gefäßwänden von Arterien und Venen, die vor allem an der basalen Konvexität des Gehirns, aber auch in der Nähe des Ventrikelsystems im Gehirnparenchym erschienen. Der Farbstoff erschien hierbei ungebunden intraventrikulär oder intravasal, aber auch bereits in phagozytierter Form in den Halsweichteilen.

2.5 Erstellen der Präparatbilder

Für die Präparataufnahmen wurden die entsprechenden Objektträger unter dem Mikroskop (DM5000 B, Leica Microsystems GmbH) in verschiedenen Vergrößerungen eingestellt (1x1,6; 1x2,5; 1x5; 1x10; 1x20; 1x40) und die Bilder anschließend mit Hilfe eines am Mikroskop angeschlossenen Computers angefertigt. Mit einer Bildbearbeitungssoftware (Leica Application Suite (LAS Core), Leica Microsystems GmbH) konnten die aufgenommenen Fotografien am Bildschirm begutachtet und digital gespeichert werden.

2.6 Anatomische Zuordnung

Die anatomische Zuordnung der verschiedenen Hirnareale und Organanschnitte in den mikroskopischen Schnitten erfolgte mit Hilfe des „Atlas of the Developing Mouse Brain“ (PAXINOS et al. 2006).

3. Ergebnisse

3.1 Score zur Bestimmung der Farbstoffintensität

Score-Grad	Farbstoffintensität	Mikroskopischer Eindruck (schematisch)
1	Vereinzelte Farbstoff-Punkte	
2	Punkte und kleinere, flächige Farbstoff-Flecken	• • • • •
3	Große zusammenhängende Farbstoff-Flächen und -Linien	

Tab. 4: Einteilung der Score-Grade

3.2 Auswertung der Präparate

Die Auswertung der Mäuse beinhaltete 101 Präparat-Blöcke, wobei den Versuchstieren jeweils verschiedene und unterschiedlich viele Gewebe entnommen wurden. Insgesamt waren 76 Blöcke auswertbar, die 36 Mäusen zugeordnet werden konnten.

Den Tieren wurde an drei verschiedenen Injektionsorten (CSF, Nase und Hypophyse) der Farbstoff (FS) injiziert. Die Mäuse wurden in Gruppen eingeteilt und nach verschiedenen Zeitintervallen euthanasiert. Die Zeitintervalle umfassten 2, 5, 10 und 20 Min. beim Injektionsort „CSF“, 5 und 10 Minuten beim Injektionsort „Nase“ und 5, 10, 20 und 30 Min. beim Injektionsort „Hypophyse“.

3.2.1 Versuchsgruppe Nase

3.2.1.1 Injektionsort Nase: 5 Minuten

Im Gewebe der tiefen und superfizialen Lymphknoten der Maus konnte zum Zeitpunkt 5 Minuten nach der Injektion weder am Lymphknotenrand (subkapsulär) noch in zentraler Richtung in den Marksinus FS gefunden werden (Abb. 3 A10). Die Beurteilung war teilweise besonders an den Rändern der Lymphknoten durch die meist intensive dunkelviolette Färbung jedoch erschwert.

Im Bindegewebe um die submandibulären Halslymphknoten und selten auch um und zwischen den Bindegewebssepten des Muskelgewebes waren stellenweise freie, artifizielle FS-Partikel und vereinzelt auch Zellen mit phagozytiertem FS zu erkennen (Score 1-2, Abb. 3 A6). Bei diesen Zellen handelt es sich um Makrophagen, die die phagozytierten Partikel in die Lymphknoten transportierten und vorwiegend im Bindegewebe um die submandibulären Lymphknoten und teilweise auch neben Speicheldrüsenanteilen und superfizialen, zervikalen Lymphknoten zu sehen waren (Abb. 3 A5 und A8). Dabei war der FS wie ein Saum um den Zellkern dieser Zellen angelegt, die außerdem auch vereinzelt im Bindegewebe der nasalen Mukosa beobachtet werden konnten.

In der Nase (Übersicht siehe Abb. 3 A1) trat insbesondere im Bereich des Naseneinganges viel freier FS auf (Score 3), der zum Teil weiter bis in den Larynx gelangt war. Dieser befand sich extrazellulär im Lumen und nicht im nasalen Schleimhautgewebe. Daneben waren im anterioren Teil der Nase teilweise auch FS-Spuren im Bindegewebe und oberflächlich in der nasalen Mukosa zu sehen. Vereinzelt zog der FS auch tiefer in die nasale Schleimhaut hinein (Score 1-2). Im posterioren Nasenanteil war schließlich der FS nur dünn und linienartig aufgelagert an der Mukosa-Oberfläche zu beobachten (Score 1). Das knorpelige Nasenskelett hatte dabei keinen FS aufgenommen oder an den Knorpelgrenzen angelagert, der FS befand sich vereinzelt zwischen dem Nasenknorpel und der Mukosa (Abb. 3 A3 und A4). Am Bulbus olfactorius befand sich ebenfalls kein FS.

Die Gewebeanschnitte des Ventrikelsystems waren größtenteils zerrissen, unvollständig und aufgrund dessen kaum zuzuordnen und auszuwerten. Jedoch war in den angeschnittenen Gewebeanteilen kein FS, weder extrazellulär noch zellulär, zu identifizieren.

Manchmal waren FS-Spuren an den Zungenpapillen sowie am harten Gaumen der Maus zu erkennen. Diese lagen den Papillen (vorwiegend Papillae filiformes) oberflächlich auf. Sie stellten somit eher Artefakte dar, die dadurch bedingt waren, dass der FS in die Nase injiziert wurde und dieser dann in die Maulhöhle der Maus und so auch an die Zungenoberfläche gelangen konnte.

Einmal trat etwas FS im Zentralkanal des Rückenmarks auf, was allerdings eher als Artefakt zu werten ist.

In folgenden Geweben wurden keine FS-Spuren, außer gelegentlichen Artefakten, beobachtet: in Gewebeanteilen des Groß- und Kleinhirns, in Anteilen des Ventrikelsystems, im Rückenmark und Stammhirn, im Ösophagus, im Knorpel- und Knochengewebe des Schädels und der Halswirbelsäule, im Muskelgewebe des Halses selbst, im Drüsengewebe, in peripheren Gefäßstraßen (Lymph- und Blutgefäße), in Anteilen des Bulbus olfactorius und im

Grafik 1: Auftreten des Farbstoffes 5 Minuten nach der FS-Injektion in die Nase.

Freier, nicht zellulär gebundener FS fand sich nur in der Nasenhöhle und in der oberflächlichen nasalen Mukosa (rosa). Zellulär gebundener FS war im Bindegewebe um die submandibulären und oberflächlichen Halslymphknoten sowie um Anteile der Speicheldrüsen (Gl. parotis) zu beobachten (hellblaue Punkte).

Augenbereich. In manchen Schnitten fielen Artefakte auf verschiedenen Geweben während des Mikroskopierens auf. Daneben konnten auch FS-Partikel an den Schnittändern beobachtet werden.

3.2.1.2 Injektionsort Nase: 10 Minuten

Die tiefen Halslymphknoten wiesen keine FS-Partikel oder phagozytierenden Makrophagen innerhalb ihres Gewebes auf. Die Randbereiche der submandibulären und superfizialen Halslymphknoten waren vereinzelt aufgrund von Zellüberlagerungen der Lymphozyten und die teilweise sehr dunkle Hämalaun-Färbung in diesen Arealen schwer zu beurteilen. Selten konnten nun aber freier FS und einige FS-enthaltende Makrophagen zwischen den Lymphozyten im Lymphknotenrand beobachtet werden, die nach 5 Minuten dort noch nicht zu detektieren waren. Das Bindegewebe um die tiefen und oberflächlichen zervikalen Lymphknoten zeigte weiterhin nur wenige zelluläre, den FS phagozytierenden Makrophagen.

Im Bindegewebe um das Speicheldrüsengewebe in einem Block befanden sich ab und zu Makrophagen mit aufgenommenem FS, in der Drüse selbst waren diese Zellen aber nicht zu erkennen (Abb. 3 A7).

Im Bindegewebe waren vereinzelt freie FS-Partikel und Makrophagen mit phagozytierten FS-Partikeln zu sehen. Generell konnten in allen Blöcken gelegentlich FS-Partikel frei und zellulär gebunden in den Bindegewebssepten zwischen Gewebeanteilen wie der Muskulatur und dem Fettgewebe gefunden werden.

Injektionsbedingt befand sich viel freier FS im Lumen (Score 3) der Nasenhöhle an den anterioren, lateralen und posterioren Anteilen der Nasenschleimhaut sowie auch im Lumen des Larynx (Abb. 3 A2). Ansonsten lag der FS vielfach wie auch nach 5 Minuten nur auf der obersten Gewebeschicht der nasalen Mukosa punkt- und linienartig auf. Dabei war die Ausdehnung des FS auf die Nasenhöhle und die Nasengänge beschränkt und der meiste FS befand sich frei im Lumen und teilweise an den Flimmerhärchen des respiratorischen Epithels. In den tieferen Gewebeschichten der Mukosa war dieser nur selten zu finden (Score 1-2). Dort war der FS von Makrophagen intrazellulär aufgenommen worden. Nach 10

Grafik 2: Auftreten des Farbstoffes 10 Minuten nach der FS-Injektion in die Nase.

Nicht zellulär gebundener FS befand sich nur in der Nasenhöhle und teilweise in der oberflächlichen nasalen Mukosa (rosa). FS-phagozytierende Makrophagen waren im Bindegewebe um die submandibulären Lymphknoten und um die Speicheldrüsen zu beobachten sowie um die superfiziellen Halslymphknoten (hellblaue Punkte).

Minuten konnten diese Zellen im Vergleich zu der 5-Minuten-Gruppe dort vermehrt identifiziert werden. Der FS befand sich dabei wieder intrazellulär um deren Zellkerne angeordnet. Es gab aber auch Bereiche, wo der FS eher extrazellulär im obersten Anteil der Nasenschleimhaut im Gewebe aufgenommen wurde. Nach 10 Minuten Verweildauer des FS in der Maus waren zusätzlich auch im Bereich zwischen der Nase und dem Gaumen kleine FS-Mengen zu erkennen, die sich zwischen Zellen dort lokalisierten Fettgewebes befanden. In folgenden Geweben wurden keine FS-Spuren - außer gelegentlichen Artefakten - beobachtet: im Hirngewebe und dem darin enthaltenen Ventrikelsystem, in der Muskulatur, in Knochen- und Knorpelanteilen des Schädels und der Halswirbelsäule, in Drüsenanteilen, im Augenbereich und im braunen Fettgewebe.

Grafik 3: Vergleich des FS-Auftretens nach 5 und 10 Minuten nach der FS-Injektion in die Nase.

Nach 5 Min (grün): Vereinzelt waren FS-phagozytierende Makrophagen in der nasalen Mukosa und im Bindegewebe um superfizielle und submandibuläre Lymphknoten sowie in der Nähe der Speicheldrüsen (Gl. parotis) zu sehen. Freier FS befand sich injektionsbedingt im Lumen der Nasenhöhle. Zum Teil hatte die nasale Mukosa den FS oberflächlich aufgenommen.

Nach 10 Min (rosa): Außer den oben beschriebenen Befunden 5 Minuten nach der Injektion, befand sich nach 10 Minuten auch etwas FS zwischen Nase und Gaumen, zwischen Zellen des Fettgewebes sowie eine höhere Anzahl FS-aufnehmender Makrophagen in der Nasenschleimhaut. Die oberflächlichen Lymphknoten des Halses enthielten selten in ihren Rändern Makrophagen mit intrazellulärem, phagozytiertem FS.

Block - Nr.	Inj.-Ort	Gewebe- Exzision	Euthanasie- Zeit (in Min.)	FS-Auftreten (JA = ✓; NEIN = ✗); LK-Lage: ✓																																									
				BG	BG u LK	LK-Sinus	LK-Rand	LK superficial	LK tief	GR/GW basal	GR/GW kranial	GR lateral	ZWIHEM	GE-VS	Hirngewebe	Ce-R	St-R	ZwiCe/St	RM (VS)	pblug	plymg	NA-Mu	NA-Lymg	NA-Fil	ZwiGE/NA	Gl. lac. intersep	um N. opticus	um/im Auge	Drüse mukös	Drüse serös	um Drüsen-gew	um Muskulatur	FG weiß	FG braun	MAK	AHY	NHY	HYS	Stichkanal						
1	Nase	SZL	5	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗			
2	Nase	TZL	5	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗		
3	Nase	Nacken	5	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	
4	Nase	Hirn- ventrikel	5	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
5	Nase	Nase + Bulbus olf.	5	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗

Tab. 5: Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in die Nase und 5 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Maus.

Block - Nr.	Inj.-Ort	Gewebe-Exzision	Euthanasie-Zeit (in Min.)	FS-Auftreten (JA = ✓ ; NEIN = ✗); LK-Lage: ✓																																								
				BG	BG u LK	LK-Sinus	LK-Rand	LK superficial	LK tief	GR/GW basal	GR/GW kranial	GR lateral	ZWIHEM	GE-VS	Hirngewebe	Ce-R	St-R	ZWiCe/St	RM (VS)	pblug	plymg	NA-Mu	NA-Lymg	NA-Fli	ZWiGE/NA	Gl. lac. intersep	um N. opticus	um/im Auge	Drüse mukös	Drüse serös	um Drüsen-gew	um Muskulatur	FG weiß	FG braun	MAK	AHY	NHY	HYS	Stichkanal					
6	Nase	SZL	10	✓	✗	✗	✓	✗	✗/✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗			
7	Nase	TZL	10	✓	✗	✗	✗	✗/✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗		
8	Nase	Nacken	10	✓	✗	✗	✗	✗/✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	
9	Nase	Hirn-ventrikel	10	✓	✗	✗	✗	✗/✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
10	Nase	Nase + Bulbus olf.	10	✓	✗	✗	✗	✗/✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗

Tab. 6: Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in die Nase und 10 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Maus.

Fotosequenz: Verlauf des Farbstoffes nach FS-Injektion in die Nase

Abb. 3 (A1-A6): Verlauf des Farbstoffes nach FS-Injektion in die Nase nach 5 Minuten.

A1: Übersicht der Nase (Na); Nasenseptum (Sep), Conchae (Co), Gaumen (Gau), Zunge (Zu). (Vergrößerung x1,6) **A2:** Anteile der Halsmuskulatur (M) und des Larynx (Lax) mit FS-Ansammlungen (*) im Lumen 10 Minuten nach der FS-Injektion (Vergrößerung x10). **A3/A4:** Der FS (*) verläuft zwischen der nasalen Mukosa und dem darunter liegenden Knorpel des Nasenskeletts in lymphatischen Gefäßen (Vergrößerung jeweils x40). **A5:** Makrophagen (→) mit phagozytiertem FS im Bindegewebe (BG) der Halsweichteile, braunes Fettgewebe (bFG), Lymphozyten (L) 5 Minuten nach der Injektion des FS in die Nase (Vergrößerung x40). **A6:** FS-phagozytierende Makrophagen (→) im Bindegewebe (BG) um einen superfiziellen Lymphknoten (LK) der Halsweichteile 5 Minuten nach der FS-Injektion in die Nase (Vergrößerung x40).

Abb. 3 (A7-A9): Verlauf des Farbstoffes nach FS-Injektion in die Nase nach 5-10 Minuten.

A7: Makrophagen (→) mit intrazellulären, phagozytierten FS-Partikeln neben mukösem Speicheldrüsenanteil (Drü) und Blutgefäßen (BluG) im Bindegewebe (BG) 5 Minuten nach der nasalten Injektion des FS (Vergrößerung x40). **A8:** Übersicht über die entnommenen superfizialen zervikalen Lymphknoten (LK) und benachbartes muköses und seröses Speicheldrüsenengewebe (mDrü, sDrü) (Vergrößerung x1,6).

A9: Oberflächlicher Halslymphknoten (LK), der noch keinen FS innerhalb von Makrophagen aufwies; Bindegewebe (BG) (Vergrößerung x10).

3.2.2 Versuchsgruppe CSF

3.2.2.1 Injektionsort CSF: 2 Minuten

Außerhalb des Schädels war im zervikalen Bindegewebe um die tiefen Halslymphknoten nur wenig FS, jedoch häufig in Lymphgefäßen in der Nähe der tiefen Lymphknoten zu sehen. Der FS lag dabei der inneren Lymphgefäßwand an und befand sich damit im Lumen der Lymphgefäße (Score 1-2). In der Nähe eines tiefen Lymphknotens war auch ein Makrophage mit phagozytiertem FS-Partikeln zu sehen.

In einem Präparat waren auch zwei tiefe, zervikale Lymphknoten angeschnitten, wobei der eine interessanterweise keinen FS beinhaltete und der andere deutlich FS am Lymphknotenrand akkumuliert hatte (Score 3, Abb. 7 E29), wobei auch feine FS-Punkte in den Randbereichen der in die Lymphknotenmitte ziehenden Lymphsinus zu erkennen waren (Score 1-2). Ein zusätzlicher kleiner, tiefer Halslymphknoten wies ebenfalls FS subkapsulär im Lymphknotenrand und den Sinus auf, der sich in den nachfolgenden Schnitten mit dem anderen FS-haltigen Lymphknoten verband. Der FS im Randbereich des Lymphknotens befand sich zwischen den Lymphozyten intrazellulär in Makrophagen. Die superfizialen Lymphknoten wiesen dagegen noch keine Färbung durch den FS auf.

Im Großhirn konnte der FS sowohl extrazellulär im Lumen des dritten Ventrikels und der beiden Seitenventrikel (Score 2-3) als auch an den kranialen und basalen Hirnkonvexitäten und in den dort liegenden Gefäßwänden von Arterien und Venen identifiziert werden. Dabei war der FS in den Arterien deutlich in der Adventitia der Gefäßwände zu erkennen. Bei den venösen Blutgefäßen war keine Trennung der Wandschichten erkennbar und der FS befand sich vollständig in der Gefäßwand. Der FS in den Ventrikeln zog nicht in die Zellen des Ependyms hinein, sondern befand sich extrazellulär im Lumen des Ventrikelsystems um die ependymalen Zotten herum, vereinzelt war auch durch die FS-Injektion eingebrachtes Blut im Lumen sichtbar. In der Nähe des dritten Ventrikels allerdings waren Anteile des Stichkanals zu erkennen, aus dem viel freier FS und Erythrozyten in das Hirngewebe übertraten. Auch im Subarachnoidalraum befand sich FS in den Wänden der dort liegenden arteriellen und einigen venösen Blutgefäßwänden (Score 2-3) sowie in den zwischen den Gyri und Hirnanteilen hineinziehenden arachnoidalen Gefäßen. An der Schädelbasis waren ebenfalls arterielle und venöse Blutgefäße mit FS in ihren Gefäßwänden zu beobachten, die zum Teil von basal in kranialer Richtung in das Hirngewebe hineinzogen. Es befand sich aber kein FS im Hirngewebe selbst. Zwischen den Hemisphären des Großhirns in der Fissura

longitudinalis war ebenfalls FS in den dort liegenden Gefäßwänden von vorwiegend arteriellen und wenigen venösen Blutgefäßen zu erkennen (Score 1).

Im Bereich des Cerebellums war FS in Anteilen des vierten Ventrikels und ein schmaler FS-Saum am basalen Randbereich (Score 1-2) zu sehen. Im späteren Verlauf des Präparates war das gesamte Lumen des vierten Ventrikels vollständig mit FS gefüllt (Score 3), jedoch befand sich der FS nur extrazellulär zwischen den Ependymzotten. In den Gefäßwänden einiger Blutgefäße, die sich neben dem Ventrikelsystem befanden, konnte ebenfalls FS beobachtet werden (Score 1-2). Dabei konnte aufgrund der intensiven und vollständigen Färbung der Gefäßwände meist keine eindeutige Unterscheidung zwischen arteriellen und venösen Blutgefäßen getroffen werden. Teilweise zogen diese Blutgefäße auch in das Hirngewebe hinein, jedoch befand sich kein FS frei oder in den Zellen des cerebellaren Gewebes. Ab und zu waren auch kleine Arterien und Venen zwischen den Kleinhirn-Gyri angeschnitten, die FS-Anteile in ihren Gefäßwänden aufwiesen (Score 2). Im Übergang zum Stammhirn befand sich

Grafik 4: Auftreten des Farbstoffes 2 Minuten nach der FS-Injektion in den CSF.

Nicht zellulär gebundener FS war im Ventrikelsystem, an den Hirnrändern von Groß- und Kleinhirn in den Meningen, der Gefäßwand der Carotiden (makroskopisch) und teilweise in den tiefen, zervikalen Lymphknoten und in kleinen Lymphgefäßen zu erkennen (rosa). FS-phagozytierende Makrophagen waren im Bindegewebe um die tiefen Halslymphknoten und in diesen Lymphknoten im Randbereich zu beobachten sowie in der Nähe kleiner lymphatischer Gefäße im zervikalen Bindegewebe (hellblaue Punkte).

wenig FS im Bereich der weichen Hirnhäute, teilweise auch in kleineren Gefäßwänden dort lokalisierter Arterien und Venen (Score 2). Die in tieferen Schichten des Präparates erkennbaren Vertebralarterien wiesen ebenfalls FS in ihren Gefäßwänden auf (Score 3). Der FS lag dort in der Adventitia, bei den kleineren Gefäßen war das Differenzieren der Wandschichten meistens nicht möglich.

Lymphgefäße mit FS-Partikeln im Lumen und FS an der inneren Gefäßwand (Score 1-2) tauchten sowohl rechts- als auch linksseitig immer wieder stellenweise auf. Diese lagen im zervikalen Bindegewebe um die Gefäßnervenscheide neben den darin enthaltenden großen Blutgefäßen, der A. carotis communis und der V. jugularis interna, und dem Nervus vagus. Kleinere lymphatische Gefäße mit FS-Partikeln befanden sich auch im zervikalen Bindegewebe (Score 1-2) auf beiden Halsseiten.

Im zervikalen Bindegewebe befanden sich vereinzelt Zellen mit einem FS-Saum (Score 2), die FS-phagozytierende Makrophagen darstellten.

Es lag kein FS in Muskulatur, im Knorpel- und Knorpelgewebe des Schädels und der Halswirbelsäule, im Hirngewebe des Klein- und Großhirns, im und um den N. vagus und im braunem Fettgewebe vor.

Block - Nr.	Inj.-Ort	Gewebe-Exzision	Euthanasie-Zeit (in Min.)	FS-Auftreten (JA = ✓; NEIN = ✗); LK-Lage: ✓
33	CSF	Cerebellum + Hirnstamm	2	<div>BG</div> <div>BG u LK</div> <div>LK-Sinus</div> <div>LK-Rand</div> <div>Lage LK superfi.</div> <div>Lage LK tief</div> <div>GR/GW basal</div> <div>GR/GW kranial</div> <div>GR lateral</div> <div>Zw HEM</div> <div>GE-VS</div> <div>Hirngewebe</div> <div>Ce-R</div> <div>St-R</div> <div>Zw Ce/St</div> <div>RM (VS)</div> <div>pBlut</div> <div>plymg</div> <div>NA-Mu</div> <div>NA-Lymg</div> <div>NA-Fl</div> <div>Zw GE/NA</div> <div>Gl. lac. intersep</div> <div>um N. opticus</div> <div>um/im Auge</div> <div>Drüse mukös</div> <div>Drüse serös</div> <div>um DrüsenGew</div> <div>um Muskulatur</div> <div>FG weiß</div> <div>FG braun</div> <div>MAK</div> <div>AHY</div> <div>NHY</div> <div>HYS</div> <div>Stichkanal</div>
34	CSF	Ventrikel (Inj.-Seite)	2	<div>BG</div> <div>BG u LK</div> <div>LK-Sinus</div> <div>LK-Rand</div> <div>Lage LK superfi.</div> <div>Lage LK tief</div> <div>GR/GW basal</div> <div>GR/GW kranial</div> <div>GR lateral</div> <div>Zw HEM</div> <div>GE-VS</div> <div>Hirngewebe</div> <div>Ce-R</div> <div>St-R</div> <div>Zw Ce/St</div> <div>RM (VS)</div> <div>pBlut</div> <div>plymg</div> <div>NA-Mu</div> <div>NA-Lymg</div> <div>NA-Fl</div> <div>Zw GE/NA</div> <div>Gl. lac. intersep</div> <div>um N. opticus</div> <div>um/im Auge</div> <div>Drüse mukös</div> <div>Drüse serös</div> <div>um DrüsenGew</div> <div>um Muskulatur</div> <div>FG weiß</div> <div>FG braun</div> <div>MAK</div> <div>AHY</div> <div>NHY</div> <div>HYS</div> <div>Stichkanal</div>
35	CSF	Anteriores Gehirn mit A. carotis	2	<div>BG</div> <div>BG u LK</div> <div>LK-Sinus</div> <div>LK-Rand</div> <div>Lage LK superfi.</div> <div>Lage LK tief</div> <div>GR/GW basal</div> <div>GR/GW kranial</div> <div>GR lateral</div> <div>Zw HEM</div> <div>GE-VS</div> <div>Hirngewebe</div> <div>Ce-R</div> <div>St-R</div> <div>Zw Ce/St</div> <div>RM (VS)</div> <div>pBlut</div> <div>plymg</div> <div>NA-Mu</div> <div>NA-Lymg</div> <div>NA-Fl</div> <div>Zw GE/NA</div> <div>Gl. lac. intersep</div> <div>um N. opticus</div> <div>um/im Auge</div> <div>Drüse mukös</div> <div>Drüse serös</div> <div>um DrüsenGew</div> <div>um Muskulatur</div> <div>FG weiß</div> <div>FG braun</div> <div>MAK</div> <div>AHY</div> <div>NHY</div> <div>HYS</div> <div>Stichkanal</div>

Tab. 7: Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in den CSF und 2 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Maus.

