Tierärztliche Hochschule Hannover
Klinik für Kleintiere

Durchflußzytometrische Untersuchungen von Leukozyten in Blut und Liquor cerebrospinalis bei Hunden mit steril-eitriger Meningitis-Arteriitis

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

Vorgelegt von
Malte Schwartz
(Neumünster)

Hannover 2007

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. Andrea Tipold

1. Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. Andrea Tipold
2. Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. Marion Hewicker-Trautwein

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2007

Gefördert durch den Schweizerischen Klub für Berner Sennenhunde und das Niedersächsische Ministerium für Wissenschaft und Kultur.

Meiner Familie

&

minun suomalaiselle

perheelleni

1 **EINLEITUNG** **1**

2 LITERATURÜBERSICHT **3**

2.1 Steril-eitrige Meningitis-Arteriitis **3**
2.1.1 Epidemiologie 3
2.1.2 Klinische Symptome und Laborbefunde 4
2.1.3 Pathologische Befunde 6
2.1.4 Diagnose 7
2.1.5 Therapie und Prognose 8
2.1.6 Ätiologie und Pathogenese 10

2.2 Liquor cerebrospinalis **10**
2.2.1 Anatomie und Physiologie 11
2.2.2 Gewinnung und Untersuchung 12
2.2.3 Physiologische und pathologische Befunde 13

2.3 Durchflußzytometrie **16**

2.4 Leukozytäre Oberflächenantigene **18**

3 MATERIAL UND METHODE **22**

3.1 Material **22**
3.1.1 Geräte 22
3.1.2 Instrumente 23
3.1.3 Reagenzien und Chemikalien 25
3.1.4 Lösungen und zu lösende Substanzen 25
3.1.5 Antikörper 26
3.1.5.1 Blockade unspezifischer Antikörperbindungen 26
3.1.5.2 Monoklonale nicht markierte Primärantikörper 27
3.1.5.3 Monoklonale markierte Primärantikörper 28
3.1.5.4 Monoklonale markierte Sekundärantikörper 29
3.1.6 Computersoftware 29
3.1.7 Hunde 29

3.2 Methode **34**
3.2.1 Probengewinnung 34
3.2.1.1 Entnahme und Untersuchung des Blutes 34
3.2.1.2 Gewinnung und Untersuchung der Gehirnrückenmarksflüssigkeit 35
3.2.2 Bestimmung des Gehaltes an Immunglobulin A (IgA) 36
3.2.3 Vorversuche 36
3.2.3.1 Wahl der Lösung zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen 37

3.2.3.2 Vergleich der Ergebnisse nach direkter und indirekter Immunphänotypisierung 38
3.2.3.3 Untersuchung zur Zulässigkeit einer Dreifachfärbung 38
3.2.3.4 Durchflußzytometrische Bestimmung des Anteils lebender Zellen 39
3.2.3.5 Evaluierung der Reinheit der Regionen 39
3.2.3.6 Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der Regionen von Lymphozyten und polymorphkernigen Zellen 40
3.2.3.7 Bestimmung der Konstanz der Messungen und Auswertungen 40
3.2.4 Hauptversuche 41
3.2.4.1 Immunphänotypisierung der Leukozyten des peripheren Blutes 41
3.2.4.2 Auswertung der Messungen der Zellen des peripheren Blutes 45
3.2.4.3 Immunphänotypisierung der Leukozyten der Gehirnrückenmarksflüssigkeit 46
3.2.4.4 Auswertung der Messungen der Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit 48
3.2.5 Statistische Auswertung 49

4 ERGEBNISSE 51

4.1 Vorversuche 51
4.1.1 Wahl der Lösung zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen 51
4.1.2 Vergleich der Ergebnisse nach direkter und indirekter Immunphänotypisierung 52
4.1.3 Untersuchung zur Zulässigkeit einer Dreifachfärbung 53
4.1.4 Durchflußzytometrische Bestimmung des Anteils lebender Zellen 54
4.1.5 Evaluierung der Reinheit der Regionen 54
4.1.6 Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der Regionen von Lymphozyten und polymorphkernigen Zellen 55
4.1.7 Bestimmung der Konstanz der Messungen und Auswertungen 57

4.2 Hauptversuche 57
4.2.1 Immunphänotypisierung der Leukozyten des peripheren Blutes 57
4.2.1.1 Immunphänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes 58
4.2.1.1.1 T-Zellmarker 58
4.2.1.1.1.1 CD3 58
4.2.1.1.1.2 T-Zell-Rezeptor α/β 60
4.2.1.1.1.3 T-Zell-Rezeptor γ/δ 62
4.2.1.1.1.4 CD4 63
4.2.1.1.1.5 CD8α 65
4.2.1.1.2 B-Zellmarker 67
4.2.1.1.2.1 CD21 67
4.2.1.1.3 Lymphozytenaktivierungsmarker 69
4.2.1.1.3.1 CD45RA 69
4.2.1.1.4 Verhältnisse der Lymphozytensubpopulationen 72
4.2.1.1.4.1 Verhältnis von CD3- zu CD21-positiven Lymphozyten 72
4.2.1.1.4.2 Verhältnis von CD4- zu CD8α-positiven Lymphozyten 73
4.2.1.1.4.3 Verhältnis von T-Zell-Rezeptor α/β- zu T-Zell-Rezeptor γ/δ- positiven Lymphozyten 75
4.2.1.1.4.4 Verhältnisse der Lymphozytensubpopulationen im Verlauf 75

4.2.1.2 Immunphänotypisierung der polymorphkernigen Zellen des peripheren Blutes 78
4.2.1.2.1 Integrinexpression 78
4.2.1.2.1.1 CD11a 78
4.2.1.2.1.2 CD11b 79
4.2.1.2.1.3 CD11c 80
4.2.1.2.1.4 Integrinexpression der polymorphkernigen Zellen im Verlauf 82
4.2.2 Immunphänotypisierung der Leukozyten der Gehirnrückenmarksflüssigkeit 84
4.2.2.1 Immunphänotypisierung der Lymphozyten der Gehirnrückenmarksflüssigkeit 84
4.2.2.1.1 T-Zellmarker 84
4.2.2.1.1.1 CD3 84
4.2.2.1.2 B-Zellmarker 86
4.2.2.1.2.1 CD21 86
4.2.2.1.3 Verhältnisse der Lymphozytensubpopulationen 87
4.2.2.1.3.1 Verhältnis von CD3- zu CD21-positiven Lymphozyten 87
4.2.2.1.3.2 Verhältnis von CD4- zu CD8α-positiven Lymphozyten 90
4.2.2.1.3.3 Verhältnisse der Lymphozytensubpopulationen im Verlauf 92
4.2.2.2 Immunphänotypisierung der polymorphkernigen Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit 93
4.2.2.2.1 Integrinexpression 93
4.2.2.2.1.1 CD11a, CD11b und CD11c 93
4.2.3 Einflüsse einer Glukokortikosteroidvorbehandlung und Korrelationen von Parametern 95

5 DISKUSSION 98

5.1 Methodik 98

5.2 Ergebnisse 104

6 ZUSAMMENFASSUNG 115

7 SUMMARY 117

8 LITERATURVERZEICHNIS 119

9 ANHANG 134

10 DANKSAGUNG 172

Abkürzungsverzeichnis

#	Nummer
AQ	Albuminquotient
Best.-Nr.	Bestellnummer
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CD	*Cluster of Differentiation*
CSF	*cerebrospinal fluid* (Gehirnrückenmarksflüssigkeit)
CSFCs	*CSF cells* (Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit)
CT	Computertomograph
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSH	Deutscher Schäferhund
EDTA	*ethylene diamine tetraacetic acid* (Ethylendiamintetraessigsäure)
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
FITC	Fluorescein Isothiozyanat
g	Erdanziehungskraft
ggf.	gegebenenfalls
HCDM	*Human Cell Differentiation Molecules* (humane Zelldifferenzierungsmoleküle)
hgr.	hochgradig
hIg	humanes Immunglobulin
HIV/AIDS	*human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome*
HLDA	*Human Leucocyte Differentiation Antigens* (humane Leukozytendifferenzierungsantigene)
Ig	Immunglobulin

IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
L7	7. Lendenwirbel
LPS	Lipopolysaccharid
m	männlich
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
max.	maximal
mg	Milligramm
MHC	*major histocompatibility complex* (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minuten
mk	männlich kastriert
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MNC	*mononuclear cell* (mononukleäre Zelle)
MNCs	*mononuclear cells* (mononukleäre Zellen)
MRT	Magnetresonanztomograph (Kernspintomograph)
µl	Mikroliter
NIAID DAIDS	*National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS*
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NSAID	*nonsteroidal antiinflammatory drug* (nichtsteroidales Anti-phlogistikum)
o.	oder
PB	*peripheral blood* (peripheres Blut)
PBMNCs	*peripheral blood mononuclear cells* (MNCs des peripheren Blutes)
PBPMNCs	*peripheral blood polymorphonuclear cells* (PMNCs des peripheren Blutes)

PBS	*phosphate buffered saline* (phosphatgepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin (= R-Phycoerythrin)
PFA	Paraformaldehyd
PMNC	*polymorphonuclear cell* (polymorphkernige Zelle)
PMNCs	*polymorphonuclear cells* (polymorphkernige Zellen)
RBC	*red blood cells* (Erythrozyten)
RPE	R-Phycoerythrin
s	Sekunde
S1	1. Kreuzwirbel
SD	*Standard Deviation* (Standardabweichung)
SRMA	*Steroid-responsive Meningitis-Arteritis* (steril-eitrige Meningitis-Arteriitis)
SRK	Spearmans Rang-Korrelationskoeffizient
s.o.	siehe oben
TCR	*T cell receptor* (T-Zell-Rezeptor)
u	atomare Masseneinheit
u.a.	unter anderem
u./o.	und/oder
V.a.	Verdacht auf
w	weiblich
wk	weiblich kastriert
ZNS	zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

Die steril-eitrige Meningitis-Arteriitis (SRMA) ist eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems, die bevorzugt bei jungen erwachsenen Hunden auftritt. Sie gilt als natürlich auftretendes Tiermodell verschiedener humanmedizinischer Vaskulitiden (BURNS et al. 1991, HOGENESCH et al. 1995).
Es werden zwei Formen unterschieden. In der klassischen akuten Form präsentieren sich die Hunde mit Fieber und zervikaler Dolenz, ohne dabei neurologische Ausfallserscheinungen aufzuweisen. Vorberichtlich zeigt das Auftreten der Symptome oft einen rezidivierenden Verlauf. In der protrahierten chronischen Form treten mitunter neurologische Defizite hinzu. Der Diagnosestellung dienen, neben den Befunden der allgemeinen klinischen und neurologischen Untersuchung, die des Blutes und der Gehirnrückenmarksflüssigkeit. Das Blutbild ist durch eine neutrophile Leukozytose charakterisiert, im Liquor cerebrospinalis tritt in der klassischen Form eine neutrophile Pleozytose auf. Bei der protrahierten Form ergibt die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis eine mononukleäre bis gemischtzellige Pleozytose. Als zusätzliches diagnostisches Hilfsmittel dient die gleichzeitige Erhöhung des Immunglobulin-A-Gehaltes in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit und im Serum (TIPOLD und JAGGY 1994, TIPOLD 2000). Die Behandlung erfolgt durch eine langfristige Gabe von Glukokortikoiden.
Zur Ätiologie der SRMA ist bisher wenig bekannt. Es wird angenommen, daß es zu einer Fehlregulation des Immunsystems kommt. Wodurch diese ausgelöst wird, ist unklar. Sämtliche Versuche, einen Erreger nachzuweisen, mißlangen (TIPOLD 2000).

Im Rahmen einer Dysregulation des Immunsystems kann es zu einer Verschiebung von Leukozytenpopulationen kommen. Die Fragestellung dieser Arbeit war daher zu klären, ob spezifische Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut bzw. im Liquor cerebrospinalis (CSF) überwiegen, die eine erhöhte IgA-Produktion erklären lassen. Die Lymphozyten sollten durchflußzytometrisch untersucht werden. Um festzustellen, ob Lymphozyten selektiv in die Gehirnrückenmarksflüssigkeit einwandern, wurden Leukozyten in Blut und CSF miteinander

verglichen bzw. die Befunde von Hunden mit SRMA denen von Hunden mit anderen Erkrankungen des zentralen Nervensystems gegenübergestellt.
In der akuten klinischen Phase der SRMA wird eine starke neutrophile Pleozytose im CSF beobachtet. Die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten wird unter anderem durch die Aufregulation von Integrinen ermöglicht. Daher sollte in einer vergleichenden Studie festgestellt werden, ob ein Integrin spezifisch dafür verantwortlich ist, daß diese Zellpopulation gezielt in die zervikalen Meningen einwandert.
Diese Untersuchungen sollen dazu dienen, die Pathogenese der SRMA besser zu verstehen, um eventuell neue Therapieansätze zu finden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Steril-eitrige Meningitis-Arteriitis

Die steril-eitrige Meningitis-Arteriitis ist eine in Nordamerika, Japan und Europa beschriebene Erkrankung des Hundes. Die erste Publikation stammt aus dem Jahr 1968 (JOSHUA und ISHMAEL 1968). Bis zur Etablierung der deutschen Bezeichnung steril-eitrige Meningitis-Arteriitis beziehungsweise der englischen Bezeichnung *Steroid-responsive Meningitis-Arteritis* (SRMA) erhielt dieses Syndrom mit *Beagle Pain Syndrome* (HAYES et al. 1989), *Canine Pain Syndrome* (BURNS et al. 1991), *Necrotizing Vasculitis* (BROOKS 1984), *Polyarteritis* (HARCOURT 1978), *Canine Juvenile Polyarteritis Syndrome* (FELSBURG et al. 1992), *Aseptic Suppurative Meningitis* (PRESTHUS 1991) sowie *Corticosteroid-responsive Meningomyelitis* (IRVING und CHRISMAN 1990) zahlreiche Namen, die jeweils verschiedene Charakteristika des Krankheitsbildes reflektieren.
Die SRMA eignet sich als natürlich vorkommendes Tiermodell für das Kawasaki-Syndrom (BURNS et al. 1991, FELSBURG et al. 1992) und weitere immunmediierte Vaskulitiden des Menschen (HOGENESCH et al. 1995, SNYDER et al. 1995).

2.1.1 Epidemiologie

Die steril-eitrige Meningitis-Arteriitis ist eine in der Kleintierpraxis häufig anzutreffende Erkrankung. In einer retrospektiven Untersuchung litten 15 % der Hunde mit Entzündungen des zentralen Nervensystems (ZNS) an SRMA (TIPOLD 1995). MERIC (1988) identifizierte die steril-eitrige Meningitis-Arteriitis als die häufigste Form der Meningitis. Eine Untersuchung von Hunden, die zur Klärung der Ursache von Fieber überwiesen wurden, ergab, daß 11 % dieser Tiere an der SRMA litten (BATTERSBY et al. 2006).
Es besteht der Eindruck, daß es bei der Prävalenz der Erkrankung in den Jahren vor 1991 zu einer Zunahme kam und daß das Auftreten epidemischen Charakter hat (BURNS et al. 1991). Bei einer Untersuchung, die die Inzidenz innerhalb einer Beaglekolonie auswertete, konnte

ein zweimaliger Anstieg in einem Abstand von fünf Jahren gefunden werden (FELSBURG et al. 1992). Zudem wird eine Häufung in den Frühjahrsmonaten beschrieben (TIPOLD 2000).
Bei dem weitaus größten Teil der betroffenen Hunde handelt es sich um adoleszente und junge adulte Tiere, wobei das jüngste erwähnte Tier bei Auftreten der ersten Krankheitserscheinungen 2 Monate (RUSSO et al. 1983) und das älteste 9 Jahre alt waren (CIZINAUSKAS et al. 2000).
Es scheint, als könnten grundsätzlich Hunde aller Rassen sowie Mischlingshunde erkranken (MERIC et al. 1985, TIPOLD 2000). Die Rassen Boxer (TIPOLD und JAGGY 1994, BEHR und CAUZINILLE 2006) und Berner Sennenhund (PRESTHUS 1991, TIPOLD und JAGGY 1994, CIZINAUSKAS et al. 2000) sind in der Gruppe der Patienten überrepräsentiert. Einzelne Autoren diskutieren zudem eine Rasseprädisposition für Welsh Springer Spaniel (CASWELL und NYKAMP 2003) und Deutsch Kurzhaar (MERIC 1988). Auch wird eine Häufung von Fällen der SRMA in der Rasse der Nova Scotia Duck Tolling Retriever angenommen (persönliche Mitteilung TIPOLD 2006). Wie der ehemals gebräuchliche Name *Beagle Pain Syndrome* zur Vermutung Anlaß gibt, sind unter den betroffenen Hunden zahlreiche Beagle (JOSHUA und ISHMAEL 1968), viele von ihnen aus Zucht- bzw. Versuchstierkolonien (HARCOURT 1978, BROOKS 1984, HAYES et al. 1989, FELSBURG et al. 1992, SCOTT-MONCRIEFF et al. 1992). In keiner der zitierten Untersuchungen konnte eine Geschlechtsprädisposition festgestellt werden.

