

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. S. Zierz)

Thema: Histochemische Darstellung der Tyrosinase in Liquorleukozyten bei
neurologischen Erkrankungen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

von Jürgen Schulze
geb. am 02. Oktober 1963 in Annaberg-Buchholz

Gutachter:

1. Prof. Dr. Zierz, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Martin-Luther-Universität Halle
2. Prof. Wagner, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universität Leipzig
3. Prof. Holzhausen, Institut für Pathologie, Martin-Luther-Universität Halle

19. 12. 2006

30. 06. 2009

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	3
1.1. Der Liquor cerebrospinalis	3
1.2. Immunreaktionen des ZNS	6
1.2.1. Infektionskrankheiten	6
1.2.2. Autoimmunerkrankungen des ZNS	11
1.3. Tumore des ZNS	14
1.4. Enzymzytochemie der Leukozyten und ihrer Vorstufen	15
1.5. Tyrosinase	17
2. PROBLEMSTELLUNG	21
3. MATERIAL UND METHODEN	22
3.1. Aufstellung der verwendeten Bio- und Feinchemikalien	22
3.2. Gewinnung und Weiterbehandlung von Untersuchungsmaterial	22
3.3. Methode des zytochemischen Tyrosinase Nachweises	23
3.4. Tyrosinase -Nachweis an Liquor-Sedimenten	24
3.5. Statistische Methoden	24
4. PROBANDEN	25
5. ERGEBNISSE	27
5.1. Tyrosinasenachweis bei Liquor-Leukozyten von Patienten mit neurologischen Erkrankungen	27
6. DISKUSSION	36
7. ZUSAMMENFASSUNG	41
8. LITERATURVERZEICHNIS	42
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	48
THESEN	50
ANHANG	53

1. EINLEITUNG

1.1. Der Liquor cerebrospinalis

Das Zentralnervensystem (ZNS), das aus Gehirn und Rückenmark besteht, ist durch die Schädelkalotte, die Wirbelsäule, die Meningen sowie eine Reihe von Schrankenmechanismen mechanisch und funktionell weitgehend gegen störende Einwirkungen von innen und außen geschützt. Der Liquor cerebrospinalis (Zerebrospinalflüssigkeit, CSF) bildet zusätzlich einen Flüssigkeitspuffer, der das Hirngewebe gegen äußere mechanische Einwirkungen abschirmt. Durch die Lagerung des Gehirns in der Liquorflüssigkeit wird gleichzeitig eine beträchtliche relative Gewichtsverringerung der Hirnsubstanz herbeigeführt. Daneben obliegt dem Liquor die Aufgabe der Volumenregulation. Bei einer Änderung des Blutvolumens in den cerebralen Gefäßen wird über die Steuerung der Liquormenge das Hirnvolumen konstant gehalten. Ferner stellt der Liquor ein Transportmedium für Nährstoffe und Metaboliten dar. In einer veränderten Mikrozusammensetzung spiegeln sich Stoffwechseleränderungen wie auch zelluläre und humorale Immunreaktionen der Hirnregion wieder.

Zwischen Blutgefäßen, den liquorführenden Räumen und dem Hirngewebe liegt das sogenannte Schrankensystem des ZNS, das aus einer Serie von funktionalen und anatomischen Barrieren besteht und im Gehirn den Eintritt von Flüssigkeit, Elektrolyten, kleinen Molekülen und Makromolekülen aus dem Blut reguliert. Das im Hirn entstehende Milieu unterscheidet sich markant von dem anderer Organe. Der Liquor zeichnet sich insbesondere durch Zellarmut und geringe Proteinkonzentration aus.

Stern (1923) prägte den Schrankenbegriff für den behinderten Stoffaustausch zwischen Blut und Hirnstrukturen.

Es lassen sich drei Schrankeneinheiten morphologisch abgrenzen (Seitenhauer 1986):

1. die Blut-Hirn-Schranke
2. die Blut-Liquor-Schranke
3. die Parenchymzellmembran-Schranke

1.1.1. Die Blut-Hirn-Schranke (BHS)

Die Blut-Hirn-Schranke wird von den Wänden der Blutgefäße und dem umgebenden Glia- und Bindegewebe gebildet. An den Grenzflächen erfolgt der Eintritt von Stoffen in das Hirnparenchym. Als Transportmechanismus sind Diffusion, aktiver Transport und Pinozytose von Bedeutung (Goldstein und Betz 1986). Die Kapillaren des Hirns besitzen im Gegensatz zu denen der meisten anderen Organe eine kontinuierliche endotheliale Begrenzung. Die Endothelzellen der Hirnkapillaren sind durch feste Zellkontakte, sogenannte "Tight junctions", verbunden.

Der sich daraus ergebende Verschluss der Interzellularspalten verhindert den Transfer von Plasmaproteinen und anderen Makromolekülen aus dem Blut in das Hirn. Der Flüssigkeitstransport ist dadurch immer proteinfrei. Immerhin 20 % des Liquorvolumens rekrutieren sich aus dieser Flüssigkeitsbewegung. Daneben existieren wenige, räumlich eng begrenzte Regionen ohne Blut-Hirn-Schranke. Dazu zählen die Hypophyse, Epiphyse und einige Bereiche des Hypothalamus (Goldstein und Betz 1986).

1.1.2. Die Blut-Liquor-Schranke

Der Stofftransport zwischen Blut und Liquor basiert auch hier auf den spezifischen Wandbau der Kapillaren.

Die Plexus choroidei der Hirnventrikel I, II und IV sind mit etwa 70 % Hauptbildungsort des Liquors.

Die Plexuskapillaren verfügen über "gap junctions" (durchlässige Epithelien), die auch den Austausch von Makromolekülen erlauben.

1.1.3. Die Parenchymzellmembran-Schranke

Vorwiegend im Bereich der zirkumventrikulären Organe gibt es auch weitere fenestrierte Hirnareale, wo ein Transport großer Moleküle stattfinden kann.

Aus dem I. und II. Ventrikel fließt der Liquor cerebrospinalis durch das Foramen interventriculare (Monroi) in den III. Ventrikel, von dort aus über den Aquaeductus in den IV. Ventrikel. Diese 4 Ventrikel und die dazugehörigen Verbindungen bezeichnet man als innere Liquorräume. Über die Foramina Luschkae und Magendii sind die inneren Liquorräume, speziell der IV. Ventrikel, mit den äußeren Liquorräumen verbunden. In diesen äußeren Liquorräumen umspült der Liquor cerebrospinalis das Rückenmark und das Gehirn und wird in Granulationes arachnoidales wieder rückresorbiert.

Das restliche Volumen (rund 10 %) stammt aus der metabolischen Wasserproduktion.

Bei der Immunpathologie spielen diese Regionen eine wichtige Rolle, da dort auch Antikörper aus dem Blut das ZNS erreichen können. Stoffe penetrieren durch Plexuskapillarmembran und Zellmembran des Plexusepithels in den Liquorraum umso besser, je lipidlöslicher sie sind. Auch werden für einige Elektrolyte, Stoffwechselsubstrate, kleinere Aminosäuren sowie Präalbumin und Transferrin diese Transportmechanismen angenommen (Leibowitz und Hughes 1983, Goldstein und Bets 1986, David 1987).

1.2. Immunreaktionen des zentralen Nervensystems:

1.2.1. Infektionserkrankungen

Voraussetzung für die richtige Interpretation diagnostischer Befunde sowie die gezielte Einleitung therapeutischer Maßnahmen ist die Kenntnis der verschiedenen Stadien einer Infektion. Als erstes ist die Inkubationsphase zu nennen. Sie kann in Abhängigkeit vom Erreger Stunden, Monate oder Jahre betragen. Es erfolgt das Eindringen und die Vermehrung des Erregers und führt zu seiner Verbreitung im Organismus. Klinische Krankheitszeichen treten noch keine auf und nur ein Erregernachweis brächte diagnostische Hinweise.

Der Inkubationsphase schließt sich das Prodromalstadium an, welches Stunden bis Tage anhalten kann. Hier zeigen sich klinisch uncharakteristische Allgemeinsymptome, wie Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen und Erbrechen. Eine erste Auseinandersetzung erfolgt zwischen Erreger und Organismus. Eine entzündliche Reaktion setzt ein. Unspezifische zelluläre und humorale Abwehrmechanismen bewirken eine erste Antigen-Eliminierung. Es kommt zu einer Neutrophilie, die auch im Liquor bei zentralnervöser Beteiligung nachweisbar ist. Diese wird aber vor allem im Liquor selten erfasst, da die Patienten selten während des Prodromalstadiums einen Arzt aufsuchen.

Im Infektionsstadium treten die typischen klinischen Symptome der jeweiligen Erkrankung in Erscheinung. In dem befallenen Zellen oder Organen kommt es zu einer Ausschüttung zahlreicher Mediatoren sowie einer Aktivierung des spezifischen Immunsystems. Neben einer Lymphozytose lassen sich pathologische Immunreaktionen nachweisen. Die klinischen Symptome klingen im Rekonvaleszenzstadium bis zur Ausheilung ab. Die Infektion ist überstanden, wenn die Abwehrmechanismen zu einer vollständigen Eliminierung des Erregers geführt haben. Häufig wird eine langfristige Immunität erworben.

Die Abwehr von Pathogenen, seien es Mikroorganismen, Toxine, Fremdstoffe, Fremdgewebe oder entartetes Gewebe, ist die Hauptaufgabe des Immunsystems, die durch flexible, aber gleichzeitig hochspezifische Abwehrmechanismen erfolgt. Es müssen unzählige verschiedene Antigene im Laufe eines Lebens erkannt und abgewehrt werden. Für die Auslösung der Immunantwort, d. h. Antigen-Erkennung und Antigen-Eliminierung, stehen dem Immunsystem unspezifische und spezifische Abwehrmechanismen zur Verfügung.

In immunologischer Hinsicht nimmt das zentrale Nervensystem eine gewisse Sonderstellung ein. Innerhalb des ZNS sind die einzelnen Elemente der immunologischen Abwehr nur sehr gering repräsentiert. So zirkulieren nur wenige Monozyten und Lymphozyten im Hirn. Echte lymphatische Organe fehlen, ebenso Gefäße und immunkompetente Zellen. Da das normale Hirn keine Antikörper synthetisiert und wegen des Fehlens immunkompetenter Zellen und Antigene ist die Immunreaktion im ZNS sehr begrenzt. Die im Hirnwasser gefundenen geringen Antikörperkonzentrationen stammen aus dem Plasma.

Der Eintritt immunreaktiver Zellen und Antikörper aus dem Blut in das ZNS ist wegen der Schrankensysteme stark eingeschränkt. Die Blut-Liquor-Schranke ist einerseits essentiell für die Gewährleistung der Funktionstüchtigkeit des ZNS, andererseits limitiert die intakte Schranke die Abwehrkapazität des Gehirns.

Im Falle von Entzündungen oder anderen krankhaften Prozessen werden die Schrankensysteme defekt und damit durchlässiger. In das ZNS können zelluläre und humorale Bestandteile des Blutes eindringen. Das Gehirn ist dadurch in der Lage, eine komplexe Immunantwort zu entwickeln, die zu einem breiten Spektrum von immunologischem Verhalten führt, angefangen von einer relativen Nichtantwort bis zur Manifestation einer Hypersensitivität.

Infektionen laufen üblicherweise ohne Beteiligung des Nervensystems ab. Das Gehirn ist weitgehend vor Infektionen geschützt, solange die Schrankensysteme intakt sind. Erst bei einer Beeinträchtigung ist mit einer ZNS-Beteiligung zu rechnen.

Erkrankungen des ZNS, die durch Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten hervorgerufen werden, stellen Komplikationen außerhalb dieses Organs stattfindender Infektionen dar. Das ZNS wird in der Regel auf hämatogenem, posttraumatischem, per continuitatem oder neuronalem Weg infiziert.

Meningitis/ Encephalitis/ Myelitis transversa

Meningitis, Encephalitis und Myelitis transversa sind entzündliche Veränderungen des Zentralnervensystems und seiner Häute, die häufig kombiniert als Meningoencephalitis, Meningomyelitis oder Encephalomyelitis bzw. Abszeßbildung auftreten. Sie werden meist durch bakterielle oder virale Infektionen verursacht. Auch ein Befall durch Parasiten und Pilze kommt vor. Die Inzidenz der Meningitiden und Encephalitiden beträgt 15/100.000, die der Hirnabszesse 1/100.000 und die der Myelitis transversa 0,3/100.000. Die Durchseuchung der Bevölkerung mit neurotrophen Viren und Toxoplasmen ist mit 50 bis 100 % relativ hoch. Die Erreger können hämatogen, fortgeleitet oder direkt in das Gehirn und seine Häute gelangen.

Die bakterielle Meningitis beginnt in der Prodromalphase mit allgemeinen Krankheitsymptomen. Im Infektionsstadium treten die typischen klinischen Symptome mit Kopf-, Nacken-, Rückenschmerzen, Meningismus, Nausea, Erbrechen, hohem Fieber und Photophobie in Erscheinung. Auch Hirnnervenausfälle können auftreten.

Vigilanzstörungen, epileptische Anfälle, eine Herd- oder Hemisymptomatik, Aphasie oder eine delirante bzw. psychopathologische Symptomatik weisen auf eine cerebrale Beteiligung (Meningo-Encephalitis) hin.

Im Liquor findet man eine starke granulozytäre Pleozytose bis zu 15.000 Mpt/l, der Proteingehalt ist stark erhöht bis 5.000 mg/l, Lactat ist ebenfalls erhöht, Glucose dagegen vermindert. Es besteht eine massive Störung der Blut-Liquor-Schranke. Makroskopisch ist der Liquor trüb bis eitrig. Nach Abklingen der Akutphase wandelt sich das Zellbild. Es sind dann besonders bei der tuberkulösen Meningitis Lymphozyten vorherrschend. Die übrigen pathologischen Liquorparameter normalisieren sich. Die Granulozyten sind bei dieser Erkrankung von großer Bedeutung. Das massive Auftreten am Ort der Entzündung stellt hier die entscheidende Abwehrreaktion des Körpers dar.

Bei einer Encephalitis sind ebenso wie bei einer viralen Meningitis die Liquorveränderung, wenn überhaupt bestehend, eher dezent. So besteht nur eine leichte Pleozytose mit zunächst lymphozytärem Zellbild und eine geringe Eiweißerhöhung. Residuen mit Augenmuskelparesen, Taubheit, Hydrocephalus und epileptischen Anfällen sind möglich.

Eine Myelitis transversa ist eine durch virale oder bakterielle Infektion hervorgerufene Entzündung des Rückenmarks, häufig nach katarrhalischem Infekt, wobei ein Erregernachweis selten gelingt. Sie ist klinisch durch eine Tetra- oder Paraparese mit entsprechenden Sensibilitätsstörungen gekennzeichnet, die sich innerhalb von 24 Stunden bis mehreren Wochen aus Lumbago, Parästhesien und Fieber entwickelt. Der Liquor ist wie oben beschrieben verändert mit Pleozytose, Eiweißerhöhung und Schrankenstörung.

Neurolues

Die Neurolues wird ebenfalls durch Spirochäten (*Treponema pallidum*) hervorgerufene Meningitis, Meningoencephalitis oder Myelitis (Lues cerebrospinalis), die in ein Spätstadium mit chronischer Enzephalopathie (progressive Paralyse) und Hinterstrangdegeneration (Tabes dorsales) übergehen kann.

Die progressive Paralyse beginnt 10 bis 15 Jahre nach dem Primärinfekt mit Leistungsabfall und Sprachstörungen in Form von Silbenstolpern und führt zur Demenz. Gelegentlich entwickeln die Patienten einen psychotischen Größenwahn.

Die Tabes dorsales setzt mit lanzinierenden Schmerzen, häufig im Ausbreitungsgebiet des N. ischiadikus, und einem ataktischen Gangbild ein. Dazu können Sehstörungen mit Gesichtsfelddefekten und Visusabfall sowie Miktionsstörungen auftreten. Starke abdominelle Schmerzen bezeichnet man als tabische Krise. Es findet sich auch eine reflektorische Pupillenstarre (Argyll-Robertson-Syndrom), herabgesetzte Tiefensensibilität, positives Romberg-Zeichen, Areflexie und mitunter eine Optikusatrophie. Auch epileptische Anfälle können auftreten.

Diagnostisch sind wiederum Antikörper-Tests in Serum und Liquor entscheidend. Der *Treponema-pallidum*-Hämagglutinationstest (TPHA) und der Fluoreszenz-*Treponema*-Antikörper-Absorptions-Test (FTA-ABS-Test) werden 4 bis 6 Wochen post infektionem mit einer Treffsicherheit von 100% positiv. Im Spätstadium spricht eine positive Kardiolipin-Komplementbindungsreaktion für eine Aktivität der Erkrankung. Auch der Liquor ist verändert. Es findet sich eine mäßige lymphozytäre Pleozytose, erhöhter Proteingehalt, insbesondere des Gammaglobulins mit oligoklonalen Banden, sowie eine intrathekale IgM- und IgG-Synthese.

Neuroborreliose

Die Neuroborreliose ist eine durch Zecken übertragene Spirochäteninfektion (*Borrelia burgdorferi*).

Im ersten Stadium entwickelt sich ein Erythema chronicum migrans. Das zweite ist durch ein meningeales Syndrom mit Hirnnervenausfällen charakterisiert. Mit dem Bild einer Meningopolyneuritis, Polyradikulitis oder seltener Myelitis manifestiert sich die Neuroborreliose. Im dritten Stadium besteht neben Hauterscheinungen eine chronisch progressive Enzephalomyelitis.

Diagnostisch ist die Bestimmung der Antikörpertiter im Serum und Liquor mit Hilfe des ELISA-Tests bedeutend. Im Liquor findet sich eine mäßige Pleozytose mit Lymphozyten, Monozyten und Plasmazellen. Oft ist das IgG erhöht und die oligoklonalen Banden in der isoelektrischen Fokussierung sind fast immer positiv.