3.2.2.2 Injektionsort CSF: 5 Minuten

Im Bindegewebe des Halses konnten vereinzelt Makrophagen gefunden werden, die einen schwarzen FS-Saum um den Zellkern aufwiesen (Abb. 7 E21). Ein paar dieser Zellen befanden sich auch im Bindegewebe hinter dem Pharynx-Ösophagus-Übergang. Selten konnten auch in der Nähe von arteriellen und venösen Blutgefäßen auf beiden Seiten des Halses Makrophagen entdeckt werden, die den FS intrazellulär transportierten.

Lymphgefäße, die etwas FS in ihren Lumina enthielten und parallel zum venösen Blutgefäßsystem verlaufen, befanden sich vereinzelt in der Umgebung des Auges (Score 1-2). Im zervikalen Bindegewebe war vorwiegend an den Außenrändern des Präparates artifiziell bedinger, freier FS in der Subkutis vorhanden. In den bindegewebigen Septen um die zervikale Muskulatur, um die zervikalen Lymphknoten und auch in der Nähe von peripheren Arterien und Venen konnte ebenfalls FS beobachtet werden (Score 1-2). Teilweise konnte der FS auch in der Nähe der großen Halsgefäße verfolgt werden. Dabei zog er linienartig an der Gefäßwand von lymphatischen Gefäßen in der Subcutis des Halses entlang (Score 1-2, Abb. 7 E23 und E24). Im Lumen der Carotiden waren mikroskopisch selten FS-Partikel zwischen den Erythrozyten erkennbar (Score 1), überraschenderweise jedoch nicht in deren Gefäßwänden, obwohl diese makroskopisch FS enthielten (Abb. 4 B2). Selten konnten auch kleine Blutgefäße zwischen der Halsmuskulatur und dem zervikalen Bindegewebe detektiert werden, deren arterielle und venöse Gefäßwände FS beinhalten.

An der kranialen Begrenzung des Cerebellums und teilweise auch lateral zieht etwas FS an der Pia mater entlang. Auch im vierten Ventrikel war FS zu sehen, dort vor allem in den Gefäßwänden der im Plexus choroideus liegenden kleinen Blutgefäße und geringe Mengen auch zwischen den choroidalen Zotten (Score 1). Die Blutgefäße hatten meist eine vollständig mit FS gefärbte Gefäßwand und konnten meistens nicht eindeutig in Arterien und Venen unterschieden werden. Im Kleinhirngewebe konnte kein FS detektiert werden. Vereinzelt konnte wenig FS an den äußeren Konturen des Stammhirns beobachtet werden (Score 1-2).

Interhemisphärisch und lateral an der Konvexität lag der FS im Subarachnoidalraum und den darin liegenden Gefäßwänden von Arterien und einigen Venen vor. An der kranialen Konvexität des Großhirns und in den dort lokalisierten kleinen Arterien und Venen war häufig FS innerhalb der Gefäßwände sichtbar (Score 2). Der angesammelte FS konnte hier auch makroskopisch, sowohl in den cerebralen als auch in den cerebellären Vasa vasorum, nach Öffnung der Schädelkalotte sehr gut verfolgt werden (Abb. 4 B1 und B2). Teilweise zog auch FS entlang der Pia mater und darin liegenden kleinen arteriellen und venösen Blutgefäßen

von kranial zwischen die Hemisphären und setzte sich entlang der Fissura longitudinalis Richtung Schädelbasis fort. Auch von laterokaudal konnte der FS weiter zwischen durch meningeale Septen getrennte Anteile des Großhirns verfolgt werden (Score 2). An den basalen Hirngrenzen und dort gelegenen Blutgefäßen hatte sich nur vereinzelte FS verteilt (Score 1). Bei den FS-enhaltenden Arterien lag dieser in der Adventitia und eine FS-freie Muscularis war noch zu erkennen. Die Venen wiesen eine vollständig eingefärbte Gefäßwand auf. In einem rechten Seitenventrikel einer Maus waren FS-Punkte als feine gepunktete Linie auf dem Ependym aufgelagert zu erkennen (Score 1). Überwiegend war bei den Versuchstieren aber nur noch sehr wenig FS im Ventrikellumen zu eruieren. Der linke Seitenventrikel wies in keinem der Tiere FS auf. Intraparenchymatös waren nie FS-Partikel zu detektieren.

Grafik 5: Auftreten des Farbstoffes 5 Minuten nach der FS-Injektion in den CSF.

Freier, nicht zellulär gebundener FS war im Ventrikelsystem, an den Hirnrändern von Groß- und Kleinhirn in den Meningen, der Gefäßwand der Carotiden und in den tiefen, zervikalen Lymphknoten und in kleinen Lymphgefäßen zu erkennen (rosa). Außerdem zog FS vom Bulbus olfactorius über Gefäßwände von kleinen, arteriellen und venösen Blutgefäßen und weiter in lymphatische Gefäße der nasalen Mukosa. FS-phagozytierende Makrophagen waren im Bindegewebe um die tiefen Halslymphknoten und in diesen Lymphknoten im Randbereich zu beobachten sowie in der Nähe kleiner lymphatischer Gefäße im zervikalen Bindegewebe (hellblaue Punkte).

In einigen Tieren konnte der rechts frontale Stichkanal identifiziert werden (Score 3). Kleine arterielle und venöse Gefäße in Stichkanalnähe zeigten teilweise FS in den Gefäßwänden. Die Hypophysen der Versuchstiere in dieser Gruppe zeigten kein FS-Auftreten.

In der rechten Hemisphäre des Großhirns einer Maus (Maus Nr. 32) konnte eine Neoplasie in Form eines Ependymoms als Zufallsbefund entdeckt werden (Abb. 6 D3).

Nicht bei allen Versuchstieren war der FS über den CSF bis auf Höhe des Rückenmarks nachzuvollziehen.

Im Subarachnoidalraum um die Nervi optici zog der FS unterhalb des Epineuriums entlang in Richtung Auge (Score 1-2). Bei einigen Mäusen war innerhalb des Bulbus FS zwischen Retina und Choroidea zu erkennen (Abb. 7 E12).

Zwischen dem knorpeligen Nasenskelett und der nasalen Mukosa befand sich der FS ubiquitär in den dort verlaufenden lymphatischen Gefäßen. Dabei lag der FS mehr den lymphatischen Gefäßwänden an, das Lumen war selten großflächiger ausgefüllt (Score 1). Auch im nasalen Drüsengewebe waren vereinzelt Lymphgefäße mit FS-Spuren an deren Gefäßrändern zu erkennen. Es konnte bei einigen Mäusen auch FS in der Nähe der Lamina cribrosa zwischen Nervenzellen des Bulbus olfactorius bzw. der entlang Fila olfactoria beobachtet werden, die auch in der Nähe nasaler Drüsen lokalisiert waren. Von dort zog der FS weiter in die Lymphgefäße der Nasenschleimhaut. In der nasalen Mukosa befand sich in den kleinen mukösen, arteriellen und venösen Blutgefäßen kein FS.

Die tiefen zervikalen und paraösophageal gelegenen Lymphknoten sowie die superfizialen (anterioren) Lymphknoten des Halses zeigten mikroskopisch nur wenig Auftreten von FS. Ein kleiner Lymphknoten im serösen Drüsengewebe und ein Lymphknoten, der kaudal der Zunge gelegen war, enthielten keinen FS. Lediglich in einem Block konnte FS in wenigen superfizialen Halslymphknoten in den Lymphknotenrändern beobachtet werden. Makroskopisch dagegen war der FS sowohl in den oberflächlichen als auch in den tiefen zervikalen Lymphknoten deutlich zu verfolgen (Abb. 6 D1 und D2).

In der Muskulatur, dem Knochen- und Knorpelgewebe der Schädelkalotte und Halswirbelsäule, den Anteilen von Speichel- und Tränendrüsen, der Gl. thyroidea, im Hirngewebe von Cerebellum und Stammhirn, der Zunge, um die Trachea und den Ösophagus, in den superfizialen und tiefen zervikalen Lymphknoten, in der Mukosa der Nase und im wenig angeschnittenen braunen Fett- und Bindegewebe war kein FS zu detektieren. Auch entlang der Spinalnerven und in peripheren Gefäßwänden arterieller und venöser Blutgefäße war kein FS zu identifizieren gewesen.

[illegible]

Tab. 8: Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in den CSF und 5 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Mäuse.

3.2.2.3 Injektionsort CSF: 10 Minuten

Die superfizialen Lymphknoten zeigten gelegentlich FS im Lymphknotenrand und in den Sinus (Score 1-2). Dabei befand sich der FS fein gepunktet zwischen den randständigen Lymphozyten (Score 1, Abb. 7 E28). Jedoch war bei keinem der Lymphknoten FS zentral im Lymphknotengewebe vorzufinden und somit keine vollständig angefärbten, oberflächlichen Lymphknoten zu sehen.

Auch in den tiefen Lymphknoten war der FS vorwiegend im Randbereich interzellulär zwischen den Lymphozyten zu sehen, jedoch in deutlich höherer Intensität. Auch zog dieser teilweise weiter entlang der Lymphsinus in das zentrale Lymphknotengewebe (Score 2-3, Abb. 7 E25). Der FS befand sich einerseits in wenigen Makrophagen, die in den Lymphknotenrändern zwischen den Lymphozyten angeordnet waren. Andererseits zog der FS frei in den Lymphsinus weiter in das zentrale Lymphknotengewebe (Score 1-2). Einige tiefe Lymphknoten hatten etwas weniger FS aufgenommen (Score 1-2), der jedoch auch dort zwischen den Lymphozyten lokalisiert war. Das perilymphatische Bindegewebe wies nur wenig, überwiegend freien FS auf (Score 1).

Ein Lymphknoten neben dem Ösophagus und ein weiterer in der Nähe der Arteria carotis enthielten keinen FS. An einer Stelle konnten neben diesem Lymphknoten und der A. carotis communis sinistra jedoch Lymphgefäße beobachtet werden, in denen FS zu sehen war (Score 2, Abb. 7 E22).

Die Gefäßwand der Halsschlagader zeigte keine FS-Aufnahme, jedoch waren in der Umgebung einige Makrophagen zu sehen, die den FS phagozytiert hatten und einen deutlichen FS-Saum um den Zellkern aufwiesen (Score 1-2).

Im Bindegewebe waren sowohl extrazelluläre, freie FS-Partikel als auch FS-enthaltende, lymphgefäßähnliche Strukturen zu sehen. Intrazellulärer, durch Makrophagen aufgenommener FS konnte in der Umgebung um die Lymphknoten und das Speicheldrüsengewebe beobachtet werden (Score 1-2). Auch im perimuskulären Bindegewebe waren vereinzelt FS-enthaltende Makrophagen zu sehen, die einen deutlichen, intrazellulären FS-Saum aufwiesen (Score 1-2). Im Bindegewebe um die Nasenhöhle, über dem harten Gaumen und unter der Zunge waren auch immer wieder FS-phagozytierende Makrophagen in der Nähe von kleinen lymphatischen Gefäßen zu erkennen (Score 1-2).

Neben dem Ösophagus konnte im umgebenden Bindegewebe ein Lymphgefäß mit etwas FS im Lumen gesehen werden. Auch zwischen Halsmuskulatur und braunem Fettgewebe war teilweise ein fadenartiger Verlauf des FS zu sehen, der sich in kleinen Lymphbahnen befand.

Oberhalb der Schädelbasis war der FS in den Wänden arachnoidaler arterieller und venöser Blutgefäße und in wenigen FS-aufnehmenden Makrophagen zu sehen (Score 2).

Im Großhirn fallen makroskopisch die durch den FS schwarz angefärbten Lumina der Seitenventrikeln und des dritten Ventrikels auf (Abb. 5 C1). Mikroskopisch ist der FS im Lumen (Score 3), um die Ependymzotten herum und in den Wänden kleiner, ventrikelnaher Arterien und Venen angeordnet (Score 2-3, Abb. 7 E1-E4). Der FS befand sich dort nur extrazellulär und wurde nicht durch die Zellen des Plexus choroideus aufgenommen. Vereinzelt gab es kleine Blutgefäße in der Nähe der Ventrikelkammern, die FS in ihren Wänden aufgenommen hatten (Score 2). FS konnte dabei sowohl in Arterien als auch in Venen detektiert werden. Aufgrund vollständig angefärbter Gefäßwände konnten die paraventrikulären Blutgefäße jedoch nicht immer eindeutig in arterielle und venöse Gefäße differenziert werden. Gelegentlich zog der FS diffus nach kranial und kaudal aus den Seitenventrikeln in das Hirngewebe. Auch im vierten Ventrikel war zunächst freier FS im Lumen zu sehen (Score 2-3), in tieferen Schichten des Präparates dann nur noch fein verteilte FS-Partikel, die im ventrikulären Randbereich dem Ependym auflagen und sich teilweise zwischen den Zellen des Plexus choroideus befanden (Score 1).

Um den Stichkanal herum war der FS auch etwas in das umgebende Hirngewebe gezogen. Frontobasal befanden sich einige, vor allem medial gelegene, arterielle und venöse Gefäße in der Arachnoidea, in deren Wänden teilweise auch sehr viel FS eingedrungen war (Score 1-2). Auch im das Gehirn umgebenden Subarachnoidalraum befand sich FS (Score 2-3), der im weiteren Verlauf auch von der Schädelbasis aus zwischen den Hirnhälften nach kranial zog. Daneben war in kranial und zwischen den Hemisphären in der Falx cerebri gelegenen kleinen arteriellen und venösen Blutgefäßen FS in deren Wänden zu sehen (Score 2-3). Auch in Gefäßwänden, die um die Hippocampi angeordnet waren, konnte FS beobachtet werden. An der lateralen Konvexität des Großhirns befand sich fast kein FS.

Am Außenrand des Stammhirns befand sich der FS in den umgebenden Hirnhäuten und darin liegenden arteriellen Gefäßwänden in der Adventitia. Im Hirnparenchym und darin liegenden Arterien und Venen war kein FS vorzufinden. An der Innenseite der Schädelkalotte befand sich selten FS, der sich in den Resten von daran anliegendem Hirnhautgewebe befand (Score 1-2).

Vereinzelt lag etwas FS in den arachnoidalen Bindegewebsschichten zwischen den Kleinhirngyri und dort vorwiegend in den Wänden von arteriellen und venösen Blutgefäßen (Score 1-2). Am Klein- und Stammhirn befand sich an den arachnoidalen Außenrändern der

beiden Hirnanteile und in den dortigen Gefäßwänden von kleinen Arterien und einigen Venen FS, genauso wie an der äußeren Kontur des beginnenden Rückenmarks (Score 1).

Das Hirnparenchym war wie bisher frei von FS. Ein Stichkanal war nicht immer zu erkennen.

Im Zentralkanal des Rückenmarks war das Lumen mit FS gefüllt, manchmal befand sich dieser auch vorwiegend am Zentralkanalrand und um das ependymale Gewebe, weniger im Lumen (Abb. 7 E5). An der Außenkontur des Rückenmarks, in daran grenzenden Gefäßwänden und im Subarachnoidalraum austretender zervikaler Spinalnerven konnte ebenfalls FS beobachtet werden (Score 1-2). Im spinalen Parenchym war kein FS nachzuweisen.

Um die N. optici war erneut FS unter dem Epineurium im perioptischen Subarachnoidalraum erkennbar (Score 1-2). Eine Versuchstier (Nr. 32) wies auch etwas FS innerhalb des Auges zwischen der Netz- und Aderhaut auf.

In den entnommenen Hypophysen dieser Versuchstiergruppe hatte sich weder an den hypophysären Randbereichen noch im Gewebe FS eingelagert.

Auf der linken Seite zwischen der Halsmuskulatur einer Maus konnte ein Nerv mit feinen FS-Punkten im Nervengewebe beobachtet werden (Score 1).

Um den kaudal des Hirns bilateral angeschnittenen N. opticus zog der FS im perioptischen Subarachnoidalraum unterhalb des Epineuriums entlang bis zum Beginn des Bulbus oculi (Score 1-2).

Der FS lag um die Bulbi olfactorii und zog von dort durch die Schädelbasis weiter vorwiegend über die Fila olfactoria zur Nase (Abb. 5 C2). Dabei war der FS zum Teil sehr schön in den Wänden der bulbusnahen Blutgefäße zu verfolgen (Score 1-2, Abb. 7 E13-E16). Teilweise zog dieser auch punktförmig durch die Lamina cribrosa in den Wänden kleiner arterieller und venöser Blutgefäße weiter zur Nase (Score 1-2). In der Nase zog der FS weiter in lymphatischen Gefäßen, die sich zwischen dem knorpeligen Nasenskelett der Nasenmuscheln sowie des Septums und der darüber liegenden nasalen Mukosa befanden (Score 1-2, Abb. 7 E20). Dabei befand sich der meiste FS fein gepunktet an der Innenseite der lymphatischen Gefäßwände und nur wenig im Lumen. Vereinzelt konnten auch submukös, unter dem Flimmerepithel liegende Lymphgefäße der Nase gesehen werden, in denen der FS schnurartig entlang zog (Score 2). Auch in Lymphgefäßwänden im perinasalen Bindegewebe und im Bereich zwischen der Nase und dem Gaumen waren feine FS-Punkte im Lumen sichtbar (Score 1). Der FS lag auch hier vorwiegend am randständig innerhalb der Gefäßwand, selten im Lumen der lymphatischen Gefäße.

In einem seromukösen Drüsenanschnitt in der Nähe der Nase verliefen einzelne Lymphgefäße, die FS luminal an ihren Rändern aufwiesen (Score 1-2).

Weiterhin konnten auch Lymphgefäße in Anteilen der serösen Glandula parotis beobachtet werden, in deren Lumina der FS weiter in Richtung Peripherie floß (Score 1).

Kein FS war in den serösen und mukösen Speicheldrüsenanteilen sowie peripheren Nervenanschnitten zu sehen. Um das Fettgewebe und die Muskulatur, die Gl. thyroidea, die Trachea und den Ösophagus, um das Auge und in Anteilen der Gl. lacrimalis war ebenfalls kein FS zu detektieren. Auch in peripheren Blutgefäßwänden im Bindegewebe des Halses und zwischen der zervikalen Muskulatur war kein FS zu erkennen. Im Knochen- und Knorpelgewebe des Schädels und der Halswirbelsäule konnte kein FS registriert werden.

Grafik 6: Auftreten des Farbstoffes 10 Minuten nach der FS-Injektion in den CSF.

Freier, nicht zellulär gebundener FS war im Ventrikelsystem und Zentralkanal des Rückenmarks, an den Hirnrändern von Groß- und Kleinhirn in den Meningen, der Gefäßwand der Carotiden sowie in den superfiziellen und tiefen, zervikalen Lymphknoten und in kleinen Lymphgefäßen zu erkennen (rosa). Weiterhin zog FS vom Bulbus olfactorius über Gefäßwände von arteriellen und venösen Blutgefäßen und Lymphgefäße weiter in kleine lymphatische Gefäße der nasalen Mukosa und entlang von Spinalnerven und dem N. opticus. FS-phagozytierende Makrophagen waren im Bindegewebe um die superfiziellen und tiefen Halslymphknoten und in diesen Lymphknoten im Randbereich zu beobachten sowie in der Nähe kleiner lymphatischer Gefäße im zervikalen Bindegewebe. Außerdem waren FS-aufnehmende Makrophagen im Bereich um die Nase und oberhalb des Gaumens zu erkennen (hellblaue Punkte).

Block - Nr.	Inj.-Ort	Gewebe- Exzision	Euthanasie- Zeit (in Min.)	FS-Auftreten (JA = ; NEIN =); LK-Lage:
				BG	BG u LK	LK-Sinus	LK-Rand	Lage LK superfi.	Lage LK tief	GR/GW basal	GR/GW kranial	GR lateral	Zwi HEM	GE-VS	Hirngewebe	Ce-R	St-R	Zwi Ce/St	RM (VS)	pBlug	plymg	NA-Mu	NA-Lymg	NA-Fli	Zwi GE/NA	Gl. lac. intersep	um N. opticus	um/im Auge	Drüse mukös	Drüse serös	um Drüsengew	um Muskulatur	FG weiß	FG braun	MAK	AHY	NHY	HYS	Stichkanal		
11	CSF	SZL	10
12	CSF	TZL	10
13	CSF	Nacken	10
14	CSF	Ventrikel (Inj.-Seite)	10
15	CSF	Hirn- ventrikel	10
16	CSF	Bulbus olf.	10
17	CSF	Nase	10
18	CSF	SZL	10
19	CSF	Nacken + TZL	10
20	CSF	Ventrikel (Inj.-Seite)	10

Tab. 9: Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in den CSF und 10 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Mäuse.

3.2.2.4 Injektionsort CSF: 20 Minuten

In allen tiefen, zervikalen Lymphknoten war FS in unterschiedlicher Intensität nachzuweisen (Score 1-3). Dabei zeigten alle Lymphknoten einige Makrophagen, die FS akkumuliert hatten und die sich zwischen den Lymphozyten im subkapsulären Rand der Lymphknoten befanden. Auch in den Lymphsinus zog bei den meisten Tieren der FS weiter in das zentrale Gewebe der tiefen Halslymphknoten (Score 1-3). In den paratrachealen Lymphknoten war in einigen Tieren kein, manchmal wenig FS (Score 2) vorzufinden. Im Bindegewebe des Halses waren nur selten und meistens in der Nähe von den tiefen und paratrachealen Lymphknoten FS-Partikel in Lymphwegen zu erkennen (Score 1).

Bei manchen Mäusen zeigte sich eine größere Menge FS in den rechtsseitigen tiefen, zervikalen Lymphknoten als in den kontralateralen, tiefen Lymphknoten der linken Halsseite. Im Gewebe einer Maus (Nr. 34) waren in einem Teil der tiefen zervikalen Lymphknoten FS und FS-enhaltende Makrophagen subkapsulär im Lymphknotenrand zwischen den Lymphozyten der rechten Halsseite zu sehen (Score 1-2), während in den auf der linken Seite des Halses gelegenen tiefen Lymphknoten nur wenig FS im perilymphatischen Gewebe um die Lymphknoten, aber nicht in den Lymphknoten selbst zu sehen war.