2.1.2 Klinische Symptome und Laborbefunde

Die steril-eitrige Meningitis-Arteriitis ist durch einen periodischen Verlauf mit einer Tendenz zur fortschreitenden Verschlechterung gekennzeichnet (BROOKS 1984). Die Dauer der symptomatischen Phasen wird mit 2 - 17 Tagen und die der asymptomatischen Intervalle mit 2 - 12 Wochen angegeben (HOGENESCH et al. 1995).
Zu unterscheiden sind eine klassische akute und eine chronische protrahierte Form (TIPOLD und JAGGY 1994), wobei sich letztere nach mehreren Rückfällen ohne adäquate Therapie einstellen kann (TIPOLD 2000).

Die klassische Form ist in den klinisch erkennbaren Phasen durch eine erhöhte innere Körpertemperatur mit Inappetenz und Apathie sowie durch eine steife Kopfhalshaltung, einen steifen Gang und eine, häufig in der Halsregion oder bei Öffnen des Fangs besonders ausgeprägte, Hyperästhesie gekennzeichnet. Mit Ausnahme eines gelegentlich zu beobachtenden verminderten Drohreflexes und einer leicht verzögerten Korrekturreaktion der Gliedmaßen sind keine neurologischen Ausfälle erkennbar. Bei der protrahierten Form lassen sich zusätzliche neurologische Defizite im Sinne einer Rückenmarks- oder einer multifokalen Neurolokalisation finden (TIPOLD und JAGGY 1994). Sie äußern sich in der Mehrzahl der Fälle als Gangstörung (TIPOLD und JAGGY 1994), die selten bis hin zu einer Para- oder Tetraplegie fortschreiten können (JOSHUA und ISHMAEL 1968, HOFF und VANDEVELDE 1981). Sporadisch wurden zentralvestibuläre (TIPOLD und JAGGY 1994, BEHR und CAUZINILLE 2006) und ophthalmologische Symptome (RUSSO et al. 1983, MERIC et al. 1985) beschrieben. In einigen Fällen konnte ein Myoklonus (TIPOLD und JAGGY 1994) bzw. ein generalisierter Tremor (GANDINI et al. 2003) gefunden werden.
Die Blutuntersuchung ergibt bei der überwiegenden Zahl der symptomatischen Tiere eine Leukozytose, verursacht durch eine Neutrophilie (SCOTT-MONCRIEFF et al. 1992, TIPOLD und JAGGY 1994). Bei Einigen, insbesondere jedoch bei Hunden, die wegen eines Rückfalls vorgestellt wurden (CIZINAUSKAS et al. 2000), konnte eine Lymphopenie diagnostiziert werden (BURNS et al. 1991). Andere Autoren hingegen fanden eine Erhöhung der Anzahl der Lymphozyten im peripheren Blut (MERIC et al. 1986). Weitere hämatologische Veränderungen sind in Form einer Monozytose (SCOTT-MONCRIEFF et al. 1992, CIZINAUSKAS et al. 2000), einer milden normozytären normochromen Anämie (HARCOURT 1978, BURNS et al. 1991, SCOTT-MONCRIEFF et al. 1992, TIPOLD und JAGGY 1994) sowie einer Thrombozytose (HAYES et al. 1989) möglich. Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit ist regelmäßig erhöht (HAYES et al. 1989). Verschiedene Autoren fanden bei einem Teil der Tiere einen Abfall des Albumins (HAYES et al. 1989, BURNS et al. 1991, SCOTT-MONCRIEFF et al. 1992) und einen Anstieg der Globulin- (BROOKS 1984, CIZINAUSKAS et al. 2000) bzw. der α_2-Globulinfraktion (HAYES et al. 1989, SCOTT-MONCRIEFF et al. 1992, TIPOLD und JAGGY 1994, BEHR und CAUZINILLE 2006). Die Untersuchung weiterer blutchemischer Parameter ergibt keine

einheitlichen Abweichungen von den Normwerten (BROOKS 1984, TIPOLD und JAGGY 1994, CIZINAUSKAS et al. 2000).
Die Befunde der Untersuchung der Gehirnrückenmarksflüssigkeit sind maßgeblich davon abhängig, ob die akute oder die chronische Form der steril-eitrigen Meningitis-Arteriitis vorliegt. Die symptomatischen Phasen der akuten Form gehen in der Regel mit einer mittel- bis hochgradigen Pleozytose mit Dominanz nicht-degenerierter polymorphkerniger Zellen einher (HARCOURT 1978, TIPOLD und JAGGY 1994, BEHR und CAUZINILLE 2006). Der Proteingehalt dieser Liquorproben ist meist mäßig bis deutlich erhöht (TIPOLD und JAGGY 1994, BEHR und CAUZINILLE 2006). In einigen Fällen erscheint die Gehirnrückenmarksflüssigkeit xanthochrom (MERIC et al. 1986) oder auch blutig (IRVING und CHRISMAN 1990, BEHR und CAUZINILLE 2006). Im Liquor von Hunden in der chronischen Phase der Erkrankung (TIPOLD und JAGGY 1994) sowie in dem von Hunden, die mit Kortikosteroiden vorbehandelt wurden (PONCELET und BALLIGAND 1993, BEHR und CAUZINILLE 2006), findet sich mehrheitlich eine milde bis moderate mononukleäre bis gemischtzellige Pleozytose. Der Proteingehalt ist normal bis leicht erhöht (TIPOLD und JAGGY 1994).

2.1.3 Pathologische Befunde

Die Sektion von an der steril-eitrigen Meningitis-Arteriitis erkrankten Hunden liefert nur in einem Teil der Fälle makroskopisch sichtbare Befunde. Diese zeigen sich als Hämorrhagien unterschiedlichen Ausmaßes, teilweise als petechiale Blutungen entlang betroffener Gefäße (SNYDER et al. 1995), mitunter auch bis hin zu massiven Blutungen vor allem im Wirbelkanal (JOSHUA und ISHMAEL 1968, VANDEVELDE und FANKHAUSER 1972). Zudem finden sich bei einigen Tieren Amyloidablagerungen insbesondere in der Milz, aber auch in Leber oder Niere (SNYDER et al. 1995), vergrößerte Lymphknoten (SCOTT-MONCRIEFF et al. 1992) oder aufgrund einer, durch eine meningeale Fibrose bedingten, Abflußstörung dilatierte Hirnventrikel (TIPOLD und JAGGY 1994, GERHARDT et al. 1998).

Die histopathologisch erkennbaren multifokalen Läsionen zeigen sich hauptsächlich extraparenchymal (BURNS et al. 1991) als Peri- und Panarteriitis in kleinen bis mittelgroßen Schlagadern (BROOKS 1984). Die an der Entzündung beteiligten Zelltypen sind Makrophagen, Plasmazellen und Lymphozyten sowie Neutrophile in unterschiedlich großer Zahl (BROOKS 1984, TIPOLD et al. 1995). Diese Veränderungen manifestieren sich hauptsächlich in den spinalen Meningen, in denen zudem eine Meningitis vorliegt, (TIPOLD und JAGGY 1994) und mit variierender Häufigkeit in extramuralen Koronararterien, im Mediastinum, in Schilddrüse und Thymus sowie in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes (HAYES et al. 1989, SCOTT-MONCRIEFF et al. 1992). Die Läsionen sind durch eine progressive fibrinoide Nekrose der Gefäßwand (MERIC et al. 1986) gekennzeichnet. In der chronischen Phase kommt es infolge einer fibrösen Verdickung (TIPOLD et al. 1995) und Kalzifizierung (TIPOLD und JAGGY 1994) der Gefäßwände gelegentlich zur Stenose. Die Verdickung wirkt sich auch auf die umliegenden Gewebe aus. So wird eine dadurch ausgelöste Kompression neuralen Gewebes von TIPOLD und JAGGY (1994) als mögliche Ursache für das Hinzukommen von neurologischen Defiziten in der protrahierten Form der Erkrankung diskutiert. Von einer Verlegung der Gefäßlumina durch Thromben wird ebenfalls berichtet (SCOTT-MONCRIEFF et al. 1992). Akute und chronische Veränderungen finden sich häufig zeitgleich in einem Tier (SNYDER et al. 1995).