1.2.2. Autoimmunerkrankungen des ZNS

Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose ist eine schubförmig oder chronisch progredient verlaufende Entmarkungskrankheit von Gehirn und Rückenmark.

Im nördlichen Europa und in nördlichen Teilen Nordamerikas beträgt die Prävalenz 30-80 pro 100 000 Einwohner, im südlichen Europa und den südlichen Teilen Nordamerikas fällt die Prävalenz auf 6-14 pro 100 000 Einwohner, und in äquatorialen Gebieten sinkt sie auf unter 1 pro 100 000 Einwohner.

Das klinische Bild ist sehr vielgestaltig.

Bei Läsionen in "stillen" Gehirngebieten kann die MS asymptomatisch auftreten.

Die erste Attacke kommt ohne Vorwarnung und kann mono- oder polysymptomatisch verlaufen. Die am häufigsten auftretenden Symptome sind: Lähmungen,

Empfindungsstörungen, Erblindung im Rahmen einer Retrobulbärneuritis, Doppelbilder, Sprachstörungen, Übelkeit, Ataxie, Schwindel und Nystagmus. Kombinationen dieser

Symptome sind häufig. Nach dem ersten Schub tritt meist eine Remission ein. Bei einem erneuten Schub oder Rückfall kommt es zu einer plötzlichen Verschlechterung alter

Symptome oder einem Auftreten neuer Läsionen. Im Laufe eines unterschiedlich langen Zeitraumes (Jahre) entwickeln die Patienten eine zunehmende Behinderung.

Die Diagnosekriterien der multiplen Sklerose ist per definitionem festgelegt.

- Als Kriterien gelten:
1. Zwei Schübe oder Progredienz über ein Jahr,
 2. Mindestens zwei disseminierte Symptome,
 3. Typischer Liquorbefund,
 4. Multilokuläre Entmarkungsherde der weißen Substanz in der MRT.

Bei einer sicheren MS müssen alle vier Kriterien erfüllt sein, bei einer wahrscheinlichen MS mindestens zwei dieser Kriterien und bei einer möglichen MS lediglich ein Kriterium.

Eine Ursache ist nicht bekannt. Es kristallisieren sich heute vier wesentliche ätiopathogenetische Aspekte heraus:

-Genetisch-metabolische Faktoren:

Bestimmte Histokompatibilitätsantigene (HLA) finden sich bei MS-Patienten häufiger als in der Normalbevölkerung (HLA-DR 2, -DR 3, -B 7, -A3, -Dw 2)

-Exogene Faktoren mit der Virus-Hypothese:

Verschiedene Hinweise sprechen für eine frühkindliche Virusinfektion als initiales Ereignis in der Pathogenese der MS, die eine Viruslatenz oder -persistenz zur Folge haben kann. Bei genetisch bedingter Veranlagung ist der Organismus wegen vorhandener Immunreaktivitätsanomalien zu einem bestimmten Zeitpunkt überfordert, das persistierende Antigen zu kontrollieren. In Kombination mit Störungen der Autotoleranz und der Immunregulation werden Autoimmunreaktionen entwickelt in denen sensibilisierte T-Lymphozyten gegen Hirnantigene entstehen, die die Blut-Hirn-Schranke passieren und Antigene erkennen können.

So sind bei einem Teil der MS-Kranken erhöhte Masern-, Röteln- und Herpes Zoster-Antikörpertiter zu verzeichnen. Ein spezielles Virus konnte aber bis jetzt weder isoliert noch übertragen werden.

-Endogene neuroallergisch-autoimmunologische Faktoren

Die grundlegenden Studien über den Demyelinisierungsprozess basieren auf Untersuchungen an Modellerkrankungen wie experimentellen allergischen Enzephalomyelitiden (EAE). Das Zielantigen für den Autoimmunprozeß bei MS dürfte das basische Myelinprotein (myelin basic protein, MBP) sein, das ein spezifisches Protein der Myelinscheiden des Nervengewebes ist und aufgrund seiner Struktur leicht dem proteolytischen Abbau unterliegt.

.-Chlamydien-Hypothese

Eine weitere, erst seit kurzem bestehende Hypothese, ist die Vermutung, daß die MS das Resultat einer chronisch persistierenden Infektion des ZNS mit *Chlamydia pneumoniae* ist (Treib et al 1999). Der erst 1985 erkannte gramnegative obligat intrazelluläre Erreger *Chlamydia pneumoniae* ist weltweit verbreitet und stellt die dritt- bis vierthäufigste Ursache von meist leichten Pneumonien dar. Auch mehrten sich in den letzten zehn Jahren Hinweise auf eine infektiöse Ursache der Arteriosklerose, als eine chronisch (vor sich hinschwehlende) über Jahrzehnte verlaufende Gefäßinfektion mit *Chlamydia pneumoniae*.

Für die These, daß auch die MS das Resultat einer auf niederem Niveau chronisch persistierenden Infektion des ZNS mit *Chlamydia pneumoniae* darstellt, gibt es Argumente: Anhand der Analyse der MS-Epidemie auf den Färöer-Inseln nach 1940 wurden epidemiologische Kriterien für ein zu forderndes Agens in der Pathogenese der MS erstellt, wobei der gramnegative intrazelluläre Erreger *Chlamydia pneumoniae* diese perfekt erfüllt (Kurtzke et al 1986).

In einer Einzelkasuistik (Sriram 1999) wurde bei einem jungen Mann mit rapide progressiv verlaufender MS serologisch mittels PCR sowie kulturell im Liquor eine Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* nachgewiesen, welche sich unter Antibiotika-Therapie mit Ofloxacin und Rifampicin besserte. Eine nachfolgende Studie berichtete über den Nachweis von *Chlamydia pneumoniae* mittels PCR und kulturell bei MS-Patienten mit schubförmiger MS (17 Patienten) und 20 Patienten mit progredienter MS. Bei Patienten mit schubförmiger MS wurde bei allen eine positive PCR und bei acht Patienten ein kultureller Nachweis von *Chlamydia pneumoniae* geführt. Der PCR-Nachweis bei Patienten mit progredienter MS gelang bei 19 und bei 16 kulturell. Ein möglicher Hinweis auf die Spezifität dieser Antikörper ist die Absorption der als oligoklonale Banden bekannten autochton produzierten IgG-Fraktion im Liquor von *Chlamydia pneumoniae*. Die Kontrollgruppe wies überwiegend negative Ergebnisse auf. Bei Rindern können Säugetierchlamydien zu einer MS-ähnlichen chronischen Encephalomyelitis führen. Untersuchungen von Grau und Layh-Schmitt kommen zu ähnlichen, aber nicht so eindeutigen Ergebnissen. Sie finden nur bei einem Viertel der untersuchten Patienten mit gesicherter und möglicher MS positive PCR-Befunde. Die Kontrollpatienten waren negativ. Sie halten die Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* deshalb bei einer Subgruppe für möglich. Auch Holzer und Maaß kommen zu diesem Ergebnis, wobei hier der Liquor 36 % der untersuchten Patienten Chlamydien-spezifische IgG-Antikörper aufwies. (Treib 1999) Die von Layh-Schmitt et al. (2000) erhobenen Daten bestätigen, dass sich bei MS-Patienten signifikant häufiger DNS von *Chlamydia pneumoniae* nachweisen lässt; die Inzidenz liegt mit 23 % jedoch deutlich niedriger, als von Sriram et al. (1999) beobachtet. Gleiches gilt für die humoralen Immunantworten. Treib et al. (2000) konnten bei 10 % der MS-Patienten DNS im Liquor nachweisen und fanden eine intrathekale Synthese von *Chlamydia pneumoniae*-spezifischem IgG bei 36 % der MS-Patienten. Die vorliegenden Untersuchungen sind nur bedingt vergleichbar, da sie unterschiedliche Methoden zur Liquorasservierung, DNS-Extraktion, PCR, und Antikörperdetektion verwenden. Anscheinend werden bei einer signifikanten Anzahl von MS-Patienten intrathekal Antikörper vom IgG-Typ gegen *Chlamydia pneumoniae* gebildet.

1.3. Tumore des ZNS

Als Hirntumoren werden raumfordernde intracranielle Neoplasmen, die vom Neuroepithel und von den umgebenden Strukturen ausgehen, sowie entwicklungsgeschichtlich ektope intracranielle Gewebsdifferenzierungen bezeichnet.

Hirnmetastasen sind intracranielle heterologe Zellproliferationen, die von einem Primärtumor außerhalb des ZNS ausgehen. Die Metastasierung erfolgt meist hämatogen oder über die Meningen. Eine Sonderform bilden Neoplasmen der blutbildenden Organe (Leukämien) oder des lymphoretikulären Systems (Lymphome). Hier tritt eine Symptomatik durch Infiltration erst im Spätstadium mit Meningismus, Kopfschmerzen, Nausea, Vomitus, Hirnnervenausfällen und hirnorganischen Psychosyndromen ein. Die neurologischen Symptome treten entsprechend der Lokalisation, Ausmaß von Hirnödemen und Massenverschiebung auf. Durch das Tumorwachstum kommt es zu einem intracraniellen Druckanstieg, der neben der Malignität des Tumors prognostisch entscheidend ist.

Man unterscheidet in benigne, semimaligne und maligne Tumore.

Zu den benignen Tumoren zählen pilozystisches Astrozytom (Astrozytom I), Ependymom, Plexuspapillom, Neurinom, Meningeom, Teratom, Kraniopharyngeom, Hypophysenadenom und Hämangioblastom.

Semimaligne Tumore sind das Oligodendrogliom, das Astrozytom II und III, das Germinom und das Neurofibrosarkom.

Glioblastom, primäres malignes Lymphom, Medulloblastom und Meningosarkom sind maligne Tumore.

Die Diagnostik erfolgt mittels EEG, CCT und MRT. Der Liquor weist oft eine Eiweißserhöhung durch Schrankenstörung auf. Es kann zu einer leichten Pleozytose mit Tumorzellen sowie Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten kommen.

Morphologisch kommt es zu einem Einwandern von Lymphozyten in das Tumorgewebe, sog. tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), die über spezifische Abwehrmechanismen das Tumorwachstum hemmen (Dietrich et al., 1997).

1.4. Enzymzytochemie der Leukozyten und ihrer Vorstufen

Es existiert eine große Zahl von Zellenzymen, wie z. B. die Oxidasen (Peroxidase, Zytochromoxidase), Dehydrogenasen (Succinatdehydrogenase, Cholindehydrogenase), Hydrolasen (alkalische und saure Phosphatase, Adenosintriphosphatase, unspezifische Esterasen, 5-Nukleotidase), Peptidasen, Glukoronidase sowie terminale Desoxynukleotidyltransferase.

Diese Enzyme sind verschiedenen Zellstrukturen der Leukozyten zuzuordnen, aber nicht spezifisch für diese Zellart.

Man findet unspezifische Esterasen und Dehydrogenasen und saure Phosphatase auch in den Zellen der Erythropoese, Peroxidase in Knochenmarkstromzellen und alkalische Phosphatase in Osteoklasten und Kapillarendothelien (Merker 1968, Helbig 1976, Huber et al. 1983, Rohrberg 1989).

Die biochemische Analyse ist heute in der Lage, eine ganze Reihe von Enzymen zu erfassen. Der histochemische Nachweis ist aber durch das Fehlen geeigneter chromogener Abfangreaktionen begrenzt. Außerdem bedeuten Permeabilitätshindernisse zwischen Substrat und Enzym eine weitere Einschränkung. Es existiert trotzdem ein breites Spektrum enzym- und zytochemischer Nachweisreaktionen, mit denen man versucht, Leukozyten nach Art, Reifungsstufen und funktioneller Hinsicht zu charakterisieren. Von normalen Enzymmustern können dabei Abweichungen erkannt werden, die für die Beurteilung pathologischer Funktionszustände von Bedeutung sein könnten.

Bei akuten Infektionen ist z. B. die Aktivität der alkalischen Granulozytenphosphatase erhöht. Auch bei Lymphogranulomatose, bei malignen Tumoren und unter Corticosteroid-Therapie wird eine Aktivitätssteigerung beobachtet. Eine Aktivitätssteigerung von Oxidoreduktasen und Hydrolasen in Granulozyten und Monozyten wird im Zusammenhang mit ihrer Beteiligung bei Abwehrprozessen gesehen (Rytömaa 1962, Kruse 1974, Bainton 1975, Boll 1978).

Diese Enzyme werden bei der Entgiftung von korpuskulären und flüssigen Substanzen sowie bei der Beseitigung von Mikroorganismen wirksam, nachdem diese durch Phagozytose und Pinozytose in die Zelle aufgenommen wurden.

Am besten untersucht sind die Myeloperoxidase (MPER) der neutrophilen Granulozyten und Monozyten sowie die Eosinophilenperoxidase (EPER) (Clark et al. 1975, Klebanoff et al. 1980, Clark 1983).

Die Freisetzung der Peroxidase erfolgt durch Exozytose. In Verbindung mit Wasserstoffperoxid und einem Wasserstoffdonator oder im Wasserstoffperoxid-Halide-System kann das Enzym wirksam werden (Klebanoff et al. 1980, Clark 1983).

Die in der Abwehr nicht phagozytierbaren Parasiten könnten mit einer Anti-Tumorzellaktivität, der biologischen Funktion der extrazellulären EPER verknüpft sein. Die extrazelluläre MPER wird mit der Gewebsschädigung, der Modulation von entzündlichen immunologischen Reaktionen, der Inaktivierung von Bakterientoxinen, der Abwehr von Parasiten und Pilzinfektionen sowie mit der Tumorerabwehr in Verbindung gebracht (Clark 1983, Kownatzki 1984).

Mit Ausnahme der Basophilen enthalten nach Untersuchungen von Schmidt (1988) alle Leukozyten neben Peroxidase auch Phenoloxidase / Tyrosinase. Peroxidase ist in der Lage, die verschiedensten organischen Verbindungen zu oxidieren, wie z. B. aromatische Amine, Phenole, aromatische Säuren und andere Substanzen (Mason et al. 1957). Wie durch die Peroxidase, werden auch zahlreiche Proteine, zu denen Hormone, Enzyme und bakterielle Toxine zählen, durch die Phenoloxidase / Tyrosinase inaktiviert. Daraus ergeben sich für die Leukozyten viele Möglichkeiten zur Beeinflussung biologischer Funktionen körperfremder wie auch körpereigener Systeme.

1.5. Tyrosinase / Phenoloxidase

Bei Pflanzen und wirbellosen Tieren ist die Phenoloxidase (PO; EC 1.14.18.1) ein weit verbreitetes Enzym.

Als Tyrosinase der Melanozyten findet sie bei Wirbeltieren und Menschen in Zusammenhang mit der Pigmentbildung Beachtung (Schmidt 1988).

Dem Schweizer Dermatologen Bloch und seinen Mitarbeitern ist es in den Jahren 1916/17 erstmals gelungen, die Phenoloxidase histochemisch nachzuweisen. Sie fanden in epithelialen Strukturen der Haut und in Granulozyten nach Inkubation mit Dihydroxyphenylalanin (Dopa) melaninähnliche Reaktionsprodukte. Diese wurden jedoch nicht in der Haut und in den Haaren von Albinos beobachtet. Die Beschreibung einer besonders enzymaktiven Wanderzelle, die die Epidermis durchzieht und im Vesikeln, Pusteln und Krusten zu finden ist, ist besonders von Bedeutung. Mit dieser Dopa-oxidierenden Eigenschaft der Haut und ihrer Anhangsgebilde wird ein spezifisches Enzym, die Dopaoxidase, in Verbindung gebracht. Wegen ihres Gehalts an Dopaoxidase werden die Melanozyten seitdem für die Pigmentbildung verantwortlich gemacht.

Die Enzymaktivität der Granulozyten führte man auf eine unspezifische Phenoloxidase zurück.

Daß nicht Dopa, sondern Tyrosin die Ausgangssubstanz für die Melaninbildung ist, wurde erst später erkannt (Lerner 1953). Das diese Reaktion katalysierende Enzym wird als Tyrosinase oder Tyrosinoxidase bezeichnet und bewirkt sowohl die Hydroxilierung des Tyrosin zum Dopa, wie auch die Dehydrierung des Dopa zum Dopachinon (Abbildung 1.1.).

Die Tyrosinase wird aufgrund ihrer zweifach katalytischen Wirkung zu den mischfunktionellen Oxidasen gerechnet (Mason 1957, Deane et al. 1960). In der zur Zeit gültigen Enzymnomenklatur werden die Dopaoxidase, die Tyrosinase und die unspezifischen Phenoloxidasen unter der Bezeichnung Monophenolmonooxygenase, Ec 1.14.17.1, zusammengefaßt.

Dem Enzymnachweis liegt in dieser Arbeit nicht die gesamte Reaktion zu Grunde. Es wird Dopa und nicht Tyrosin als Substrat verwendet.

Da die Bezeichnung Phenoloxidase in der Humanmedizin ungebräuchlich ist, wird in der vorliegenden Arbeit der Begriff Tyrosinase verwendet.