Die tiefer liegenden Halslymphknoten hatten im Vergleich zu den superfizialen (Score 1-2) randständig immer deutlich mehr FS aufgenommen (Score 2-3). Makroskopisch jedoch schien die FS-Aufnahme beider Lymphknotengruppen ähnlich intensiv zu sein. In den oberflächlicheren Lymphknoten war der FS von geringerer Intensität, aber dafür gleichmäßiger im gesamten lymphatischen Gewebe verteilt. Die weit lateral und subkutan lokalisierten superfizialen Halslymphknoten zeigten nur wenige Makrophagen (Abb. 7 E26) oder oft auch keine FS-Aufnahme. Bei einem Tier konnten in der Nähe eines oberflächlichen Lymphknotens einige Makrophagen identifiziert werden, die FS aufgenommen hatten.

Im Bindegewebe um die superfizialen Halslymphknoten und die Muskulatur waren nur selten vereinzelte FS-Partikel zu sehen (Score 1-2).

Auch zeigten die weiter kranial und auch paratracheal gelegenen tiefen Lymphknoten eine höhere FS-Aufnahme als die Lymphknoten, die weiter in kaudaler Richtung lagen.

FS-phagozytierende Makrophagen waren im perilymphatischen Bindegewebe der superfizialen Lymphknoten im Vergleich zu der Versuchsgruppe, die nach 10 Minuten euthanasiert wurden, weniger zu sehen (Abb. 7 E27).

Auch im Bindegewebe um die Muskulatur, die Trachea und den Ösophagus war FS zu sehen (Score 1-2). So konnte der FS hierbei selten im Lumen von kleineren Lymphgefäßen zwischen

Muskel- und Bindegewebe und neben dem Ösophagus (Score 2) sowie im Lumen eines paratracheal lokalisierten, muskelnahen Lymphgefäßes (Score 2-3) registriert werden. Die vom Bindegewebe umgebenden, schädelbasisnahen arteriellen Blutgefäße wiesen FS in ihren Wänden (Adventitia) auf (Score 3, Abb. 7 E9). Die dort lokalisierten venösen Gefäße hatten den FS vollständig in ihrer Gefäßwand aufgenommen. In einigen Lymphgefäßen in deren Nähe zeigte sich FS im Lumen (Score 2-3). Auch zwischen der Halsmuskulatur und neben dem Ösophagus verliefen wenige kleine Lymphgefäße mit punktförmigem FS im Lumen (Score 1-2). Im Bindegewebe zwischen der Muskulatur und dem braunen Fettgewebe waren an vielen Stellen feine FS-Punkte erkennbar (Score 1-2).

An vereinzelt Stellen verlief der FS gefäßähnlich und gepunktet, sodass es sich dabei auch um periphere Lymphgefäße gehandelt haben könnte. Im Bindegewebe waren teilweise mit einem FS-Saum dunkel angefärbte Zellen zu sehen, die als FS-phagozytierende Makrophagen einzuordnen sind. In der Nähe peripherer, zervikaler Arterien und Venen war kaum zellulär gebundener FS zu beobachten.

Schädelbasisnah konnte FS im Subarachnoidalraum zwischen Anteilen des Großhirns detektiert werden, der vorwiegend auch in den Wänden der ortsständigen arteriellen und venösen Blutgefäße lokalisiert war (Score 2-3). Der FS konnte dabei in der größten Intensität vorwiegend median der Schädelbasis und in den dort liegenden Wänden von Arterien und Venen beobachtet werden. Oft war keine Wandschichtung, insbesondere bei den kleinen oder auch venösen Gefäßen, erkennbar. Jedoch war die Adventitia von größeren Arterien oft angefärbt. Der FS zog auch etwas von basal zwischen die Hirnhälften und war auch dort vorwiegend in den Wänden von kleinen Arterien und Venen des Subarachnoidalraumes zu sehen (Score 2-3, Abb. 7 E6). Auch an der kranialen Konvexität des Großhirns und zwischen den Hemisphären konnte vereinzelt in dort liegenden Gefäßwänden von arteriellen und venösen Gefäßen FS beobachtet werden (Score 2-3). Dabei war mehr FS am basalen Hirnpol vorzufinden als an der kranialen Außenkontur. Lateral war an die äußere Hirnoberfläche kaum FS gelangt (Score 1-2).

Das Lumen der Seitenventrikel (Score 3) war mit FS und zum Teil auch mit Blut vollständig ausgefüllt. Der FS zog um die ependymalen Zotten des Plexus choroideus, wurde aber nicht von diesen aufgenommen (Score 2-3). Ab und zu trat etwas FS aus den Ventrikeln in das angrenzende Hirngewebe über (Score 1-2), wobei ansonsten kein FS im Hirnparenchym zu sehen war. Im vierten Ventrikel befand sich ebenfalls FS im Lumen um das Ependym (Score 2-3).

Es war kein FS im Hirngewebe zu sehen, jedoch konnte selten in den Wänden kleiner intraparenchymatöser Hirngefäße FS beobachtet werden (Score 1-2). Diese arteriellen und venösen Gefäße befanden sich hauptsächlich in der Umgebung der Ventrikel und waren wahrscheinlich Anschnitte ventrikelnaher Blutgefäße, die den FS aus dem CSF aufgenommen und transportiert hatten (Score 1-2). Diese Gefäße waren auch teilweise in ihrem weiteren Verlauf im Hirngewebe sichtbar. Bei den kleinen paraventrikulär liegenden Blutgefäßen war oft keine Wandschichtung erkennbar, sondern meist ein schwarzer FS-Saum um das Gefäßlumen (Score 2-3). In der rechten Hirnhemisphäre waren bei einigen Mäusen Anteile des Stichkanals erkennbar.

Ähnlich zeigte sich die FS-Verteilung im Bereich des Cerebellums. Dieser lag teilweise im Subarachnoidalraum zwischen den Kleinhirnwindungen sowie vereinzelt an der Außenkontur des Kleinhirns und in den Wänden dort ansässiger kleiner Arterien und Venen (Score 2-3). Das Kleinhirngewebe selbst hatte keinen FS aufgenommen. Zwischen dem Cerebellum und dem Stammhirn lag der FS ebenfalls vereinzelt in den Gefäßwänden von arteriellen und venösen Blutgefäßen des Subarachnoidalraumes (Score 1-3). Im Bereich der Hirnhaut um das Stammhirn und in den dortigen arteriellen und einigen venösen Gefäßwänden konnte ebenfalls FS beobachtet werden (Score 1-3). Im Parenchym des Stammhirns konnte wie bisher kein FS nachgewiesen werden.

Vereinzelt konnte auch etwas FS an der Dura unter der Schädelkalotte gesehen werden (Score 1-2). In der Nähe der Basis cranii waren ein, zwei lymphgefäßähnliche Strukturen zu erkennen, deren Lumina mit FS gefüllt war.

Im hypophysären Gewebe war kein FS detektiert worden (Abb. 7 E7).

Im das Rückenmark umgebenden Subarachnoidalraum und in dort liegenden, randständigen Gefäßwänden konnte ebenfalls FS beobachtet werden (Score 1-2). Der Zentralkanal enthielt bei manchen Versuchstieren keinen FS, bei anderen war der FS randständig im Lumen des Zentralkanals sichtbar (Score 1-2). Aus dem Rückenmark austretende Spinalnerven wiesen FS im Subarachnoidalraum auf. Der FS befand sich unterhalb des die Nerven umgebenden Epineuriums (Score 1-3).

In der Nähe der Pons konnte im Subarachnoidalraum eines bilateral austretenden Hirnnerven (sehr wahrscheinlich N. oculomotorius) FS beobachtet werden (Score 3; Abb. 7 E8). Vereinzelt war sogar etwas FS um einzelne Nervenzellen zu sehen (Score 2).

Im Bereich der Augen konnte vereinzelt FS zwischen den Augenmuskeln, im Subarachnoidalraum des N. opticus (Abb. 7 E11) und etwas im Bindegewebe um den Bulbus oculi beobachtet werden (Score 2-3). Teilweise zogen auch geringe FS-Mengen etwas in das

Gewebe der Augenlider (Score 1-2). Der FS im Auge verlief zwischen der Retina (an das Str. pigmentosum angrenzend) und der Choroidea, zum Teil auch bis in die vordere Augenkammer an den Zotten der Iris entlang. Der FS befand sich dabei an der Außenseite der Iris (Score 2-3, Abb. 7 E12).

Zwischen den Drüsenläppchen der Gl. lacrimalis war kein FS zu identifizieren.

Es war erneut gut erkennbar wie der FS von den Bulbi olfactorii aus dem Gehirn über die Fila olfactoria in der Frontobasis zum kranialen Anteil der Nase zog und dort weiter in den Lymphgefäßen der Nasenschleimhaut zu verfolgen war (Score 3, Abb. 7 E10).

Grafik 7: Auftreten des Farbstoffes 20 Minuten nach der FS-Injektion in den CSF.

Freier, nicht zellulär gebundener FS war im Ventrikelsystem, an den Hirnrändern von Groß- und Kleinhirn in den Meningen, der Gefäßwand der Carotiden sowie in den superfizialen und tiefen, zervikalen Lymphknoten und in kleinen Lymphgefäßen zu erkennen (rosa). Weiterhin zog FS vom Bulbus olfactorius über Gefäßwände von kleineren Arterien und Venen weiter in kleine lymphatische Gefäße der nasalen Mukosa. Außerdem war FS entlang von Spinalnerven und dem N. opticus zu detektieren. FS-phagozytierende Makrophagen waren im Bindegewebe um die superfizialen und tiefen Halslymphknoten und in diesen Lymphknoten im Randbereich zu beobachten sowie in der Nähe kleiner lymphatischer Gefäße im zervikalen Bindegewebe. FS-aufnehmende Makrophagen waren hier mehr im zervikalen Bindegewebe und weniger im Bereich um die Nase und oberhalb des Gaumens zu sehen (hellblaue Punkte).

In einem Block war gut zu erkennen, dass dem Bulbus olfactorius ein Blutgefäß direkt anlag, dessen Gefäßwand FS führte (Abb. 7 E17). Schädelbasisnah, zwischen den Neuronen des Bulbus olfactorius, waren ebenfalls feine FS-Partikel zu detektieren (Abb. 7 E18) sowie in den Gefäßwänden der Vasa vasorum der Bulbi olfactorii (Abb. 7 E19).

Im Bindegewebe um die Nasenhöhle waren im kranialen Bereich über der Nase kleine Lymphgefäße zu sehen, in deren Lumen peripher feine FS-Punkte zu erkennen waren (Score 1).

Auch in der nasalen Mukosa konnten kleine Lymphgefäße registriert werden, die in ihrem Lumen FS führten. In den Conchae nasales verliefen unterhalb der nasalen Schleimhaut ebenfalls lymphatische Gefäße, die FS enthielten. An wenigen Stellen waren dem Flimmerepithel der Nase extrazelluläre FS-Partikel aufgelagert (Score 1-2), die aber eher artifiziell zu interpretieren sind. FS-aufnehmende Makrophagen im Bindegewebe und in der Nähe der Nase waren nicht zu sehen gewesen.

Im Muskelgewebe, den Knochen- und Knorpelanteilen von Kopf und Hals, im mukösen und serösen Speicheldrüsengewebe, um Larynx- und Zungenanteile, die Trachea und den Ösophagus und die Gl. thyroidea lag kein FS vor. Auch im Gewebe um die Ohren und die Halsgefäße konnte kein FS detektiert werden. In einer Maus war außerdem auch kein FS in den zervikalen und paratrachealen Lymphknoten festzustellen.

Grafik 8: Vergleich des FS-Auftretens nach 5, 10 und 20 Minuten nach der FS-Injektion in den CSF.

Nach 5 Min (grün): Der FS ist im Ventrikelsystem, an den Groß- und Kleinhirnrändern und dort liegenden, arachnoidalen Blutgefäßwänden und am Bulbus olfactorius zu beobachten. Von dort zieht er über die Wände von arteriellen und venösen Blutgefäßen zur Nase und dort angelangt weiter in kleinen Lymphgefäßen der nasalen Mukosa. Vereinzelt sind auch FS-phagozytierende Makrophagen im Bindegewebe des Halses und um den Ösophagus zu sehen.

10 Min (rosa): Zusätzlich zu den FS-Lokalisationen, die nach 5 Minuten Verweildauer nachgewiesen wurden, ist 10 Minuten nach der FS-Injektion in den CSF außerdem FS im Zentralkanal des Rückenmarks, im Subarachnoidalraum der Spinalnerven und des N. opticus, zwischen Drüsenläppchen der Gl. parotis und in den zervikalen Lymphknoten zu sehen. Dabei haben die tiefen Halslymphknoten insgesamt mehr FS im Randbereich (zellulär) und in den Lymphsinus (frei) aufgenommen als die oberflächlichen Lymphknoten. Außerdem traten FS-aufnehmende Makrophagen in der Umgebung um die Nasenhöhle auf.

20 Min (hellblau): Nach diesem Intervall konnten zu dem bisherigen FS-Auftreten vor allem in den Lymphknoten vermehrt FS-phagozytierende Makrophagen in den Lymphknotenrändern beobachtet werden. Daneben trat nicht zellulär gebundener FS innerhalb des Auges zwischen Retina und Choroidea auf.

Block - Nr.	Inj.-Ort	Gewebe- Exzision	Euthanasie- Zeit (in Min.)	FS-Auftreten (JA = ✓ ; NEIN = ✗); LK-Lage: ✓																																								
				BG	BG u LK	LK-Sinus	LK-Rand	Lage LK superfl.	Lage LK tief	GR/GW basal	GR/GW kranial	GR lateral	ZWI HEM	GE-VS	Hirngewebe	Ce-R	St-R	ZwiCe/St	RM (VS)	pBlug	plymg	NA-Mu	NA-Lymg	NA-Fil	ZwiGE/NA	Gl. lac. Intersep	um N. opticus	um/im Auge	Drüse mukös	Drüse serös	um Drüsengew	um Muskulatur	FG weiß	FG braun	MAK	AHY	NHY	HYS	Stichkanal					
27	CSF	Cerebellum + Hirnstamm	20	✓	✗	✓	✓	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗			
28	CSF	Ventrikel (Inj.-Seite)	20	✓	✗	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗		
29	CSF	Anteriores Gehirn	20	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗		
36	CSF	Cerebellum + Hirnstamm	20	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗		
37	CSF	Ventrikel (Inj.-Seite)	20	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗		
38	CSF	Anteriores Gehirn	20	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	
47	CSF	Cerebellum + Hirnstamm	20	✓	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	
48	CSF	Inj.-Seite + Hypophyse	20	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	
49	CSF	Inj.-Seite + Hypophyse	20	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	
52	CSF	Cerebellum + Hirnstamm	20	✓	✗	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
53	CSF	Anteriores Gehirn + Hypophyse	20	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
54	CSF	Inj.-Seite + Hypophyse	20	✓	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
66	CSF	Alles	20	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
67	CSF	Alles	20	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
68	CSF	Alles	20	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗

Tab. 10: Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in den CSF und 20 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Mäuse.

Abb. 4 (B1/B2): Schneller Abflussweg des FS über die Gefäßwände der Vasa vasorum (Meningealarterien) und der A. carotis nach Injektion des FS in das Ventrikelsystem nach 5 Minuten.

B1: Die Vasa vasorum sammeln den FS aus den cerebralen und cerebellaren Blutgefäßen (→). **B2:** die FS-ansammelnden Vasa vasorum der cerebralen und cerebellaren Blutgefäße. Der → zeigt hier auf die A. carotis sinistra.

Abb. 5 (C1/C2): FS-Auftreten in der nasalen Mukosa nach Injektion des FS in das rechte Vorderhorn des Seitenventrikels nach 10 Minuten.

C1: Nach der Injektion verteilt sich der FS im CSF und Subarachnoidalraum. **C2:** Der FS erreicht über den Bulbus olfactorius (BO) die zarten Fila olfactoria (→).

Abb. 6 (D1/D2): FS-Verteilung in den zervikalen Lymphknoten nach Injektion in den rechten Seitenventrikel nach 5 Minuten.

D1: Nach Präparation findet sich ein tiefes, parapharyngeal liegendes Gefäß (lange →) und ein tiefer, zervikaler Lymphknoten (kurzer →). In beiden Strukturen ist eindeutig FS zu erkennen. **D2:** Zwischen den Mm. digastricus und masseter ist der Verlauf eines oberflächlichen, FS führenden Gefäßes (langer →) zu erkennen. Unmittelbar neben der Speicheldrüse ist ein superfizieller Lymphknoten (kurzer →) zu sehen, der ebenfalls angefärbt ist. Der FS hat sich sowohl in den tiefen Halslymphknoten (kurzer →) (**D1**) als auch in den oberflächlichen, zervikalen Lymphknoten (kurzer →) in der Nähe der Speicheldrüse (**D2**) verteilt; GS = Glandula salivaria.

Abb. 6 (D3): Ependymom bei einem Versuchstier der CSF-Gruppe nach 5 Minuten.

Dieser Tumor des ependymalen Gewebes stellte einen Zufallsbefund im Gehirn der Maus Nr. 32 (Block 51) dar.

Fotosequenz: Farbstoffverlauf nach FS-Injektion in das rechte Vorderhorn (intraventrikulär)

Abb. 7 (E1-E6): Verlauf des Farbstoffes nach intraventrikulärer FS-Injektion in den CSF des rechten Vorderhorns 10-20 Minuten nach Injektion.

E1: Übersicht (coronare Schnitführung) des Großhirns (GH) mit dem injizierten FS im Ventrikelsystem (Injektion in das rechte Vorderhorn, intraventrikulär; lange →) und subarachnoidal (kurze →) (Vergrößerung x1,6). **E2:** Ausschnitt aus E1: FS und Blut im Ventrikelsystem und paraventriculäre Blutgefäße mit FS in ihren Gefäßwänden (→) (Vergrößerung x10). **E3:** Stichkanal (S) rechts frontal in Projektion auf das Vorderhorn mit FS im Ventrikelsystem (*) und in kleinen Gefäßwänden subarachnoidal (→) (Vergrößerung x5). **E4:** Corpus callosum (CC) mit darunter liegendem FS-enhaltendem (*) dritten Ventrikel (Vergrößerung x10). **E5:** Im Lumen des Zentralkanal (ZK) der unteren Medulla oblongata lokalisierter FS (→) im Übergang zum Rückenmark (RM) (Vergrößerung x40). **E6:** Basal und zwischen den Hemisphären liegender FS subarachnoidal (→) am Hirnrand und in Blutgefäßwänden. Der FS zieht in das Epineurium des N. opticus (N.II) und zur Nase (Vergrößerung x5).

Abb. 7 (E7-E12): Verlauf des Farbstoffes nach intraventrikulärer FS-Injektion in den CSF des rechten Vorderhorns nach 10-20 Minuten.

E7: Übersicht vom Großhirn (GH) mit FS (→) in Anteilen des Ventrikelsystems (VS), am basalen Hirnrand subarachnoidal, am Chiasma opticum (ChO) und im Epineurium der Nn. optici (N.II). Die Hypophyse (HY) enthält keinen FS (Vergrößerung x1,6). **E8:** Hirnnerv (HN), am wahrscheinlichsten N. III mit FS (→) im Epineurium in der Nähe der Pons (HS) (Vergrößerung x40). **E9:** Basales, arterielles Hirngefäß mit FS in der Adventitia (kurze →) und am basalen Hirnrand subarachnoidal (lange →) (Vergrößerung x40). **E10:** Der FS (dünne →) zieht von der Frontobasis (FB) zum und am N. olfactorius (N.I) entlang. Eine FS-enhaltende Gefäßwand ist unten rechts im Bild (dicker →) (Vergrößerung x40). **E11:** FS (→) am basalen Hirnrand des Großhirns (GH) subarachnoidal, am Chiasma opticum (ChO) und im Epineurium des Nn. optici (N.II). Die Hypophyse (HY) enthält keinen FS (Vergrößerung x10). **E12:** Übersicht des Auges (A) und des periorbitalen Gewebes 5 Minuten nach FS-Injektion. Der FS (→) verläuft zwischen der Retina (am Stratum pigmentosum entlang) und der Choroidea (Aderhaut) und auch in der vorderen Augenkammer vor der Iris (Regenbogenhaut) entlang. Großhirn (GH), Bulbus olfactorius (BO), Glandula lacrimalis (Glac), Muskulatur (M) (Vergrößerung x1,6).

Abb. 7 (E13-E18): Verlauf des Farbstoffes nach intraventrikulärer FS-Injektion in den CSF des rechten Vorderhorns nach 10-20 Minuten.

E13: Übersicht über die Nase mit den Bulbi olfactorii (BO) und Anteilen des Auges (A) einschließlich der Gl. lacrimalis (Glac). Zwischen den Hemisphären, an den Bulbi olfactorii und um den N. opticus (N.II) im Epineurium ist der FS (→) zu erkennen (Vergrößerung x1,6). **E14:** Zwischen den Bulbi olfactorii (BO, kurzer →) und auf der darunter liegenden Frontobasis (FB) entlang ziehender FS (lange →); Fila olfactoria (FO) (Vergrößerung x10). **E15:** Ausschnitt aus E14: Zwischen den Bulbi olfactorii (BO) und auf der darunter liegenden Frontobasis (FB) entlang ziehender FS (→) (Vergrößerung x40). **E16:** Zwischen Bulbus olfactorius (BO) und der Frontobasis (FB) liegendes Blutgefäß (BluG) mit FS (lange →) in Gefäßwandnähe und in darunter liegenden Lymphgefäßen (kurze →) (Vergrößerung x40). **E17:** Der FS (→) liegt in der Gefäßwand eines kleinen Blutgefäßes zwischen den Bulbi olfactorii (BO) (Vergrößerung x40). **E18:** Der FS (*) liegt zwischen den Neuronen des Bulbus olfactorius (BO) (Vergrößerung x40).

Abb. 7 (E19-E24): Verlauf des Farbstoffes nach intraventrikulärer FS-Injektion in den CSF des rechten Vorderhorns nach 5-10 Minuten.

E19: Am Rand des Bulbus olfactorius (BO, lange →) und in den Gefäßwänden der Vasa vasorum liegender FS (kurze →) (Vergrößerung x40). **E20:** Der FS (→) verläuft in Gefäßwänden der nasalen Mukosa zwischen dieser und dem darunter liegenden Knorpel. Nach Injektion des FS in den CSF ist dort deutlich mehr FS zu erkennen als nach nasaler FS-Injektion (Vergrößerung x20). **E21:** Makrophagen (→) mit phagozytiertem FS im peripheren Bindegewebe (BG). Der FS liegt um den Zellkern verteilt. Braunes Fettgewebe (bFG) (Vergrößerung x40). **E22:** Zwischen der Arteria carotis und einem benachbarten Lymphknoten liegt der FS (→) in zwei kleinen Lymphgefäßen (Vergrößerung x40). **E23:** In einer Gefäßnervenstraße (o) des Halses ist der FS (→) unterhalb der Nerven- und Blutgefäßbahnen in lymphatischen Gefäßen zu sehen (Vergrößerung x10). **E24:** Ausschnitt aus E23: In der Nachbarschaft venöser Blutgefäße (V) befindet sich der FS (→) in einem Lymphgefäß (Vergrößerung x40).

Abb. 7 (E25-E28): Verlauf des Farbstoffes nach intraventrikulärer FS-Injektion in den CSF des rechten Vorderhorns nach 10-20 Minuten.

E25: Zwei tiefe Hals-Lymphknoten, die zwischen der zervikalen Muskulatur (M) und dem braunen Fettgewebe (bFG) liegen, haben den FS insbesondere im Randbereich (LK1), aber teilweise auch im LK-Zentrum des (LK2) aufgenommen (Vergrößerung x5). **E26:** Im Rand des superfiziellen zervikalen Lymphknotens haben wenige Makrophagen den FS phagozytiert (→) (Vergrößerung x40). **E27:** Makrophagen (→) im Bindegewebe um einen oberflächlichen Lymphknoten (Vergrößerung x40). **E28:** FS (→) im Rand eines superfiziellen zervikalen Lymphknotens (LK) (Vergrößerung x40).

Abb. 7 (E29): FS-Akkumulation tiefer Halslymphknoten 2 Min nach Injektion in den CSF.