Ähnliche sich meist auf die extramuralen Koronargefäße beschränkende Läsionen wurden mehrfach bei asymptomatischen Beaglen aus Toxikologiestudien sowie bei den zugehörigen Kontrollhunden beschrieben (STEJSKAL et al. 1982, HARTMAN 1987, SPENCER und GREAVES 1987, HARTMAN 1989, RUBEN et al. 1989, KEMI et al. 1990).

2.1.4 Diagnose

Die Diagnose der akuten Form der SRMA bereitet dem Kliniker in der Regel selten Probleme. Die der protrahierten Form hingegen gelang in einer Studie lediglich bei sieben von elf Tieren intra vitam (TIPOLD und JAGGY 1994).

Die Diagnose basiert auf den klinischen Befunden, den Ergebnissen der Blut- und Liquoruntersuchung sowie auf dem Ausschluß von differentialdiagnostisch in Betracht zu ziehenden Erkrankungen. Zu diesem Zweck bedarf es unter Umständen weiterer Untersuchungstechniken, die insbesondere bildgebende und elektrodiagnostische Verfahren beinhalten (TIPOLD 2000). Unter der Behandlung unterstützt das nicht nur kurzfristige Ansprechen auf Kortikosteroide die vorherige Diagnose der steril-eitrigen Meningitis-Arteriitis.
Als ein besonders sensibles Diagnostikum erwies sich in einigen Studien die Bestimmung der IgA-Gehalte im peripheren Blut und Liquor, die bei den erkrankten Hunden jeweils oberhalb der Referenzwerte lagen (TIPOLD und JAGGY 1994, CIZINAUSKAS et al. 2000). Gleichartige Veränderungen konnten bisher nur im Zusammenhang mit Tumoren des hämatopoetischen Systems gefunden werden (TIPOLD 2000). Eine andere retrospektive Studie konnte diesen Doppelbefund nur bei einem Viertel der Patienten erheben (BEHR und CAUZINILLE 2006).

2.1.5 Therapie und Prognose

Die bisher einzige Therapie mit langfristigen Erfolgen beruht auf einer Unterdrückung der Immunreaktion. Andersartige Therapieansätze schlugen in der Regel fehl, wobei zu beachten ist, daß aufgrund des periodischen Krankheitsverlaufs die Besserung des Gesundheitszustands fälschlicherweise einer zuvor eingeleiteten Medikamentengabe zugeschrieben werden kann (MERIC 1988).
Das Verabreichungsschema sowie die Dosierung der Pharmaka werden weiterhin kontrovers diskutiert (CIZINAUSKAS et al. 2000). Das von TIPOLD (2000) vorgeschlagene Regime hat in der Praxis weite Verwendung gefunden und sich bei individueller Anpassung vielfach bewährt (CIZINAUSKAS et al. 2000, GANDINI et al. 2003).
Sind die klinischen Symptome mild, und ergibt die Leukozytenzählung in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit eine Zellzahl von weniger als 200 pro Mikroliter, so kann unter strenger Beobachtung eine Therapie mit einem nichtsteroidalen Antiphlogistikum (NSAID) eingeleitet werden. Bei Verschlechterung der Symptomatik muß auf das im Folgenden

beschriebene Behandlungsschema mit steroidalen Entzündungshemmern und unter Umständen weiteren Immunsuppressiva umgestellt werden.

Zunächst wird für zwei Tage Prednisolon in einer Dosierung von 4 mg/kg Körpermasse (KM) alle 24 Stunden gegeben. Es schließen sich ein bis zwei Wochen mit der Gabe von 2 mg/kg KM einmal täglich an. In der Folge wird die Dosis abermals auf dann 1 mg/kg KM einmal täglich halbiert. Die Tiere werden im Verlauf der Therapie alle vier bis sechs Wochen untersucht. Diese Untersuchungen beinhalten jeweils eine neurologische Untersuchung, das Erstellen eines Blutbilds sowie die Untersuchung des Liquors. Sollten sowohl die neurologischen als auch die Liquorbefunde keine Abweichungen zeigen, so kann die Dosierung auf die Hälfte der zuvor verabreichten bis auf eine Menge von 0,5 mg/kg KM alle 48 bis 72 Stunden gesenkt werden. Wird eine Pleozytose festgestellt, sollte die Dosis beibehalten werden. Das Medikament kann nach etwa einem halben Jahr abgesetzt werden, wenn die letzten beiden Kontrolluntersuchungen keine Abweichungen der untersuchten Parameter ergaben. Bei Nichtansprechen kann der Versuch einer Kombinationstherapie mit Prednisolon und Azathioprin (in einer Dosierung von 1,5 mg/kg KM alle 48 Stunden) unternommen werden. TIPOLD (2000) schlägt vor, die Medikamente alternierend jeden zweiten Tag zu verabreichen. Die zusätzliche Gabe von Protektiva der gastrointestinalen Schleimhäute wird empfohlen (TIPOLD 2000).

Die unerwünschten Nebenwirkungen der Therapie erwiesen sich in der Regel als nicht gravierend und waren nach Beendigung der Behandlung reversibel (TIPOLD und JAGGY 1994, CIZINAUSKAS et al. 2000).

Die Prognose ist für Hunde, bei denen eine adäquate Therapie frühzeitig eingeleitet wird, günstig (MERIC et al. 1985, PONCELET und BALLIGAND 1993, CIZINAUSKAS et al. 2000, GANDINI et al. 2003, BEHR und CAUZINILLE 2006). Eine vorsichtigere Prognose ist bei älteren (CIZINAUSKAS et al. 2000) und solchen Tieren zu stellen, die bereits die protrahierte Form zeigen (TIPOLD und JAGGY 1994).

2.1.6 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie und Pathogenese sind bis dato weitgehend ungeklärt. Eine Dysregulation des Immunsystems scheint in der Pathogenese eine entscheidende Rolle zu spielen (TIPOLD 2000), wie dies auch bei dem Großteil der humanen nekrotisierenden Vaskulitiden vermutet wird (EASLEY 1979). Über den Auslöser dieser Fehlregulation kann derzeit nur spekuliert werden.

Keiner der bisher unternommenen Versuche, ein infektiöses Agens als Ursache für die Erkrankung zu isolieren, war von Erfolg gekrönt (HARCOURT 1978, MERIC et al. 1986). Auch die Bemühungen einiger Autoren, die SRMA durch Körperflüssigkeiten kranker Tiere auf gesunde zu übertragen, scheiterten (HARCOURT 1978, SCOTT-MONCRIEFF et al. 1992). In einem Fallbericht wurde ein mit der steril-eitrigen Meningitis-Arteriitis identisches Syndrom als Nebenwirkung eines Medikamentes beschrieben (KÄLIN et al. 1987). PRESTHUS (1991) hatte bei einer von ihm tierärztlich betreuten Hündin den Eindruck, daß das Einsetzen des Östrus mit dem Auftreten von Symptomen in kausalem Zusammenhang stand.

Ein Einfluß genetischer Faktoren konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden (MERIC et al. 1986, HAYES et al. 1989, RUBEN et al. 1989, SCOTT-MONCRIEFF et al. 1992, PONCELET und BALLIGAND 1993).

2.2 Liquor cerebrospinalis

Die Untersuchung der Gehirnrückenmarksflüssigkeit liefert bei einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen wertvolle Hinweise auf dem Weg zu einer definitiven Diagnose (ABATE et al. 1998). Sie ist insbesondere von großer diagnostischer Bedeutung, da das zentrale Nervensystem, weil es fast vollständig von Knochen eingeschlossen ist, nur bedingt für die bei anderen Organsystemen üblichen diagnostischen Prozeduren wie Biopsieentnahmen und ultrasonographische Untersuchungen geeignet ist (COOK und DENICOLA 1988). Zu beachten ist, daß die Ergebnisse in der Regel lediglich einen Hinweis auf eine bestimmte Erkrankungskategorie geben (TIPOLD 2003, LORENZ und KORNEGAY 2004, DI

TERLIZZI und PLATT 2006) und stets im Zusammenhang mit Signalement, Anamnese und der Gesamtheit der erhobenen Befunde zu bewerten sind (MAYHEW und BEAL 1980, CHRISMAN 1992, BOHN et al. 2006).