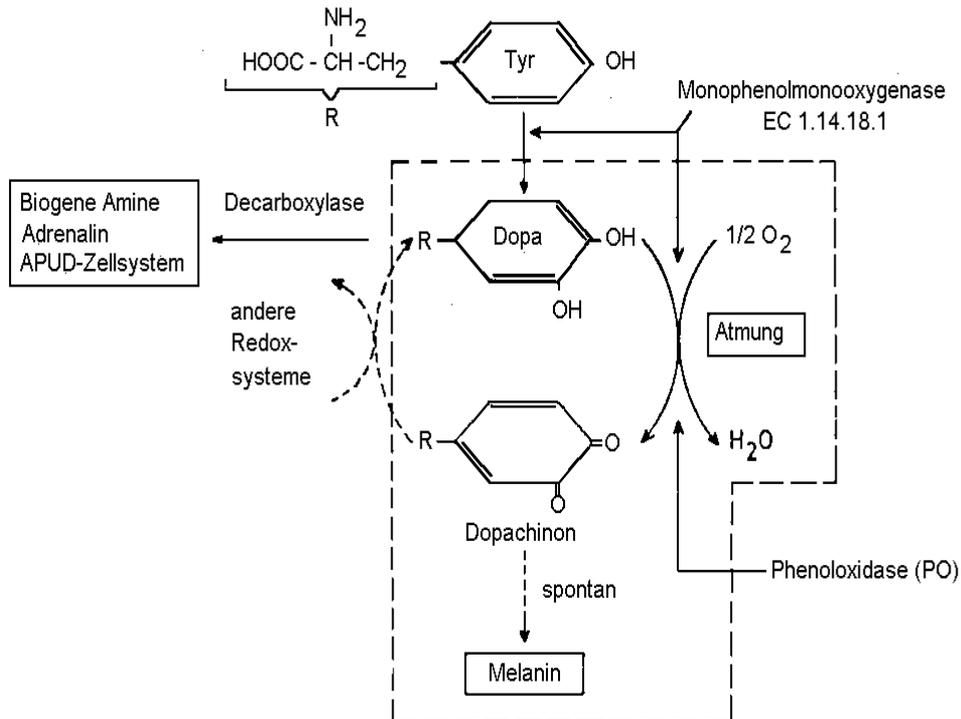


Abbildung 1.1. Enzymkaskade der Tyrosinase (Monophenolmonooxygenase) Dargestellt ist die Hydroxylierung des Tyrosins zum Dopa, wie auch die Dehydrierung des Dopa zum Dopachinon durch das Enzym Tyrosinase und die spontane Oxidation zu Melanin

Ergebnisse, die von den Mitteilungen Blochs (1916/17) abwichen, fanden Schmidt und Modis (1970) beim Nachweis von Tyrosinase enthaltenden Zellen (TPZ) in der Subcutis und im Corium, zwischen Muskelfasern der Haut und im Granulationsgewebe weißer Ratten. Dies konnten keine Melanozyten und nach der Häufigkeit ihres Vorkommens keine Entzündungszellen sein, da es sich um Albinos handelte. Die TPZ erwiesen sich nicht als Melanozyten oder Chromatophoren. Sie kamen nicht in dafür typischen Lokalisationen wie Haarfollikeln oder Stratum basale der Epidermis vor, hatten aber die Fähigkeit zur Dopa-Melanin-Synthese, ohne aber primär der Melaninbildung zu dienen. Sie wurden zunächst vielmehr als ubiquitär im Bindegewebe vorkommende Wanderzellen bezeichnet (Schmidt und Modis 1974).

Aus weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Schmidt ergaben sich folgende Erkenntnisse:

- TPZ kommen im Bindegewebe aller bisher untersuchten Spezies (Ratte, Maus, Kaninchen, Huhn, Mensch) vor (Schmidt und Modis 1974)
- TPZ kommen in den Organen und Geweben mit unterschiedlicher Häufigkeit vor, zahlreiche Zellen befinden sich in Lunge, Milz, Darm und Knochenmark (Schmidt und Modis 1974).
- TPZ sind in der Lage, Epithel zu durchwandern (Schmidt und Stintz 1975, Schmidt 1981 c)
- TPZ des Bindegewebes bilden unter physiologischen Bedingungen kein Melanin. Sie sind keine Mastzellen, keine Plasmazellen, keine Fibrozyten und keine Muskelzellen. Am Stoffwechsel des Adrenalins sind sie nicht beteiligt und gehören nicht zum APUD-Zellsystem. Ihre Phenoloxidase ist methanolresistent (Schmidt und Modis 1974, Schmidt und Stintz 1975, Schmidt 1988)
- TPZ sind auch mit dem Enzym Peroxidase ausgestattet (Schmidt 1976 und 1981 b).
- TPZ sind an zellvermittelten immunologischen Abwehrreaktionen beteiligt (Schmidt und Modis 1978, Schmidt 1980, Wagner 1982, Schmidt 1983 und 1988).

In Veröffentlichungen neueren Datums wird die Rolle der Phenoloxidase bei Invertebraten untersucht.

Dort liegt sie als Prophenoloxidase (proPO) vor. Durch ein Prophenoloxidase-aktivierendes Enzym (ppA) wird diese in zwei Peptide gespalten, wodurch die Phenoloxidase aktiviert wird. Das proPO-System wird durch verschiedene mikrobielle Polysaccharide wie β -1,3-Glykane, Peptidoglycane oder Lipopolysaccharide in seine aktive Form gebracht. Das proPO-System wird noch durch andere Substanzen reguliert. Dies sind Proteinaseinhibitoren wie das alpha Makroglobulin und ein hochmolekularer Inhibitor trypsinähnlicher Proteinase. Der Trypsininhibitor ist ein sehr effizienter Inhibitor des ppA. Ein weiterer Weg der Kontrolle von Produktion und Aktivität der proPO ist die proteolytische Degradation.

Dieses System ist in den sekretorischen Granula der semigranulären und granulären Haemozyten lokalisiert und spielt bei der Abwehr gegen Bakterien und Pilze eine große Rolle (Söderhäll et al. 1994).

Auch Leukozyten des peripheren Blutes enthalten das Enzym Tyrosinase.

Schmidt und Modis fanden 1974 erste Hinweise, daß es sich bei den im Bindegewebe vorkommenden TPZ um Blutzellen handeln könnte, als sie in Knochenmark und Milz der Ratte solche Zellen nachwiesen.

Untersuchungen des Verhaltens der TPZ bei der embryonalen Entwicklung des Huhns haben gezeigt, daß diese bereits am 6. Brütungstag in den die Blutzellen bildenden Inseln des Dottersack nachgewiesen werden können. Im übrigen Gewebe des Hühnerembryos kommen sie erst nach dem 11. Tag vor. 3 Tage vor dem Schlüpfen wurde eine auffällige Vermehrung der Tyrosinase im Knochenmark, in der Milz und in der Lunge festgestellt, ebenso im übrigen Bindegewebe.

Den Beweis für das Vorkommen Tyrosinase-positiver Zellen im peripheren Blut brachte die Untersuchung klinisch gesunder Probanden unterschiedlichen Alters und beiderlei Geschlechts. Die TPZ stellten sich in unterschiedlicher Größe und Reaktionsintensität dar. Es wurde zunächst nur zwischen großen, mittelgroßen und kleinen TPZ unterschieden, da wegen diffusen, granulären oder scholligen Auftretens des Melanins die morphologische Zuordnung erschwert wurde. Die kleinen TPZ konnten später kleinen Lymphozyten, die mittelgroßen den neutrophilen Granulozyten, den großen Lymphozyten und Monozyten und die großen TPZ den eosinophilen Granulozyten zugeordnet werden (Schmidt 1981 a, 1982, 1988). Wenn die Zellen statt mit Formol mit reinem Methanol fixiert werden, ist nur noch bei wenigen Zellen eine Enzymaktivität nachweisbar. Dabei handelt es sich um eosinophile Granulozyten. Es wird angenommen, daß sie den großen Zellen nach Formolfixierung entsprechen. Eine ebenfalls methanolresistente Enzymaktivität weisen die im Bindegewebe vorkommenden TPZ auf (Schmidt 1983, 1988). Dies wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bewiesen (Schmidt und Modis 1985).

Die eosinophilen Granulozyten sind ihrer Verteilung nach mehr als Bindegewebs-, denn als Blutzellen anzusehen (Schmidt 1988).

Über das Verhalten der basophilen Granulozyten, der Makrophagen sowie der B- und T-Lymphozyten bestehen zur Zeit noch Unklarheiten (Schmidt 1988).

Rohrberg beschreibt 1988 in seiner Arbeit die Tyrosinase -Aktivität in Blutleukozyten wie folgt:

In den neutrophilen Granulozyten ist die Tyrosinase -Aktivität hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert und kann unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

Das Zytoplasma stellt sich in formolvorbehandelten Ausstrichpräparaten nach der Tyrosinase -Reaktion gleichmäßig oder wolkig grau dar und kann darüber hinaus mit

zarter schwärzlicher Granulation bestäubt sein. In anderen Fällen bedeckt eine tiefschwarze Granulation das dunkelgraue Zytoplasma. Weniger ausgebreitete Zellen erscheinen mit einem nahezu gleichmäßigen dunkelgrauen bis schwarzen Reaktionsprodukt.

Mit diffusem Reaktionsprodukt stellen sich die Neutrophilen in den ungefärbten Präparaten dar. Ihre segmentierten Kerne erscheinen als Aufhellungen mit Tyrosinase-positiven Innenstrukturen.

Ein je nach Ausbreitung und Enzymaktivität grobgranulär bis diffus schwarz erscheinendes Reaktionsprodukt erkennt man in den eosinophilen Granulozyten in den formolvorbehandelten Ausstrichpräparaten. Es werden in stärker ausgebreiteten Zellen dunkelgraue bis schwarze, teilweise konfluierende Granula sichtbar, auch die Kernsegmente treten in Erscheinung. In unmittelbarer Zellnähe findet man homogenes oder feingranuläres Dopa-Melanin und meist zahlreiche Tyrosinase enthaltende bläschenförmige Gebilde, die teilweise netzartige Innenstrukturen erkennen lassen.

In ungefärbten Präparaten zeigen die Eosinophilen als große TPZ einen deutlich höheren Dopa-Melaningehalt als die Neutrophilen. Das Reaktionsprodukt ist dunkelbraun bis schwarz und überlagert teilweise den Zellkern. Es ist wie in den gefärbten Präparaten eine Hofbildung zu erkennen, was die Freisetzung von Tyrosinase beweist.

Auch die Lymphozyten des peripheren Blutes gehören zu den Tyrosinase -positiven Zellen. Die Enzymaktivität ist geringer als die der Neutrophilen, das Enzymmuster ist unterschiedlich. In den formolbehandelten und gefärbten Ausstrichpräparaten läßt sich bei einzelnen Lymphozyten im Zytoplasma ein homogenes, wolkiges oder fleckförmiges Reaktionsprodukt nachweisen. Ungefärbt sind in den Lymphozyten bei insgesamt schwacher Enzymreaktion diffuse, granuläre und fleckförmige Enzymaktivitäten zu erkennen.

Monozyten können Tyrosinase enthalten oder Tyrosinase -negativ sein, mit schwächerer Enzymreaktion als die der neutrophilen Granulozyten. Neben stärker enzymaktiven Zellen finden sich stets auch schwächer reagierende. Das Reaktionsprodukt stellt sich diffus und mit zusätzlichen Punktaktivitäten dar.

Da der Anteil basophiler Granulozyten an den Leukozyten des peripheren Blutes nur 0-0,01 % beträgt, ist die Beurteilung der Tyrosinase -Reaktion beim Gesunden kaum möglich. Einzelne beobachtete Zellen lassen kein Enzymprodukt erkennen.

2. PROBLEMSTELLUNG

Die Tyrosinase stellt einen Marker für die an der Abwehr beteiligten Zellen dar, wobei eine grundsätzliche Bedeutung für ihre Funktion beim Menschen noch unklar ist.

Die hier vorliegende Arbeit wurde durch die Feststellung veranlasst, daß die Tyrosinase als spezifisches Markerenzym für zellvermittelte Immunprozesse im Gewebe auch in den Leukozyten des Blutes vorkommt, insbesondere bei eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, aber auch in geringem Umfang bei Lymphozyten und Monozyten.

Dabei sollte geklärt werden:

- ob und bei welchen neurologischen Erkrankungen sich das Enzym Tyrosinase in Liquorzellen nachweisen läßt,
- ob bei einer Pleozytose die Tyrosinase-positive Zellen nachweisbar sind,
- ob es Unterschiede bei Autoimmunerkrankungen und Infektionserkrankungen gibt,
- ob die Bestimmung der Tyrosinase-Aktivität als Routinetest von diagnostischer Relevanz wäre.

Als Kontrollgruppe dienen nicht-entzündliche ZNS-Erkrankungen mit normaler Zellzahl.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Bio- und Feinchemikalien

DOPA der Fa. SERVA, Feinbiochemica GmbH & Co. Heidelberg

Echt-Blausalz, Fa. Arco-Chemie Berlin

Alle anderen Reagenzien der Firmen VEB Laborchemie Apolda und Polskie odczynniki chemiczne gliwice waren von analytischem Reinheitsgrad.

3.2. Gewinnung und Weiterbehandlung von Untersuchungsmaterial

3.2.1. Liquor cerebrospinalis:

Der Liquor wurde lumbal durch Punktion zwischen dem 3. und 4. oder 4. und 5. Lendenwirbel gewonnen. Dabei wurden ca. 5 - 10 ml in 3 Einzelportionen gewonnen.

Liquor ist in der Regel wasserklar und farblos. Von der zügigen Untersuchung nach Probengewinnung hängt entscheidend die Qualität der Liquorzytologie ab, da Hirnflüssigkeit ein zellfeindliches Medium darstellt. Sie erfolgte deshalb innerhalb von zwei Stunden nach der Punktion.

3.2.1.1. Zelldiagnostik:

3.2.1.1.1. Bestimmen der Zellzahl:

Aus dem unverdünnten Punktat wurde die Anzahl der Zellen in der Fuchs-Rosenthal-Kammer ermittelt. Liquorproben, die sehr zellreich waren, wurden verdünnt.

3.2.1.1.2. Anfertigung des Liquor-Zellbildes:

Der Liquor wurde unmittelbar nach Eintreffen im Labor 12 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute (= 31 g) in einer Zyto-Zentrifuge der FA Andreas Hettig GmbH & Co KG Tuttlingen zentrifugiert und der klare Überstand abgehoben. Er diente als Prüfmateriale für lösliche Inhaltsstoffe. Um das Liquorsediment zu gewinnen, wurde der so zellangereicherte Liquor abermals für 1 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute (=69 g) zentrifugiert. Bis 1992 erfolgte die Sedimentation in der sog. Sayk-Kammer. Anschließend wurde das Präparat mit reinem Äthylalkohol fixiert und nach der panoptischen May-Grünwald/Giemsa-Färbung nach Pappenheim für die lichtmikroskopische Auswertung gefärbt.

Es wurden 100 Zellen differenziert.

Im normalen Zytogramm findet man 60 - 80 % kleine Lymphozyten und 20 - 40 % Monozyten. Zusätzlich können punktionsbedingt Zellen des Deckepithels und des Knochenmarks im Liquor vorhanden sein, ohne daß sie einen diagnostischen Wert besitzen. Neutrophile und eosinophile Granulozyten, aktivierte Lymphozyten, Plasmazellen, aktivierte Monozyten, Erythrozyten, alle Arten von phagozytierenden Zellen sowie tumorverdächtige Zellen und Tumorzellen sind als pathologisch zu werten.

3.2. Methode des zytochemischen Tyrosinase-Nachweises

Die zytochemische Nachweisreaktion beruhte nach Schmidt und Modis (1970) auf der Oxidation des L-Dihydroxyphenylalanin (DOPA), das als Substrat angeboten wurde, zu DOPA-Chinon, welches in Gegenwart von Sauerstoff spontan zu DOPA-Melanin umgewandelt wird (siehe Abbildung 1.1., Seite 20).

Dieses Melanin ist an seiner braunen bis tiefschwarzen Farbe zu erkennen und charakterisiert die Lokalisation des Enzyms, da es als unlösliches homogenes oder granuläres Reaktionsprodukt am Ort der Entstehung liegen bleibt.

Eine 0,1 molare Phosphatpuffer-Lösung mit einem pH-Wert von 6,8 und 1 mg DOPA pro 1 ml Lösung diente als Inkubationslösung. Der pH-Wert von 6,8 wurde gewählt, da hier für die enzymatische Reaktion ein optimales Milieu ohne Einfluß der nichtenzymatischen Reaktion besteht.

Es war auf eine exakte Einhaltung des pH-Wertes zu achten, da diese nichtenzymatische autoxidative Umwandlung im alkalischen Milieu abläuft (Deane et al. 1960, Schmidt und Kiss 1975).

Der Phosphat-Puffer wurde aus 5,999 g NaH_2PO_4 pro 1000,0 ml Aqua dest. und 7,098 g Na_2HPO_4 pro 1000,0 ml Aqua. dest. hergestellt. 508 ml NaH_2PO_4 und 492 ml Na_2HPO_4 ergaben exakt bei pH-Wert 6,8. 1000,0 ml Pufferlösung.

Der Zusatz von Fast Blue B salt beim Inkubieren mit DOPA hatte einen günstigen Einfluß auf die Stabilität der Zellmembran der Liquorzellen.

Grundsätzlich bestand jeder Versuchsansatz aus einem Hauptversuch (HV) und einem Kontrollversuch (KV).

Tab. 3.1. Versuchsansatz

Inkubationsansatz	Zusammensetzung
Hauptversuch (HV)	Liquorsediment-Präparate + L-Dopa-Phosphatpufferlösung 20 ml
Kontrollversuch (KV)	Liquorsediment-Präparate + Phosphatpufferlösung 20 ml

3.3. Tyrosinase -Nachweis an Liquor-Sedimenten

Als Proben dienten Liquorsedimente.

Das Liquorsediment wurde wie oben beschrieben hergestellt.

Anschließend wurde dieses in 4 %-iger gepufferter Formollösung (pH 7,0) 20 min. fixiert.

Die Formollösung setzt sich wie folgt zusammen:

100 ml 37 - 40 %-iger Formollösung und 900 ml Phosphat-Puffer

Die Präparate wurden im Anschluß an die Fixation 5 min. mit Aqua. dest. und anschließend mit Leitungswasser gewaschen.