E29: Ein tiefer Halslymphknoten (LK3) zeigt eine deutliche FS-Aufnahme (→) subkapsulär im Lymphknotenrand, während in einem weiteren, dazu benachbarten tiefen zervikalen Lymphknoten (LK4) keinerlei FS-Aufnahme zu verzeichnen ist.

3.2.3 Versuchsgruppe Hypophyse

3.2.3.1 Injektionsort Hypophyse: 5 Minuten

In den superfizialen und den tiefen zervikalen Lymphknoten konnte weder in den subkapsulär gelegenen Randbereichen noch in den zentralen Regionen des Lymphgewebes zellulär aufgenommener oder freier FS detektiert werden.

Das Großhirn zeigte FS an den basalen, kranialen und teilweise auch lateralen Konvexitäten und in den Gefäßwänden dort lokalisierter kleiner Arterien und Venen (Score 1-2). In einer Maus war auch etwas FS im Ventrikelsystem vorzufinden (Score 1-2), der aber vermutlich injektionsbedingt dort hineingelangt war und nicht über hypophysäre Abflusswege. Einmalig konnte auch wenig FS in wenigen Gefäßwänden zwischen den Gyri des Kleinhirns beobachtet werden (Score 1-2).

Grafik 9: Auftreten des Farbstoffes 5 Minuten nach der FS-Injektion in die Hypophyse.

Freier, nicht zellulär gebundener FS war an den basalen und teilweise kranialen Hirnrändern von Groß- und Kleinhirn im Subarachnoidalraum nachzuweisen. Wenig FS befand sich oberhalb der Lamina cribriformis und zog von dort über die Blutgefäßwände kleinerer Arterien und Venen weiter zur Nase. In der Kapsel der Hypophyse war wenig extrazellulärer FS vorwiegend an den Rändern des adenohipophysären Anteils zu sehen.

In den superfizialen und tiefen, zervikalen Lymphknoten war kein FS zu beobachten gewesen. FS-phagozytierende Makrophagen konnten nicht beobachtet werden.

In einem Block war sehr wenig FS oberhalb der Nase in Umgebung der Lamina cribriformis innerhalb kleiner Blutgefäßwände zu erkennen (Score 1).

Die Hypophyse zeigte vereinzelt an den Rändern von Adeno- und Neurohypophyse wenig FS, der aber extrazellulär innerhalb der Kapsel der Drüse lag (Score 1-2). Außerdem zeigte sich auch FS am Geweberand um das Infundibulum (Score 1) und im angeschnittenen Stichkanal (Abb. 8 F1).

Die bindegewebigen Anteile wiesen gelegentlich Zelltrümmer auf. Im Bindegewebe und braunen Fettgewebe waren selten an den Präparaträndern nicht zellulär gebundene, FS-ähnliche Partikel (Score 1) zu beobachten. Diese stellten aber eher Artefakte und Zelltrümmer dar.

Auch im Drüsengewebe der angeschnittenen Speicheldrüsen (Glandulae salivariae) war außer wenigen Artefakten kein FS zu beobachten. Im Muskelgewebe konnte kein FS detektiert werden.

Block - Nr.	Inj.-Ort	Gewebe- Exzision	Euthanasie- Zeit (in Min.)	FS-Auftreten (JA = ✔ ; NEIN = ✘); LK-Lage: ✔																																				
				BG	BG u LK	LK-Sinus	LK-Rand	Lage LK superfl.	Lage LK tief	GR/GW basal	GR/GW kranial	GR lateral	ZWIHEM	GE-VS	Hirngewebe	Ce-R	St-R	ZwiCe/St	RM (VS)	pBlug	plymg	NA-Mu	NA-Lymg	NA-Fil	ZwiGE/NA	Gl. lac. intersep	um N. opticus	um/im Auge	Drüse mukös	Drüse serös	um Drüsen-gew	um Muskulatur	FG weiß	FG braun	MAK	AHY	NHY	HYS	Stichkanal	
69	Hypophyse	Alles	5	✔	✘	✘	✘			✘	✔	✔	✘	✔	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✔	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘		
70	Hypophyse	Alles	5	✔	✘	✘	✘			✔	✔	✘	✘	✘	✔	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	
80	Hypophyse	SZL	5	✔	✘	✘	✘			✘	✔	✔	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	
81	Hypophyse	TZL	5	✔	✘	✘	✘			✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	
97	Hypophyse	SZL	5	(✔)	✘	✘	✘			✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	
98	Hypophyse	TZL	5	(✔)	✘	✘	✘			✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	
104	Hypophyse	Hypo- thalamus	5	✘	✘	✘	✘			✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	
105	Hypophyse	Hypophyse	5	✘	✘	✘	✘			✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✘	✔

Tab. 11: Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in die Hypophyse und 5 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Mäuse.

3.2.3.2 Injektionsort Hypophyse: 10 Minuten

In den superfiziellen und tiefen Halslymphknoten konnte kein FS beobachtet werden. Das Gewebe der Lymphknotenränder unterhalb der Kapsel der superfiziellen Lymphknoten war durch Zellüberlagerungen und die teilweise sehr starke HE-Färbung schwer beurteilbar. Ein tiefer zervikaler Lymphknoten enthielt außer einem aufgelagerten, randständigen Artefakt keinen FS. Allerdings waren FS-Partikel im Bindegewebe in der Nähe des kaudalen Randes eines tiefen Lymphknotens (Score 1) zu erkennen. Zwischen einem weiteren tiefen Halslymphknoten und benachbartem Drüsengewebe befanden sich ebenfalls wenige FS-Partikel (Score 1) und wenige Makrophagen, in denen sich phagozytierter FS befand. Im Bindegewebe um die superfiziellen Lymphknoten, um Drüsenanteile und in Blutgefäßnähe waren vereinzelt FS-phagozytierende Makrophagen zu sehen (Score 1).

Grafik 10: Auftreten des Farbstoffes 10 Minuten nach der FS-Injektion in die Hypophyse.

Wenig nicht zellulär gebundener FS befand sich am Rand der Adenohypophyse (rosa). Im Bindegewebe um die tiefen und oberflächlichen Halslymphknoten sowie zwischen Speicheldrüsenläppchen waren wenige Makrophagen zu sehen gewesen, die den FS aufgenommen hatten. In den Lymphknoten selbst war kein FS zu erkennen. Vereinzelt FS-phagozytierende Makrophagen konnten zwischen der Halsmuskulatur und in Blutgefäßnähe beobachtet werden (hellblau).

Im Bindegewebe, das die tiefen Halslymphknoten und die Muskulatur umgab, konnte sehr selten zellulär gebundener, phagozytierter FS gefunden werden.

Zwischen Anteilen der Halsmuskulatur und deren intermuskulären Septen waren Makrophagen mit einem intrazellulären FS-Saum zu erkennen. Teilweise waren interseptal zwischen den Anteilen von mukösem und serösem Speicheldrüsengewebe geringe Mengen von FS (Score 1-2) vorhanden. Im Bindegewebe zwischen dem Drüsen- und Fettgewebe konnten wiederholt Makrophagen mit intrazellulärem FS beobachtet werden (Score 1-2). Der FS befand sich aber wie bisher nur in den Bindegewebssepten zwischen den verschiedenen Geweben, nicht in den Geweben selbst.

Im braunen Fett- und Bindegewebe waren an den Schnittträgern selten extrazelluläre FS-Punkte (Score 1) zu sehen, die eher artifiziell zu beurteilen sind.

Bei den entnommenen Hypophysen konnte einmal im Bereich der Außenkontur der Adenohypophyse etwas FS entdeckt werden, der aber nicht zellulär gebunden war. Auch in Wänden kleiner Blutgefäße innerhalb der Hypophysenkapsel konnte FS beobachtet werden (Score 2). Dabei handelte es sich um Äste der A. hypophysialis inferior, die anschließend weiter in die A. carotis interna drainiert (Abb. 8 F6). Makroskopisch konnte der FS ebenfalls in den A. hypophysialis anterior nachgewiesen werden, der dann weiter in den Arteriae carotides communes verfolgt werden konnte (Abb. 9 G2). Zur Orientierung ist in der Abb. 9 G1 die Injektionsstelle in der Hypophyse in Nachbarschaft zu den Hirnnerven II und V zu erkennen.

Ansonsten konnte kein FS im hypophysären Gewebe oder dessen Umgebung detektiert werden. Da in den Präparaten dieser Mäusegruppe kein Hirngewebe angeschnitten wurde, konnte dieses nicht auf das Auftreten von FS untersucht werden.

Block - Nr.	Inj.-Ort	Gewebe- Exzision	Euthanasie- Zeit (in Min.)	FS-Auftreten (JA = ✓ ; NEIN = ✗); LK-Lage: ✓																																						
				BG	BG u LK	LK-Sinus	LK-Rand	Lage LK superfl.	Lage LK tief	GR/GW basal	GR/GW kranial	GR lateral	ZWIHEM	GE-VS	Hirngewebe	Ce-R	St-R	Zw/Ce/St	RM (VS)	pBlug	plymG	NA-Mu	NA-LymG	NA-Fil	Zw/GE/NA	Gl. lac. Intersep	um N. opticus	um/im Auge	Drüse mukös	Drüse serös	um Drüsengew	um Muskulatur	FG weiß	FG braun	MAK	AHY	NHY	HYS	Stichkanal			
84	Hypophyse	SZL	10	✓	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗		
85	Hypophyse	TZL	10	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	
92	Hypophyse	SZL	10	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	
93	Hypophyse	TZL	10	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	
94	Hypophyse	SZL	10	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	
95	Hypophyse	TZL	10	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	
96	Hypophyse	SZL	10	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	
106	Hypophyse	Hypophyse	10	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	
107	Hypophyse	Hypophyse	10	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗

Tab. 12: Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in die Hypophyse und 10 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Mäuse.

3.2.3.3 Injektionsort Hypophyse: 20 Minuten

Im Bindegewebe und braunen Fettgewebe neben den oberflächlichen Lymphknoten und auch vereinzelt in der bindegewebigen Umgebung um das Drüsengewebe und an den Schnittträgern konnten FS-phagozytierende Makrophagen und fein verteilte FS-Partikel (Score 1-2) identifiziert werden. Selten waren auch im die mukösen und serösen Speicheldrüsenanteile umgebenden Bindegewebe Makrophagen, die den FS intrazellulär aufgenommen hatten, und einige freie FS-Partikel zu detektieren. Vereinzelt waren diese Zellen auch im subkapsulären Randbereich der oberflächlichen, zervikalen Lymphknoten zwischen den Lymphozyten zu beobachten.

Grafik 11: Auftreten des Farbstoffes 20 Minuten nach der FS-Injektion in die Hypophyse.

Wenig nicht zellulär gebundener FS befand sich an den Rändern von Adeno- und Neurohypophyse (rosa).

Im Bindegewebe um die tiefen und oberflächlichen Halslymphknoten und um Speicheldrüsenengewebe waren vereinzelt FS-phagozytierende Makrophagen zu sehen gewesen. In den Lymphknoten selbst war nur zellulär gebundener FS in den superfizial liegenden Halslymphknoten zu sehen, in den tiefen zervikalen Lymphknoten konnten keine FS-haltigen Makrophagen beobachtet werden (hellblau).

Die tiefen Halslymphknoten, die teils sehr dunkel gefärbt waren und viele Zellüberlagerungen aufwiesen, zeigten keinen extra- oder intrazellulär aufgenommenen FS auf. Einmal waren minimale, wahrscheinlich lediglich artifizielle FS-Spuren im Bindegewebe neben dem Rand eines tiefen, zervikalen Lymphknotens zu erkennen. Zwischen einigen tiefen Halslymphknoten war manchmal etwas FS im Bindegewebe sichtbar. Daneben waren auch gelegentlich Makrophagen, die den FS phagozytiert hatten, im perilymphatischen Gewebe um die tiefen Lymphknoten zu sehen.

In den Anteilen der angeschnittenen Muskulatur und des mukösen und serösen Drüsengewebes war kein FS zu beobachten.

Das umgebende Binde- und braune Fettgewebe wies nur ab und zu feine schwarze FS-Punkte an den Rändern der Gewebeanschnitte auf (überwiegend Score 1). Teilweise handelte es sich bei den punktuellen vermeintlichen FS-Spuren auch um zertrümmerte Zellreste. Im Halsmuskulgewebe konnte kein FS beobachtet werden.

Im Bindegewebe konnten gelegentlich Makrophagen, meistens in der Nähe von zervikalen Lymphknoten, registriert werden.

Die Hypophysen zeigten zum Teil FS an den peripher liegenden Gewebeanteilen der Adenohypophyse, der extrazellulär dem Gewebe von außen anlag (Score 1-2, Abb. 8 F4 und F5). Die Neurohypophyse war in den Präparaten zum Teil sehr stark angefärbt (Score 3) und kaum beurteilbar. Ansonsten zeigte sich dort aber ebenfalls überwiegend FS an den äußeren Geweberändern, zum Teil auch am Infundibulum (Score 1-2). Daneben war der Stichtkanal bei einigen entnommenen Geweben eindeutig zu erkennen, von dem der FS teilweise etwas in das hypophysäre Gewebe zog (Abb. 8 F2 und F3). Auch hier war wieder in den Wänden kleiner Blutgefäße nahe der Hypophysenkapsel und kleinen Ästen der A. hypophysialis inferior FS zu detektieren gewesen. Vereinzelt waren FS-Partikel im Bereich unterhalb der Kapsel der Adenohypophyse zu sehen, die möglicherweise auch zellulär gebunden waren. Dies konnte jedoch nicht eindeutig bestimmt werden.

In den Versuchstieren dieser Gruppe war vergleichsweise wenig FS nachzuverfolgen.

Im weißen und braunen Fettgewebe, den Muskulatur- und Drüsenanteilen konnte keine FS - Aufnahme ermittelt werden.

Block - Nr.	Inj.-Ort	Gewebe- Exzision	Euthanasie- Zeit (in Min.)	FS-Auftreten (JA = ✓ ; NEIN = ✗); LK-Lage: ✓																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
				BG	BG u LK	LK-Sinus	LK-Rand	Lage LK superfl.	Lage LK tief	GR/GW basal	GR/GW kranial	GR lateral	ZWIHEM	GE-VS	Hirngewebe	Ce-R	St-R	Zw/Ce/St	pBlug	plymg	NA-Mu	NA-Lymg	NA-Fl	ZwIGE/NA	Gl. lac. intersep	um N. opticus	um/im Auge	Drüse mukös	Drüse serös	um Drüsen-gew	um Muskulatur	FG weiß	FG braun	MAK	AHY	NHY	HYS	Stichkanal																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
71	Hypophyse	Alles	20	✓	✗	✗	✗			✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	

Tab. 13: Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in die Hypophyse und 20 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Mäuse.

3.2.3.4 Injektionsort Hypophyse: 30 Minuten

Auch nach 30 Minuten war nicht immer FS in den superfizialen und tiefen zervikalen Lymphknoten detektierbar. Vereinzelt konnte FS innerhalb von Makrophagen im Bindegewebe um die tiefen und oberflächlichen Halslymphknoten beobachtet werden, in den Lymphknoten selbst waren jedoch nicht immer FS-enthaltende Makrophagen erkennbar. In einem Block waren wenige FS-phagozytierende Makrophagen in den Lymphknotenrändern superfizialer Lymphknoten zu beobachten, die zwischen den subkapsulären Lymphozyten lokalisiert waren (Score 1-2). Kleine Lymphgefäße in der Nähe der superfiziellen Lymphknoten wiesen gelegentlich geringe FS-Mengen auf (Score 1-2).

Tiefer liegende Lymphknoten, die rechts und links paratracheal lokalisiert waren, zeigten durch Makrophagen aufgenommenen FS im peripher liegenden lymphatischen Gewebe der Lymphknoten. Dabei zeigte sich in den weiter kranial liegenden Lymphknoten mehr FS im subkapsulären Gewebe als in den weiter kaudal befindlichen Lymphknoten. Auch nahe der Schädelbasis gelegene kranijuguläre Lymphknoten wiesen einen feinen Saum von Makrophagen mit phagozytiertem FS im Lymphknotenrand zwischen den dort befindlichen Lymphozyten auf (Score 1, Abb. 8 F10). In den superfizialen zervikalen Lymphknoten war häufiger FS zu sehen als in den tiefen Halslymphknoten. Bis der FS von der Hypophyse an andere Orte im Körper gelangt, dauert es relativ lange. So ist 30 Min. nach der Injektion des FS erst der Drainageweg über die Nase genauer nachzuverfolgen. Nach 20 Minuten war noch kaum FS in den zervikalen Lymphknoten zu detektieren, jedoch waren gelegentlich FS-haltige Makrophagen im Bindegewebe um die vorwiegend oberflächlichen, zervikalen Lymphknoten und zwischen Fett- und Drüsengewebe zu erkennen.

An der basalen Kontur des Großhirns und in dort liegenden Blutgefäßwänden der Meningen war an wenigen Stellen FS zu sehen gewesen, der sich injektionsbedingt bis dorthin ausgebreitet hatte (Score 1-2). In oder um die Hypophyse selbst war kein FS zu beobachten. Womöglich war dieser schon größtenteils abgeflossen bzw. abtransportiert. Einmal lag wenig FS im Ventrikellumen vor sowie im Subarachnoidalraum in der Nähe des Hirnstamms, der aber sehr wahrscheinlich durch die stereotaktisch durchgeführte Injektion dort hineingelangt war.

In einigen Blöcken war sehr gut zu erkennen, dass auch die Hypophyse einen Drainageweg über die Nase nutzt. So zog der FS vom Bulbus olfactorius und benachbarten kleinen Blutgefäßwänden weiter über die Lamina cribiformis zur Nase (Score 1-2, Abb. 8 F7). In manchen Präparaten war gut zu sehen, dass der FS entlang der Schädelbasis in

Blutgefäßwänden zur Nase lief. Dort war er dann weiter über das Septum und die Nasenmuscheln in kleinen lymphatischen Gefäßen innerhalb der nasalen Mukosa zu verfolgen (Score 1). Dabei befanden sich die lymphatischen Gefäße zwischen dem nasalen Skelett und der aufliegenden Mukosa (Abb. 8 F8).

In Lymphgefäßen, die sich um die Nasenhöhle befanden, waren vereinzelt kleine FS-Punkte im Lumen dieser Gefäße zu sehen.

Selten war etwas FS in der Höhe von Ösophagus und Trachea zu erkennen, der vermutlich ebenfalls über kleine Lymphwege dort hingelangt war (Score 1).

Gelegentlich konnte zwischen Muskel- und Drüsengewebe in den Septen etwas FS gefunden werden (Score 1-2), ein mal auch in der Nähe eines muskelbegleitenden Blutgefäßes. Im Bindegewebe am Präparatrand gab es FS-Partikel, die aber eher artifiziell zu interpretieren waren. In der Muskulatur, den Knochen- und Knorpelanteilen des Schädels und der

Grafik 12: Auftreten des Farbstoffes 30 Minuten nach der FS-Injektion in die Hypophyse.

Wenig freier, nicht zellulär gebundener FS befand sich an den basalen Rändern von Groß- und Stammhirn. Dieser zog über den Bulbus olfactorius, entlang der Schädelbasis und dort benachbarten arteriellen und venösen Blutgefäßwänden zur Nase in lymphatische Gefäße der nasalen Mukosa. Vereinzelt waren auch kleine Lymphgefäße in der Nähe der zervikalen Lymphknoten und des Ösophagus zu beobachten, die etwas FS in ihren Lumina führten (rosa). Im Bindegewebe um die tiefen und oberflächlichen Halslymphknoten sowie in den Randbereichen dieser Lymphknoten sind vereinzelt FS-phagozytierende Makrophagen zu sehen gewesen (hellblau).

Halswirbelsäule, im Drüsengewebe, der Gl. thyroidea, im Hirngewebe, um die Trachea, um das Auge und im Fettgewebe konnte kein FS nachgewiesen werden.

Grafik 13: Vergleich des FS-Auftretens nach 5, 10, 20 und 30 Minuten nach der FS-Injektion in die Hypophyse.

Nach 5 Min (grün): FS konnte an den basalen und teilweise kranialen Konvexitäten und dortigen arteriellen und venösen Blutgefäßwänden des Großhirns detektiert werden. Wenig FS befand sich auch oberhalb der Lamina cribiformis in der Nähe des Bulbus olfactorius. Die Hypophyse wies vereinzelt an ihren Randbereichen extrazellulär lokalisierten FS auf. In den zervikalen Lymphknoten war noch kein FS zu sehen. FS-haltige Makrophagen konnten nicht nachgewiesen werden.

10 Min (rosa): Zusätzlich traten nun FS-aufnehmende Makrophagen im Bindegewebe um Speicheldrüsen, zervikale Lymphknoten und vereinzelt zwischen der Halsmuskulatur auf. In den Lymphknoten selbst war jedoch noch immer kein FS zu beobachten.

20 Min (hellblau): Nach diesem Intervall konnte der FS neben den bereits beschriebenen Lokalisationen sehr schön in den arteriellen Wänden der Aa. hypophyseales inferiores kaudal der Hypophyse verfolgt werden (hier nicht eingezeichnet).

30 Minuten (gelb): In der Gruppe mit der längsten FS-Verweildauer vor der Euthanasie wurde der Drainagemechanismus der Hypophyse über die Nase deutlich. Dabei war der FS vom Bulbus olfactorius aus entlang der Schädelbasis und angrenzenden Blutgefäßwänden dort lokalisierter Arterien und Venen zu beobachten, der sich dann weiter in kleinen Lymphgefäßen der Nasenschleimhaut verfolgen ließ. Die lymphatischen Gefäße befanden sich zwischen dem knorpeligen Nasenskelett und der aufliegenden Mukosa. Auch in Lymphgefäßen, die im Bindegewebe um die Nasenhöhle lagen, konnte etwas FS gefunden werden. In den zervikalen Lymphknoten konnten nun auch FS-phagozytierende Makrophagen zwischen den randständigen Lymphozyten beobachtet werden, wobei die oberflächlichen zervikalen Lymphknoten mehr FS aufwiesen als die tiefen Halslymphknoten. In den paratracheal und unterhalb der Schädelbasis lokalisierten Lymphknoten war ebenfalls FS vorzufinden. Selten waren auch kleine Lymphgefäße zwischen der Halsmuskulatur zu sehen gewesen.

Block - Nr.	Inj.-Ort	Gewebe- Exzision	Euthanasie- Zeit (in Min.)	FS-Auftreten (JA = ✓ ; NEIN = ✗); LK-Lage: ✓																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
				BG	BG u LK	LK-Sinus	LK-Rand	Lage LK superfl.	Lage LK tief	GR/GW basal	GR/GW kranial	GR lateral	ZWIHEM	GE-VS	Hirngewebe	Ce-R	St-R	ZwiCe/St	RM (VS)	pblug	plymg	NA-Mu	NA-Lymg	NA-FII	ZwiGE/NA	Gl. lac. intersep	um N. opticus	um/im Auge	Drüse mukös	Drüse serös	um Drüsengew	um Muskulatur	FG weiß	FG braun	MAK	AHY	NHY	HYS	Stichkanal																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
55	Hypophyse	Alles	30	✓	✓	✗	✓	✗/✗/✗	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
56	Hypophyse	Alles	30	✓	✗	✗	✗	✗/✗/✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
57	Hypophyse	Alles	30	✓	✓	✗	✓	✗	✗	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
58	Hypophyse	Alles	30	✓	✗	✗	✓	✗/✗/✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
59	Hypophyse	Alles	30	✓	✓	✗	✗	✗/✗/✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗

Tab. 14: Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in die Hypophyse und 30 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Mäuse.

Fotosequenz: Farbstoffverlauf nach FS-Injektion in die Hypophyse

Abb. 8 (F1): Verlauf des Farbstoffes nach stereotaktischer FS-Injektion in die Hypophyse nach 5 Minuten.

F1: Übersicht über die Hypophyse mit stereotaktisch herbeigeführtem, Blut und FS enthaltendem Stichkanal (→) im HVL (Vergrößerung x10).

Abb. 8 (F2-F6): Verlauf des Farbstoffes nach stereotaktischer FS-Injektion in die Hypophyse nach 10 bis 20 Minuten.