2.2.1 Anatomie und Physiologie

Sämtliche Oberflächen des zentralen Nervensystems werden von der Gehirnrückenmarksflüssigkeit umspült. Zudem dringt sie in das Hirn- und Rückenmarksparenchym ein (DE LAHUNTA 1983).

Der Liquor stammt aus den Choroidplexus der Hirnventrikel, den Blutgefäßen der Leptomeningen sowie aus dem Gehirn. Die Produktion erfolgt durch Ultrafiltration des Blutplasmas und durch aktiven Transport (DE LAHUNTA 1983).
Die Gehirnrückenmarksflüssigkeit fließt aus dem ventrikulären System in den Zentralkanal des Rückenmarks sowie in den Subarachnoidalraum (DE LAHUNTA 1983). Der Fluß entlang des Rückenmarks erfolgt vornehmlich kaudal, aber auch zirkulär (TIPOLD 2003). Der Antrieb für diese Bewegung wird der Blutpulsation in den Adergeflechten zugeschrieben (DE LAHUNTA 1983).
Der Großteil der Absorption geschieht entlang des Druckgefälles zwischen Liquor und peripherem Blut über die Arachnoidalzotten, die in die Sinus der harten Hirnhaut sowie in die zerebralen Venen hineinragen. Zu einem kleineren Teil tritt die Gehirnrückenmarksflüssigkeit auch an den Choroidplexus (TIPOLD 2003) und im Bereich der spinalen Nervenwurzeln sowie an den Austrittsstellen der ersten beiden Gehirnnerven aus der Schädelhöhle in das venöse und lymphatische System über. Zudem ist die Absorption an zerebralen Venen möglich, nachdem der Liquor in das Hirnparenchym übergetreten ist (DE LAHUNTA 1983).
Der unkontrollierte Übertritt von Substanzen aus dem Blut in den Liquorraum wird durch die Blut-Liquor- und Blut-Hirn-Schranke unterbunden. Der Stoffaustausch zwischen dem Liquor und der extrazellulären Flüssigkeit des Hirngewebes hingegen ist weitgehend ohne Einschränkung möglich (DE LAHUNTA 1983).

Die Gehirnrückenmarksflüssigkeit besteht zu 99% aus Wasser (TIPOLD 2003) und ist leicht alkalisch (MAYHEW und BEAL 1980). Im Vergleich zum Plasma ist ihr Gehalt an Natrium, Chlorid und Magnesium leicht erhöht, der an Kalium, Kalzium und Glukose etwas vermindert. Sie enthält nur etwa 1/250 des Proteingehalts des peripheren Bluts. Mit mehr als 50% stellt das Albumin die größte Proteinfraktion dar (DI TERLIZZI und PLATT 2006).

Die Funktionen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit sind der mechanische Schutz des zentralen Nervengewebes, seine Versorgung mit Nährstoffen und die Schaffung eines konstanten Milieus. Neben den Nährstoffen werden auch neuroendokrine Substanzen und Neurotransmitter transportiert (DE LAHUNTA 1983). Desweiteren erfüllt der Liquor exkretorische Aufgaben und schützt vor einem akuten Anstieg des intrakraniellen Drucks (TIPOLD 2003).

2.2.2 Gewinnung und Untersuchung

Für die Gewinnung einer Liquorprobe beim Kleintier ist eine Vollnarkose erforderlich. Der häufigste Punktionsort ist die Cisterna cerebellomedullaris, alternativ bzw. zusätzlich wird gelegentlich eine lumbale Punktion durchgeführt (LORENZ und KORNEGAY 2004). Lumbal gewonnene Proben weisen zu einem größeren Prozentsatz eine Blutkontamination auf (BAILEY und HIGGINS 1985), empfehlen sich jedoch zur Erkennung von Veränderungen bei, im Verlauf des Rückenmarks kaudal der zerebellomedullären Zisterne gelegenen, Läsionen (THOMSON et al. 1989, THOMSON et al. 1990).

Die Liquorroutinediagnostik umfaßt neben der makroskopischen Beurteilung die Bestimmung von Gesamtprotein und Zellzahl und bei Überschreitung des oberen Referenzwertes für die Zellzahl die Bestimmung der beteiligten Zelltypen (WRIGHT 1978, MAYHEW und BEAL 1980). Da die Zellen, insbesondere die Granulozyten, in dem proteinarmen Milieu schnell zugrunde gehen, müssen Zellzählung und -differenzierung innerhalb von 30 Minuten erfolgen. Kühlschranktemperaturen verlangsamen den Degenerationsprozeß (TIPOLD 2003). Für die Zellzahlbestimmung eignen sich verschiedene Zählkammern. Die Identifikation der

Zelltypen erfordert, sofern die Zellzahl nicht massiv erhöht ist, eine Konzentration der Zellen mittels Sedimentation, Membranfiltration oder Zytozentrifugation (JAMISON und LUMSDEN 1988). Zu einer groben Schätzung des Globulingehaltes können die Pandy- bzw. die Nonne-Apelt-Reaktion herangezogen werden (JAMISON und LUMSDEN 1988). Die Verwendung eines Urinsticks kann der groben Abschätzung des enthaltenen Gesamtproteins dienen (JACOBS et al. 1990). Zur exakten quantitativen Bestimmung finden verschiedene photometrische Meßmethoden, entweder als Streulicht- oder als Trübungsmessung, Anwendung (TIPOLD 2003). Zusätzlich wurden unterschiedliche Methoden zur qualitativen Charakterisierung der Proteinfraktionen entwickelt (KRAKOWKA et al. 1981, SORJONEN et al. 1981, BICHSEL et al. 1984, SORJONEN 1987, SORJONEN et al. 1991, TIPOLD et al. 1993, TIPOLD et al. 1994, BEHR et al. 2006).

2.2.3 Physiologische und pathologische Befunde

Die physiologische Gehirnrückenmarksflüssigkeit ist klar, farblos und hat eine wäßrige Konsistenz. Eine sichtbare Trübung tritt bei einem Zellgehalt von > 500/µl auf. Ein erhöhter Proteingehalt kann diese verstärken und zu einer erhöhten Viskosität führen (TIPOLD 2003). Eine farbliche Abweichung ist durch eine iatrogene, mit der Probenentnahme im Zusammenhang stehende Blutung möglich. Nach der Zentrifugation stellt sich in einem solchen Fall der Überstand als farblos dar. Ist auch der Überstand gelb-rötlich verfärbt, also xanthochrom, so spricht dies für eine vorangegangene Blutung mit bereits degenerierten Erythrozyten, die in einem Zeitfenster von einer Stunde bis acht Tagen stattgefunden hat (JAMISON und LUMSDEN 1988). MAYHEW und BEAL (1980) berichten, daß eine posthämorrhagische Xanthochromie bis zu vier Wochen bestehen bleiben kann. Im Falle eines eitrigen Entzündungsprozesses kann die Gehirnrückenmarksflüssigkeit eine grau-gelbe bis grünliche Färbung annehmen (MAYHEW und BEAL 1980, CIZINAUSKAS et al. 2001).

Die physiologische Zahl von roten Blutkörperchen wird in der Literatur übereinstimmend mit 0/µl angegeben (COOK und DENICOLA 1988, CHRISMAN 1992). Die Angaben, ab wann von einer erhöhten Leukozytenzahl, einer Pleozytose, auszugehen ist, variieren von > 2/µl

(JAMISON und LUMSDEN 1988) bis hin zu > 8/µl (WRIGHT 1978, MAYHEW und BEAL 1980).
Die weißen Blutzellen setzen sich vornehmlich aus mononukleären Zellen zusammen, wobei die Zahl der Lymphozyten die der Monozyten in der Regel übersteigt. Vereinzelt sind Makrophagen, Neutrophile oder auch Eosinophile sowie selten Choroidplexus- oder Ependymzellen zu beobachten (MAYHEW und BEAL 1980, JAMISON und LUMSDEN 1988, CHRISMAN 1992, TIPOLD 2003).

Eine Erhöhung der Zellzahl und des Gesamtproteins kann bei Entzündungen des zentralen Nervensystems sowie bei Prozessen, die die Integrität der Blut-Liquor- und der Blut-Hirn-Schranke stören, erwartet werden (LORENZ und KORNEGAY 2004).