Dieses mit Formol fixierte Präparat kann bei 4°C längere Zeit aufbewahrt werden.

Die formolfixierten Präparate wurden dann mit DOPA inkubiert.

Dazu wurden 75 mg DOPA in 75 ml Phosphat-Puffer gelöst und dann 1 ½ - 2 Stunden im Inkubation bei 37°C unter ständigem Luftstrom inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Präparate erneut 2 x 2 min. mit Aqua dest gespült.

Nach der Auswertung wurden ausgewählte Präparate mit der panoptischen, kombinierten May-Grünwald-Giemsa-Färbung nach Pappenheim gefärbt.

Dabei entsteht ein dunkelgrünes Reaktionsprodukt.

Die Eiweisanalytik (Gesamteiweis, Albumin, Immunglobuline, Eiweisanalytik nach Reiber<9 erfolgte durch standartisierte Methoden.

3.4. Statistische Methoden

Zur Bestimmung, inwieweit eine Abhängigkeit zwischen der Zellzahl und dem Nachweis von PO-positiven Zellen wurde mit Hilfe von Kreuztabellen der Kontingenzkoeffizient ermittelt.

Bei zu kleinen Fallzahlen wurde auf die Berechnung verzichtet.

4. PROBANDEN

Es wurden 292 Liquorsedimentpräparate im Einzugsgebiet des Liquorlabors der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gewonnen. Zur Auswertung kamen 203 Liquor-Präparate von 184 Patienten.

Die Präparate sind der Routine-Liquordiagnostik entnommen worden und waren dadurch auf zwei Präparate je Patient begrenzt.

Nicht berücksichtigt wurden Liquores mit mehr als 100 Mpt/l Erythrozyten im Liquorsediment, sowie artefaktreiche Präparate.

Die Art der Erkrankung, klinisch relevante Befunde und der Krankheitsverlauf wurden zu den Tyrosinase-Befunden in Beziehung gesetzt.

Eine Übersicht der im Zeitraum von November 1991 bis Januar 1995 untersuchten Patienten gibt die Tabelle 4.1.

In diese Arbeit gingen (89) Präparate von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen wie Multiple Sklerose (53 Patienten), Meningoenzephalomyelitiden verschiedener Genese (28 Präparate von 19 Patienten) sowie Neurolyues (6 Präparate von 3 Patienten), Neuroborreliose (14 Präparate von 9 Patienten) und Toxoplasmose (3 Patienten), des weiteren 9 Präparate von 9 Patienten mit Neoplasmen ein.

Präparate von Patienten mit zerebrovaskulären Prozessen incl. Blutungen ins ZNS (9 Patienten), Epilepsien (7 Patienten), Erkrankungen peripherer Nerven (25) incl. Polyneuropathie und Polyradikulitiden, Zervikal- und Lumbalsyndromen (20 Patienten), degenerativen Erkrankungen des ZNS (8 Patienten), Kopf- und Gesichtsschmerzsyndromen (6 Patienten) dienten als Kontrollgruppe.

Die Gruppe mit oben nicht aufgeführten Diagnosen umfaßt 14 Patienten. Darunter fallen Diagnosen wie Schwindel (2 Patienten), Sinusitis (2 Patienten), Aids, Blasenstörung, Orbita-Spitzen-Syndrom, Osteomyelitis, perniziöse Anämie, Sympathische Ophthalmie, Sarkoidose, Torticollis spasticus, toxische Hepatose und Tremor (je 1 Patient). Diese wurden ebenfalls in die Kontrollgruppe einbezogen.

Die detaillierten Liquorbefunde finden sich im Tabellenanhang (Tabellen)

Tabelle 4.1. Übersicht über alle untersuchten Patienten (n=184)

Erkrankung	Patienten	Liquor - Präparate	Alter in Jahren (Mittelwert)
Entzündungen des ZNS	89	106	10-78 (46)
Neoplasmen	9	9	45-76 (58)
zerebrovaskuläre Prozesse	9	9	36-74 (58)
Epilepsie	7	7	19-46 (32)
Zervikal-/Lumbalsyndrom	20	20	34-64 (45)
degenerative Erkrankungen des ZNS	8	8	46-73 (60)
Erkrankungen peripherer Nerven / Polyradikulitis/ Polyneuropathie/ Polyneuritis,(außer Neuroborreliose)	25	25	27-59 (41)
Sonstige Erkrankungen (Aids, Kopf-/Gesichtsschmerz, Osteomyelitis, Sarkoidose, Sinusitis)	20	20	34-57 (45)

Tabelle 4.2.: Patienten mit Entzündungen des ZNS (n=89)

Entzündungen des ZNS	Patienten	Präparate
Sichere Multiple Sklerose	14	15
mögliche Multiple Sklerose	32	32
wahrscheinliche Multiple Sklerose	7	7
Bakt. Meningitis/Meningoenzephalitis	8	15
Virale Meningitis	1	3
Enzephalitis	7	7
Myelitis	3	3
Neuroborreliose	9	14
Neurolues	4	6
Toxoplasmose	4	4

5. ERGEBNISSE

5.1. Tyrosinase nachweis bei Liquor-Leukozyten von Patienten mit neurologischen Erkrankungen

Tabelle 5.1. Häufigkeit der Patienten hinsichtlich der Tyrosinase -Aktivität

Diagnose	Patienten mit Tyrosinase - positive Zellen / Anzahl der Patienten	Rate in %
Multiple Sklerose (gesamt)	11/53	20
Sichere Multiple Sklerose	5/14	36
Mögliche Multiple Sklerose	4/32	8
Wahrscheinliche Multiple Sklerose	2/7	35
Entzündlich Erkrankungen		
Bakt. Meningitis/Meningoenzephalitis	8/8	100
Virale Meningo- Enzephalitis	0/8	0
Myelitis	2/3	67
Neuroborreliose	7/9	78
Neurolyues	2/3	67
Toxoplasmose	3/4	75
Neoplasmen	6/9	67
Hirnmetastasen	2/2	100
Glioblastom	1/1	100
Leukämien	0/2	0
Lymphome	3/4	75
zerebrovaskuläre Prozesse	0/9	0
Epilepsie	0/7	0
Zervikal-/Lumbalsyndrom.	0/20	0
degenerative Erkrankungen	0/8	0
Erkrankungen. peripherer Nerven	0/25	0
Sonstige Erkrankungen	0/20	0

5.1.1.1. Tyrosinasenachweis bei sicherer Multipler Sklerose

Es wurde der Liquor von 14 Patienten mit sicherer Multipler Sklerose untersucht. Dabei zeigte der Liquor bei fünf Patienten Tyrosinase -positive Zellen. Im einzelnen handelt es sich um die Patienten 2, 7, 10 und 13 mit Lymphozyten sowie um Patienten 8 mit eosinophilen Granulozyten. Das Auftreten von Tyrosinase positiven Zellen ist unabhängig von pathologischen Liquorwerten, MRT-Befunden, anderen Zusatzuntersuchungen oder der neurologischen Symptomatik, so dass Korrelationen nicht hergestellt werden können.

Auch zwischen der Zellzahl und dem Auftreten von Tyrosinase -positiven Zellen konnte kein Zusammenhang gefunden werden.

5.1.1.2. Tyrosinasenachweis bei Patienten mit möglicher MS

Es wurde der Liquor von 32 Patienten mit möglicher Multipler Sklerose untersucht. Dabei zeigte der Liquor bei 4 Patienten Tyrosinase -positive Zellen. Im einzelnen handelt es sich um die Patienten 8 und 31 mit Lymphozyten sowie die Patienten 4 und 18 mit Granulozyten. Das Auftreten von Tyrosinase positiven Zellen ist unabhängig von pathologischen Liquorwerten, MRT-Befunden, anderen Zusatzuntersuchungen oder der neurologischen Symptomatik, so dass Korrelationen nicht hergestellt werden können.

Auch zwischen der Zellzahl und dem Auftreten von Tyrosinase -positiven Zellen konnte kein Zusammenhang gefunden werden.

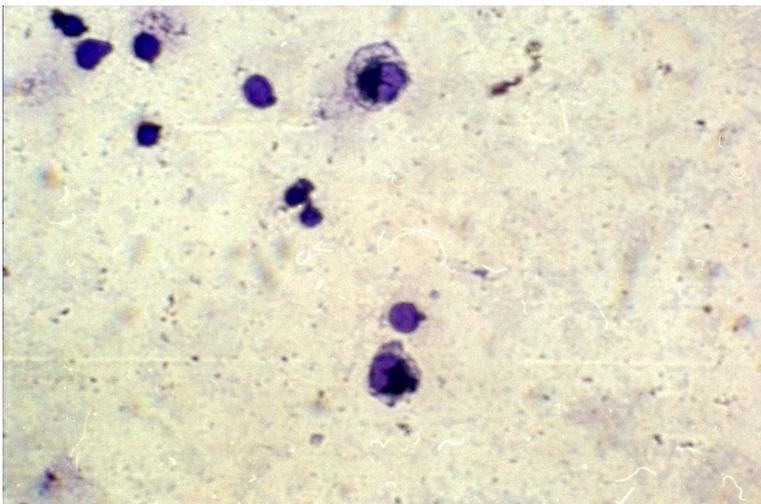


Bild 1: Patient 5.1.1.2.18. möglicher MS
Enzymdarstellung mit braunem Reaktionsprodukt mit Pappenheim-
Gegenfärbung

5.1.1.3. Tyrosinasenachweis bei Patienten mit wahrscheinlicher MS

Es wurde der Liquor von 7 Patienten mit sicherer Multipler Sklerose untersucht. Dabei zeigte der Liquor bei 2 Patienten Tyrosinase -positive Zellen. Im einzelnen handelt es sich um die Patienten 2, und 6 mit Lymphozyten. Das Auftreten von Tyrosinase positiven Zellen ist unabhängig von pathologischen Liquorwerten, MRT-Befunden, anderen Zusatzuntersuchungen oder der neurologischen Symptomatik, so dass Korrelationen nicht hergestellt werden können.

Auch zwischen der Zellzahl und dem Auftreten von Tyrosinase -positiven Zellen konnte kein Zusammenhang gefunden werden.

5.1.1.4. Tyrosinasenachweis bei Myelitis transversa

Es wurde der Liquor von drei Patienten untersucht. Von diesen enthielten zwei Liquores Tyrosinase -positive Zellen, Patienten 1 und 2 in Form von Eosinophilen. Bei Patienten 2 war ein Toxoplasmose-Titer nachweisbar. Der dritte Patient, der zugleich einen positiven Herpes-simplex-Titer (IgG) aufwies und daraufhin die Diagnose Herpes-Myelitis gestellt wurde, zeigte keine Tyrosinase -positiven Zellen. Zellzahl und Gesamteiweiß waren bei Patienten 1,2 und 3 nur gering erhöht. Es bestand eine geringe Schrankenstörung.

5.1.1.5. Tyrosinasenachweis bei Bakterieller Meningitis/Meningoenzephalitis

Hier wurden 15 Liquorpräparate von 8 Patienten untersucht, davon zwei Verlaufsbeobachtungen (siehe Tab. 5.1.1.4.) Alle Patienten im Akutstadium bis ca. zum 15. Tag zeigten Tyrosinase -positive Zellen im Liquor. Die Tyrosinase positiven Zellen zeigten sich in den ersten fünf Tagen als homogen gefärbte Granulozyten, dann nur noch in Form von intrazellulären Granula als inhomogen gefärbte Granulozyten, wobei dies als Restaktivität anzusehen ist. Im Liquorzellbild dominieren vom 2. bis 5. (10.) Tag die neutrophilen Granulozyten (siehe Bild 1).

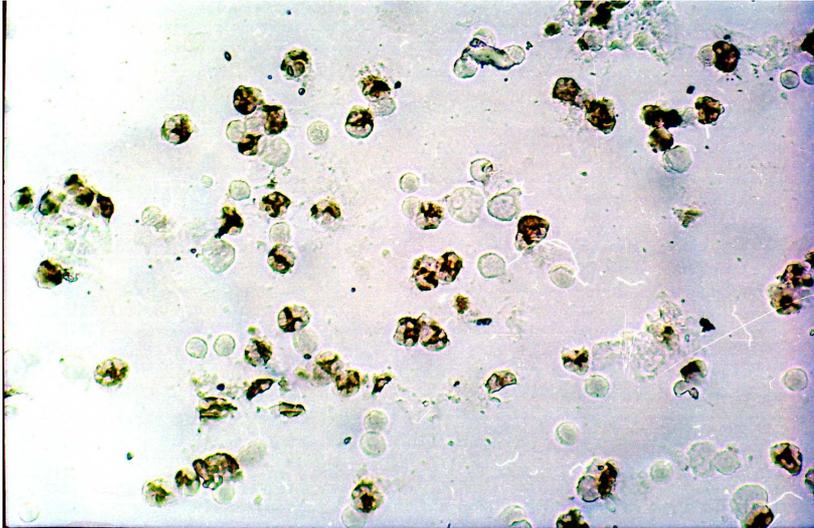


Bild 2: Patient 5.1.1.5.2.6. Bakterielle Meningitis, Tyrosinase-positive Granulozyten sind braun angefärbt.

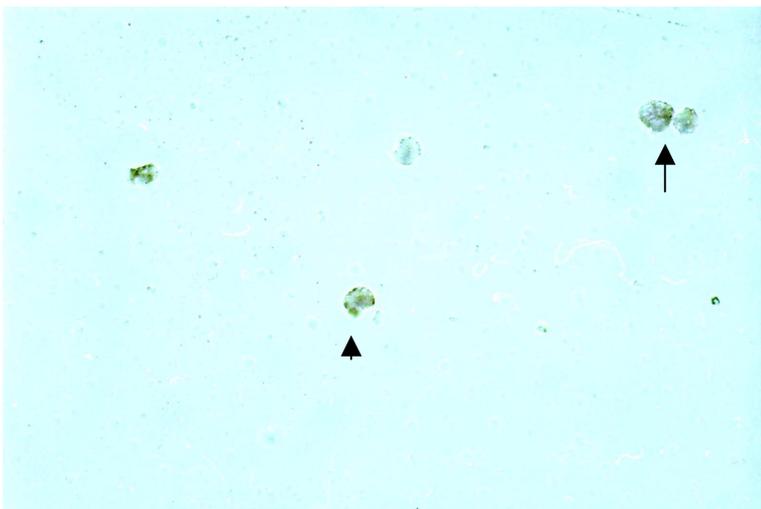


Bild 3: Patient 5.1.1.5.2.2 (8) Bakterielle Meningitis in Abheilung (8. Tag)
Nur noch schwach angefärbte Granulozyten mit noch stärker angefärbten intrazellulären Granula als Ausdruck einer Restaktivität

Mit deren Verschwinden sind auch keine Tyrosinase -pos. Zellen mehr vorhanden. Das zeigen die beiden Verläufe (Patienten 1 und 2). Korrelationen zu anderen erhobenen Befunden konnten mit Ausnahme einer erhöhten Zellzahl (48-645 Mpt/l bei homogen angefärbten Granulozyten und 42-87 Mpt/l bei inhomogen angefärbten Granulozyten) nicht festgestellt werden. Auch die Höhe des Gesamteiweißes (das allgemein stark erhöht war, unabhängig vom Vorhandensein Tyrosinase -pos. Zellen mit 1.510 mg/l-13.453 mg/l) und der Reiber-Bereich (der zwischen intrathekaler Eiweißproduktion und Schrankenstörung mit intrathekaler Eiweißproduktion schwankte), sowie das

Vorhandensein von oligoklonalen Banden in der Elektrophorese zeigten keinen verwertbaren Zusammenhang mit dem Auftreten von Tyrosinase -positiver Zellen. Letztere sind im Akutstadium vorhanden, während oligoklonale Banden eine B-Zell-Antwort darstellt. Diese Liquorveränderungen sind für das Akutstadium charakteristisch. Nach erfolgter antibiotischer Behandlung verschwand mit der Zahl der Granulozyten auch die Tyrosinase positiven Zellen.

5.1.1.6. Tyrosinasenachweis bei Neuroborreliose

Bei diesem Krankheitsbild wurden 14 Präparate von neun Patienten untersucht. Davon waren neun Erstuntersuchungen und fünf Verlaufsuntersuchungen bei drei Patienten. Bei den Patienten mit nur einer Untersuchung zeigten vier Pat. Tyrosinase -positiven Zellen, bei zweien in Form von intrazellulären Granula (Patienten 7 und 9) und bei zweien in Form von Lymphozyten (Patienten 1 und 8). Die restlichen beiden (Patienten 2 und 3) zeigten keine.

Der Liquor von Patient 4 zeigte bei der Erstuntersuchung Tyrosinase -positive Zellen in Form von intrazellulären Granula, am 14. Tag keine Tyrosinase -positiven Zellen und am 45. Tag Tyrosinase -positive Lymphozyten. Bei Patient 5 war bei der Erstuntersuchung wiederum Tyrosinase -positive Zellen in Form von intrazellulären Granula feststellbar, während am 50. Tag keine Tyrosinase -positiven Zellen zu sehen war. Auch bei Patient 6 zeigten die Liquorzellen bei der Erstuntersuchung und am 16. Tag Tyrosinase -positive Zellen in Form von intrazellulären Granula, am 67. Tag aber keine Tyrosinase -positiven Zellen mehr.