F2: Anschnitt der Adenohypophyse mit extrazellulärem FS im Stichkanal (lange →) und interzellulärem FS in der Pars intermedia (kurzer →) (Vergrößerung x10). **F3:** Ausschnitt aus F2: Vergrößerung des Stichkanals in der Adenohypophyse mit extra-zellulärem FS (→) (Vergrößerung x40). **F4:** Extrazellulärer FS im Gewebe der Adenohypophyse (→) (Vergrößerung x40). **F5:** Am Geweberand der Adenohypophyse schnurartig angesamelter FS zwischen Adenohypophyse und Pars intermedia (lange →) und einzelne freie FS-Partikel (kurze →) (Vergrößerung x40). **F6:** Anteil des Hypophysenvorderlappens (AHY) mit FS (→) am Rand, der zu einem arteriellen Blutgefäß (Art) aus der A. hypophysealis inferior (aus der A. carotis interna) und zum Teil an dessen Gefäßwand entlang zieht (Vergrößerung x20).

Abb. 8 (F7-F10): Verlauf des Farbstoffes nach stereotaktischer FS-Injektion in die Hypophyse nach 20-30 Minuten.

F7: Der FS (→) zieht zwischen und am Bulbus olfactorius (BO) innerhalb von Gefäßwänden der Blutgefäße in Richtung Nase (Na); Nasenseptum (Sep), Conchae (Co) (Vergrößerung x2,5). **F8:** FS (→) in Lymphgefäßen der nasalen Mukosa 30 Minuten nach Injektion des FS in die Hypophyse (Vergrößerung x40). **F9:** Zelle Nervenfaszikel (*) mit eingeschlossenen FS-Partikeln (→) neben einem superfizialen zervikalen Lymphknoten (LK) im umgebenden Bindegewebe 20 Minuten nach FS-Injektion in die Hypophyse (BG) (Vergrößerung x40). **F10:** Wenig FS (→) im Rand eines tiefen zervikalen Lymphknotens (LK) 30 Minuten nach FS-Injektion in die Hypophyse; Muskulatur (M), braunes Fettgewebe (bFG) (Vergrößerung x10).

Abb. 9 (G1/G2): FS-Verteilung nach stereotaktischer Injektion in die Hypophyse nach 10 Minuten.

G1: Zu erkennen ist neben den Hirnnerven II und V die Injektionsstelle in der Hypophyse (langer →); N.II = N. opticus, N.V = N. trigeminus. **G2:** Der FS verläuft in der A. hypophysealis inferior (kurze →) über den perivaskulären Raum weiter zur A. carotis interna.

3.3 Anatomische und zeitliche Unterscheidung zwischen den Abflusswegen

Nase 5 Min.

Die Tiere dieser Gruppe wurden 5 Minuten nach der FS-Injektion in die Nase euthanasiert. Der FS war nach 5 Minuten Verweildauer noch überwiegend im Lumen der Nase zu sehen. Dabei war er der nasalen Mukosa größtenteils aufgelagert und teilweise etwas in die oberflächliche Nasenschleimhaut gezogen. Am Bulbus olfactorius befand sich kein FS. Lymphgefäße in der nasalen Schleimhaut hatten den FS nicht aufgenommen.

Bis in die superfizialen und tiefen Lymphknoten war kein FS gelangt, jedoch im Bindegewebe um die Lymphknoten und zwischen der Halsmuskulatur waren vereinzelt FS-enhaltende Makrophagen zu sehen. Es war ein deutlicher FS-Saum um die Zellkerne dieser Zellen erkennbar.

Nase 10 Min.

Auch nach 10 Minuten befand sich der Großteil des injizierten FS im Lumen der Nasenhöhle. Im tieferen Gewebe der nasalen Mukosa ist selten FS in Makrophagen zu sehen, die diesen aufzunehmen scheinen. Der FS war nicht bis in die superfizialen und tiefen zervikalen Lymphknoten gelangt und auch Makrophagen mit intrazellulärem FS fehlten in der Umgebung um die Lymphknoten. In der Nähe von Speicheldrüsengewebe sowie selten im Bindegewebe zwischen der zervikalen Muskulatur konnten hingegen vereinzelt FS-phagozytierende Makrophagen detektiert werden. Oberhalb des Gaumens waren vereinzelt kleine, nicht zellulär gebundene FS-Partikel sichtbar.

Nach 5 und auch nach 10 Minuten gibt es keine Hinweise, dass über die Nase FS bzw. Substanzen auf passivem Weg über die lymphatischen Gefäße der Nasenmukosa in die Peripherie zu den Halslymphknoten gelangen können, um dort dem Immunsystem präsentiert werden zu können. Jedoch könnte es sein, dass der FS durch Makrophagen in der nasalen Mukosa aufgenommen wird. Solche FS-Partikel enthaltenden Fresszellen waren vereinzelt in der Nähe der zervikalen Lymphknoten und der Halsmuskulatur vorzufinden, jedoch (noch) nicht im Gewebe der superfizialen und tiefen Lymphknoten selbst.

CSF 2 Min.

2 Minuten nach der Injektion des FS in den CSF war der FS sowohl in die beiden Seitenventrikel als auch in den dritten und vierten Ventrikel gelangt und hatte sich über den CSF im Ventrikelsystem verteilt. Der in den Ventrikeln lokalisierte Plexus choroideus mit seinen Ependymzotten hatte jedoch keinen FS aufgenommen. Ventrikelnahе kleine Arterien und Venen enthielten teilweise FS in ihren Gefäßwänden. Der FS war anschließend im basalen, meningealen Bindegewebe und darin liegenden, arteriellen und venösen Blutgefäßwänden zu erkennen, deren Gefäßverlauf auch vereinzelt im Hirngewebe verfolgt werden konnte. Teilweise war der FS auch entlang der Meningen und vereinzelt Gefäßwänden und entlang der Fissura longitudinalis zwischen einzelne Großhirnanteile gezogen, die durch die bindegewebigen Hirnhäute voneinander getrennt wurden. Das Hirnparenchym selbst enthielt keinen zellulär gebundenen oder freien FS. Auch in das meningeale Gewebe und kleine Gefäßwände um das Cerebellum und das Stammhirn war vereinzelt FS gelangt.

In den Gefäßwänden der Vertebralarterien konnte ebenfalls FS in der Adventitia beobachtet werden. Bei den kleineren Gefäßen war eine Differenzierung der Wandschichten meistens nicht möglich.

Extrakraniell war nur vereinzelt und mengenmäßig wenig FS in der Nähe der Lymphknoten im diese umgebenden Bindegewebe und kleinen Lymphgefäßen zu sehen. Vereinzelt war auch FS in lymphatischen Gefäßen und phagozytierenden Makrophagen im Bindegewebe in der Nähe der Gefäßnervenscheide des Halses zu finden. Die Carotis-Gefäße enthielten keinen FS in ihren Wänden. Einmalig war eine FS-phagozytierende Zelle neben einem tiefen zervikalen Lymphknoten zu beobachten. Zum Teil war der FS nach 2 Minuten auch in die subkapsulären Randbereiche der tiefen Halsymphknoten gelangt, einschließlich weniger Lymphsinus. Der FS befand sich intrazellulär von Makrophagen, die zwischen den subkapsulär angeordneten Lymphozyten erkennbar waren. Jedoch waren diese Zellen nicht in allen tiefen zervikalen Lymphknoten zu detektieren.

Die superfizialen Lymphknoten hatten 2 Minuten nach der Injektion noch keinen FS aufgenommen. In die Abflusswege der Nase war ebenfalls kein FS abgeflossen oder durch Makrophagen aufgenommen.

CSF 5 Min.

Nach 5 Minuten konnte der FS außerdem zwischen Neuronen des Bulbus olfactorius in der Nähe der Lamina cribrosa und in den Lumina lymphatischer Gefäße der nasalen Mukosa verfolgt werden.

Bis in die tiefen paratrachealen und paraösophagealen Lymphknoten war kein FS gelangt. Selten waren in der Nähe des Ösophagus und zwischen den zervikalen Gewebeschichten FS-enhaltende Makrophagen zu sehen.

An der kranialen Hirnkonvexität war nur sehr wenig FS in den Meningen und darin enthaltenden Gefäßwänden aufgenommen worden. Es war kein FS in die Hypophyse abgeflossen.

CSF 10 Min.

Nach 10 Minuten war der FS auch bis in die meisten superfizialen Halslymphknoten im peripheren Lymphknotengewebe und in die Lymphsinus gelangt. Die tiefen Lymphknoten enthielten jedoch deutlich mehr FS, sowohl subkapsulär als auch in den Sinus. Im randständigen Lymphknotengewebe konnte der FS vor allem intrazellulär in Makrophagen registriert werden, die zwischen den Lymphozyten platziert waren. Im perilymphatischen Gewebe der vorwiegend tiefen zervikalen Lymphknoten konnte zellulärer FS beobachtet werden, ebenso wie in der Nähe der großen Halsgefäße. Auch im Bindegewebe um die Nasenhöhle und über dem harten Gaumen konnten einige FS-phagozytierende Makrophagen gefunden werden.

Nach 10 Minuten befand sich an der kranialen Konvexität des Großhirns und zwischen den Hemisphären vermehrt FS sowie ebenfalls im basalen Subarachnoidalraum der Schädelbasis und darin befindlichen Gefäßwänden von Arterien und Venen. Die laterale Außenkotur des Großhirns zeigte nur wenig FS in den Wänden subarachnoidaler, arterieller und venöser Blutgefäße. Zwischen den Kleinhirngyri konnte gelegentlich FS in den dazwischen liegenden Hirnhäuten und Gefäßwänden beobachtet werden. Neben den lymphatischen Gefäßen der Nase, die zwischen Mukosa und knorpeligem Nasenskelett lagen, waren auch wenige Lymphgefäße in der Gl. parotis zu erkennen, in deren Lumina FS zu sehen war. Vereinzelt waren nach der Verweildauer des FS von 10 Minuten FS-phagozytierende Makrophagen über der Basis cranii, in der Nähe der Lamina cribrosa und auch teilweise FS in dort ansässigen arteriellen und venösen Blutgefäßwänden zu sehen.

Der FS zog über das hirneigene Ventrikelsystem weiter bis in den Zentralkanal des Rückenmarks.

Der FS zog im Subarachnoidalraum der zervikalen Spinalnerven und des N. opticus entlang. Im Gewebe und Blutgefäßwänden in und um die Hypophyse war kein FS nachweisbar.

CSF 20 Min.

20 Minuten nach der FS-Injektion lag an der kranialen Kontur des Großhirns und zwischen den Hirnhemisphären bereits wieder weniger FS vor. Innerhalb der basalen Meningen und darin liegenden Gefäßwänden war der meiste FS zu beobachten. Der FS zog von den Bulbi olfactorii innerhalb von Blutgefäßwänden und Lymphgefäßen weiter zur Nase über Lymphgefäße in die nasale Mukosa. Auch in den Conchae nasales und im kranial gelegenen Bindegewebe um die Nasenhöhle konnten FS-führende Lymphgefäße entdeckt werden. Nasal konnte nicht bei allen Mäusen FS gefunden werden (z.B. nicht bei Maus 35). Die tiefen Lymphknoten enthielten immer noch viel zellulär gebundenen FS im subkapsulären Randgewebe und freien FS in den Lymphsinus. In den kranialer gelegenen Lymphknoten war mehr FS zu sehen als in den weiter kaudal liegenden.

In den paratrachealen Lymphknoten hatte sich nach 20 Minuten nun auch teilweise FS angesammelt. Periphere kleine Lymphgefäße und Makrophagen mit phagozytiertem FS waren selten im Bindegewebe um die Halsmuskulatur und die tiefen und paratrachealen Lymphknoten zu sehen. Freie kleine FS-Partikel konnten selten im Bindegewebe um die Trachea und den Ösophagus registriert werden. Im Subarachnoidalraum aus dem Stammhirn austretender Hirnnerven und um darin liegende, einzelne Nervenzellen konnte vereinzelt FS detektiert werden.

Das hypophysäre Gewebe und dessen Umgebung wies keine FS-Akkumulation auf.

Innerhalb des Auges konnte 20 Minuten nach der Injektion der FS zwischen der Retina und der Choroidea verfolgt werden, der bis in die vordere Augenkammer an der Außenseite der Iris entlang zog.

Hypophyse 5 Min.

Der FS wurde stereotaktisch in die Hypophyse injiziert und konnte 5 Minuten nach der Injektion noch nicht in den superfizialen und tiefen Halslymphknoten beobachtet werden.

Auch in anderen Geweben wie der Muskulatur oder Drüsenanteilen konnte kein freier oder zellulärer FS nachgewiesen werden.

Hypophyse 10 Min.

Nach 10 Minuten zeigten sowohl die superfizialen als auch die tiefen zervikalen Lymphknoten noch keine Aufnahme des FS. Jedoch waren vereinzelt Makrophagen im Bindegewebe um die superfizialen und tiefen Halslymphknoten, um Drüsenanteile und in der Nähe von peripheren Arterien und Venen zu sehen. Diese hatten den FS intrazellulär angereichert.

Hypophyse 20 Min.

Auch nach 20 Minuten war kaum FS zu sehen. Ähnlich wie in den Mäusen der 10 Minuten-Gruppe waren im Bindegewebe, gelegentlich auch im braunen Fettgewebe und um die oberflächlichen und tiefen zervikalen Lymphknoten ab und zu Makrophagen zu erkennen, die den FS phagozytiert hatten. Die superfizialen Lymphknoten wiesen äußerst selten durch Makrophagen intrazellulär gesammelten FS auf, wobei diese Zellen im randständigen Lymphknotengewebe zwischen den Lymphozyten lokalisiert waren. Die tiefen zervikalen Lymphknoten enthielten keinen FS.

Hypophyse 30 Min.

Der FS lief entlang der Basis cranii in dort ortsständigen Blutgefäßwänden zur Nase und dort, wenn auch nicht viel, weiter in Lymphgefäßen in der nasalen Mukosa.

Auch 30 Minuten nach der FS-Injektion war in den tiefen zervikalen, den paratrachealen und paraoesophagealen Lymphknoten meistens kein FS nachzuweisen. Jedoch konnten Makrophagen im Bindegewebe um diese Lymphknoten und zwischen Fett- und Drüsengewebe detektiert werden. In den tiefen Lymphknoten in der Nähe der Schädelbasis (hinter der Trachea und dem Ösophagus) waren an einzelnen Stellen ebenfalls wenige Makrophagen mit intrazellulärem FS in das periphere Lymphknotengewebe eingewandert. Selten waren auch in die oberflächlich angelegten, lateralen Halslymphknoten FS-haltige Makrophagen in das subkapsuläre Gewebe im Lymphknotenrand gelangt.

4. Diskussion

4.1 Die anatomischen Abflusswege

4.1.1 Abflusswege des ZNS

Das Gehirn besitzt im Vergleich zum übrigen Körper keine klassischen Lymphgefäße, die einen Abfluss von Flüssigkeit und Stoffen aus dem Gewebe ermöglichen. Jedoch können auch Substanzen, die im CSF und ISF gelöst sind, über Mechanismen aus dem cerebralen und cerebellaren Gewebe eliminiert werden, die einer Lymphdrainage ähneln. So gibt es verschiedene Drainagewege, die das Gehirn nutzt und auch die Hypophyse scheint eine Art „lymphatischen“ Abflussweg zu nutzen.

Die dynamische und histologische Analyse der lymphatischen Drainage des CSF, der Hypophyse und der Nase in der Maus ergab dabei unterschiedliche Wege. Diese unterscheiden sich sowohl zeitlich als auch anatomisch voneinander.

Die Auffassung, dass eine Verbindung des CSF zu den extrakranialen Lymphbahnen, sowohl über die Nase als auch entlang von Blutgefäßen besteht, ist nicht neu.

Der CSF drainierte insbesondere entlang der größeren hirnversorgenden Arterien wie der A. cerebri media und der A. carotis vorwiegend in die tiefen Lymphknoten des Halses. Der Abfluss erfolgte hierbei innerhalb der Gefäßwände sowie paravaskulär innerhalb von 3-7 Minuten relativ schnell. Weiterhin konnte eine verzögerte Ableitung des CSF entlang des Bulbus olfactorius nachvollzogen werden. Diese war durch die Lamina cribriformis entlang den Fila olfactoria bis in lymphatische Gefäße der nasalen Mukosa nachzuverfolgen. In Abb. 10 H5 ist neben den angefärbten Vasa vasorum der kortikalen Blutgefäße schön zu erkennen, dass sich der FS vorwiegend an den Bulbi olfactorii und innerhalb der Cisterna magna anreichert. Dieser langsamere, nasale Drainageweg des CSF (19-29 Min.) endete in den superfizialen Halslymphknoten. Zu einem geringen Anteil erfolgte auch ein Abfluss des CSF über den Subarachnoidalraum des N. opticus bis in den Bulbus oculi zwischen Retina und Choroidea. Eine ältere Studie von CSERR und KNOPF (1992) wiederum geht auch von einer Drainage des N. opticus zu den Halslymphknoten aus, ohne eine Differenzierung in tiefe und oberflächliche Lymphstationen vorzunehmen.

Abb. 10 (H5): FS-Verteilung nach CSF-Injektion und Euthanasie nach 5 Minuten.

H5: Ansicht von kranial 5 Minuten nach der Injektion in den CSF. Die Schädelkalotte wurde entfernt.

Am Schnittpunkt der Sutura coronalis und der Sutura sagittalis (Bregma; langer →) wurde der FS über die rechte Hirnhemisphäre in den rechten Seitenventrikel und den darin enthaltenen CSF injiziert.

Der FS sammelt sich vorwiegend an den Bulbi olfactorii und im Bereich zwischen dem Okzipitallappen des Großhirns und dem Kleinhirn (Tentorium cerebelli). Auch die Vasa vasorum der kortikalen Blutgefäße (kurze →) führen FS.

CSERR und KNOPF (1992) konnten neben der nasalen Drainage des CSF bereits einen subarachnoidalen Abflussweg des CSF entlang bestimmter Hirnnerven wie dem N. olfactorius, aber auch dem N. opticus, N. trigeminus und N. vestibulocochlearis zeigen. Dabei wird wiederum unter diesen Nerven der Abfluss des CSF über den N. olfactorius zu den zervikalen Lymphbahnen als primäre Route angesehen, wobei auch für die anderen genannten Hirnnerven die Drainage zu den Lymphknoten des Halses beschrieben wird. Die Aufnahme des CSF erfolgte über endständige Lymph- und kapilläre Blutgefäße in der nasalen Mukosa. Hingegen werden die Zielregionen der nasalen Drainage, die entweder die superfizialen oder die tiefen zervikalen Lymphknotenstationen darstellen, von CSERR und KNOPF (1993) nicht näher differenziert. KIDA et al. (1993) konnten ebenfalls in ihren Versuchen an Ratten farblich markierten CSF im Subarachnoidalraum des N. opticus nachweisen, jedoch von dort ausgehend keine Beziehung zu zervikalen Lymphknoten. Da der N. opticus aber von Ausläufern des Subarachnoidalraumes umgeben ist und dieser wiederum entlang der Arachnoidalzotten und entlang von Blutgefäßen zu den tiefen zervikalen Lymphknoten drainiert, könnte eine Verbindung zwischen dem N. opticus zu den tiefen Halslymphknoten als wahrscheinlich angesehen werden.

In Tierversuchen injizierten KIDA et al. (1993) Ratten Indian Ink als Marker in den Liquor der Cisterna magna, einem subarachnoidalen Raum zwischen dem Cerebellum und der Medulla spinalis. Die Verteilung des markierten CSF konnte entlang perivaskulärer Spalträume (Virchow-Robin-Raum) der A. cerebri media und arterieller Gefäße der Nase sowie entlang

der Unterseiten der Bulbi olfactorii, über nasale Lymphbahnen bis in die nasale Mukosa verfolgt werden.

Ältere Publikationen beschrieben, dass in das Ventrikelsystem injizierter FS über periarterielle CSF-Kanäle zum Circulus arteriosus Willisi und schließlich ebenfalls über arterielle Blutgefäße, hier die Arteria ethmoidalis, zu den Unterflächen der olfaktorischen Bulbi gelangte (WELLER et al. 1992; ZHANG et al. 1992). Vorausgegangene Tierversuche verschiedener Autoren an Kaninchen, Ratten und Affen zeigten, dass radioaktiv- bzw. farbstoffmarkierter CSF unterhalb des Bulbus olfactorius, durch die Lamina cribrosa und über die Fila olfactoria bis in die Lymphgefäße der nasalen Mukosa und letztendlich zu den tiefen zervikalen Lymphknoten gelangte (BRADBURY und WESTROP 1983; KIDA et al. 1993; JOHNSTON et al. 2004). Der Verlauf der Drainage des CSF über die einzelnen anatomischen „Stationen“ bis in die nasalen Lymphgefäße konnte auch in unserer Arbeit nachvollzogen werden.

Im Gegensatz zu CSERR und KNOPF (1993) beschrieben KIDA et al. (1993) nur für die nasale Drainage über den Bulbus olfactorius eine direkte Verbindung zwischen CSF und peripheren Lymphbahnen entlang eines Hirnnerven. KIDA et al. (1993) gaben einen Zeitraum für die paravaskuläre und nasale Drainage des CSF zu den tiefen zervikalen Lymphknoten innerhalb von 30 Minuten an. Ein weiterer Abflussweg zu den superfiziellen Halslymphknoten, etwa über die Nase, wurde hier jedoch weder erwähnt noch zeitlich abgegrenzt. Auch BRADBURY und WESTROP (1983) beschrieben eine Verbindung zwischen CSF und den tiefen, zervikalen Lymphknoten über den N. olfactorius und die Lymphbahnen der nasalen Mukosa.

WALTER et al. (2006) berichteten nach Injektion von Indian Ink in den Subarachnoidalraum von Rattengehirnen über die nasale Drainage, die sowohl in den tiefen als auch in den oberflächlichen Lymphknoten des Halses endete.

In unserer Arbeit finden sich dazu konträre Ergebnisse. Nach den Beobachtungen der genannten Autoren scheint der CSF über die Nase zu den tiefen Halslymphknoten abzufließen und nicht gemäß den Befunden in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich zu den oberflächlichen, zervikalen Lymphknoten. Außerdem gab es Unterschiede hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs. So zeigte sich in unserer Arbeit der paravaskuläre Abfluss des CSF zu den tiefen Halslymphknoten als schnelle Eliminationsroute aus dem Gehirn. Dort konnte bereits nach 3 Minuten FS detektiert werden, während die nasale Drainage mit einer Dauer von nahezu 30 Minuten den langsameren Ablaufweg darstellte.

Unter anderem bezeichneten BRADBURY und WESTROP (1983) den Weg entlang des Bulbus olfactorius und die nasale Mukosa als größte Verbindung zwischen dem CSF und den tiefen

Lymphknoten. Auch WELLER et al. (2010) beschrieben eine vorherrschende Drainage des CSF über die Lamina cribriformis bis in die Lymphgefäße der nasalen Mukosa.

Wir hingegen konnten in der vorliegenden Arbeit den olfaktorischen Weg des „Lymphabflusses“ aus dem Gehirn bis in die tiefen Halslymphknoten nicht in dieser Form bestätigen. Unsere Ergebnisse zeigten einen vermehrten Abfluss des nasalen Weges zu den oberflächlichen, zervikalen Lymphknoten. Stattdessen halten wir die paravaskuläre Drainage des CSF zu den tiefen Halslymphknoten für wahrscheinlicher, da er einen umfangreicheren und deutlich schnelleren Abfluss bietet. So könnte diese Abflussroute auch bei einem plötzlichen Anstieg des Hirndrucks regulierend für einen unverzüglichen Ausgleich der Druckschwankungen wirken.

Eine Verteilung von intraventrikulär eingebrachten Tracern bis in den Subarachnoidalraum des N. opticus wurde ebenfalls schon gezeigt.

So berichteten beispielsweise SHEN et al. (1985) über eine CSF-Drainage entlang des Subarachnoidalraumes des N. opticus bis in die Sklera des Auges bei Hamstern. In die Cisterna magna injiziertes Ferritin gelangte dabei innerhalb von 8 Minuten über ein feines Netzwerk gewundener Mikrokanälchen im distalen, subarachnoidalen Optikusanteil bis in die Sklera und das hintere intraorbitale Bindegewebe.