Die in Zusammenhang mit einer spezifischen Erkrankung auftretenden Veränderungen des Liquors können stark variieren (CHRISMAN 1992).
Eine hauptsächlich mononukleäre Pleozytose spricht für eine virale Infektion (VANDEVELDE und SPANO 1977, TIPOLD 1995, MARISCOLI und JAGGY 1997), eine der rassespezifischen nekrotisierenden Enzephalitiden (TIPOLD 1995, MARISCOLI und JAGGY 1997), die granulomatöse Meningoenzephalomyelitis (VANDEVELDE und SPANO 1977, BAILEY und HIGGINS 1986b, MARISCOLI und JAGGY 1997) oder für das chronische Stadium der steril-eitrigen Meningitis-Arteriitis (TIPOLD und JAGGY 1994).
Erkrankungen, die typischerweise eine Pleozytose mit substanzieller Beteiligung von Neutrophilen aufweisen, sind bakterielle Meningoenzephalomyelitiden (KORNEGAY et al. 1978, TIPOLD 1995, MARISCOLI und JAGGY 1997, CIZINAUSKAS et al. 2001) und die SRMA in ihrem akuten Stadium (TIPOLD und JAGGY 1994, CIZINAUSKAS et al. 2000, BEHR und CAUZINILLE 2006).
Der Befund einer gemischtzelligen Pleozytose wird häufig bei parasitären (DE LAHUNTA 1983, TIPOLD 1995, MARISCOLI und JAGGY 1997) und mykotischen (VANDEVELDE und SPANO 1977, DE LAHUNTA 1983) Infektionen des ZNS sowie bei der granulomatösen Meningoenzephalomyelitis (BAILEY und HIGGINS 1986b, TIPOLD 1995) erhoben.

Bei den durch Parasiten (DE LAHUNTA 1983, TIPOLD 1995, MARISCOLI und JAGGY 1997, BOHN et al. 2006) und Pilze (DE LAHUNTA 1983) verursachten Entzündungen sowie bei der granulomatösen Meningoenzephalomyelitis (VANDEVELDE und SPANO 1977, TIPOLD 1995) findet sich mitunter eine merkliche Beteiligung eosinophiler Granulozyten. Zudem sind Fälle einer idiopathischen eosinophilen Meningoenzephalomyelitis mit einem von Eosinophilen dominierten Zellbild beschrieben (SMITH-MAXIE et al. 1989).
Die Tumoren des zentralen Nervensystems stellen bezüglich des sie begleitenden Zellbildes in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit eine heterogene Gruppe dar. Der überwiegende Teil der Proben von Hunden mit primären Neoplasien des ZNS weist eine normale bis leicht erhöhte Zellzahl mit hauptsächlich mononukleären Zellen (BAILEY und HIGGINS 1986a) oder mit einem gemischten Zellbild auf (DICKINSON et al. 2006, SNYDER et al. 2006). Eine deutliche, nicht selten polymorphkernige Pleozytose wird bei einigen Patienten im Zusammenhang mit Meningeomen beobachtet (BAILEY und HIGGINS 1986a, DICKINSON et al. 2006). Tumoröse Zellen erscheinen bei der Mehrzahl der Geschwulste nicht im Liquor (BAILEY und HIGGINS 1986a, SNYDER et al. 2006). Eine Ausnahme stellt hier das ZNS-Lymphosarkom dar. SNYDER et al. (2006) gelang es, in einem Drittel dieser Proben atypische oder neoplastische Zellen nachzuweisen.
Massive Pleozytosen mit Zellzahlen von > 1000/µl treten insbesondere bei der akuten SRMA sowie bei bakteriellen Meningoenzephalomyelitiden, mitunter auch bei der granulomatösen Meningoenzephalomyelitis, auf (TIPOLD 1995).
In den Gruppen der vaskulären, traumatischen, degenerativen (LORENZ und KORNEGAY 2004) und metabolisch-toxischen Erkrankungen sowie bei Anomalien (JAMISON und LUMSDEN 1988) ist die Zahl der weißen Blutzellen im Liquor normal bis leicht erhöht. Der Zelltyp ist in der Regel mononukleär.

Auch die Referenzwerte für die Menge des Gesamtproteins der Gehirnrückenmarksflüssigkeit gesunder Hunde variieren und liegen in einem Bereich < 40 mg/dl (COOK und DENICOLA 1988). DE LAHUNTA (1983) und LORENZ und KORNEGAY (2004) geben jeweils als Grenzwert 25 mg/dl an, wobei letztere, sich auf BAILEY und HIGGINS (1985) berufend, anmerken, daß dieser Wert bei lumbalen Punktionen überschritten werden kann.

Einem Überschreiten dieses Wertes können zwei, unter Umständen in Kombination auftretende Pathomechanismen zugrunde liegen. Zum einen können Proteine bei Störung der Blut-Hirn- bzw. Blut-Liquor-Schranke vermehrt in den Liquorraum übertreten. Dies wird durch einen Anstieg des Albuminquotienten (AQ) erkennbar (AQ = $Albumin_{CSF}$ / $Albumin_{Serum}$) (SORJONEN 1987). Zum anderen ist eine Erhöhung des Gesamtproteins durch eine intrathekale Globulinsynthese erklärbar. Diese zeigt sich in einer Erhöhung des Immunglobulin G-Indexes (IgG-Index = (IgG_{CSF} /IgG_{Serum}) / AQ) (TIPOLD et al. 1993).
Eine Erhöhung des Gesamtproteins kann in der Gruppe der vaskulären, entzündlich-infektiösen, metabolisch-toxischen, neoplastischen (TIPOLD 2003) und auch in der Gruppe der traumatischen (THOMSON et al. 1990) Erkrankungen gefunden werden.

Wie im Falle einer iatrogenen Blutkontamination der Gehirnrückenmarksflüssigkeit zu verfahren ist, wird kontrovers diskutiert. Viele Autoren empfehlen die Korrektur der ermittelten Zellzahl bzw. des gemessen Proteingehaltes mit Hilfe der Formel $X_{CSF\ korrigiert} = X_{CSF\ gemessen} - [X_{Blut} \times Erythrozyten_{CSF}/Erythrozyten_{Blut}]$, wobei X alternativ für die Zahl der weißen Blutzellen oder für die Menge des Gesamtproteins steht. Der Anwender der Formel geht davon aus, daß Leukozyten und Proteine in gleichem Maße wie Erythrozyten vom Blut in die Gehirnrückenmarksflüssigkeit übertreten (MAYHEW und BEAL 1980, TIPOLD 2003). Zwei Studien, die sich mit der Brauchbarkeit dieser Formel befassen, legen nahe, daß die Annahme eines Übertritts in gleichem Maße nicht der Realität entspricht (WILSON und STEVENS 1977, HURTT und SMITH 1997), und eine Korrektur bis zu einer Erythrozytenzahl von 13200/µl nicht erforderlich ist (HURTT und SMITH 1997).

2.3 Durchflußzytometrie

Die Entwicklung der Durchflußzytometrie begann in den späten 1960er Jahren (CRAM 2002). Heute wird die Technik in einer Vielzahl der Naturwissenschaften, inklusive der Medizin, intensiv verwendet (RIESEBERG et al. 2001). Der besondere Nutzen dieser Methode besteht in der Möglichkeit, multiple Parameter für individuelle Partikel mit Zählraten von bis zu 10 000 Partikeln pro Sekunde bestimmen zu können. Zudem erlaubt ein

Großteil der Geräte, die gemessenen Partikel bezüglich einer beliebigen Kombination von Parametern von den übrigen zu separieren (CARTER und ORMEROD 2000, CRAM 2002).
Das Prinzip der Durchflußzytometrie besteht darin, daß die zu messenden Partikel einzeln einen Lichtstrahl passieren, und daß das durch diese Teilchen gestreute und von Fluorochromen, mit denen sie markiert wurden, emittierte Licht registriert wird (CARTER und ORMEROD 2000, CRAM 2002).
Das sogenannte Vorwärtsstreulicht, das heißt der Anteil des gestreuten Lichtes, der von Photodetektoren gemessen wird, die sich in einer Achse mit dem Strahl der Lichtquelle befinden, erlaubt Rückschlüsse auf die Größe der Partikel. Das Seitwärtsstreulicht, das von Meßelementen registriert wird, die in einer Achse liegen, die orthogonal zum Lichtstrahl steht, gibt Aufschluß über die Granularität der Teilchen (CARTER und ORMEROD 2000, CRAM 2002). Die Meßobjekte können zur Gewinnung weiterer Informationen mit Fluoreszenzsonden markiert werden. Handelt es sich hierbei um Antikörper, an die ein Fluorochrom kovalent gebunden wurde, so wird von der Immunfluoreszenztechnik gesprochen (LOKEN et al. 2000). Eine richtige Auswahl von optischen Filtern ermöglicht die kombinierte Anwendung verschiedener Fluorochrome (CARTER und ORMEROD 2000).
Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in der Regel als Einparameterdarstellung, bei der die Anzahl der gemessen Ereignisse als Funktion eines Parameters, angegeben wird, oder als Zweiparameterdarstellung, bei der ein gemessener Parameter einem zweiten gegenüber gestellt wird (CARTER und ORMEROD 2000, CRAM 2002).