Auffällig war, daß die Tyrosinase -positiven Zellen bei der Erstuntersuchung (Patienten 4, 5, 6, 7 und 9) und einer Verlaufsuntersuchung (Patient 6) durch intrazelluläre Granula bestimmt wurde. Tyrosinase -positive Lymphozyten sind nur ein Mal bei der Erstuntersuchung (Patient 1) sowie zweimal bei einer Verlaufsuntersuchung (Patienten 4 und 8) aufgetreten, wobei bei Patient 8 keine Untersuchung zu Krankheitsbeginn durchgeführt wurde. Bei Patienten mit intrazellulären Granula bei der Erstuntersuchung war eine z.T. deutlich erhöhte Zellzahl zwischen 66 und 97 Mpt/l und ein deutlich erhöhtes Gesamteiweiß zwischen 997 und 2675 mg/l in Verbindung mit einer erhöhten intrathekalen IgG- und IgM-Produktion (Reiber 4 und 5) festzustellen. Lediglich Patient 9 mit einer Zellzahl von 1 Mpt/l und die erste Verlaufsuntersuchung bei Patient 6 mit einer Zellzahl von 14 Mpt/l und einem Reiberbereich von 3 fallen aus dem Rahmen, was zumindest bei Patient 6 mit der einsetzenden Heilung erklärt werden kann. Die Patienten mit Tyrosinase -positiven Lymphozyten haben eine normale Zellzahl und ein nur leicht erhöhtes Gesamteiweiß sowie nur eine Schrankenstörung. Im Krankheitsverlauf nimmt die Zahl der Tyrosinase -positiven Zellen im Rahmen der Behandlung ab und

verschwindet. Zweimal (bei Patient 4 und 8) traten nach Abheilung Tyrosinase -positive Zellen (Lymphozyten) auf.

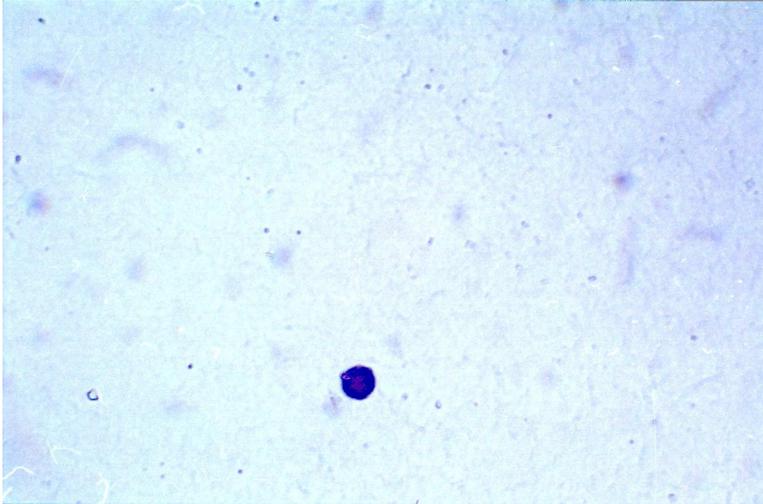


Bild.4: Patient 5.1.1.6.1. Neuroborreliose
Einzelner Tyrosinase-positiver Lymphozyt

5.1.1.7. Tyrosinasenachweis bei Neuro-Lues

Es wurde der Liquor von drei Patienten mit insgesamt sechs Präparaten untersucht. Davon war bei Patient 1 und Patient 2 Tyrosinase -positive Zellen zu erkennen, bei Patienten 1 und 2 in Form von intrazellulären Granula. Die Kontrolluntersuchungen von Patient 1 und 2 sowie der Liquor von Patient 3 zeigten keine Tyrosinase -Aktivität.

Die Tyrosinase -positiven Zellen konzentrierte sich auch hier auf die akute Krankheitsphase, d.h. nur der erste Liquorbefund zu Therapiebeginn war positiv.

5.1.1.8. Tyrosinasenachweis bei Patienten mit Toxoplasmosetiter

Es wurde der Liquor von vier Patienten untersucht. Drei von ihnen wurden zunächst unter anderen Diagnosen geführt (Patient 1 unter Myelitis, Patient 2 unter Entzündungsverdacht, Patient 4 unter peripherer Facialisparesie). Tyrosinase -positiven Zellen war bei Patient 3 in Form von intrazellulären Granula bei Granulozyten und bei Patient 1 und 4 in Form von Monozyten feststellbar. Die Liquorleukozyten bei Patient 2 zeigten keine Enzym-Aktivität. Allen ist ein positiver Toxoplasmosetiter im Blut gemeinsam. Zellzahl und Gesamteiweiß ist einmal leicht erhöht und bei allen anderen normal.

Im Zellbild sind bei Patient 1 und 4 Veränderungen vorhanden. Bei Patient 1 mit immunkompetenten Zellen (Lymphoide) und einer sog. Abräumreaktion (Makrophagen), bei Patient 3 noch zusätzlich eosinophile und neutrophile Granulozyten. Der

Reiberbereich schwankt zwischen 1 (Patient 4), 2 (Patient 2) und 3 (Patienten 1 und 3). Oligoklonale Banden in der Elektrophorese und ein IgM von 31,6 % waren bei Patient 2 vorhanden.

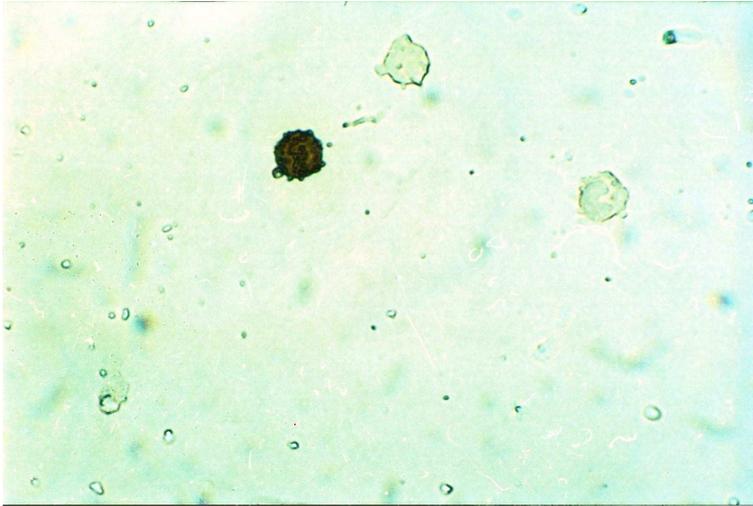


Bild 5: Patient 5.1.1.8.4. Positiver Toxoplasmose-Titer bei peripherer Facialisparesse. Hier deutlich angefärbter Monozyt

5.1.1.9. Tyrosinase-nachweis bei viraler Meningo- Enzephalitis

Bei diesem Patienten, von dem drei Liquor-Präparate angefertigt wurden, wurde in keinem eine Tyrosinase -pos. Zelle gefunden. Alle Präparate wiesen eine erhöhte Zellzahl im Liquor auf.

5.1.2 Tyrosinase-nachweis bei Neoplasmen

Es kamen 9 Präparate von 9 Patienten zur Auswertung, davon 6 Patienten mit systemischen Tumoren (malignen Blut- und Knochenmarkserkrankungen, sowie des lymphoretikulären Systems) und 3 Patienten mit soliden Tumoren des ZNS. Eines der Präparate war eine Verlaufskontrolle.

Bei allen drei Patienten mit soliden Tumoren des ZNS konnten Tyrosinase -positive Zellen gefunden werden. Ebenfalls Tyrosinase -positive Zellen konnten bei Patient 5 mit Morbus Hodgkin und bei den Patienten 7 und 8 mit einem Non-Hodgkin-Lymphom gefunden werden, wobei es sich bei Patient 8 um eine Zelle handelt, die lichtmikroskopisch nicht differenziert werden konnte. Bei Leukämien war keine Tyrosinase -Aktivität der Liquorleukozyten zu verzeichnen. Klinisch bestand bei Patient 5 eine Meningeosis carcinomatosa, was die Zellzahlerhöhung und das neutrophile Zellbild erklärt.

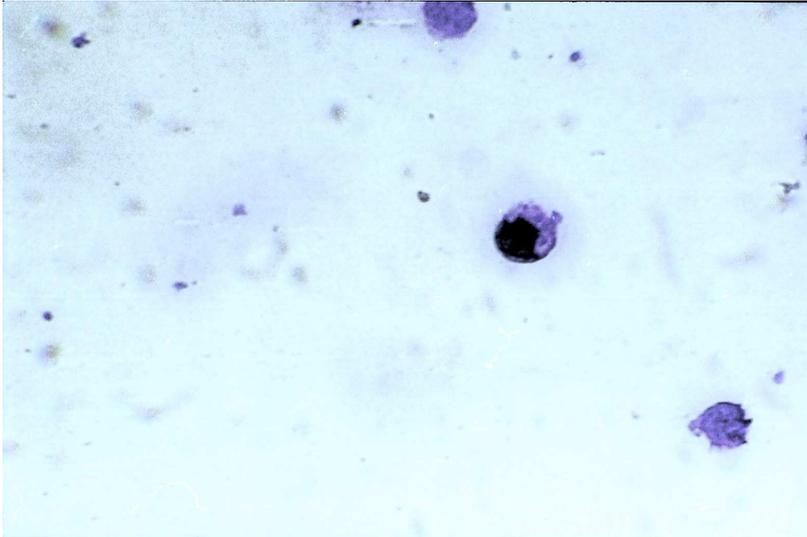


Bild 6: Patient 5.1.2.9. Glioblastoma multiforme
Ein Tyrosinase-positiver Granulozyt

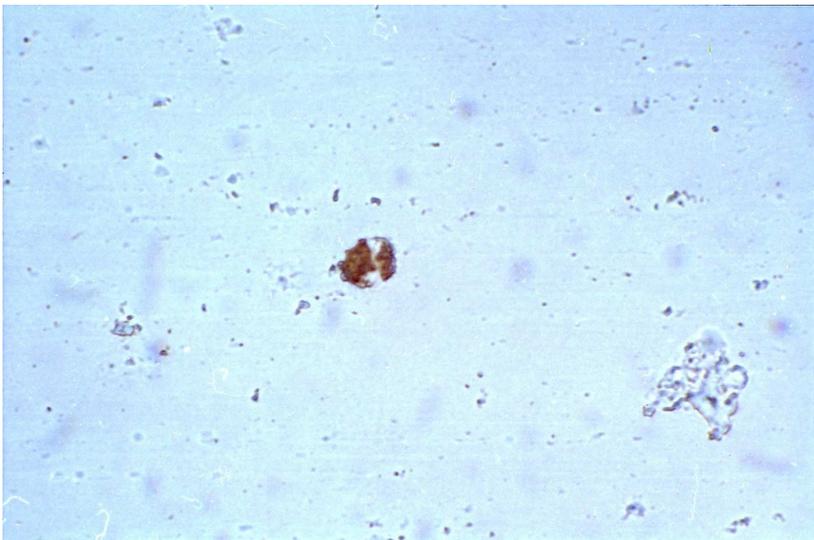


Bild 7: Patient 5.1.2.9. Glioblastoma multiforme
Einzelner Tyrosinase-positiver Granulozyt

5.1.3. Tyrosinasenachweis bei Erkrankungen peripherer Nerven, zerebrovaskulären Prozessen, Epilepsie, Zervikal- und Lumbalsyndrome inclusive Wirbelsäulentumore, degenerativen Erkrankungen des ZNS, Kopf- und Gesichtsschmerzen, Patienten mit sonstigen Erkrankungen

5.1.4. Zusammenhang zwischen Zellzahl und dem Auftreten Tyrosinase -positiver Zellen

Tabelle 5.2. Zusammenhang zwischen Zellzahl und dem Auftreten Tyrosinase -positiver Zellen

Diese Tabelle diene als Kreuztabelle der Zusammenhangsberechnungen.

Erkrankung	Präparate mit TPZ bei norm. ZZ	Präparate ohne TPZ bei norm. ZZ	Präparate mit TPZ bei erhöhter ZZ	Präparate ohne TPZ bei erhöhter ZZ
Summe bakteriell	6	8	21	3
Viral	1	0	0	10
MS	6	24	5	19
ZNS-Tumor-erkrankungen	2	3	4	1
alle Fälle	17	36	31	33

Bei der Summe der bakteriellen Erkrankungen beträgt der Kontingenzkoeffizient 0,429 bei 38 Fällen. Hieraus ergibt sich ein Signifikanzniveau von 0,003, was einem direkten Zusammenhang zwischen den Auftreten von Tyrosinase -positiven Zellen und einer erhöhten Zellzahl im Liquor entspricht.

Bei viralen Erkrankungen beträgt der Kontingenzkoeffizient 0,707 bei 11 Fällen. Hieraus ergibt sich ein Signifikanzniveau von 0,001, was einen indirekten Zusammenhang zwischen den Auftreten von Tyrosinase -positiven Zellen und einer erhöhten Zellzahl im Liquor entspricht.

Bei Patienten mit MS beträgt der Kontingenzkoeffizient 0,01 bei 54 Fällen. Hieraus ergibt sich ein Signifikanzniveau von 0,940, was keinen Zusammenhang zwischen den Auftreten von Tyrosinase -positiven Zellen und einer erhöhten Zellzahl im Liquor entspricht.

Bei Tumorerkrankungen beträgt der Kontingenzkoeffizient 0,378 bei 10 Fällen. Hieraus ergibt sich ein Signifikanzniveau von 0,197, was keinen Zusammenhang zwischen den Auftreten von Tyrosinase -positiven Zellen und einer erhöhten Zellzahl im Liquor entspricht.

Berechnet man alle Fälle beträgt der Kontingenzkoeffizient 0,173 bei 117 Fällen. Hieraus ergibt sich ein Signifikanzniveau von 0,073, was keinen Zusammenhang zwischen den Auftreten von Tyrosinase -positiven Zellen und einer erhöhten Zellzahl im Liquor entspricht.

6. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen das Enzym Tyrosinase in Liquor-Leukozyten nachzuweisen.

Die Tyrosinase spielt als spezifisches Markerenzym für zellvermittelte Abwehrprozesse im Gewebe auch in den Leukozyten des Blutes eine Rolle und kommt, bei eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten vor.

In den Granulozyten ist die Tyrosinase -Aktivität hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert und kann unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

Das Zytoplasma stellt sich in den Ausstrichpräparaten nach der Tyrosinase -Reaktion gleichmäßig oder wolkig braun dar. Ihre segmentierten Kerne erscheinen als Aufhellungen mit Tyrosinase-positiven Innenstrukturen. Je nach Ausbreitung und Enzymaktivität erkennt man ein granuläres bis diffus dunkelbraun erscheinendes Reaktionsprodukt.

Das Vorkommen und die Ausprägung der Tyrosinase-positiven Zellen variiert im Krankheitsverlauf. Dies war besonders bei bakteriellen Infektionen zu beobachten. Zu Beginn der Erkrankung stellt sich das Reaktionsprodukt nach der Tyrosinase -Reaktion gleichmäßig oder wolkig braun dar. Im Krankheitsverlauf und bei klinischer Besserung nimmt das Vorkommen der Tyrosinase-positiven Zellen und die Aktivität in den Zellen ab. Es sind nur noch schwach angefärbte Granulozyten mit angefärbten intrazellulären Granula als Ausdruck einer Restaktivität in einzelnen Zellen sichtbar.

Bei der Enzymdarstellung mit Pappenheim-Gegenfärbung stellt sich das sonst braune Reaktionsprodukt der zwei Tyrosinase-positive Granulozyten grünlich-braun dar.

Monozyten können Tyrosinase enthalten oder Tyrosinase -negativ sein. Das Reaktionsprodukt stellt sich diffus und mit zusätzlichen Punktaktivitäten dar.

Auch die Lymphozyten des peripheren Blutes gehören zu den Tyrosinase -positiven Zellen. Die Enzymaktivität ist geringer als die der Neutrophilen, das Enzymmuster ist unterschiedlich. In den Ausstrichpräparaten lässt sich bei einzelnen Lymphozyten im Zytoplasma ein homogenes, Reaktionsprodukt nachweisen

Bei folgenden Erkrankungen waren Tyrosinase -positive Liquor-Leukozyten nachweisbar

6.1. Bakterielle Meningitis

In der Akutphase der bakteriellen Meningitis tritt bis zum 5. Tag eine deutliche Tyrosinase -Aktivität als gesteigerte Enzymaktivität und -freisetzung in Form von Granulozyten und bis zum 15. Tag in Form von intrazellulären Granula als Restaktivität der Granulozyten (inhomogene Anfärbung) und Ausdruck einer gesteigerten Immunabwehr bei dieser bakteriellen Erkrankung auf. Der Gehalt an neutrophilen Granulozyten ist das Maß der Aktivität der ZNS-Infektion. Weiter ist zu folgern, daß neben Phagozytose der Bakterien auch Enzyme u.a. die Tyrosinase freigesetzt werden und der Bakterienabwehr dienen.

Die Tyrosinase -Aktivität ist bei erhöhter Zellzahl im Liquor ebenfalls erhöht.

Es besteht ein direkter Zusammenhang.

6.2. Myelitis transversa

Auch bei den Patienten mit bakterieller Myelitis transversa ist eine Enzymaktivität zu verzeichnen. Auch hier scheint die Tyrosinase in der körpereigenen Abwehr von Bedeutung zu sein.

6.3. Neuroborreliose

Besonders zu Beginn ist eine erhöhte Tyrosinase -Aktivität vorhanden, hauptsächlich als intrazelluläre Granula als Restaktivität in inhomogen angefarbte Granulozyten und z.T. auch in Lymphozyten. Da es sich auch hier um eine bakterielle Erkrankung handelt, liegt die Vermutung nahe, daß die Erkrankung durch die Bakterien selbst herbeigeführt wurde.

6.4. Neurolues

Auch bei den Patienten mit Neurolues ist eine Enzymaktivität zu verzeichnen. Die enzympositiven Schildchen wurden auch von Rohrberg (1988) beobachtet. Er beschrieb dieses Phänomen als Kernauswanderung neutrophiler Granulozyten. Die Zell- und Kernvolumen nehmen gleichzeitig zu. Die Kernstruktur lockert sich auf und Tyrosinase - positive Innenstrukturen werden sichtbar. Die Kernsegmente bewegen sich bei weiterer Größenzunahme über die Zellgrenzen hinaus in das umgebende Milieu, wobei sich an ihrem vorderen Pol ein enzympositives Schildchen formt. Aufgrund struktureller Ähnlichkeit und der Tyrosinase -Positivität ist anzunehmen, daß es sich bei den Schildchen um Enzymanteile handelt. Schmidt (1988) hat den Vorgang der Segmentauswanderung Neutrophiler als Augenzellbildung bezeichnet und in den freiliegenden "Augen" DNS nachweisen können.