Wir konnten gleichermaßen eine Verteilung des FS bis in den Bulbus oculi verfolgen, jedoch reicherte sich der FS dort in kleinen Lakunen zwischen Choroidea und Retina an. Die CSF-Drainage bis in Lokalisationen zwischen der mittleren und inneren Augenhaut wurde in dieser Form noch nicht dargelegt. Der Anteil der Lymphdrainage dürfte aber vermutlich für das „lymphatische“ Abflusssystem des Gehirns insgesamt eine eher untergeordnete Rolle spielen.

In die Nase injizierter FS folgte einem lymphatischen Abflussweg vornehmlich zu den oberflächlichen Halslymphknoten. Die Drainageroute führte dabei zunächst über die submukösen Lymphgefäße der Nasenmukosa von Septum und Nasenmuscheln, teilweise auch entlang der großen Speicheldrüsen und schließlich über periphere Lymphgefäße in der Nähe der Gefäßnervenscheide bis zu den oberflächlichen, submandibulären und zervikalen Lymphknoten.

Die nasale „lymphatische“ Abflussroute transportiert den injizierten FS aus dem CSF deutlich langsamer als die Drainagewege des CSF über die Blutgefäße. Der FS gelangt frühestens nach 20 Minuten in die kleinen Lymphgefäße der nasalen Mukosa. In dieser Arbeit konnte nach

nasaler FS-Injektion bereits nach 10 Minuten FS in den submandibulären Halslymphknoten der Versuchsmäuse nachgewiesen werden. Zum einen befand sich dieser frei in den Lymphsinus und zum anderen zellulär in vereinzelt FS-phagozytierenden Makrophagen, die selten in den Lymphknotenrändern sichtbar waren. Die tiefen Halslymphknoten wiesen mehrheitlich keinen FS auf. Im Bindegewebe um die superfizialen, selten auch um die tiefen Halslymphknoten konnten wenige FS-haltige Makrophagen detektiert werden.

Außerdem war im Vergleich zur paravaskulären Drainage entlang hirnversorgender Blutgefäße deutlich weniger FS in der nasalen Mukosa und oberhalb der Schädelbasis zu finden. Über diese Route erfolgte demnach nur eine qualitativ langsamere und quantitativ ebenfalls verringerte Drainage aus dem Bereich von Gehirn und Hypophyse zu den oberflächlichen Halslymphknoten als die durch die Abflusswege des CSF zu den tiefen zervikalen Lymphknoten. Ob subarachnoidale Kanäle unterhalb der olfaktorischen Bulbi existieren, die möglicherweise in direkter Verbindung zu den nasalen Lymphbahnen stehen (KIDA et al. 1993; BRINKER et al. 1997), konnte durch diese Arbeit nicht beantwortet werden. Hierfür ist die lichtmikroskopische Beurteilung möglicherweise nicht ausreichend geeignet und die Auflösung zu gering bzw. hätte die Schnittdicke deutlich geringer ausfallen müssen, da durch zu viele Gewebeüberlagerungen die Identifizierung derart kleiner Strukturen kaum durchführbar gewesen wäre. Eine andere Möglichkeit für den Nachweis von potentiellen Kanälen wäre eine elektronenmikroskopische Beurteilung, deren Auflösung im Nanometerbereich liegt. Man könnte mittels Fluoreszenzfarbstoffen Strukturen des Subarachnoidalraums anfärben und mit Hilfe des Elektronenmikroskops sichtbar machen. Dies wäre beispielsweise denkbar, wenn bereits Kanalporteine bekannt sind bzw. deren Existenz durch andere, bereits bekannte Kanäle mit ähnlicher Funktion angenommen werden könnten. Brinker et al. (1997) visualisierten den Durchfluss des CSF im Subarachnoidalraum von Ratten mit Hilfe von Röntgenstrahlen über Kontrastmittel und Indian Ink während der Infusionen, wobei mit dieser Methode keine molekularen Strukturen, wie subarachnoidale Kanäle, nachgewiesen werden konnten.

Von der Hypophyse ist bisher nicht bekannt, ob und in welcher Weise sie eine Art „lymphatischen“ Abflussweg besitzt.

4.1.2 Abflusswege der Hypophyse

Die Hypophyse nutzt eine Kombination verschiedener „Lymphabflusswege“. Nach stereotaktischer FS-Injektion in die Adenohypophyse konnten zwei verschiedene Abflussrouten ermittelt werden.

Ähnlich zu der Drainage des CSF nutzt die Hypophyse ebenfalls einen perivaskulären Abflussweg entlang von Gefäßwänden entlang der A. hypophysealis inferior und der A. carotis. Daneben dient auch ein Weg entlang der „nasalen“ Route vom Bulbus olfactorius, über die Lymphgefäße der nasalen Mukosa bis zu den superfizialen, zervikalen Lymphknoten der hypophysären Drainage. Diese Beobachtungen spiegeln den embryologisch-anatomischen Ursprung der Adenohypophyse wider, die sich der Neurohypophyse erst während der Entwicklung anlagert. Anders als der Hypophysenhinterlappen ist der Hypophysenvorderlappen keine Ausstülpung des neuroektodermalen Diencephalons, sondern entsteht aus der ektodermalen Rathke-Tasche. Die Abflusswege der Hypophyse enden sowohl in den tiefen als auch in den superfizialen Lymphknoten des Halses. Damit erfolgt die Drainage der Hypophyse nicht ausschließlich über die Nase, wie es embryologisch zu vermuten wäre, sondern es existiert auch ein schnellerer Abflussweg. Dieser ähnelt dem des CSF und verläuft entlang größerer, zerebraler Arterien bis zu den tiefen Halslymphknoten. Unterschiede des „lymphatischen“ Abflusses zwischen der Hypophyse und dem CSF bestehen nur zu Beginn, da der Ursprung des perivaskulären Abtransports zum Teil zunächst über unterschiedliche arterielle Kopf-Hals-Gefäße erfolgt, bis sich die gemeinsame Wegstrecke entlang der A. carotis bis zu den tiefen Halslymphknoten fortsetzt.

Nach FS-Injektion in den CSF des Ventrikelsystems konnte zu keinem Zeitpunkt FS im oder um das hypophysäre Gewebe beobachtet werden! Auch konnte umgekehrt nach Injektion des FS in die Hypophyse regelmäßig keine Schwarzfärbung des CSF in den Hirnventrikeln nachgewiesen werden. Lediglich eine Maus wies artifiziellen FS in kleinen Anteilen des Ventrikelsystems auf.

Die vorliegenden Untersuchungen konnten somit keine Verbindung des Liquorsystems zur Hypophyse aufzeigen. Dies entspricht auch den natürlichen anatomischen Gegebenheiten: Die (Adeno)hypophyse liegt extradural, durch eine Duratasche (Diaphragma sellae) von den schädelbasisnahen Hirnanteilen abgetrennt und somit außerhalb des ZNS. Letztendlich spricht diese Beobachtung und das Fehlen von „Kreuzfarbstoff“ auch für die saubere Injektionstechnik. Die Nadel musste für das Einbringen des FS während der stereotaktisch ausgeführten Injektion durch das Hirnparenchym und auch durch das Liquorsystem

gestochen werden, um von kranial an die Hypophyse zu gelangen. Dennoch nutzen beide Strukturen unabhängig von einander Drainagerouten für die Elimination des injizierten FS, die sich zum Teil ähneln.

Interzelluläre FS-Partikel, die ab und zu an den Rändern der Adenohypophyse und in der Nähe des Stichkanals zu beobachten waren, waren am ehesten bedingt durch den Injektionsdruck zwischen die Zellen des Gewebes gepresst worden.

4.1.3 Der Abflussweg der Nase als Kontrollroute

Klinische und experimentelle Studien an menschlichen Leichen (PAN et al. 2008) und Ratten (TILNEY 1971) konnten zeigen, dass die nasalen Lymphgefäße eine Verbindung zu den superfizialen Lymphknoten im Bereich der Mandibula und des Halses aufweisen. Wir konnten in unseren Versuchen bestätigen, dass der Abfluss über die Nase zum Großteil zu den oberflächlichen Halslymphknoten erfolgt und eben im Gegensatz zu vorangegangenen Arbeiten lediglich zu einem sehr geringen Anteil auch bis in die tiefen zervikalen Lymphknoten zu verfolgen war. Der „lymphatische“ Abfluss erfolgt über die submukösen Lymphgefäße der Nasenmukosa, teilweise auch entlang der großen Speicheldrüsen und schließlich über periphere Lymphgefäße in der Nähe der Gefäßnervenscheide bis zu den submandibulären und oberflächlichen, zervikalen Lymphknoten.

Der nasale Abflussweg galt hier als Kontrollroute für den Vergleich und die Beschreibung der hypophysären Drainage. Bedingt durch die anatomische Nähe der Nase bzw. des Sinus sphenoidalis zur Fossa hypophysealis, können für die (Adeno)Hypophyse und die Nase bereits embryologisch angelegte, gleiche Abflusswege angenommen werden. Beide Strukturen haben einen ektodermalen Ursprung. Die Vermutung, dass die Hypophyse eine Art „Lymphabfluss“ über die Nase nutzt, konnte durch die Beobachtungen dieser Arbeit gefestigt werden.

4.2 Dynamische Analyse und zeitlicher Verlauf der Drainagewege

Die Drainagewege von CSF, Nase und Hypophyse unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich der Anatomie, sondern auch bezogen auf die Geschwindigkeit des „Lymphabflusses“.

Für den CSF besteht eine schnelle, paravaskuläre Abflussmöglichkeit aus dem Gehirn zu den peripheren Lymphknoten entlang größerer, arterieller Blutgefäße.

Nach KIDA et al. (1993) erreichte der nach Injektion in die Cisterna magna farblich markierte CSF die tiefen, zervikalen Lymphknoten erst nach 30 Minuten. In unserer Arbeit konnte bereits 2 Minuten nach der Injektion in das Ventrikelsystem in einigen tiefen Halslymphknoten FS im Lymphknotenrand und vereinzelt in den Lymphsinus identifiziert werden. Nach 5 Minuten konnte sowohl in den oberflächlichen als auch in den tiefen, zervikalen Lymphknoten FS in diesen Lymphknotenanteilen detektiert werden.

Abb. 10 H1-H4 verdeutlicht die FS-Akkumulation innerhalb der superfizialen, zervikalen Lymphknoten nach FS-Injektion in den CSF des rechten Seitenventrikels nach 5, 10 und 20 Minuten. Folgerichtig war die Färbung der peripheren Gewebestrukturen wie der zervikalen Lymphknoten und den das Rückenmark umgebenden Subarachnoidalraumes umso intensiver, je länger der Verteilungszeitraum des eingebrachten FS im Gewebe bis zur Euthanasie der Versuchstiere war. Dabei fällt auf, dass der CSF zuerst in die tiefen zervikalen Lymphknoten drainiert (Abb. 10 H3) und die superfizialen Halslymphknoten selten nach 10, zumeist erst nach 20 Minuten (Abb. 10 H4) eine FS-Akkumulation aufwiesen. Die Verteilung des FS über den CSF bis in den Subarachnoidalraum auf Rückenmarksebene konnte bereits nach 5 Minuten dargestellt werden. Die tiefen, zervikalen Lymphknoten sind in Abb. 10 H1 und H2 nicht zu sehen.

Die Unterschiede nach intraventrikulärer FS-Injektion hinsichtlich Drainagegeschwindigkeit und Intensität der FS-Aufnahme in die tiefen und oberflächlichen Halslymphknoten wird in Abb. 10 H3 und H4 weiter verdeutlicht. Somit sind die Verbindungen zu den tiefen zervikalen Halslymphknoten die ersten peripheren Stationen, die der CSF in weniger als 10 Minuten nach FS-Applikation in das Ventrikelsystem als Abflussweg nutzt. Daneben existiert innerhalb der ersten 5-10 Minuten auch die Möglichkeit der Drainage über den Subarachnoidalraum der Spinal- und Hirnnerven, wie z.B. dem N. opticus oder dem N. olfactorius. Vermutlich dürfte der letztgenannte Drainagepfad aber, bezogen auf einer schnellen Drainage größerer CSF-Mengen aus dem Gehirn, quantitativ eher eine untergeordnete Rolle spielen.

Dass die Drainage des FS in die superfizialen Halslymphknoten erst zeitverzögert nach überwiegend 20 Minuten zu beobachten war, spricht wahrscheinlich lediglich für eine anatomisch längere Wegstrecke, die im Vergleich zu den tiefen Halslymphknoten zurück gelegt werden musste, da in den oberflächlichen Halslymphknoten in der Regel vergleichsweise deutlich weniger FS zu detektieren waren. Möglicherweise findet in den tiefen Halslymphknoten dadurch bedingt auch eine verstärkte immunologische Reaktion statt.

Abb. 10 (H1-H4): Ansicht von kaudal auf den Kopf und den Nacken einer Maus nach intraventrikulärer FS-Injektion nach 5, 10 und 20 Minuten.

H1: 5 Minuten nach der Injektion des FS in den CSF. In den superfizialen zervikalen Lymphknoten (→) hat sich noch kein FS angereichert. Der Subarachnoidalraum um das Rückenmark ist etwas mit FS angefärbt. Die tiefen, zervikalen Lymphknoten sind aus dieser Perspektive nicht einsehbar. **H2:** 10 Minuten nach der Injektion des FS in den CSF. In den superfizialen zervikalen Lymphknoten (→) ist kein, vereinzelt sehr wenig FS zu erkennen. Zirkulär um das Rückenmark fällt die deutlichere Schwarzfärbung des Subarachnoidalraumes auf. Auch hier sind die tiefen Halslymphknoten nicht sichtbar. **H3:** Ansicht von kaudal auf den Kopf und den Nacken einer Maus 10 Minuten nach intraventrikulärer FS-Injektion. Der in den CSF injizierte FS ist in den tiefen zervikalen Lymphknoten (lange →) und entlang der aus dem Rückenmark austretenden, zervikalen Spinalnerven (kurze →) zu sehen. Im Subarachnoidalraum um das Rückenmark befindet sich ebenfalls deutlich FS. Die oberflächlichen Hals-Lymphknoten wurden hier entfernt. **H4:** 20 Minuten nach der Injektion des FS in den CSF. In den superfizialen (lange →) und auch tiefen zervikalen Lymphknoten sind jetzt deutliche FS-Ansammlungen zu erkennen. Außerdem sind beidseitig kleine FS-führende Lymphgefäße (kurze →) zu sehen, die in die oberflächlichen Lymphknoten drainieren. Auch im Subarachnoidalraum um das Rückenmark ist der FS immer noch deutlich sichtbar.

Für die Hypophyse existiert zum einen ein paravaskulärer Drainagemechanismus über die A. hypophysealis inferior und die A. carotis interna. Zum anderen konnte eine nasale Abflussroute über den Bulbus olfactorius und nachfolgend über die Lymphbahnen der nasalen Mukosa gezeigt werden. Somit kann die Hypophyse gleichermaßen in die superfizialen als auch in die tiefen, zervikalen und kraniojugulären, schädelbasisnahen Lymphknoten drainieren, wobei der Abfluss hier mit 21-30 Minuten vergleichsweise langsam stattfindet. Auffällig war, dass nach 20 Minuten noch sehr wenig FS bis in die superfizialen, zervikalen Lymphknoten gelangt war. Jedoch konnten schon einige Makrophagen im Bindegewebe um diese Lymphknoten identifiziert werden, die eindeutig FS phagozytiert hatten. Erst nach 30 Minuten war ein Abfluss des hypophysär injizierten FS über den Bulbus olfactorius und die nasale Wegstrecke zu verfolgen. Somit ähnelt dieser „lymphatische“ Abflussweg sowohl anatomisch als auch zeitlich der langsamen Drainage des CSF über die Nase.

Analog zu der Möglichkeit der CSF-Ableitung entlang größerer zerebraler Arterien nutzt auch die Hypophyse einen solchen Abfluss. Mit einer Dauer von 20 Minuten verhält sich die hypophysäre Drainage aber deutlich verzögerter als die schnelle, paravaskuläre CSF-Drainage innerhalb von 3-7 Minuten. Möglicherweise ist für die Hypophyse die Abflussgeschwindigkeit von nicht so großer Bedeutung wie der Abfluss des CSF aus den Liquorräumen für das Gehirn. Hier ist der schnellere Ablauf vermutlich für schnelle funktionelle Abläufe wie den Ausgleich von Hirndruckschwankungen ein wichtiger Mechanismus. Sicherlich haben dabei auch die Pulsationen der arteriellen Blutgefäße unterstützende Wirkung auf den zügigen Abfluss des CSF und somit auch auf den Druckausgleich.

Auffällig war bei einigen Versuchstieren, dass die zervikalen Lymphknoten der rechten und linken Halsseite zum Teil eine unterschiedliche Intensität der FS-Aufnahme in den zervikalen Lymphknoten aufwiesen. So war mehrfach zu sehen, dass sich in den Halslymphknoten der Injektionsseite (diese war bei allen Versuchstieren immer rechts) mehr FS im subkapsulären Randbereich der Lymphknoten angereichert hatte als auf der linken Halsseite. Zum Teil befand sich der FS auch in Makrophagen im perilymphatischen Gewebe und nicht in den zervikalen Lymphknoten selbst. Ein seitengetrennter Abfluss der rechten und linken Körperhälfte zu den zervikalen Lymphknoten ist nicht sicher auszuschließen, aber eher unwahrscheinlich. Bei den Mäusen der Injektionsgruppen Hypophyse und Nase erscheint es plausibel, dass der FS vermutlich bedingt durch den rechtsseitig lokalisierten Injektionsort lediglich schneller zu den ipsilateralen Halslymphknoten gelangte und für die Drainage zur kontralateralen zervikalen Lymphknoten etwas mehr Zeit benötigte.

Für die Tiere mit der Liquorinjektion dürfte die Seite der Injektion eher irrelevant sein, da sich der FS hier im gesamten Liquorraum verteilt und sich dementsprechend gleichmäßig in den peripheren Halslymphknoten anreichern müsste. Dennoch konnte bei einer Maus 20 Minuten nach der Injektion in den CSF rechtsseitig vermehrt FS in den tiefen Halslymphknoten detektiert werden, während auf der linken Seite der FS nur im Gewebe um diese Lymphknoten zu sehen war. Diese Beobachtung könnte zufallsbedingt sein oder einen Hinweis für einen seitengetrennten lymphatischen Abfluss mit möglicherweise kollateralen Verbindungen über Lymphplexus, ähnlich wie z.B. bei der Schilddrüse, darstellen.

Generell ist die Verteilung des FS in den zervikalen Lymphknoten zum einen abhängig von ihrer Lage in kranio-kaudaler Richtung, zum anderen vom jeweiligen Drainageort (CSF, Nase oder Hypophyse). Die Beobachtungen entsprechen einer „Lymphdrainage“ von kranial nach kaudal und von zentral in Richtung Peripherie.

4.3 (Para)vaskulärer versus zellulärer Transportmechanismus

4.3.1 Paravaskulärer Abfluss

Die paravaskuläre Drainage des Gehirns spielt sowohl für den CSF als auch für den Abfluss aus der Hypophyse eine Rolle. Sowohl aus dem Ventrikelsystem als auch aus der Hirnanhangsdrüse ist der Transport entlang größerer arterieller Kopf- und Halsgefäße in deren Gefäßwänden unterhalb der Adventitia zu beobachten gewesen. Dabei gelangte der injizierte FS über die Gefäßwände kleinerer Blutgefäße über die A. cerebri media bzw. A. hypophysealis inferior bis in die A. carotis interna, die die Drainageroute beider Abflussgebiete vereint und war bis in die zervikalen Lymphknoten nachzuverfolgen. Ebenso existiert ein Abtransport über kleine benachbarte, auch venöse Blutgefäße des Subarachnoidalraumes und dessen Aussackungen entlang von Spinal- und Hirnnerven.

LÜDEMANN et al. (2005) konnten bereits in Versuchen mit Katzen mittels subokzipital infundierten Kontrastmittels in den CSF zeigen, dass es insbesondere im distalen Anteil des N. opticus einen Abfluss über den periorbitalen Subarachnoidalraum in die konjunktivalen Lymphgefäße gibt. Somit besteht anscheinend auch über das Auge bzw. über dessen subarachnoidale Verbindungen zu den periorbitalen Lymphgefäßen eine Drainagemöglichkeit für den CSF in die Peripherie, der in Relation aber einen eher untergeordneten Stellenwert

haben dürfte. So könnte der schnelle und kapazitätsstarke paravaskuläre Abflussweg entlang der größeren Blutgefäße möglicherweise eine wichtige Funktion für den Ausgleich von Druckunterschieden (z.B. Hirndrucksteigerung infolge eines Hirnödems oder Hydrocephalus) im Gehirn haben, während die Drainage über den Subarachnoidalraum der Spinal- und Hirnnerven quantitativ einen eher geringeren Anteil daran tragen dürfte.

Spinalnerven werden von kleinen arachnoidalen Aussackungen umgeben (WELCH und POLLAY 1963; KIDO et al. 1976). Auch in dieser Arbeit konnte nach 5 bis 10 Minuten FS nach der Injektion in den CSF im Subarachnoidalraum von einzelnen Spinalnerven aus dem zervikalen Rückenmark beobachtet werden. Ebenso befand sich FS im perioptischen Subarachnoidalraum des N. opticus, der erstmals bei einem Versuchstier nach 5 Minuten dort zu sehen war. Regelmäßig war der FS aber ansonsten in diesem Bereich nur bei der Tiergruppe mit der 20-Minuten-Injektion zu beobachten.

Entlang der Hirn- und Spinalnerven war der FS bei vielen Versuchstieren im Subarachnoidalraum zu sehen. Von dort wird dann die Resorption über das periphere Lymphsystem vermutlich in ähnlicher Weise erfolgen wie es vom Subarachnoidalraum des N. opticus in dort ansässige Lymphgefäße aus möglich ist.

Ein Hauptdrainageweg über die subarachnoidalen Räume von Spinalnerven und dem N. opticus ist eher nicht zu erwarten, da hier nur sehr wenig markierter CSF drainiert und frühestens nach 10 Minuten dort beobachtet werden konnte.

Ein Druckausgleich im ZNS könnte möglicherweise auch durch einen vermehrten AQP4-Einbau in den perivaskulären astrozytären Endigungen, die die hirneigenen Blutgefäße umschließen, ermöglicht werden. Nach ILIFF und NEDERGAARD (2013) werden die astroglialen AQP4 in den perivaskulären Astrozytenendfüßchen in großer Zahl exprimiert und können sofort den paravaskulären CSF-Einstrom und die ISF-Clearance-Pfade verbinden. Bei Versuchsmäusen, denen die AQP4-Kanäle fehlten, waren der Einstrom des CSF entlang der Blutgefäße und die ISF-Clearance dramatisch reduziert! Somit könnte die Vermutung geäußert werden, dass die Drainage von CSF und ISF und damit ein potentiell verbundener Druckausgleich abhängig davon sein könnte, wie viele AQP4-Kanäle perivaskulär in den Astrozyten vorliegen (möglicherweise in intrazellulären Vesikeln zwischengespeichert, um einen schnellen Einbau zu ermöglichen) bzw. wie schnell diese eingebaut werden. Je mehr dieser Kanäle für den Abfluss zerebraler Flüssigkeit zur Verfügung stünden, desto schneller könnte diese über die beschriebenen Wege in Richtung Peripherie abfließen und den Hirndruck senken. Zelluläre Vorgänge durch perivaskulär phagozytierende Makrophagen sind

dafür wahrscheinlich weniger verantwortlich, da hierüber eher Antigene und gelöste Substanzen aus dem ZNS gelangen und Immunreaktionen auslösen können.

4.3.2 Zellulärer Abtransport

Makrophagen entstehen aus den mononukleären Leukozyten und stellen Zellen der angeborenen Immunabwehr dar. Die auch als Phagozyten bezeichneten Zellen erkennen körperfremde Proteine und Mikroorganismen und phagozytieren diese. Zusätzlich können sie eine adaptive Immunantwort auslösen und sind zur Antigenpräsentation befähigt.