In der medizinischen Anwendung der Durchflußzytometrie handelt es sich bei den zu charakterisierenden Partikeln meist um Zellen. Sie können sowohl aus dem Blut als auch, nachdem sie in Suspension gebracht wurden, aus Geweben stammen (CARTER und ORMEROD 2000). TIPOLD et al. (1998a) und DUQUE et al. (2002) konnten für die Anwendung beim Hund demonstrieren, daß die Durchflußzytometrie auch die Immunphänotypisierung von Zellen aus der Gehirnrückenmarksflüssigkeit erlaubt. Ein entsprechendes Protokoll wurde zuvor bereits für die Humanmedizin beschrieben (DUX et al. 1994).

2.4 Leukozytäre Oberflächenantigene

Die auf den Zelloberflächen exprimierten Glykoproteine erfüllen eine Vielzahl von Funktionen. Zu diesen gehören die Erkennung, das Binden, die Verarbeitung und die Präsentation von Antigenen, die Vermittlung der Adhäsion und die Unterstützung der Fortbewegung der Zellen sowie die Übermittlung von Signalen an andere Zellen, bei denen dies zur Aktivierung, Inaktivierung oder Differenzierung beitragen oder auch deren Apoptose einleiten kann (LAI und HUANG 1996). Einige der Oberflächenantigene sind für Zellinien charakteristisch, während andere Aussagen über das Aktivierungs- oder Differenzierungsstadium der Zellen ermöglichen (ABBAS und LICHTMAN 2003).

Die Entwicklung einer großen Zahl von gegen diese Strukturen gerichteten monoklonalen Antikörpern (mAk) machte eine exakte übereinstimmende Charakterisierung der Spezifitäten der Antikörper sowie die Einführung einer einheitlichen Nomenklatur für die Antigene erforderlich. Zu diesem Zweck wurde das *Human Leucocyte Differentiation Antigens* (HLDA)-Projekt ins Leben gerufen, durch dessen ersten internationalen Workshop im November 1982 das CD (*Cluster of Differentiation*)-System eingeführt wurde (BERNARD et al. 1984). Diejenigen Antikörper, die die gleiche Spezifität aufwiesen, wurden in einem *Cluster of Differentiation* zusammengefaßt, und die durch die Antikörper gebundenen Antigene erhielten als Benennung das Kürzel CD mit dem Zusatz einer fortlaufenden Nummer (LAI et al. 1996). Bis zum heutigen Tage sind 339 solcher Oberflächenmoleküle bezeichnet (CD1-CD339) (ZOLA 2006). Da sich das Spektrum der Strukturen, gegen die monoklonale Antikörper produziert werden, auf nicht-leukozytäre Zellen und auch auf intrazelluläre Moleküle ausgeweitet hat, erfolgte nach dem achten HLDA-Workshop im Dezember 2004 eine Umbenennung des HLDA- in *Human Cell Differentiation Molecules* (HCDM)-Workshop (ZOLA 2006).

In Anlehnung an dieses humanmedizinische Projekt wurde Entsprechendes für die verschiedenen Spezies organisiert. Zur Definierung kaniner leukozytärer Oberflächenmarker und zu deren Identifizierung als Homologe der humanen CD-Moleküle sowie zur Ordnung der die Antigene bindenden monoklonalen Antiköper wurde 1993 der *First International Canine Leukocyte Antigen Workshop* abgehalten (COBBOLD und METCALFE 1994).

Als eine mögliche Alternative zur Produktion von speziell gegen die Oberflächenmoleküle der einzelnen Tierarten gerichteten Antikörper erwies sich die Verwendung verschiedener bereits etablierter monoklonaler Antikörper, die mit den homologen Antigenen der anderen Spezies kreuzreagieren (BRODERSEN et al. 1998, SAALMÜLLER et al. 2005).

Es folgt eine Übersicht über die Oberflächenmoleküle, deren Expression in dieser Studie mittels monoklonaler Antikörper dargestellt wurde (siehe Tab. 2.1).

Tab. 2.1: **Übersicht der Eigenschaften der in dieser Studie untersuchten Oberflächenantigene**

CD-Antigene	Alternative Bezeichnung	Molekülmasse [10^3 x u]	Kanine Zellen, die das Antigen exprimieren	Funktionen
T-Zell-Rezeptor α/β	TCR-2[a]	α-Kette: 45-60[b] β-Kette: 40-55[b]	α/β-T-Zellen, Thymozyten[c]	Erkennung von an MHC-I- oder MHC-II-Moleküle gebundenen Antigenen[c,d]
T-Zell-Rezeptor γ/δ	TCR-1[e]	γ-Kette: 36-46[b] δ-Kette: 40-60[b]	γ/δ-T-Zellen, Thymozyten[c]	Erkennen von Antigenen[b,c,d]
CD3	T3[c,d], Leu-4[d]	γ-Kette: 21-28[b] δ-Kette: 20-28[b] ε-Kette: 20-25[b] ζ-Kette: 16[b] η-Kette: 22[b]	T-Zellen[b], Thymozyten[c,d,f]	als Bestandteil des T-Zell-Rezeptor-Komplexes für die Signalübertragung und Zell-oberflächenexpression des T-Zell-Rezeptors erforderlich[c,d]
CD4	T4[c,d,f], L3T4[c,d], Leu-3[d], gp59[f]	60[g]	T-Helferzellen[g], Thymozyten-subpopulation[g], Neutrophile[g], Makrophagen-subpopulation[g]	bindet als Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors an MHC-II-Moleküle[g]

CD-Antigene	Alternative Bezeichnung	Molekülmasse [10^3 x u]	Kanine Zellen, die das Antigen exprimieren	Funktionen
CD8α	T8[c,d,f], Leu-2[d], Lyt2[c,d]	32,36[g]	zytotoxische T-Zellen[g], Thymozyten-subpopulation[g]	bindet als Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors an MHC-I-Moleküle[g]
CD11a	LFA-1 α-Kette[c,d,f], α_L-Integrinkette[d,f]	180[h]	Leukozyten[h], Makrophagen[h], follikuläre dendritische Zellen[h]	bildet mit CD18 ein Integrin und bindet an ICAM-1, -2 und -3; dient der Leukozyten-adhäsion ans Endothel sowie der Interaktion von Lymphozyten mit anderen Zellen[i]
CD11b	Mac-1[c,d,f], Mo1[d], CR3[d,f], α_M-Integrinkette[c,d,f]	175[h]	Monozyten[h], Granulozyten[h], Lymphozyten-subpopulation[h]	bildet mit CD18 ein Integrin und bindet an ICAM-1, iC3b und Fibrinogen; dient der Phagozytose mit iC3b opsonisierter Partikel sowie der Adhäsion an Endothel und extrazellulärem Matrixprotein[d]
CD11c	p150,95[c,d,f], CR4-α-Kette[c,d], CR4[c,f], α_X-Integrinkette[d,f]	150[h]	Monozyten[h], Granulozyten[h], Makrophagen-subpopulation[h], dendritische Zellen[h], follikuläre dendritische Zellen[h]	bildet mit CD18 ein Integrin und bindet an iC3b und Fibrinogen; dient der Phagozytose mit iC3b opsonisierter Partikel sowie der Adhäsion an Endothel und extrazellulärem Matrixprotein[d]
CD21	CR2[b,c,d,f], C3d-Rezeptor[d,f], B2[d]	145[g]	B-Zellen[j], follikuläre dendritische Zellen[j]	bildet gemeinsam mit CD19 und CD81 den B-Zell-Co-Rezeptor-Komplex und führt nach Bindung von C3d zu einer Verstärkung des durch den B-Zell-Rezeptor vermittelten Signals[d]
CD45	Leukocyte common antigen (LCA)[c,d,f], T200[c,d,f] B220[c,d]	180-220[k]	Gesamtheit der Leukozyten	transmembranöse Tyrosin-phosphatase, die für die Signalweiterleitung durch andere Rezeptoren benötigt wird; kommt in verschiedenen Isoformen vor[c]