6.5. Patienten mit Toxoplasmose

Bei drei von vier Patienten mit Toxoplasmose ist eine Enzymaktivität zu verzeichnen. Tyrosinase -positive Zellen scheinen auch bei der Abwehr von Protozoen eine Rolle zu spielen.

6.6. Multiple Sklerose

Bei einer Tyrosinase -Aktivität bei sechs von 14 Patienten im Liquor bei sicherer MS, unabhängig von Symptomatik und Untersuchungen, stellt sich die Frage nach der Ursache. Die Rate der Patienten mit Tyrosinase -positiven Zellen im Liquor bei sicherer MS von 35,7 % sowie mit 28,5 % bei wahrscheinlicher MS kommen den Raten von Chlamydien-PCR-positiven Patienten mit MS (25 % bei Grau/Layh-Schmitt und 36 % bei Holzer) sehr nahe, ebenso die 12,1 % Tyrosinase -positiver Patienten mit möglicher MS gehen in diese Richtung. Ob die Tyrosinase -positiven Patienten mit den Chlamydien-PCR-positiven Patienten identisch sind, kann zur Zeit nur spekuliert werden und bedarf weiterer Untersuchungen, da sich hier in der Tat neue therapeutische Strategien ergeben könnten.

Da die Chlamydien-Hypothese erst im November 1999 erstmals in Deutschland publiziert wurde, sind Antikörper auf Chlamydien im Rahmen der Arbeit nicht bestimmt worden, so dass eine sichere Aussage hierzu nicht möglich ist.

Es besteht aber die Vermutung, daß diese Erkrankung bakteriell zumindest mitbedingt ist. Insbesondere nach Postulierung der Chlamydien-Hypothese, muß vermutet werden, ob es nur eine mögliche Ursache der MS bzw. der Myelin-Schädigung bei MS gibt oder ob mehrere Möglichkeiten dafür bestehen, wobei neben der Autoimmun-Hypothese auch die Chlamydien-Hypothese in Frage kommt.

Vorliegende Untersuchungen zum Nachweis der Chlamydien mittels PCR oder kulturell sind aufgrund unterschiedlicher Methoden nur bedingt vergleichbar, möglicherweise kann hier das Enzym Tyrosinase neue Erkenntnisse bringen, insbesondere bezüglich einer akuten Infektion.

Untersuchungen dieser Subpopulation sind von besonderer Bedeutung, da sich hier in der Tat neue therapeutische Strategien ergeben könnten. Zuvor muss aber vor allem geklärt werden, ob es sich hier um eine „Bystander“-Produktion von erregerspezifischen Antikörpern handelt, wie man sie bei der MS auch gegen andere Viren findet, oder um eine eigenständige antigeninduzierte Immunantwort (Archelos 2001).

6.7. Neoplasmen

Auch die deutliche Zunahme der Tyrosinase -Aktivität bei den Patienten mit Hirntumoren deutet auf eine nicht unerhebliche Bedeutung der Tyrosinase bei der Tumorabwehr. Welche Funktion das Enzym im Einzelnen spielt, ist jedoch unklar, kann aber als unspezifische Reaktion gedeutet werden. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhter Zellzahl und dem Vorhandensein von TPZ im Liquor besteht allerdings nicht.

Kranke mit Wirbelsäulen-Tumoren zeigten im Gegensatz dazu keine Tyrosinase -positive Zellen im Liquor.

Rohrberg (1988) erbrachte den Nachweis, daß Phenoloxidase bei Non-Hodgkin-Lymphomen im Vergleich zum Tyrosinase -Verhalten gesunder Probanden eine Zunahme der Enzym-Aktivität und -freisetzung bei Kranken eine Bedeutung des Enzyms für die Zellerneuerung ableitete.

Es konnte gezeigt werden, daß das Enzym Tyrosinase bei zellvermittelten Abwehrprozessen gegen Bakterien und Protozoen (hier Toxoplasmen) sowie in der Tumorabwehr auch bei neurologischen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt.

Bei der, zerebrovaskulären Prozessen, Epilepsie, Zervikal- und Lumbalsyndromen inclusive Wirbelsäulentumoren, degenerativen Erkrankungen des ZNS mit Ausnahme eines Patienten mit ALS, Kopf- und Gesichtsschmerzen, Erkrankungen peripherer Nerven wie Mono- und Polyneuropathien und Polyradikulitiden sowie Patienten mit sonstigen Erkrankungen waren keine Tyrosinase -positive Liquor-Leukozyten nachweisbar, so dass bei diesen Erkrankungen das Enzym keine Rolle zu spielen scheint, oder wie bei der viralen Meningitis und Enzephalitis die akute Phase der jeweiligen Erkrankung verstrichen ist.

Ein genereller Zusammenhang zwischen der Zellzahl und dem Auftreten von Tyrosinase aktivierten Zellen konnte nicht gefunden werden.

Bei einzelnen Krankheitsbildern hingegen kommt es zu z.T. starken Korrelationen.

Bei bakteriellen Erkrankungen ist eine Tyrosinase -Aktivität mit TPZ mit einer erhöhten Zellzahl verbunden.

Akut virale Erkrankungen haben eine erhöhte Zellzahl ohne den Nachweis Tyrosinase -positiver Zellen im Liquor.

Bei Tumorerkrankungen des ZNS sowie bei MS als Autoimmunerkrankung gibt es keine Abhängigkeit zwischen Tyrosinase -aktiven Zellen und einer erhöhten Zellzahl.

Hier gibt es Unterschiede zwischen Autoimmunerkrankungen und Infektionserkrankungen.

Die Rolle des Enzyms bei Multipler Sklerose bedarf weiterer Untersuchung, da hier häufiger eine Tyrosinase -Aktivität zu beobachten war. Erst wenn hier weitere Erkenntnisse vorliegen, kann entschieden werden ob eine Bestimmung der Tyrosinase -Aktivität als Routinetest von diagnostischer Relevanz ist.

Vorliegende Untersuchungen zum Nachweis der Chlamydien mittels PCR oder kulturell sind aufgrund unterschiedlicher Methoden nur bedingt vergleichbar, möglicherweise kann hier das Enzym Tyrosinase neue Erkenntnisse bringen, insbesondere bezüglich einer möglichen akuten Infektion oder Reaktivierung. Untersuchungen hier sind von besonderer Bedeutung, da sich in der Tat neue therapeutische Strategien ergeben könnten. Vor allem muss geklärt werden, ob es sich hier um eine „Bystander“-Produktion von erregerspezifischen Antikörpern handelt, wie man sie bei der MS auch gegen andere Viren findet, oder um eine eigenständige antigeninduzierte Immunantwort.

Bei Infektionskrankheiten ist die Bestimmung der Tyrosinase -Aktivität in Liquorzellen entbehrlich.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die hier vorliegende Arbeit wurde durch die Feststellung veranlasst, daß die Tyrosinase als spezifisches Markerenzym für zellvermittelte Abwehrprozesse im Gewebe auch in den Leukozyten des Blutes vorkommt, insbesondere bei eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten. Deshalb war auf das Vorhandensein solcher Zellen im Liquor mit Tyrosinaseaktivität bei neurologischen, insbesondere bei entzündlichen (akuten oder autoimmunen) Erkrankungen zu prüfen. Durch Enzymdarstellung (mit und ohne Pappenheim-Gegenfärbung) wurden die Liquorzellen bei Patienten mit neurologischen Erkrankungen untersucht.

Es wurden 292 Liquorsedimentpräparate im Einzugsgebiet des Liquorlabors der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg gewonnen. Zur Auswertung kamen 204 Liquor-Präparate von 184 Patienten.

Der Tyrosinasenachweis gelang bei bakteriellen Erkrankungen und bei positivem Toxoplasmose-Titer zu Krankheitsbeginn bzw. bei der Erstuntersuchung fast ausnahmslos.

Bei Patienten mit soliden Tumoren des ZNS und systemischen Tumoren mit ZNS-Beteiligung (Morbus Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphom) konnten Tyrosinase -positive Zellen gefunden werden, während Kranke mit Wirbelsäulen-Tumoren im Gegensatz dazu keine Tyrosinase -positive Zellen im Liquor zeigten.

Nur bei fünf von 14 Patienten mit sicherer Multiple Sklerose wurde einen Tyrosinase – positive Zellen nachgewiesen.

Keine Tyrosinase -positive Zellen fanden sich bei viralen Erkrankungen, zerebrovaskulären Prozessen, Epilepsien, Wurzelreizungen und degenerativen Erkrankungen.

Ein genereller Zusammenhang zwischen der Zellzahl und dem Auftreten von Tyrosinase aktivierten Zellen konnte nicht gefunden werden. Allerdings fand sich eine positive Korrelation bei bakteriellen Erkrankungen.

Kein Zusammenhang zwischen der Zellzahl und dem Auftreten von TPZ bestand bei MS und Tumorerkrankungen des ZNS.

Schlußfolgernd kann gesagt werden, daß das Enzym Tyrosinase auch bei zellvermittelten Immunreaktionen gegen Bakterien und Protozoen (hier Toxoplasmen) sowie in der Tumorerkrankungen des ZNS auch beim Menschen eine Rolle zu spielen scheint.

Allerdings scheint der Einsatz in der Routinediagnostik nicht gerechtfertigt.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Archelos JJ, Hartung HP. Chlamydieninfektion und multiple Sklerose, Kommentar. *Fo Neurologie & Psychiatrie* 1 (2001) 45
2. Bloch, B.: Chemische Untersuchungen über das spezifische pigmentbildende Ferment der Haut, die Dopaoxidase. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 98 (1916/17) 226 - 254.
3. Bloch, B.; Ryhiner, P.: Histochemische Studien in überlebendem Gewebe über fermentative Oxydation und Pigmentbildung. *Z. gesamte exp. Med.* 5 (1917) 179 - 181.
4. Boll, J.: Das granulozytäre Zellsystem. Queißer, W (Hrsg.): *Das Knochenmark.* Stuttgart: G. Thieme (1978) 167 - 192.
5. Cardosa, M. J.: Dengue virus isolation by antibody-dependent enhancement of infectivity in makrophages. *Lancet.* I (1987) 193 -194
6. Clark, R. A.: Extracellular effects of the myeloperoxidase - hydrogen peroxide-halide- system. *Advances in inflammation research.* Vol. 5 / vol. ed: Weissmann, G. New York Raven Press (1983) 107 - 146.
7. Clark, R. A.; Klebanoff, S. J.; Einstein, A. B.: Peroxidase H₂O₂ halide system: Cytotoxic effect on mammalian tumor cells. *Blood.* 45 (1975) 161 - 170.
8. David., H.: *Wörterbuch der Medizin.* 13., überarbeitete Auflage Berlin Volk und Gesundheit Band I bis II (1987)
9. Delpech, B.; Lichtblau, E.: Etude quantitative des immunoglobulines G et de l'albumine du liquide cephalorachidien. *Clin. Chim. Acta* 37 (1972) 15 - 23
10. Felgenhauer, K.: The blood brain barrier redefined. *J. Neurol.* 233 (1986) 193 - 194
11. Ganrot, K.; Laurell, C. B.: Measurement of IgG and albumine content of cerebrospinal fluid and its interpretation. *Clin. Chem.* 20 (1974) 571 - 573.
12. Goldstein, G. W.; Bets., A. L.: *Die Blut-Hirn-Schranke.* Spectrum Wiss. 11 (1986) 82 - 91
13. Hartmann, W.; Kluge, H.: Grundlagen zur Bewertung und Differenzierung von Einzelproteinbefunden in der Zerebrospinalflüssigkeit an Beispielen von IgG, IgA, IgM und Transferrin. , *Psychiat. Neurol. med. Psychol.* 34 (1982) 395 - 408
14. Karlson, P.: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie.* Georg Thieme Verlag Stuttgart. 11. Aufl. (1980) 161, 302

15. Klebanoff, S. J.; Jong, E. C.; Henderson, W. R.: The eosinophil peroxidase: Purification and biological properties. Mammut, A. A. F. (eds.): The eosinophil in health and disease: Proceedings of the Eosinophil Centennial, Brook. Lodge, Augusta / Michigan Grune und Stratton (1980) 99 - 111.
16. Kluge, H.; Hartmann, W.; Mertins, B.; Wieczorek, V.: Correlation between protein data in normal lumbar CSF and morphological findings of choroid plexus epithelium: a biochemical cooperation of barrier transport via tight junctions pores. J. Neurol. 233 (1976) 195 - 199
17. Kuppe, G.: Die Bedeutung klinisch-neurochemischer und -immunologischer Untersuchung bei Erkrankung des Nervensystems. Halle, Univ., Math.-Nat. Fak., Dis. B. (1989). 185 Seiten.
18. Kurtzke JF, Hyllested K. Multiple sclerosis in the Faroer Islands II. Clinical update, transmission, and the nature of MS. Neurology 36 (1986) 307-308.
19. Layh-Schmitt G, et al. Evidence for infection with Chlamydia pneumoniae in a subgroup of patients with multiple sclerosis. Ann Neurol 47 (2000) 652-655.
20. Lehmitz, R.; Olischer, R. M.; Wenk, E.-D.: Zur quantitativen IgG-Bestimmung im Liquor cerebrospinalis Korrelation der Ergebnisse zur anderen Liquorwerten. Psychiat. Neurol. med. Psychol. 33 (1981) 10 - 18.
21. Leibowitz, S.; Hughes, R. A. C.: Immunology of the nervous system.: Current topics in immunology. Bd 17 / ed. by John Turk London: Eduard Arnold (1983)
22. Löwenthal, A.: Agar gel electrophoresis in neurology. Auflage. Amsterdam 1. / London / New York: Elsevier Publishing Co. (1965)
23. Ludewig, M.: Toxic quinones produced by mammalian defense cells- causative agents for autoimmune reactions? Medical hypotheses (1993) 375 - 377.
24. Ludewig, R.; Kuppe, G.: Proteinanalytische und enzymatische Parameter bei Multipler Sklerose im Vergleich zu anderen neurologischen Erkrankungen, Wiss. Z. Univ. Halle Halle XXXVI M (1987) 90-95
25. Maida, E.; Horvath, E.: Cerebrospinal fluid alterations in bacterial meningitis. Eur. Neurol. 25 (1986) 110-116
26. Mason, H. S.; Onopryenko, J.; Buhler, D. H.: Hydroxylation: The activation of oxygen by peroxidase., Biochem. Biophys. Acta. 24 (1957) 225 - 226.
27. Merker, : Zytochemie der Blutzellen. In: Heilmeyer, L. (Hrsg.): Handbuch der Inneren Medizin. Band II T. 1. Berlin (W) /o. A./ Springer: (1968) 130 - 249.
28. Reiber, H.: Quantitative Bestimmung der lokal im Zentralnervensystem synthetisierten Immunglobulin G-Fraktion des Liquors., J. Klin. Chem. Klin. Biochem. 17 (1979) 587 - 591.

29. Reiber, H.: The discrimination between different blood CSF barrier dysfunctions and inflammatory reactions of the CNS by a recent evaluation graph for the protein profile of cerebrospinal fluid. *J. Neurol.* 224 (1980) 89 - 99.
30. Reiber, H.: Untersuchung des Liquors zur Diagnose neurologischer Erkrankungen. *Bioscientia.* 30 (1987 a) 1 - 10.
31. Reiber, H.: Liquordiagnostik. *Diagn. Lab. Marburg* 37 (1987 b) 63 - 72
32. Reiber, H.: Aktuelle Methoden der Liquoranalytik. *Lab. med.* 12 (1988 a) 101 - 109.
33. Reiber, H.: Untersuchungen des Liquors zur Diagnose neurologischer Erkrankungen. In: *Liquordiagnostik von Erkrankungen des Nervensystems /* hrsg. von M. Holzgräfe; H. Reiber; K. Felgenhauer. Erlangen: perimed. Fachbuch Verlagsgesellschaft mbH (1988 b) 35 - 50
34. Reiber, H.; Felgenhauer, K.: Protein gradients in normal and pathological blood CSF barrier function. *Wis. Z. Karl-Marx-Univ. Leipzig* 36 M. N. (1987 a) 100 - 103
35. Reiber, H.; Felgenhauer, K.: Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin. Chem. Acta. Amsterdam* 19 163 (1987 b) 319 - 328.
36. Rohrberg, R.: Phenoloxidase-Aktivität in Blutleukozyten mit malignen Lymphomen, Leukämien, Hypereosinophilie-Syndrom, sowie ihrer in vitro-Beeinflussung durch ausgewählte Arzneistoffe. *Halle Univ. Med. Fak. Dis. B.* (1988)
37. Rytomäa, T.: Role of peroxidase activity of neutrophils and eosinophils in kinetics of granulocytes. *Proceedings: VIII. Konkr. Eur. Soc. Haematol. Wien* 1961. Basel: S. Karger, Nr. 32 (1962).
38. Schliep, G.; Felgenhauer, K.: Serum-CSF protein gradients, the blood- CSF-barrier and the local immune response. *J. Neurol.* 218 (1978) 77 - 96
39. Schmidt, H.: Der histochemische Nachweis der Peroxidase in den Phenoloxidase-enthaltenden Zellen (POZ) des menschlichen Blutes. *Folia haematol. Leipzig* 108 (1981 b) 85 - 89.
40. Schmidt, H.: Der histochemische Phenoloxidasenachweis an isolierten Leukozyten und Lymphozyten des menschlichen Blutes. *Folia haematol. Leipzig* 109 (1982) 761 - 769.
41. Schmidt, H.: Der Nachweis der Peroxidase in den TPZ. *Acta Histochem. Jena* 57 (1976) 78 - 86.