Nach CARARE et al. (2008) sind perivaskulär lokalisierte Makrophagen des Gehirns offenbar in der Lage, Substanzen oder auch versuchsweise injizierte Farbmoleküle aus dem CSF oder der interstitiellen Gehirnflüssigkeit zu phagozytieren. Jedoch bestanden bisher keine Hinweise darauf, ob diese Zellen des Immunsystems diese auch aus dem Gehirn eliminieren und weiter in die extrazerebrale Peripherie transportieren können. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern erste Anhaltspunkte dafür, dass gelöste Substanzen oder auch Antigene aus dem Gehirn über Makrophagen das ZNS verlassen können, um das phagozytierte Material nachfolgend in die Lymphknoten zu transportieren und dem Immunsystem zu präsentieren. Diese Drainagewege haben daher möglicherweise auch bei neuroimmunologischen Erkrankungen, wie beispielsweise bei der Multiplen Sklerose (MS) oder der Autoimmun-Hypophysitis (LH), eine wichtige Funktion und könnten eine Erklärung sein, warum es auch zerebrale Erkrankungen autoimmunen Ursprungs gibt.

Nach Injektion des Indian Ink in den CSF konnten in der Nähe der FS-haltigen Blutgefäßwände, die um die Schädelbasis lokalisiert waren, und in der näheren Umgebung der Gefäßnervenscheide perivaskulär angeordnete, FS-phagozytierende Zellen detektiert werden, welche morphologisch als Makrophagen identifiziert wurden. Es existieren Hinweise, dass Lymphozyten im CSF einen Abflussweg nutzen können, der aus dem Gehirn über die Lamina cribrosa bis zur nasalen Schleimhaut und in die zervikalen Lymphknoten führt (GOLDMANN et al. 2006). Makrophagen aus dem ZNS dürften möglicherweise ebenfalls auf diesem Weg zu den Lymphknoten des Halses gelangen. Vereinzelt befanden sie diese Zellen auch im Bindegewebe um die Halsmuskulatur oder in der Nähe von arteriellen und venösen Blutgefäßen sowie im Bindegewebe um die Nasenhöhle und oberhalb des harten Gaumens. Auch im perilymphatischen Bindegewebe um die zervikalen Lymphknoten waren

diese Zellen zu erkennen, ebenso im subkapsulärem Lymphgewebe der Lymphknotenrändern zwischen den Lymphozyten.

Bereits 2 Minuten nach Injektion in den CSF war intrazellulärer FS vereinzelt innerhalb von Makrophagen im Bindegewebe in der Nähe der Gefäßnervenscheide des Halses und in den subkapsulär im Rand einiger tiefer Halslymphknoten zu sehen. Vermutlich handelt es sich aber bei den zur Phagozytose befähigten Zellen um ortständige Makrophagen, die bereits damit begonnen hatten, den bis in das zervikale Gewebe paravaskulär abgeflossenen FS zu phagozytieren. Es ist nicht sehr wahrscheinlich, dass Makrophagen aktiv innerhalb von zwei Minuten FS bzw. Fremdstoffe des CSF aus dem Gehirn bis zu den zervikalen Lymphknoten abtransportieren können. Im Gewebe der tiefen zervikalen Lymphknoten selbst waren auch noch keine FS-haltigen Makrophagen erkennbar.

In der CSF-Gruppe konnten FS-phagozytierende Makrophagen nach 10 Minuten im Bereich der Schädelbasis bestimmt werden und scheinen demnach relativ zügig Fremdmaterial „entfernen“ zu können. Ein aktiver, zellulärer Transport durch diese Zellen zu den Halslymphknoten wird dagegen deutlich verzögerter möglich sein als über die lymphatischen Gefäße der Nasenschleimhaut.

Die Makrophagen sind - analog zum frei abfließenden FS über den CSF - zuerst in den tiefen zervikalen und paratrachealen Lymphknoten zu detektieren und frühestens nach 10 Minuten auch in den oberflächlichen zervikalen Lymphknoten vorzufinden. Je später die Tiere euthanasiert wurden, desto mehr Makrophagen konnten in den Lymphknotenrändern von tiefen und superfiziellen Lymphknoten gefunden werden, aber auch im perinodulären Bindegewebe und um die zervikale Gefäßnervenscheide. Je mehr potentielle Antigene im CSF enthalten sind, desto stärker wird vermutlich auch deren Phagozytose und Abtransport über Makrophagen in die Peripherie erfolgen und davon abhängig eine mehr oder weniger intensiv ausgeprägte Immunantwort resultieren.

Zelluläre Vorgänge - wie der Abtransport über perivaskuläre und perilymphatische Makrophagen - sind dabei aber wenig wahrscheinlich für schnelle Reaktionen, wie beispielsweise eine zügige Regulation intrakranieller Druckschwankungen, verantwortlich. Vielmehr wird vermutlich ein hierüber stattfindender Abtransport von Fremdstoffen, Krankheitserregern und gelösten Substanzen aus dem ZNS in die Peripherie zur Antigenpräsentation in den Lymphknoten und das anschließende Auslösen von Immunreaktionen die Folge sein können.

Inwieweit der FS bereits in der Hypophyse durch Makrophagen aufgenommen wird oder diese Zellen möglicherweise auch erst im Bereich von Blutgefäßwänden beginnen, den FS zu phagozytieren, konnte aufgrund der eingeschränkten Beurteilbarkeit der Präparate nicht eindeutig bestimmt werden. Eine genaue Identifizierung von phagozytiertem FS im und um das hypophysäre Gewebe war nicht sicher möglich. Makrophagen konnten in der direkten Umgebung der Hypophyse nicht sicher abgegrenzt werden, fanden sich aber sicher in und um die zervikalen Lymphknoten und im zervikalen Bindegewebe.

Sowohl nach Injektion des FS in die Nase als auch in die Hypophyse konnten auch Makrophagen in den zervikalen Lymphknoten detektiert werden. Die zelluläre FS-Aufnahme und womöglich auch der Transport über Makrophagen war häufig in der Nähe von Blut oder Lymphe führenden Gefäßen zu beobachten sowie von Lymphknoten vorzufinden, eben entlang der „Stationen“, die auch der „freie“ FS zur „lymphatischen“ Drainage aus dem ZNS in die zervikalen Lymphknoten nutzte.

Nach nasaler FS-Injektion konnte bereits nach 5 Minuten eindeutig FS in den superfizialen Halslymphknoten der Versuchsmäuse nachgewiesen werden, der zum einen frei in den Lymphsinus und zum anderen eben zellulär über vereinzelte FS-phagozytierende Makrophagen in den Lymphknotenrändern und im die Lymphknoten umgebenden Bindegewebe sichtbar war. Die tiefen Halslymphknoten wiesen mehrheitlich keinen FS auf.

Im Bindegewebe um die superfizialen, selten auch um die tiefen Halslymphknoten konnten wenige FS-haltige Makrophagen detektiert werden.

Auffällig war, dass 10 Minuten nach Injektion in die Nase keine Zellen mit intrazellulärem FS im Bindegewebe um die Halslymphknoten gefunden werden konnten, nach 5 Minuten aber bereits vereinzelt wenige dieser FS-haltigen Makrophagen im perilymphatischen Gewebe zu sehen waren. Möglicherweise sind die Zellen in den angefertigten Präparaten der 10 Minuten-Gruppe nicht mit angeschnitten worden, was aufgrund der Schnittdicke von 7 µm aber eher unwahrscheinlich scheint. Es handelte sich nur um zwei Versuchstiere, bei denen FS in die Nase injiziert wurde, wovon eines nach 5 und das andere nach 10 Minuten getötet wurde. Somit könnte das Fehlen FS-haltiger Makrophagen nach 10 Minuten auch zufallsbedingt sein. Wenigstens zwei Mäuse für jede Versuchsgruppe wären daher möglicherweise aussagekräftiger gewesen.

Der Großteil des FS lag aber sowohl nach 5 als auch nach 10 Minuten noch im Lumen der Nasenhöhle vor und war der Nasenschleimhaut aufgelagert.

Zum einen könnte das Fremdmaterial entlang der „lymphatischen“ Abflusswege von den ortständigen Makrophagen phagozytiert, zum anderen über bewegliche Phagozyten zu den zervikalen Lymphknotenstationen abtransportiert werden. Es hat den Anschein, dass auch subkapsulär im Rand der Lymphknoten Makrophagen zwischen den Lymphozyten im Gewebe lokalisiert sind, die dort in die Lymphknoten drainiertes Fremdmaterial erkennen und aufnehmen.

Die Beobachtungen von Makrophagen, die den FS nach der Injektion in den CSF phagozytiert und weiter zu den zervikalen Lymphknotenstationen transportiert haben (könnten), sind bisher so noch nicht beschrieben worden. Diese unter anderem auch zur Antigenpräsentation befähigten Zellen könnten an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen des ZNS beteiligt sein und ihrer Erklärung dienen.

CHO et al. (2012) untersuchten die Anatomie und Entwicklung von Lymphgefäßen in der Kopf-Hals-Region an 10 und 15 Wochen alten Feten. CD68+ Makrophagen begleiteten dabei nicht die Lymphgefäßentwicklung. Demnach könnten diese Zellen während der Entwicklung der Abflusswege des ZNS weniger wichtig sein, für die späteren Drainagefunktion von Gehirn und Hypophyse aber unterstützende und immunologische Aufgaben besitzen, die auch zu Problemen wie Autoimmunkrankheiten führen können.

4.4 Allgemeine Limitationen bei der Auswertung (Methodenkritik)

Die gewählte Schnittdicke der Präparate betrug 7 µm und war im Vergleich zu herkömmlich angefertigten Schnitten in der Histologie (1-2 µm) relativ dick. Somit erschwerten auch Zellüberlagerungen, insbesondere in den dunkel gefärbten Bereichen der Schnitte die Auswertung. Aufgrund der vielen knochenhaltigen Präparate, die manuell entkalkt werden mussten, konnte die Schnitttiefe aber nicht geringer gewählt werden. 1-2 µm dicke Schnitte wären zum größten Teil gerissen.

Die teilweise durch das Hämalun sehr dunkel angefärbten Gewebe wie die Lymphknoten und dort insbesondere die peripher lokalisierten Lymphozyten in den Geweberändern der Lymphknoten waren nicht einfach auszuwerten. Der Kontrast durch die schwarze Tinte, die als FS eingesetzt wurde, zu den oft dunkel violett angefärbten Lymphknoten erschwerte teilweise die Differenzierung. Dadurch waren Makrophagen, die phagozytierten FS aufwiesen, nicht immer einfach zwischen den Lymphozyten zu identifizieren und von passiv angeflutetem FS zu unterscheiden. Es bleibt spekulativ, ob eine kürzere Färbung mit

Hämalaun für die Auswertung günstiger gewesen wäre. Möglicherweise wäre der von Makrophagen aufgenommene FS von den sehr dunkelblau gefärbten Lymphozyten, insbesondere in den Lymphknotenrändern, besser zu unterscheiden und zu bewerten gewesen.

Außerdem könnte der FS bei den knochenhaltigen Blöcken unter Umständen auch durch den manuellen Entkalkungsvorgang in der Petrischale partiell herausgelöst worden sein. So war z.B. bei einer Maus makroskopisch FS in der Gefäßwand der A. carotis zu sehen, der aber im histologischen Präparat letztendlich nicht mehr vorhanden war.

Der Injektionsdruck für den FS war manuell schwer zu kontrollieren. Ein FS-Übertritt (beispielsweise aus dem Ventrikelsystem in das Hirnparenchym) bei einzelnen Versuchen war somit nicht immer sicher auszuschließen, insbesondere aus den lateralen Ventrikeln in das periventrikuläre Hirngewebe. Es könnte sich aber auch um angeschnittene Reste des Stichkanals in Ventrikelnähe handeln.

Zum Teil konnten kleine lymphatische und venöse Gefäße unter dem Mikroskop schwer voneinander abgegrenzt werden. Jedoch enthielten die Blutgefäße meistens wenige Erythrozyten, sodass dünnwandige Gefäße, die FS und keine Erythrozyten im Lumen enthielten, als Lymphgefäße beurteilt wurden.

Daneben waren zum Teil dunkelbraune Pigmente in der Gl. lacrimalis einiger Versuchstiere aufgefallen, die sich interseptal zwischen den einzelnen Drüsenläppchen befanden. Diese Pigmente, die auch nicht so dunkel wie der injizierte FS waren, besitzen jedoch viele Mäuse physiologisch im Tränendrüsen Gewebe, sodass es sich hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um injektionsbedingt ins Gewebe hineingelangten FS handelt.

5. Schlussfolgerung

Das Gehirn besitzt eine Art „lymphatisches System“, über das die Drainage von CSF und ISF ermöglicht wird, jedoch keine klassischen Lymphgefäße. Über die Drainagewege der Hypophyse sind bisher noch keine Nachweise erbracht worden. Dabei existiert neben den bereits länger bekannten passiven Drainagewegen, die in die peripheren Lymphwege führen, auch ein aktiver zellulärer Transportweg über Makrophagen. Über die Hypophyse kann ein perivaskulärer Abfluss zu den superfizialen zervikalen Lymphknoten über die Aa. hypophyseales inferiores und die Carotiden erfolgen. Weiterhin konnte die nasale Abflussroute, die auch der CSF zur Drainage nutzt, als zusätzlicher Abflussweg für die Hypophyse identifiziert werden. Hier gibt es Hinweise auf Übereinstimmungen mit der Entstehung des Hypophysenvorderlappens, dessen embryologische Herkunft sich aus der Rathke-Tasche und dem sich daraus gebildeten Hypophysenbläschen ableiten lässt, und der anatomischen Lage dieser Strukturen zu den lymphatischen Gefäßen des Halses. Der CSF fließt vornehmlich zu den tiefen Halslymphknoten und verzögert auch über die Abflusswege der Nase ab. Da sich die Drainage des CSF über den nasalen Abflussweg jedoch zeitlich mit 19-29 Minuten deutlich vom schnelleren Abflussmechanismus des CSF zu den zervikalen Lymphknoten mit 3-7 Minuten unterscheidet, ist letztgenannter vermutlich die Hauptdrainageroute des CSF. Möglicherweise könnten diese Beobachtungen helfen, die autoimmunen Prozesse hypophysärer und cerebraler Krankheitsbilder besser zu verstehen, da Antigene und Makrophagen aus der Hypophyse so die zervikalen Lymphknoten erreichen und krankheitsauslösend sein könnten. Hierzu sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Für eine Anpassung des Hirndrucks bei geringeren Schwankungen könnte der „schnelle“ Drainagemechanismus des CSF ebenfalls eine wichtige Rolle für den Erhalt und die Sicherung von wichtigen Hirnfunktionen spielen.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit diene vor allem der Untersuchung, ob es im Gehirn vergleichbare Lymphabflusswege wie im übrigen Körper gibt und falls dies zutrifft, wo diese Abflusswege des Gehirns verlaufen. Denn für größere Proteine und Moleküle müsste es eine geeignete Route geben, um das ZNS verlassen zu können, da diese zum Passieren der Bluthirnschranke (BHS) zu groß sind. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass es auch eine Art lymphatischen Drainageweg aus der Hypophyse (HVL = Adenohypophyse) zu den tiefen und superfizialen, zervikalen Lymphknoten gibt. Daneben konnten auch die Abflussrouten des CSF und über die Nase bestätigt werden.

Darüber hinaus wurde versucht zu ermitteln, wie schnell über die jeweiligen Drainagemöglichkeiten extrazelluläre Substanzen und Flüssigkeiten (Liquor) aus dem Gehirn gelangen und weiter in die peripheren Lymphknoten des Halses abtransportiert werden können. Hierbei sollte auch dargestellt werden, ob diese Mechanismen nur passiven Vorgängen zuzuordnen sind, oder ob es auch Hinweise auf aktive, zellulär gesteuerte Prozesse gibt. Wahrscheinlich spielen hier Makrophagen, die hirneigene Proteine und Antigene aufnehmen und in Lymphknoten transportieren und präsentieren, eine wesentliche Rolle. Obwohl es die BHS gibt, die als eine physiologische Barriere- und Filterfunktion zwischen dem Blutkreislauf und dem ZNS fungiert, existieren dennoch autoimmun bedingte Krankheitsbilder des ZNS wie die Autoimmun-Hypophysitis oder die MS. Es ist daher wahrscheinlich, dass es möglicherweise auch mehrere Mechanismen (passiv und aktiv) geben könnte, über die hirneigene Proteine und Substanzen aus dem Gehirn zu den Lymphknotenstationen gelangen können. Über das Lymphsystem wäre wiederum eine Aktivierung des Immunsystems naheliegend, sodass die aus dem ZNS entstammenden Proteine eine Immunantwort initiieren und so autoimmune Krankheitsprozesse einleiten könnten. Für das Verständnis von Erkrankungen wie der MS, der Autoimmunhypophysitis oder aber auch des Morbus Alzheimer wären genauere Kenntnisse über die funktionellen Hintergründe eines „hirneigenen lymphatischen Systems“ von großer klinischer und therapeutischer Relevanz.

Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit könnte das Entstehen von Autoimmunerkrankungen des ZNS und eben auch der Hypophyse eine Erklärung finden, da auch Antigene dem Immunsystem über die beschriebenen Abflusswege zu den peripheren Lymphknotenstationen des Halses gelangen und präsentiert werden können. Weiterhin

besteht die Vermutung, dass zusätzlich auch Makrophagen aktiv durch ihre antigenpräsentierenden Eigenschaften an solchen Immunreaktionen beteiligt sind, jedoch sehr wahrscheinlich in verzögerter Weise im Vergleich zu den schnelleren passiven Drainagerouten des ZNS.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A β	Amyloid- β
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AQP4	Aquaporin-4-Kanal
BALT	Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe
BHS	Blut-Hirn-Schranke
B-Lymphozyt	im Knochenmark (<i>bone marrow</i>) ausdifferenzierter Lymphozyt
CAA	zerebrale Amyloidangiopathie
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i> (Liquor cerebrospinalis)
DC	<i>dendritic cells</i> (dendritische Zellen)
DNA	Desoxyribonukleinsäure, Träger der Erbinformation
EZM	Extrazelluläre Matrix
FS	Farbstoff
GALT	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe
HCl	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HSA	humanes Serumalbumin
HVL	Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse)
l	Liter
ISF	interstitielle Flüssigkeit
LH	Lymphozytäre Hypophysitis
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
m	Milli-; Meter
μ	Mikro
min	Minute(n)
MPS	mononukleär-phagozytäres System
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NALT	Nasen-assoziiertes lymphatisches Gewebe
RNA	Ribonukleinsäure, Bestandteil des Genoms
sek	Sekunde(n)
T-Lymphozyt	im Thymus ausdifferenzierter Lymphozyt
ZNS	zentrales Nervensystem

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	13
Übersicht über die Liquorzirkulation.	
Abb. 2a:	14
Frontalschnitt: Detailansicht des Subarachnoidalraumes mit den Pacchioni-Granulationen.	
Abb. 2b:	14
Schema: Feinbau der Leptomeninx mit ihrem Spaltraum (Subarachnoidalraum).	
Abb. 3 (A1-A6):	43
Verlauf des Farbstoffes nach FS-Injektion in die Nase nach 5 Minuten.	
Abb. 3 (A7-A9):	44
Verlauf des Farbstoffes nach FS-Injektion in die Nase nach 5-10 Minuten.	
Abb. 4 (B1/B2):	66
Schneller Abflussweg des FS über die Gefäßwände der Vasa vasorum (Meningealarterien) und der A. carotis nach Injektion des FS in das Ventrikelsystem nach 5 Minuten.	
Abb. 5 (C1/C2):	66
FS-Auftreten in der nasalen Mukosa nach Injektion des FS in das rechte Vorderhorn des Seitenventrikels nach 10 Minuten.	
Abb. 6 (D1/D2):	67
FS-Verteilung in den zervikalen Lymphknoten nach Injektion in den rechten Seitenventrikel nach 5 Minuten.	
Abb. 6 (D3):	67
Ependymom bei einem Versuchstier der CSF-Gruppe nach 5 Minuten.	

Abb. 7 (E1-E6):	68
Verlauf des Farbstoffes nach intraventrikulärer FS-Injektion in den CSF des rechten Vorderhorns 10-20 Minuten nach Injektion.	
Abb. 7 (E7-E12):	69
Verlauf des Farbstoffes nach intraventrikulärer FS-Injektion in den CSF des rechten Vorderhorns nach 10-20 Minuten.	
Abb. 7 (E13-E18):	70
Verlauf des Farbstoffes nach intraventrikulärer FS-Injektion in den CSF des rechten Vorderhorns nach 10-20 Minuten.	
Abb. 7 (E19-E24):	71
Verlauf des Farbstoffes nach intraventrikulärer FS-Injektion in den CSF des rechten Vorderhorns nach 5-10 Minuten.	
Abb. 7 (E25-E28):	72
Verlauf des Farbstoffes nach intraventrikulärer FS-Injektion in den CSF des rechten Vorderhorns nach 10-20 Minuten.	
Abb. 7 (E29):	72
FS-Akkumulation tiefer Halslymphknoten 2 Min nach Injektion in den CSF.	
Abb. 8 (F1):	86
Verlauf des Farbstoffes nach stereotaktischer FS-Injektion in die Hypophyse nach 5 Minuten.	
Abb. 8 (F2-F6):	86
Verlauf des Farbstoffes nach stereotaktischer FS-Injektion in die Hypophyse nach 10 bis 20 Minuten.	
Abb. 8 (F7-F10):	87
Verlauf des Farbstoffes nach stereotaktischer FS-Injektion in die Hypophyse nach 20-30 Minuten.	

Abb. 9 (G1/G2):	88
FS-Verteilung nach stereotaktischer Injektion in die Hypophyse nach 10 Minuten.	
Abb. 10 (H1-H4):	104
Ansicht von kaudal auf den Kopf und den Nacken einer Maus nach intraventrikulärer FS-Injektion nach 5, 10 und 20 Minuten.	
Abb. 10 (H5):	95
FS-Verteilung nach CSF-Injektion und Euthanasie nach 5 Minuten.	

7.3 Grafikverzeichnis

Grafik 1:	39
Auftreten des Farbstoffes 5 Minuten nach der FS-Injektion in die Nase.	
Grafik 2:	40
Auftreten des Farbstoffes 10 Minuten nach der FS-Injektion in die Nase.	
Grafik 3:	41
Vergleich des FS-Auftretens nach 5 und 10 Minuten nach der FS-Injektion in die Nase.	
Grafik 4:	46
Auftreten des Farbstoffes 2 Minuten nach der FS-Injektion in den CSF.	
Grafik 5:	50
Auftreten des Farbstoffes 5 Minuten nach der FS-Injektion in den CSF.	
Grafik 6:	56
Auftreten des Farbstoffes 10 Minuten nach der FS-Injektion in den CSF.	
Grafik 7:	62
Auftreten des Farbstoffes 20 Minuten nach der FS-Injektion in den CSF.	
Grafik 8:	64
Vergleich des FS-Auftretens nach 5, 10 und 20 Minuten nach der FS-Injektion in den CSF.	
Grafik 9:	73
Auftreten des Farbstoffes 5 Minuten nach der FS-Injektion in die Hypophyse.	
Grafik 10:	76
Auftreten des Farbstoffes 10 Minuten nach der FS-Injektion in die Hypophyse.	
Grafik 11:	79
Auftreten des Farbstoffes 20 Minuten nach der FS-Injektion in die Hypophyse.	
Grafik 12:	83
Auftreten des Farbstoffes 30 Minuten nach der FS-Injektion in die Hypophyse.	
Grafik 13:	83
Vergleich des FS-Auftretens nach 5, 10, 20 und 30 Minuten nach der FS-Injektion in die Hypophyse.	