42. Schmidt, H.: Die Phenoloxidase-Aktivität bei Gegenwart von H₂O₂, EDTA und Kupfer., *Acta Histochem. Jena* 59 (1977) 85 - 95.
43. Schmidt, H.: Persönliche Mitteilung, (1994)
44. Schmidt, H.: Phenol- und Peroxidase-Aktivität in Gegenwart verschiedener Vektoren. *Acta Histochem. Jena* 64 (1979) 194 - 205.
45. Schmidt, H.: Phenoloxidase (EC 1.14.18.1) a marker-enzyme for defense cells. *Prog. Histochem. Cytochem. Stuttgart* 17/3 (1988) 194 S.
46. Schmidt, H.: Phenoloxidase -a specific enzyme of defense cells. *Wiss. Z. Martin Luther Univ. Halle-Wittenberg. Math. Nat. Wiss. Reihe. Halle* 32 M (1983) 12 - 22.
47. Schmidt, H.: Phenoloxidase enthaltende Zellen: Histochemischer Nachweis und mögliche immunologische Bedeutung. *Dermatol. Mon. Schr. Leipzig* 166 (1980) 449 - 453.
48. Schmidt, H.: Zum histochemischen Nachweis von Phenoloxidase in menschlichen Blutzellen. *Folia haematol. Leipzig* 108 (1981 a) 76 - 84.
49. Schmidt, H.: Zum Nachweis von Phenoloxidase enthaltenden Zellen in erkrankten periodontalen Geweben. *Zahn-Mund-Kieferheilkunde - Leipzig* 69 (1981 c) 23 - 30.
50. Schmidt, H.; Kiss, F. A.: Ein Beitrag zur Methotik des Phenoloxidase-Nachweises. *Acta histochem. Jena* 53 (1975) 306 - 314.
51. Schmidt, H.; Koch, J.: Zur Substratspezifität der Phenoloxidase (EC 1. 14.18.1.) *Acta histochem. Jena* 73 (1983) 63 - 70.
52. Schmidt, H.; Modis, L.: Das Verhalten verschiedener Dehydrogenasen und Oxidasen der Rattenhaut bei lokaler Ischämie. *Acta histochem. Jena* 37 (1970) 80 - 104.
53. Schmidt, H.; Modis, L.: Das Vorkommen von Phenoloxidase enthaltenden Zellen (TPZ) während der embryonalen Entwicklung des Huhnes (TPZ-Zellen des Immunsystem?) *Acta histochem. Jena* 59 (1977) 47 - 60.
54. Schmidt, H.; Modis, L.: Der Nachweis von Phenoloxidase-enthaltenden Zellen (POZ) in verschiedenen Geweben und Organen der Ratte. *Acta histochem. Jena* 51 (1974) 286 - 300.
55. Schmidt, H.; Modis, L.: Der Nachweis von POZ bei der xenogenen Hauttransplantation. *Acta histochem. Jena* 61 (1978) 32 - 47.
56. Schmidt, H.; Modis, L.: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Phenoloxidase (EC 1.14.18.1) in eosinophilen Granulozyten des Dünndarms weißer Ratten. *Folia Haematol. Leipzig* 112 (1985) 550-561.

57. Schmidt, H.; Sengewald, H.: Untersuchung über die Wirkung von Tyrosinase-Inhibitoren auf Phenoloxidase. *Acta histochem. Jena* 73 (1983) 113 - 120.
58. Schmidt, H.; Stintz, A.-R.: Das Melanom - ein PO-Zellen-Tumor? *Arch. Geschwulstforsch. Berlin* 45 (1975) 146 - 152.
59. Schmidt, R. M. (Hrsg.): *Der Liquor cerebrospinalis. 2., überarbeitete Auflage.* - Leipzig: Georg-Thieme, Band 1 bis 2 (1987). 1078.
60. Schmidt, R. M. (Hrsg.): *Multiple Sklerose. 2. Aufl. Jena / Stuttgart: Gustav Fischer Verl. (1990)*
61. Schmidt, R. M.: In: *Atlas der Liquorzytologie. 1. Auflage. Leipzig: Johann Ambrosius Barth (1978) 198 Seiten*
62. Schmidt, R. M.; Kuppe, G.: Die Liquordiagnostik - klinisch-chemische und zytologische Untersuchungen., *Z. med. Labor.-Diagn.* 25 (1984) Studienmaterial 1-16
63. Schmidt, R. M.; Kuppe, G.; Kissig, B.: "Oligoclonal - CSF - IgG reaction" und ihre Bedeutung für die neurologische Diagnostik. *Wiss. Z. Univ. Halle Halle XXXV M (1986) 37-42*
64. Schmidt, R. M.; Kuppe, G.; Kissig, B.; Ludewig, R.; Neumann, V.: Research approaches on the diagnosis of multiple sclerosis by CSF examination. *Schweiz. Arch. Neurol. Psychiatr.* 138 (1987 a) 13-22
65. Schmidt, R. M.; Kuppe, G.; Kissig, B.; Ludewig, R.; Neumann, V.: Fortschritte zur Diagnose der Multiplen Sklerose durch Liquoruntersuchung., *Psychiat. Neurol. Med. Psychol.* 139 (1987 b) 651-661
66. Schmidt, R. M.; Kuppe, G.; Ludewig, R.; Neumann, V.: Klinische und pathophysiologische Aspekte bei viralen Infekten des ZNS., *Psychiat. Neurol. Med Psychol.* 139 (1987 c) 513-523
67. Schmidt, R. M.; Neumann, V.: CSF- oligoclonal bands in multiple sclerosis., *Schweiz. Arch. Neurol. Neurochir. Psychiatr.* 123 (1978) 321-329
68. Schmidt, R.M.: Zur Bedeutung der Lymphoidzellen im Liquor cerebrospinalis bei entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems., *Schweiz. Arch. Neurol. Neurochir. Psychiatr.* 113 (1973) 295-301
69. Sindic, C. J. M.; Cambiaso, C. L. ; Depre, A.; Laterre, W. C.; Masson, B. L.: The concentration of IgM in the cerebrospinal fluid of neurological patients. *J. Neurol. Sci. Amsterdam* 55 (1982) 339 - 350
70. Söderhall, K.; Cerenius, L; Johansson M. W.: The phenoloxidase Activating system and its role in invertebrate defence., *Ann-N-Y-Acad-Sci* 712 (1994) 155 - 161.

71. Sriram S, Stratton CW, Yao S, et al. Chlamydia pneumoniae infektion of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 46 (1999) 6-14.
72. Thomas, L.: *Proteindiagnostik*. 1. Auflage - Marburg: Behringwerk Aktiengesellschaft (1982) 81 Seiten.
73. Tibbling, G.; Link, H.; Öhman, S.: Principles of albumin and IgG-analysis in neurological disorders. Part 1 (establishment of reference values). *Scant. J. Klin. Lab. Invest.* 37 (1977) 385 - 390
74. Tippling, H.; Tippling, G.: Principles of albumin and IgG-analysis in neurological disorders. 2. Relation of the Concentration of the proteins in serum and cerebrospinal fluid., *Scant. J. Klin. Lab. in West.* 37 (1977 a) 391 - 396
75. Tibbling, H.; Tibbling, G.: Principles of albumin and IgG-analysis in neurological disorders. 2. Relation of the Concentration of the proteins in serum and cerebrospinal fluid. *Scant. J. Klin. Lab. in West.* 37 (1977 b) 397 - 401
76. Tortelotte, W. W.: On cerebrospinal fluid immunoglobulin G (IgG) quotients in multiple sklerosis and other diseases. A review and a new formula to estimate the amount of IgG synthesized per day by the central nervous system. *J. Neurol. Sci.* 10 (1970) 279 - 304.
77. Treib J, Haas A, Stille W, et al. Multiple sclerosis and Chlamydia pneumoniae. *Ann Neurol* 47 (2000) 408.
78. Treib, J.; Haas, A.; *Infektionskrankheiten des Nervensystems: Mögliche Auslöser der Multiplen Sklerose*. *Deutsches Ärzteblatt* 45 (1999) B-2339-B2340
79. Usui, M.; Aoki, I.; Sunshine, G. H. ; Dorf, M. E. : A role for macrophages in supressor cell induction. *J. Immunol.* 132 (1984) 1728 - 1734
80. Veerman, A. J. B.; Huismans, L.; van Zantwijk, I.: Storage of cerebrospinal fluid samples at room temperature, *Acta Cytol. Philadelphia* 29 (1985) 188 - 189
81. Wagner, U.: *Phenoloxidase enthaltende Zellen in Tumoren des Kiefer-Gesichtsbereiches und ihr Verhalten bei experimentellen Studien mit Bleomycin Methotrexat und Prednisolon* Halle, Univ. Med. Fak., Diss. B. (1982) 170 Seiten,
82. Weisner, B.; Bernhardt, W.: Zusammenhang der Immunglobulin-Konzentration im Liquor und im Serum. *Fortschr. Med.* 96 (1978) 1865 - 1869
83. Wikkelso, C.; Blomstrand, C.: Cerebrospinal fluid proteins and cells in normal pressure hydrocephalus. *J. Neurol.* 228 (1982 a) 171 - 180
84. Zimmermann, K.; Krauß, H. ; Linke, E.: Zur diagnostischen Wertigkeit der IgG-Bestimmung im Liquor cerebrospinalis mittels radialer Immundiffusion. *Psychiat. Neurol. Med. Psychol.* 28 (1976) 615 – 622

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abn. Kernf.	Abnorme Kernform
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
allg.	allgemein
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APUD-Zellsystem	Amine Precursor Uptake and Decarboxylation-Zellsystem
biklon.	Biklonal
Borr.	Borrelien
Ca	Karzinom
cCT	cranielles Computertomogramm
chr.pro.	chronisch progredient
CMT	Kardiolipin-Mikroflockungstest
cort.	kortikal
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
Dg.	Diagnose
Dopa	Dihydroxyphenylalanin
EDTA	ethylene diamine tetraacetat
EEG	Elektroenzephalogramm
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Eos.	Eosinophile Granulozyten
E-phor.	Elektrophorese
FTA-Abs.	Fluoreszenz-Treponemenantikörper-Test
Gra./Gran.	homogen gefärbte Granulozyten
Granul.	Intrazelluläre Granula, inhomogen gefärbte Granulozyten
Herpes	Herpes simplex
IgG	Immunglobulin G (intrathekale Synthese)
IgM	Immunglobulin M (intrathekale Synthese)
Imm./Immunkomp.	Immunkompetente Zellen wie Lymphoid- und Plasma-Zellen
Kontr.	Kontrolle
Ly./Lymph.	Lymphozyten
Lyo.	Lymphoid-Zellen
M. Hodgkin	Morbus Hodgkin
Mono/Mo/M	Monozyten
Monopl.	Monoplegie
Mpt/l	Megapartikel pro Liter

MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MS	Multiple Sklerose
n.v.	nicht vorhanden bzw. unauffällig
Neutro/N	Neutrophile Granulozyten
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
Ob.Pl.p	obere Plexusparese
oligokl.	oligoklonal
p VII P	periphere Facialisparese
Papill.	Papillitis
Pat.	Patienten
PCR	Plasma-Clearance-Rate
Phago.	Phagozyten
Plasma	Plasma-Zellen
PNP	Polyneuropathie
Polyrad.	Polyradikulitis
Pos.	Entmarkungsherde im MRT bei MS vorhanden
PRIND	prolonged ischaemic neurological deficit
Prot.	Proteingehalt bzw. Gesamteiweiß in mg/l
PSF	polarographisches Serumfiltrat
Reiber	Reiberbereich
Sch.-A.-Sy.	Schulter-Arm-Syndrom
Schub	schubförmige MS
Serol.	Erreger-Antikörper im Liquor
subcort.	subkortikal
temp.	temporal
TIA	transiente ischämische Attacke
Toxo.	Toxoplasmose
TPHA	Treponema-Pallidum-Hämagglutinations-Test
TPZ	Tyrosinase positive Zellen
Tu-Zellen	Tumor-Zellen
V.a.	Verdacht auf
V.a.Ent.	Verdacht auf Entzündung
ZB	Zellbild
ZZ	Zellzahl in Mpt/l

THESEN

1. In den letzten Jahren hat die Kenntnis von der Funktion der Granulozyten und Monozyten / Makrophagen zugenommen. Im Vordergrund des Interesses stand zunächst die Phagozytose. Heute ist es die Freisetzung präformierter und neugebildeter Mediatoren durch aktive Zellen zur Auslösung und Regulation entzündlicher und Immunprozesse.
2. Ein spezifischer Marker für die an der Immunabwehr beteiligten Zellen ist das Enzym, welches mit Ausnahme der basophilen Granulozyten enthalten alle Leukozyten dieses Enzym. Der zytochemische Nachweis seiner Aktivität erlaubt es, einen funktionellen Parameter dieser Zellen lichtmikroskopisch zu erfassen.
3. Ziel der Untersuchung war es, durch vergleichende Anwendung von Enzymnachweis mit und ohne Pappenheim-Gegenfärbung die Liquorleukozyten bei Patienten mit entzündlichen neurologischen Erkrankungen in ihrem Tyrosinasegehalt zu charakterisieren. Als Kontrollgruppe dienten Patienten nichtentzündlichen neurologischen mit Erkrankungen.
4. Der zytochemische Tyrosinase-Nachweis wurde unter standardisierten Bedingungen nach der von SCHMIDT und KISS (1975) angegebenen Technik durchgeführt. Die Grundlage der Nachweisreaktion bildet die Oxidation des als Substrat angebotenen Dihydroxyphenylalanins (Dopa) zu Dopachinon, das in Gegenwart von Sauerstoff spontan in Melanin umgewandelt wird. Dieses Melanin bleibt als braunes bis tiefschwarzes Reaktionsprodukt am Ort der Entstehung liegen und charakterisiert so die Lokalisation des Enzyms.
5. Es wurden 292 Liquorsedimentpräparate im Einzugsgebiet des Liquorlabors der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Medizinischen Fakultät der "Martin-Luther-Universität" Halle/Wittenberg gewonnen. Zur Auswertung kamen 204 Liquor-Präparate von 184 Patienten mit ebenso vielen Erst- und 19 Verlaufsuntersuchungen. Diese Präparate sind aus der Routine-Liquordiagnostik entnommen worden und waren auf zusätzlich zwei Präparate zur Routine-Liquordiagnostik begrenzt. Nicht berücksichtigt wurden Präparate mit mehr als 100 Mpt/l Erythrozyten im Liquorsediment, sowie artefaktreiche Präparate.

6. Der Tyrosinasenachweis gelang bei bakteriellen Erkrankungen und positivem Toxoplasmosetiter zu Krankheitsbeginn bzw. bei der Erstuntersuchung fast ausnahmslos. Nach erfolgter antibakterieller Behandlung war Tyrosinase mit einer Ausnahme nicht mehr nachweisbar.

Bei Patienten mit bakterieller Meningitis traten ab Krankheitsbeginn bis zum 5. Tag eine deutliche Tyrosinase -Aktivität als gesteigerte Enzymaktivität aller Granulozyten und bis zum 15. Tag intrazelluläre Granula als Restaktivität der Granulozyten (inhomogene Anfärbung) und Ausdruck einer gesteigerten Immunabwehr bei dieser bakteriellen Erkrankung auf. Nach erfolgter antibiotischer Behandlung verschwand mit der Zahl der Granulozyten auch die Tyrosinase-Aktivität.

Bei den drei Patienten mit Lues war eine Tyrosinase-Aktivität einmal in Form von sog. Schildchen und zum Anderen in Form von intrazellulären Granula als inhomogen angefärbte Granulozyten nachweisbar. Die Kontrolluntersuchungen sowie der Liquor des dritten Patienten zeigten keine Tyrosinase-Aktivität. Die Tyrosinase-Aktivität konzentrierte sich auf die akute Krankheitsphase, d.h. nur der erste Liquorbefund zu Therapiebeginn war positiv.

Im Liquor von Patienten mit Neuroborreliose waren bei fünf von neun Patienten intrazelluläre Granula, wiederum als inhomogen angefärbte Granulozyten, und bei einem von neun Patienten war in Lymphozyten, besonders zu Beginn der Erkrankung, eine erhöhte Tyrosinase-Aktivität nachweisbar. Die Tyrosinase-Aktivität nahm im Rahmen der Behandlung ab und verschwand. Einmal trat nach 45 Tagen eine erneute PO-Aktivität (Lymphozyten) auf. Bei einem zweiten Patienten mit Tyrosinase-positivem Lymphozyten erfolgte die Erstuntersuchung nicht zu Beginn der Erkrankung, sondern als Kontrolluntersuchung (Patient 8). Da es sich auch hier um eine bakterielle Erkrankung handelte, liegt die Vermutung nahe, daß die Erkrankung durch die Bakterien selbst herbeigeführt wurde bzw. sekundär durch Bakterientoxine.

Zwei von drei Patienten mit Myelitis transversa zeigten ebenfalls Tyrosinase-positive Zellen im Liquor, wobei ein Erregernachweis nicht gelang. Es liegt aber die Vermutung nahe, daß es sich hier um eine bakterielle Infektion handelt. Beim dritten Patienten war die Myelitis virusbedingt.

Bei den Patienten mit Toxoplasmose wurden intrazelluläre Granula bei einem Patienten und eosinophile Granulozyten bei zwei Patienten von insgesamt vier Patienten nachgewiesen. Somit scheinen Tyrosinase -positive Zellen auch bei der Abwehr von Protozoen eine Rolle zu spielen.

7. Bei allen drei Patienten mit primären (Glioblastoma multiforme) und sekundären Tumoren (Hirnmetastase eines Bronchialkarzinoms und Hirnmetastase eines Seminoms) des ZNS konnten TPZ gefunden werden. Die deutliche Zunahme der Tyrosinase-Aktivität bei den Patienten mit Hirntumoren deutet auf eine nicht unerhebliche Bedeutung der Tyrosinase bei der Tumorabwehr. Ebenfalls Tyrosinase-positive Zellen konnten bei Patient 5 mit Morbus Hodgkin und bei den Patient 7 und Patient 8 mit einem Non-Hodgkin-Lymphom gefunden werden. Kranke mit Wirbelsäulen-Tumoren zeigten im Gegensatz dazu keine TPZ im Liquor.
8. Auch bei sechs von 14 Patienten mit Multiple Sklerose wurde eine erhöhte Tyrosinase-Aktivität nachgewiesen, so dass die Vermutung besteht, daß diese Erkrankung bakteriell zumindest mitbedingt ist. Insbesondere nach Postulierung der Chlamydien-Hypothese kann gefragt werden, ob es nur eine mögliche Ursache der MS bzw. der Myelin-Schädigung bei MS oder ob es mehrere Möglichkeiten dafür gibt, wobei die Autoimmun-Hypothese als auch die Chlamydien-Hypothese in Frage kommen.
9. Eosinophile und neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten sowie ihre aktivierten Formen als Lymphoide- und Plasmazellen sind immunkompetente Zellen, die über ein umfangreiches Potential an zytotoxischen Effektormechanismen verfügen und der körpereigenen Abwehr dienen. An diesem Mechanismus scheint auch die Tyrosinase beteiligt zu sein. Nach den Ergebnissen dieser stichprobenartigen Untersuchungen scheinen weitere Untersuchungen zur genaueren Abklärung gerechtfertigt. Dies trifft insbesondere für die Multiple Sklerose und die Tumorabwehr zu.
10. Ein genereller Zusammenhang zwischen der Zellzahl und dem Auftreten von Tyrosinase-aktivierten Zellen konnte nicht gefunden werden.

Bei einzelnen Krankheitsbildern hingegen kommt es zu z.T. starken Korrelationen, positive Korrelation bei bakteriellen Erkrankungen, negative Korrelation bei akut virale Erkrankungen, kein Zusammenhang bei MS und Tumorerkrankungen des ZNS.

TABELLENANHANG

Die Zahlen in Klammer geben die Tage an, nach denen eine Kontrollpunktion durchgeführt wurde.

Abkürzungen in den Tabellen vgl. Seite 48 ff

Tabelle A.1. Liquorbefunde von Patienten mit sicherer Multipler Sklerose

Pat. *	Dg.	TPZ	ZZ	ZB	Protein (mg/l)	Reiber- Bereich	E-phor.	IgG (%)	MRT
1	Chr.pro	keine	7	Ly,Lyoi	340	4	oligokl.	40,0	n.v.
2	Chr.pro	Ly.	4	Ly.	354	5	oligokl.	43,2	n.v.
3	Schub	keine	5	Ly,Lyoi	337	1	n.v.	n.v.	pos.
4	Schub	keine	1	Mo,Ly	380	1	n.v.	n.v.	pos.
5	Schub	keine	7	Mo.	591	4	oligokl.	26,3	pos.
6	Schub	keine	3	Ly.	630	1	n.v.	n.v.	pos.
6 (28)	Schub	keine	495	Ly,Lyoi	3010	4	oligokl.	19,2	n.v.
7	Schub	Ly.	1	Ly.	356	1	n.v.	n.v.	pos.
8	Schub	Eos.	15	Ly.	457	4	oligokl.	64,2	n.v.
9	Schub	keine	28	Ly,Imm	450	4	oligokl.	69,5	n.v.
10	Schub	Ly.	6	Ly,Lyoi Plasma	546	4	oligokl.	22,9	n.v.
11	Schub	keine	26	Ly,Lyoi	738	4	oligokl.	39,2	n.v.
12	Schub	keine	1	Ly,Lyoi	360	1	n.v.	n.v.	n.v.
13	Schub	Ly.	7	Ly,Lyoi	445	1	n.v.	n.v.	n.v.
14	Schub	keine	1	Ly.	340	1	n.v.	n.v.	n.v.

Tabelle A.2. Liquorbefunde der Patienten mit möglicher MS

Pat.	TPZ	ZZ	ZB	Protein (mg/l)	Reiber- Bereich	E-phor	IgG (%)	IgM (%)	Sero- logie
1	keine	6	Ly.	486	1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
2	keine	7	Ly.	638	2	n.v.	24,7	n.v.	n.v.
3	keine	3	Schatt.	300	1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
4	Granul.	4	Ly.	321	1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
5	keine	1	Ly,M,N	259	1	n.v.	n.v.	73,0	n.v.
6	keine	4	Ly.	597	2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
7	keine	8	Mo.	760	3	n.v.	35,8	n.v.	n.v.
8	Ly.	3	Ly.	623	2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
9	keine	49	Ly-Mo	579	3	n.v.	27,4	n.v.	n.v.
10	keine	4	Ly.	309	1	n.v.	21,3	n.v.	n.v.
11	keine	4	Mo.	536	2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
12	keine	1	Ly.	365	1	n.v.	33,4	n.v.	n.v.
13	keine	3	Mo.	437	1	n.v.	n.v.	64,3	n.v.
14	keine	8	Ly.	386	2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
15	keine	2	Ly.	543	2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
16	keine	9	Ly.	433	3	n.v.	23,8	n.v.	n.v.
17	keine	17	Ly.	684	4	oligokl.	n.v.	43,6	n.v.
18	Eo,Neu	43	L,N,Eo, LyoI	854	5	oligokl.	47,6	n.v.	n.v.
19	keine	1	Mo.	386	1	n.v.	21,3	42,7	n.v.
20	keine	7	Ly.	415	1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
21	keine	8	Ly,LyoI	288	1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
22	keine	2	Ly.	537	1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
23	keine	5	Ly.	637	2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.

Pat.	TPZ	ZZ	ZB	Protein (mg/l)	Reiber- Bereich	E-phor	IgG(%)	IgM(%)	Sero- logie
24	keine	2	Mo,Ly.	376	1	oligokl.	n.v.	n.v.	n.v.
25	keine	24	Ly.	455	4	n.v.	35,7	78,3	n.v.
26	keine	2	Ly.	345	1	n.v.	n.v.	n.v.	Borr.+
27	keine	2	Ly.	493	2	n.v.	24,8	n.v.	n.v.
28	keine	9	Ly.	543	3	oligokl.	42,3	n.v.	n.v.
29	keine	2	Ly.-Mo	325	1	n.v.	27,4	n.v.	n.v.
30	keine	2	Ly.	576	2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
31	Ly.	1	Ly.	437	1	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
32	keine	14	Ly.	385	2	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.

Tabelle A.3. Liquorbefunde der Patienten mit wahrscheinlicher MS

Pat.	TPZ	ZZ	ZB	Protein (mg/l)	Reiber- Bereich	E-phor.	IgG(%)	IgM(%)
1	keine	1	Ly	352	1	oligokl.	n.v.	n.v.
2	Ly.	20	Ly	586	5	oligokl.	34,7	n.v.
3	keine	3	Ly	254	1	oligokl.	n.v.	63,8
4	keine	18	Ly	359	4	oligokl.	55,8	n.v.
5	keine	28	L,Lyoi, Phag.	793	3	oligokl.	43,4	54,6
6	Ly.	4	Ly.	258	1	oligokl.	n.v.	n.v.
7	keine	1	Ly.-Mo	242	1	n.v.	n.v.	34,7

Tabelle A.4. Liquorbefunde von Patient 1 mit bakterieller (tuberkulöser) Meningitis

Punkt. Tage	TPZ	ZZ	Neuro.	Mono.	Lymph.	Immun komp.	Phago	Protein (mg/l)	Reiber-Bereich	E-phor.
1	Gran.	4	1	70	21	2	6	897	3	n.v.
2	Gran.	945	58	23	5	8	7	4.810	4	n.v.
6	Gran.	69	48	5	28	15	4	13.453	4	n.v.
11	Granul.	93	10	32	36	13	7	6.820	4	n.v.
26	keine	27	0	46	38	3	14	3.784	3	oligokl.
40	keine	47	0	50	36	4	10	2.400	3	n.v.

Tabelle A.5. Liquorbefunde der übrigen Patienten mit bakterieller Meningitis

Pat. *	TPZ	ZZ	ZB	Protein (mg/l)	Reiber-Bereich	E-phor.
2(1)	Gran.	645	Gran.	1.659	4	n.v.
2(8)	Gran. Granula	87	Gra,Ly	5.380	3	n.v.
2(16)	Granula	22	Ly	3.726	3	n.v.
3	Granula	42	Ly.	4.210	3	n.v.
4	Gran.	55	Gran.	1.510	4	biklon.
5	Gran.	495	Gra,Ly	3.010	3	oliklon.
6	Gran.	88	Gran.	2.783	4	n.v.
7	Gran.	124	Gra,Ly	2.378	4	oliklon.
8	Gran.	140	Gra,Ly	4.436	4	n.v.

Tabelle A.6. Liquorbefunde der Patienten mit Myelitis transversa

Pat.	Sero- logie	TPZ	ZZ	ZB	Protein (mg/l)	Reiber- Bereich
1	n.v.	Eos.	11	Ly	623	2
2	n.v.	Eos.	7	Ly,Lyoi	548	2
3	Herpes	keine	3	Mo,Ly	436	2

Tabelle A.7. Liquorbefunde der Patienten mit Neuroborreliose

Pat. *	Bor- relien- AK im Liquor	TPZ	ZZ	ZB	Protein (mg/l)	Reiber- Bereich	E-phor.	IgG (%)	IgM (%)
1	+	Ly.	2	Ly,Mo	983	2	n.v.	n.v.	n.v.
2	+	keine	2	Ly,Mo	254	1	n.v.	n.v.	n.v.
3	+	keine	1	Ly,Mo	258	1	n.v.	n.v.	n.v.
4(0)	+	Granul.	72	Ly	997	4	n.v.	n.v.	n.v.
4(14)	+	keine	21	Ly	766	3	oligokl.	1,2	22
4(45)	+	Ly.	4	Ly	603	2	oligokl.	n.v.	47,2
5(0)	+	Granul.	66	Ly	2.675	4	n.v.	36,8	66
5(50)	+	keine	3	Ly	860	3	oligokl.	37,6	59
6(0)	+	Granul.	92	Ly	1.009	5	oligokl.	21,8	53,3
6(16)	+	Granul.	14	Ly	926	3	n.v.	n.v.	67
6(67)	+	keine	3	Ly	592	2	n.v.	n.v.	20,2
7	+	Granul.	97	Ly	1.809	4	oligokl.	55,7	n.v.
8 (?)	+	Ly.	3	Mo,Ly	783	2	n.v.	n.v.	n.v.
9	+	Granul.	1	Ly,Mo	1.850	3	n.v.	n.v.	n.v.

Tabelle A.8. Liquorbefunde der Patienten mit Neuro-Lues

Pat. *	TPHA-FTA-Abs Blut/Liquor	TPZ	ZZ	ZB	Protein (mg/l)	Reiber-Bereich	E-phor.	IgG (%)	IgM (%)
1(0)	+++/ ++/+	Granula	5	Gran. Mono, Makro	815	4	oligokl. oligokl.	72,53	67,2
1(180)	+++/ ++/+	keine	3	Mo, Ly	766	3	oligokl.	63	
1(420)	+++/ ++/+	keine.	3	Ly	603	2	n.v.	n.v.	
2(0)	+++/ ++/+	Granula	95	Ly, Mo	815	2	oligokl.	72,53	67,2
2(170)	+++/ ++/+	keine	3	Ly	860	3	oligokl.		
3	+++/ ++/+	keine	1	Mo		5			

Tabelle A.9. Liquorbefunde der Patienten mit einem pos. Toxoplasmosetiter

Pat.	TPZ	ZZ	ZB	Protein (mg/l)	Reiber-Bereich	E-phor.	IgG(%)	IgM(%)
1	Mo	7	Ly, Pha	548	2	n.v.	n.v.	n.v.
2	keine	2	Ly.	468	2	oligokl.	n.v.	31,6
3	intrazelluläre Granul.	5	Ly, Eos, Neutro, Phago	624	2	n.v.	n.v.	n.v.
4	Mo.	2	Mo-ly.	333	1	n.v.	n.v.	n.v.

Tabelle A.10. Übersicht der Patienten mit Neoplasmen

Pat. *	Diagnose	TPZ
1	ALL	keine
2	Hirn-Metastase (Bronchial-Ca)	Granulozyten
3	Leukämie	keine
4	Lymphom	keine
5	M. Hodgkin	Granulozyten, Monozyten
6	Hirn-Metastase (Seminom)	Granulozyten, Lymphozyten
7(0)	NHL mit Leukenzephalopathie	Granulozyten
7 (20))		keine
8	NHL	eine unklare Zelle
9	Glioblastom	Granulozyten, Lymphozyten

Tabelle A.11. Liquorbefunde der Patienten mit Neoplasmen

Pat.*	ZZ	ZB	Protein (mg/l)	Reiber- Bereich	IgG in %
1	3	Ly.	286	1	n.v.
2	6	Mono,Lyoi, Phagen	888	3	n.v.
3	2	Ly.,Phagen	370	1	n.v.
4	8	Ly.,Phagen Tu-Zellen	396	1	n.v.
5	18	N.,Mo.,Ly	862	3	n.v.
6	4	Ly,Eo,Lyoi	794	2	n.v.
7 (0)	8	Ly,Mo,Eo	823	3	n.v.
7(20)	2	Ly.	969	3	61,0 %
8	438	Ly,Mitosen, abn.Kernf.	728	2	n.v.
9	3	Ly,Mo,Gra	389	1	n.v.

DANK

Herrn Prof. Dr. R. M. Schmidt und Frau Dr. rer. nat. habil. Gerlinde Kuppe danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas.

Herrn Prof. Dr. St. Zierz danke ich für die Weiterführung der Arbeit nach der Emeritierung von Prof. Dr. R. M. Schmidt und dem Ausscheiden von Frau Dr. rer. nat. habil. Gerlinde Kuppe aus dem Kliniksdienst.

Frau Dr. rer. nat. Ruth Ludewig und den Mitarbeitern des Liquorlabors der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg möchte ich besonders für die großzügige Unterstützung und jederzeit gewährte, zuverlässige Hilfe bei der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit danken, sowie für die wertvolle Diskussion und vielen Anregungen.

Bei Herrn Dr. Schmitt, Mitarbeiter der Klinik für Neurologie am Klinikum Chemnitz, möchte ich mich für die Unterstützung bei der Lösung der statistischen Aufarbeitung bedanken.

EIDESTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Quellen direkt oder indirekt übernommener Daten und Konzepte sind als Quellen gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsdiensten in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

LEBENS LAUF

Mein Name ist Jürgen Schulze. Ich wurde am 2. Oktober 1963 in Annaberg- Buchholz als einziges Kind der Eheleute Richard Schulze und FrauChrista Schulze, geb. Iser geboren. Mein Vater verstarb am 30. Mai 1970. Meine Mutter ist Rentnerin.

Ich wohne in der Turnergasse 15 in 09456 Annaberg-Buchholz.
Seit 11.5.1989 mit Grit Schulze, gelernte Krankenschwester, verheiratet.
Ich habe vier Kinder (Adline, siebzehn Jahre; Florian, acht Jahre, Linda, sieben Jahre, Elisa zwei Jahre).

Von 1970 bis 1980 besuchte ich die "Adam-Ries-Schule" in Annaberg und von 1980 bis 1982 "Johannes-R.-Becher-Schule" (Gymnasium) in Annaberg.
Die Schule schloss ich 1982 mit dem Abitur, Prädikat gut (Note: 1,54) ab.

Meinen Wehrdienst leistete ich von November 1982 bis April 1984 ab.

Im September und Oktober 1982 und von Mai 1984 bis August 1986 arbeitete ich als Hilfspfleger im KKH Annaberg.
Von 1985-1986 qualifizierte ich mich zum Facharbeiter für Krankenpflege (jetzt Krankenpflegehelfer). Diese Weiterbildung schloss ich mit Note: "sehr gut" ab und arbeitete bis August 1987 im Beruf.

Mein Studium der Humanmedizin absolvierte ich von 1993 bis 1997 an der MLU Halle/Wittenberg. Dieses schloss ich mit dem Prädikat:" befriedigend"ab.

Von Oktober 1993 bis März 1995 war ich als AiP in der Klinik für Neurologie an der MLU Halle/Wittenberg tätig.

Am 01.04.1995 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Von Mai 1995 bis Oktober 1997 arbeitete ich als Assistenzarzt in der Klinik für Neurologie und Psychiatrie am Klinikum Aue.

Von November 1997 bis Dezember 1999 war ich Assistenzarzt in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie am Erzgebirgsklinikum Annaberg.

Am 26.09.2000 erhielt ich nach bestandener Prüfung die Anerkennung als Facharzt für Psychiatrie und Psychotherapie

Von Oktober 2000 bis September 2004 arbeite ich als Assistenzarzt in der Klinik für Neurologie am Klinikum Chemnitz

Am 12.10.2004 erhielt ich nach bestandener Prüfung die Anerkennung als Facharzt für Neurologie

Von Dezember 2004 bis November 2006 war ich an der Rehabilitationsklinik "Miriquidi" Thermalbad Wiesenbad als Facharzt tätig.

Seit Dezember 2006 bin ich als Kassenärztlicher Bereitschaftsdienst und Notarzt, und ab dem 01.04.2007 als Kassenarzt für Neurologie, Psychiatrie und Psychotherapie in eigener Praxis selbständig.

Annaberg, den 23.05.2007

Jürgen Schulze