7.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	24/25
Übersicht der Materialien, Chemikalien und Reagenzien	
Tab. 2:	26
Übersicht über die verschiedenen Tiergruppen	
Tab. 3:	32
Färbeschema aus dem Institut für Neuropathologie, Universitätsmedizin Göttingen	
Tab. 4:	37
Einteilung der Score-Grade	
Tab. 5:	42
Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in die Nase und 5 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Maus.	
Tab. 6:	42
Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in die Nase und 10 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Maus.	
Tab. 7:	48
Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in den CSF und 2 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Maus.	
Tab. 8:	52
Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in den CSF und 5 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Mäuse.	
Tab. 9:	57/58
Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in den CSF und 10 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Mäuse.	
Tab. 10:	65
Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in den CSF und 20 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Mäuse.	

Tab. 11:	75
Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in die Hypophyse und 5 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Mäuse.	
Tab. 12:	78
Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in die Hypophyse und 10 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Mäuse.	
Tab. 13:	81
Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in die Hypophyse und 20 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Mäuse.	
Tab. 14:	85
Übersicht über das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von Farbstoff nach Injektion in die Hypophyse und 30 Minuten Verweildauer bis zur Euthanasie der Mäuse.	

7.5 Legende zu den Ergebnis-Tabellen

Abkürzung	Bedeutung
BG	Bindegewebe
BG u LK	Bindegewebe um Lymphknoten
LK	Lymphknoten
LK-Sinus	Lymphknoten-Sinus
LK-Rand	Lymphknoten-Rand
Lage LK superfi.	Superfizielle Lage des Lymphknotens
Lage LK tief	Tiefe Lage des Lymphknotens
GR/GW basal	Gehirnrand/Gefäßwände basal
GR/GW kranial	Gehirnrand/Gefäßwände kranial
GR lateral	Gehirnrand lateral
Zwi HEM	zwischen Hirnhemisphären (Gehirnrand und Gefäßwände)
GE-VS	Gehirn-Ventrikelsystem
Hirngewebe	Hirngewebe
Ce-R	Cerebellum (Rand/Gefäßwände)
St-R	Stammhirn (Rand/Gefäßwände)
Zwi Ce/St	zwischen Cerebellum und Stammhirn (im Ventrikelsystem)
RM (VS)	Rückenmark (Zentralkanal)
pBluG	periphere Blutgefäße
pLymG	periphere Lymphgefäße
NA-Mu	Nasenmukosa (Lumen)
NA-LymG	Nasale Lymphgefäße
NA-Fli	Nase Flimmerepithel
Zwi GE/NA	zwischen Gehirn und Nase (Weg vom Gehirn zur Nase)
Gl. lac. intersept	Gl. lacrimalis (interseptal)
um N. opticus	Im Epineurium um den N. opticus
um/im Auge	um Auge (Muskulatur, Lymphgefäße, BG, etc.)
DRÜ mukös	Speicheldrüse mukös
DRÜ serös	Speicheldrüse serös
um Drüsengew	um Drüsengewebe
um Muskulatur	um Muskulatur
FG weiß	Fettgewebe weiß
FG braun	Fettgewebe braun
MAK	Makrophagen (Zellen mit phagozytiertem FS)
FS um MAK	FS-Saum um Makrophagen
AHY	Adenohypophyse
NHY	Neurohypophyse
HYS	Hypophysenstiel (Infundibulum)
Stichkanal	stereotaktisch herbeigeführt

Abkürzung	Bedeutung
Arach-Z + GW	Arachnoidalzotten und Gefäßwände
BO	Bulbus olfactorius
Car	A. carotis
Ce	Cerebellum
GH	Großhirn
HY	Hypophyse
Na	Nase
N. II	N. opticus
Oes	Oesophagus
Par	Gl. parotis
RM	Rückenmark
SpN	Spinalnerven
SZL	superfizielle, zervikale Lymphknoten
T	Trachea
TZL	tiefe, zervikale Lymphknoten
VS	Ventrikelsystem

8. Literaturverzeichnis

Abbott NJ (2004): Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int* 45, 545-552

Alcolado R, Weller RO, Parrish EP, Garrod D (1988): The cranial arachnoid and pia mater in man: anatomical and ultrastructural observations. *Neuropathol Appl Neurobiol* 14, 1-17

Andersson PB, Perry VH, Gordon S (1992): The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in CNS parenchyma differs from that in other body tissues. *Neuroscience* 48(1), 169-186

Beach TG (2008): Physiologic origins of age-related beta-amyloid deposition. *Neurodegener Dis* 5, 143-145

Beach TG, Potter PE, Kuo YM, Emmerling MR, Durham RA, Webster SD, Walker DG, Sue LI, Scott S, Layne KJ, Roher AE (2000): Cholinergic deafferentation of the rabbit cortex: a new animal model of Abeta deposition. *Neurosci Lett* 283, 9-12

Bechmann I, Kwidzinski E, Kovac AD, Simbürger E, Horvath T, Gimsa U, Dirnagl U, Priller J, Nitsch R (2001): Turnover of rat brain perivascular cells. *Exp Neurol* 168, 242-249

Bechmann I, Galea I, Perry VH (2007): What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol* 28, 5-11

Beressi N, Cohen R, Beressi JP, Dumas JL, Legrand M, Iba-Zizen MT, Modigliani E (1994): Pseudotumoral lymphocytic hypophysitis successfully treated by corticosteroid alone: first case report. *Neurosurgery* 35(3), 505-508, discussion 508

Bergsneider M (2001): Evolving concepts of cerebrospinal fluid. *Neurosurg Clin N Am* 36, 631-638

- Boulton M, Flessner M, Armstrong D, Hay J, Johnston M (1998):** Determination of volumetric cerebrospinal fluid absorption into extracranial lymphatics in sheep. *Am J Physiol* 274, R88-R96
- Boulton M, Flessner M, Armstrong D, Mohamed R, Hay J, Johnston M (1999):** Contribution of extracranial lymphatics and arachnoid villi to the clearance of a CSF tracer in the rat. *Am J Physiol* 276 (3 Pt 2), R818-R823
- Bourette RP, Mouchiroud G (2008):** The biological role of interferon-inducible P204 protein in the development of the mononuclear phagocyte system. *Front Biosci* 13, 879-886
- Bradbury MW, Westrop RJ (1983):** Factors influencing exit of substances from cerebrospinal fluid into deep cervical lymph of the rabbit. *J Physiol* 339, 519-534
- Bratl M, Flügel A (2002):** The role of T cells in brain pathology. *Curr Top Microbiol Immunol* 265, 141-162
- Brinker T, Ludemann W, Berens von Rautenfeld D, Samii M (1997):** Dynamic properties of lymphatic pathways for the absorption of cerebrospinal fluid. *Acta Neuropathol (Berl)* 94(5), 493-498
- Butler MG, Isogai S, Weinstein BM (2009):** Lymphatic development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 87(3), 222-231
- Buxton N, Robertson I (2001):** Lymphocytic and granulocytic hypophysitis: a single centre experience. *Br J Neurosurg* 15(3), 242-245, discussion 245-246
- Caesar NM, Myers KA, Fan X (2013):** Neisseria meningitidis serogroup B vaccine development. *Microb Pathog* 57, 33-40

- Carare RO, Bernardes-Silva M, Newman TA, Page AM, Nicoll JAR, Perry VH, Weller RO (2008):** Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries. Significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34, 131-144
- Carare RO, Hawkes CA, Weller RO (2014):** Afferent and efferent immunological pathways of the brain. Anatomy, function and failure. *Brain Behav Immun* 36, 9-14
- Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG, Lo D (1999):** Disproportionate recruitment of CD8+ T cells into the central nervous system by professional antigen-presenting cells. *Am J Pathol* 154(2), 481-494
- Castrop F, Haslinger B, Hemmer B, Buck D (2013):** Review of the pharmacoeconomics of early treatment of multiple sclerosis using interferon beta. *Neuropsychiatr Dis Treat* 9, 1339-1349
- Cho KH, Cheong JS, Ha YS, Cho BH, Murakami G, Katori Y (2012):** The anatomy of fetal peripheral lymphatic vessels in the head-and-neck region: an immunohistochemical study. *J Anat* 220(1), 102-111
- Chung C, Iwakiri Y (2013):** The lymphatic vascular system in liver diseases: its role in ascites formation. *Clin Mol Hepatol* 19(2), 99-104
- Cserr HF, Knopf PM (1992):** Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: A new view. *Immunol Today* 13, 507-512
- Cserr HF, Harling-Berg CJ, Knopf PM (1992a):** Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. *Brain Pathol* 2, 269-276
- Cserr HF, DePasquale M, Harling-Berg CJ, Park JT, Knopf PM (1992b):** Afferent and efferent arms of the humoral immune response to CSF-administered albumins in a rat model with normal blood-brain barrier permeability. *J Neuroimmunol* 41, 195-202

- Dalgleish AG, O'Byrne KJ (2002):** Chronic immune activation and inflammation in the pathogenesis of AIDS and cancer. *Adv Cancer Res* 84, 231-276
- Davson H, Welch K, Segal MB:** Physiology and pathophysiology of the cerebrospinal fluid. Churchill Livingstone, Edinburgh 1987
- Djuanda E, Lee R, Weller RO (1998):** A search for the lymphatic drainage of the human brain? *Neuropath Appl Neurobiol* 24, 132
- Durán Martínez M, Santonja C, Pavón de Paz I, Monereo Megías S (2001):** Lymphocytic hypophysitis: report of an unusual case of a rare disorder. *J Endocrinol Invest* 24(3), 190-193
- Elmore SA (2006):** Enhanced histopathology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol* 34(5), 687-696
- Erlich SS, McComb JG, Hyman S, Weiss MH (1986):** Ultrastructural morphology of the olfactory pathway for cerebrospinal fluid drainage in the rabbit. *J Neurosurg* 64, 466-473
- Galea I, Bechmann I, Perry VH (2007):** What is immune privilege (not)? *Trends Immunol* 28, 12-18
- Goldman EE (1909):** Die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der "vitalen Färbung". *Beitr Klin Chirug* 64, 192-265
- Goldman EE (1913):** Vitalfärbung am Zentralnervensystem. *Abh preuss Akad Wiss Phys-Math K1* No 1, 1-60
- Goldmann J, Kwidzinski E, Brandt C, Mahlo J, Richter D, Bechmann I (2006):** T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa. *J Leukoc Biol* 80, 797-801

- Goldstein N, Goldstein R, Terterov D, Kamensky AA, Kovalev GI, Zolotarev YA, Avakyan GN, Terterov S (2012):** Blood-brain barrier unlocked. *Biochemistry (Mosc)* 77(5), 419-24
- González Cámpora R, Otal Salaverri C, Vázquez Ramirez F, Salguero Villadiego M, Galera Davidson H (1993):** Metastatic glioblastoma multiforme in cervical lymph nodes. Report of a case with diagnosis by fine needle aspiration. *Acta Cytol* 37, 938-942
- Greitz D (2007):** Paradigm shift in hydrocephalus research in legacy of Dandy's pioneering work: rationale for third ventriculostomy in communicating hydrocephalus. *Childs Nerv Syst* 23, 487-489
- Gutenberg A, Buslei R, Fahlbusch R, Buchfelder M, Brück W (2005):** Immunopathology of primary hypophysitis: implications for pathogenesis. *Am J Surg Pathol* 29(3), 329-338
- Gutenberg A, Hans V, Puchner MJ, Kreutzer J, Brück W, Caturegli P, Buchfelder M (2006):** Primary hypophysitis: clinical-pathological correlations. *Eur J Endocrinol* 155(1), 101-107
- Harling-Berg C, Knopf PM, Merriam J, Cserr HF (1989):** Role of cervical lymph nodes in the systemic humoral immune response to human serum albumin microinfused into rat cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* 25, 185-193
- Hashimoto K, Takao T, Makino S (1997):** Lymphocytic adenohypophysitis and lymphocytic infundibuloneurohypophysitis. *Endocr J* 44(1), 1-10
- Hatterer E, Davoust N, Didier-Bazes M, Vuillat C, Malcus C, Belin M-F, Nataf S (2006):** How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. *Blood* 107, 806-812
- Hickey WF (2001):** Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 36, 118-124

- Hochmeister S, Zeitelhofer M, Bauer J, Nicolussi E-M, Fischer M-T, Heinke B, Selzer E, Lassmann H, Bradl M (2008):** After injection into the striatum, in vitro-differentiated microglia- and bone marrow-derived dendritic cells can leave the central nervous system via the blood stream. *The American journal of pathology* 173 (6), 1669-1681
- Honegger J, Fahlbusch R, Bornemann A, Hensen J, Buchfelder M, Müller M, Nomikos P (1997):** Lymphocytic and granulomatous hypophysitis: experience with nine cases. *Neurosurgery* 40(4), 713-722; discussion 722-723
- Hong YK, Shin JW, Detmar M (2004):** Development of the lymphatic vascular system: a mystery unravels. *Dev Dyn* 231(3), 462-473
- Hutchings M, Weller RO (1986):** Anatomical relationships of the pia mater to cerebral blood vessels in man. *J Neurosurg* 65, 316-325
- Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA et. al (2012):** A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med* 4(147), 147ra111
- Iliff JJ, Lee H, Yu M, Feng T, Logan J, Nedergaard M, Benveniste H (2013):** Technical advance Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI *J Clin Invest* 123(3), 1299–1309
- Johanson CE, Duncan JA, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD (2008):** Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res* 5, 10
- Johnston M (2003):** The importance of lymphatics in cerebrospinal fluid transport. *Lymphat Res Biol* 1 (1), 41-44; discussion 45

- Johnston M, Zakharov A, Papaiconomou C, Salmasi G, Armstrong D (2004):** Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species. *Cerebrospinal Fluid Res* 1, 2-15
- Kaushik DK, Basu A (2013):** A Friend in Need May Not be a Friend Indeed: Role of Microglia in Neurodegenerative Diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12(6), 726-740
- Kida S, Pantazis A, Weller RO (1993):** CSF drains directly from the subarachnoid space into nasal lymphatics in the rat. Anatomy, histology and immunological significance. *Neuropathol Appl Neurobiol* 19, 480-488
- Kida S, Weller RO, Zhang ET, Phillips MJ, Iannotti F (1995):** Anatomical pathways for lymphatic drainage of the brain and their pathological significance. *Neuropathol Appl Neurobiol* 21(3), 181-184
- Kido DK, Gomez DG, Pavese AMJ, Potts DG (1976):** Human spinal arachnoid villi and granulations. *Neuroradiology* 11, 221-228
- Killer HE (2013):** Production and circulation of cerebrospinal fluid with respect to the subarachnoid space of the optic nerve. *J Glaucoma* Jun-Jul 22 Suppl 5: S8-S10
- Krahn V (1981):** Leukodiapedesis and leukocyte migration in the leptomeninges and in the subarachnoid space. *J Neurol* 226, 43-52
- Krahn V (1982):** The pia mater at the site of the entry of blood vessels into the central nervous system. *Anat Embryol (Berl)* 164, 257-263
- Krementsov DN, Teuscher C (2013):** Environmental factors acting during development to influence MS risk: insights from animal studies. *Mult Scler* 19(13), 1684-1689

- Kristof RA, Van Roost D, Klingmüller D, Springer W, Schramm J (1999):** Lymphocytic hypophysitis: non-invasive diagnosis and treatment by high dose methylprednisolone pulse therapy? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67(3), 398-402
- Krizova L, Kollar B, Jezova D, Turcani P (2013):** Genetic aspects of vitamin D receptor and metabolism in relation to the risk of multiple sclerosis. *Gen Physiol Biophys* 32(4), 459-466
- Landek-Salgado MA, Gutenberg A, Lupi I, Kimura H, Mariotti S, Rose NR, Caturegli P (2010):** Pregnancy, postpartum autoimmune thyroiditis, and autoimmune hypophysitis: intimate relationships. *Autoimmun Rev* 9(3), 153-157
- Lecube A, Francisco G, Rodríguez D, Ortega A, Codina A, Hernández C, Simó R (2003):** Lymphocytic hypophysitis successfully treated with azathioprine: first case report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74(11), 1581-1583
- Leung GK, Lopes MB, Thorner MO, Vance ML, Laws ER (2004):** Primary hypophysitis: a single-center experience in 16 cases. *J Neurosurg* 101(2), 262-271
- Lowhagen P, Johansson BB, Nordborg C (1994):** The nasal route of cerebrospinal fluid drainage in man. A light-microscope study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20, 543-550
- Lüdemann W, Berens von Rautenfeld D, Samii M, Brinker T (2005):** Ultrastructure of the cerebrospinal fluid outflow along the optic nerve into the lymphatic system. *Childs Nerv Syst* 21(2), 96-103
- Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP (2010):** The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* 58(9), 1094-1103.

- Mollanji R, Papaiconomou C, Boulton M, Midha R, Johnston M (2001):** Comparison of cerebrospinal fluid transport in fetal and adult sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R1215-R1223
- Neuropathology Group of the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (MRC CFAS) (2001):** Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. *Lancet* 357(9251), 169-175
- Pan WR, Suami H, Taylor GI (2008):** Lymphatic drainage of the superficial tissues of the head and neck: anatomical study and clinical implications. *Plast Reconstr Surg* 121(5), 1614-1624; discussion 1625-1626
- Papaiconomou C, Bozanovic-Sosic R, Zakharov A, Johnston M (2002):** Does neonatal cerebrospinal fluid absorption occur via arachnoid projections or extracranial lymphatics? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283, R869-R876
- Pashenkov M, Teleshova N, Link H (2003):** Inflammation in the central nervous system: the role for dendritic cells. *Brain Pathol* 13, 23-33
- Paxinos G, Koutcherov Y, Wang H, Halliday GM, Watson C:** Atlas of the Developing Mouth Brain, Elsevier Ltd. Oxford 2006, 1. Auflage
- Planas-Paz L, Lammert E (2013):** Mechanical forces in lymphatic vascular development and disease. *Cell Mol Life Sci* 70(22), 4341-4354
- Platt AM, Randolph GJ (2013):** Dendritic cell migration through the lymphatic vasculature to lymph nodes. *Adv Immunol* 120, 51-68

- Preston SD, Steart PV, Wilkinson A, Nicoll JAR, Weller RO (2003):** Capillary and arterial amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: defining the perivascular route for the elimination of amyloid beta from the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29, 106-117
- Randall TD, Carragher DM, Rangel-Moreno J (2008):** Development of secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 26, 627-650
- Roher AE, Kuo YM, Esh C, Knebel C, Weiss N, Kalback W, Luehrs DC, Childress JL, Beach TG, Weller RO et al. (2003):** Cortical and leptomeningeal cerebrovascular amyloid and white matter pathology in Alzheimer's disease. *MolMed* 9, 112-122
- Rouphael NG, Stephens DS (2012):** Neisseria meningitidis: biology, microbiology, and epidemiology. *Methods Mol Biol* 799, 1-20
- Ruddle NH, Akirav EM (2009):** Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. *J Immunol* 183(4), 2205-2212
- Russo E, Nitschké M, Halin C (2013):** Dendritic cell interactions with lymphatic endothelium. *Lymphat Res Biol* 11(3), 172-182
- Schley D, Carare-Nnadi R, Please CP, Perry VH, Weller RO (2006):** Mechanisms to explain the reverse perivascular transport of solutes out of the brain. *J Theor Biol* 238, 962-974
- Schoppmann SF (2005):** Lymphangiogenesis, inflammation and metastasis. *Anticancer Res Nov-Dec* 25(6C), 4503-4511
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K:** Prometheus Lernatlas der Anatomie: Kopf, Hals und Neuroanatomie; 1. Auflage, © Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006

- Selch MT, DeSalles AA, Kelly DF, Frighetto L, Vinters HV, Cabatan-Awang C, Wallace RE, Solberg TD (2003):** Stereotactic radiotherapy for the treatment of lymphocytic hypophysitis. Report of two cases. *J Neurosurg* 99(3), 591-596
- Shen JY, Kelly DE, Hyman S, McComb JG (1985):** Intraorbital cerebrospinal fluid outflow and the posterior uveal compartment of the hamster eye. *Cell Tissue Res* 240(1), 77-87
- Shoesmith CL, Buist R, Del Bigio MR (2000):** Magnetic resonance imaging study of extracellular fluid tracer movement in brains of immature rats with hydrocephalus. *Neurol Res* 22, 111-116
- Sitki-Green DL, Edwards RH, Covington MM, Raab-Traub N (2004):** Biology of Epstein-Barr virus during infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 189(3), 483-492
- Sokołowski R, Targowski T (2012):** [Invasive meningococcal disease]. *Pol Merkur Lekarski* 33(197), 255-260
- Szentistvanyi I, Patlak CS, Ellis RA, Cserr HF (1984):** Drainage of interstitial fluid from different regions of rat brain. *Am J Physiol* 246, F835-F844
- Thodou E, Asa SL, Kontogeorgos G, Kovacs K, Horvath E, Ezzat S (1995):** Clinical case seminar: lymphocytic hypophysitis: clinicopathological findings. *J Clin Endocrinol Metab* 80(8), 2302-2311
- Tilney NL (1971):** Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. *J Anat* 109(Pt 3), 369-383
- Walter BA, Valera VA, Takahashi S, Ushiki T (2006):** The olfactory route for cerebrospinal fluid drainage into the peripheral lymphatic system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32(4), 388-396

- Weih F, Caamaño J (2003):** Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway. *Immunol Rev* 195, 91-105
- Weitman E, Cuzzone D, Mehrara BJ (2013):** Tissue engineering and regeneration of lymphatic structures. *Future Oncol* 9(9), 1365-1374
- Welch K, Pollay M (1963):** The spinal arachnoid villi of the monkeys *Cercopithecus aethiops* *sabaeus* and *Macaca irus*. *Anat Rec* 145, 43-48
- Weller RO (1998):** Pathology of cerebrospinal fluid and interstitial fluid of the CNS: significance for Alzheimer disease, prion disorders and multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 57, 885-894
- Weller RO (2005):** Microscopic morphology and histology of the human meninges. *Morphologie* 89(248), 22-34
- Weller RO, Kida S, Zhang ET (1992):** Pathways of fluid drainage from the brain – morphological aspects and immunological significance in rat and man. *Brain Pathol* 2, 277-284
- Weller RO, Massey A, Newman TA, Hutchings M, Kuo YM, Roher AE (1998):** Cerebral amyloid angiopathy: amyloid beta accumulates in putative interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 153, 725-733
- Weller RO, Subash M, Preston SD, Mazanti I, Carare RO (2008):** Perivascular drainage of amyloid beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 18, 253-266
- Weller RO, Djuanda E, Yow HY, Carare RO (2009):** Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease. *Acta neuropathologica* 117(1), 1-14

- Weller RO, Galea I, Carare RO, Minagar A (2010):** Pathophysiology of the lymphatic drainage of the central nervous system: Implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Pathophysiology* 17(4), 295-306
- Williams PL, ed:** Gray's Anatomy, 38th edn, Churchill Livingstone, Edinburgh 1995
- Xiao BG, Link H (1998):** Immune regulation within the central nervous system. *J Neurol Sci* 157, 1-12
- Xing L, Ji RC (2008):** Lymphangiogenesis, myeloid cells and inflammation. *Expert Rev Clin Immunol* 4(5), 599-613
- Zakharov A, Papaiconomou C, Johnston M (2004):** Lymphatic vessels gain access to cerebrospinal fluid through unique association with olfactory nerves. *Lymphat Res Biol* 2, 139-146
- Zhang ET, Inman CB, Weller RO (1990):** Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow-Robin) spaces in the human cerebrum. *J Anat* 170, 111-123
- Zhang ET, Richards HK, Kida S, Weller RO (1992):** Directional and compartmentalised drainage of interstitial fluid and cerebrospinal fluid from the rat brain. *Acta Neuropathol* 83, 233-239
- Zwillinger H (1912):** Die Lymphbahnen des oberen Nasalschnittes und deren Beziehungen zu den perimeningealen Lymphräumen. *Arch Laryngol Rhinol* 26, 66-78

Danksagung

Besonderer Dank gilt Frau Privatdozentin Dr. med. A. Gutenberg, geschäftsführende Oberärztin der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die engagierte und umfassende wissenschaftliche Betreuung.

Mein Dank gilt außerdem dem Direktor des Instituts für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen, Herrn Prof. Dr. med. W. Brück, sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors im Institut für Neuropathologie für ihre freundliche Unterstützung und die Ermöglichung meiner Laborarbeiten.