CD-Antigene	Alternative Bezeichnung	Molekülmasse [10^3 x u]	Kanine Zellen, die das Antigen exprimieren	Funktionen
CD45RA		205,220[j]	B-Zellen[j], T-Zell-Subpopulation[j], Monozyten[j], Thymozyten[j]	Isoform des CD45-Moleküls, die die Aminosäuresequenz enthält, die durch das A-Exon kodiert wird; ein funktioneller Unterschied zu CD45 ist nicht bekannt[d]

[a] (MOORE und ROSSITTO 1993)

[b] (TIZARD 2004)

[c] (JANEWAY et al. 2002)

[d] (ABBAS und LICHTMAN 2003)

[e] (MOORE et al. 1994)

[f] (LAI et al. 1996)

[g] (MOORE et al. 1992)

[h] (DANILENKO et al. 1992)

[i] (BUTCHER 1996)

[j] (MOORE et al. 1990)

[k] (COBBOLD und METCALFE 1994)

3 MATERIAL UND METHODE

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Hämozytometer: Advia™ Hematology System	Fa. Siemens, Berlin, Deutschland
Computertomograph: Somatom AR.HP Spiral	Fa. Siemens-Elema, Solna, Schweden
Kernspintomograph: Magnetom Impact plus (1,0 Tesla)	Fa. Siemens, Berlin, Deutschland
Mikroskope:	
1) Leica DMLB	Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland
2) H600	Fa. Hund, Wetzlar, Deutschland
Hitachi 912 Automatic Analyzer	Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Sterilbank: Aura Mini	Fa. Ehret, Emmendingen, Deutschland
Vortex: REAX control	Fa. Heidolph, Schwabach, Deutschland
Zentrifugen:	
1) Rotina 35R	Fa. Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

2) Zytozentrifuge: Hettich Universal Nr. 1200 mit Einsätzen Nr. 1323, Nr. 1266, Nr. 1271 und Nr. 1275	Fa. Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Durchflußzytometer: FACSCalibur™ mit Computer MacPro	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Fa. Apple, Cupertino, CA, U.S.A.

3.1.2 Instrumente

Pipette (0,1-1 µl): Transferpette®	Fa. Brand, Wertheim, Deutschland
Pipette (0,5-10 µl): Transferpette®	Fa. Brand, Wertheim, Deutschland
Pipette (10-100 µl): Transferpette®	Fa. Brand, Wertheim, Deutschland
Pipette (100-1000 µl): m1000	Fa. Biohit, Helsinki, Finnland
Pipettenspitzen verschiedener Größen: Best.-Nr. 702504, Best.-Nr. 702516, Best.-Nr. 702521	Fa. Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettierhilfe: accu-jet®	Fa. Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettierhilfe: HandyStep	Fa. Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten verschiedener Größen (steril): Best.-Nr. 86.1251.001, Best.-Nr. 86.1253.001, Best.-Nr. 86.1254.001	Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten verschiedener Größen (unsteril): Best.-Nr. 702372, Best.-Nr. 702380	Fa. Brand, Wertheim, Deutschland

Röhrchen: beschichtet, steril

1) 1,3 ml mit 1,6 mg EDTA/ml Blut: Best.-Nr. 41.1504.005	Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
2) 5 ml mit 1,6 mg EDTA/ml Blut: Best.-Nr. 31.328	Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
3) 10 ml mit Gerinnungsaktivator: Best.-Nr. 26.367	Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Röhrchen: unbeschichtet, steril

1) 3,5 ml: Best.-Nr. 55.484.001	Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
2) 15 ml: Best.-Nr. 62.554.502	Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
3) 50 ml: Best.-Nr. 62.547.004	Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Röhrchen: unsteril

1) 1,5 ml: Best.-Nr. 0030 120.086	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2) 5 ml: Best.-Nr. 55.1578	Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Spinalkanülen:

1) 0,7 x 38 mm: Best.-Nr. 405254	Fa. Becton Dickinson, Madrid, Spanien
2) 0,7 x 75 mm: Best.-Nr. 405255	Fa. Becton Dickinson, Madrid, Spanien

Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal	Fa. Optik Labor, Deutschland
Zählkammer nach Türk	Fa. Brand, Wertheim, Deutschland

3.1.3 Reagenzien und Chemikalien

Dinatriumhydrogenphosphat: Best.-Nr. 1.06586.0500	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid: Best.-Nr. 1.04936.0500	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat: Best.-Nr. 1.04873.250	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid: Best.-Nr. 1.06404.1000	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd: Best.-Nr. 1.04005.1000	Fa. Merck, Hannover, Deutschland

3.1.4 Lösungen und zu lösende Substanzen

BD FACSFlow™:Best.-Nr. 342003	Fa. BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
CellWASH: Best.-Nr. 349524	Fa. BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
FACSClean: Best.-Nr. 340345	Fa. BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
FACSRinse: Best.-Nr. 340346	Fa. BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Histopaque® 1119: Best.-Nr. 11191	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
Pancoll human 1,077 g/ml: Best.-Nr. P04-60500	Fa. PAN™ Biotech, Aidenbach, Deutschland
To-Pro-3® (1mM Lösung in DMSO)	Fa. Molecular Probes™, Leiden, Niederlande

Diff-Quik®: Best.-Nr. 130832	Fa. Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz
Türksche Lösung: Best.-Nr. 1.09277.0100	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
U/CSF Protein: Best.-Nr. 1877801	Fa. Roche/Hitachi, Mannheim, Deutschland

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS); eingestellt auf pH 7,4:

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na_2HPO_4	1,15 g
KH_2PO_4	0,20 g
Aqua tridest.	ad 1000 ml

Doppelt konzentrierte PBS (2 x PBS); eingestellt, so daß nach Zugabe der gleichen Menge Aqua tridest. ein pH von 7,4 erreicht wird:

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na_2HPO_4	1,15 g
KH_2PO_4	0,20 g
Aqua tridest.	ad 500 ml

3.1.5 Antikörper

3.1.5.1 Blockade unspezifischer Antikörperbindungen

Humanes Normal-Immunglobulin (hIg) (Charge: 015 252.01)	Fa. Globuman Berna®, Serum- und Impfinstitut Bern, Schweiz

3.1.5.2 Monoklonale nicht markierte Primärantikörper

Maus **IgG1 Negativkontrolle** (IgG1; Klon: W3/25; Best.-Nr. MCA928; Charge: 0605)	Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Maus **IgG2a Negativkontrolle** (IgG2a; Klon: MRC OX-34; Best.-Nr. MCA929; Charge: 0803)	Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Maus gegen kanines **CD3** (IgG1; Klon: CA17.2A12; Best.-Nr. MCA1774)	Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Maus gegen kanines **CD4** (IgG1; Klon: CA13.1E4; Best.-Nr. MCA1998S)	Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Maus gegen kanines **CD8α** (IgG2a; Klon: CA9.JD3; Best.-Nr. MCA1999S)	Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Maus gegen kanines **CD11a** (IgG1; Klon: CA11.4D3; Best.-Nr. MCA1776)	Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Maus gegen kanines **CD11b** (IgG1; Klon: CA16.3E10; Best.-Nr. MCA1777S)	Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland

Die nachfolgend in der Tabelle 3.1 aufgeführten monoklonalen, gegen kanine leukozytäre Oberflächenmoleküle gerichteten Antikörper wurden durch Herrn Prof. Dr. P. F. Moore (Department of Pathology, Microbiology and Immunology, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA, U.S.A.) zur Verfügung gestellt. Ihre Gewinnung erfolgte aus Zellkulturüberständen.

Tab. 3.1: Durch Prof. Dr. P. F. Moore (University of California, Davis, CA, U.S.A.) zur Verfügung gestellte monoklonale, gegen Epitope kaniner leukozytärer Oberflächenantigene gerichtete, murine Antikörper

Zieloberflächenantigen	Klon	Isotyp	Referenz
T-Zell-Rezeptor α/β	CA15.8G7	IgG1	MOORE und ROSSITTO (1993)
T-Zell-Rezeptor γ/δ	CA20.8H1	IgG2a	MOORE et al. (1994)
CD21	CA2.1D6	IgG1	BRODERSEN et al. (1998)
CD45RA	CA4.1D3	IgG1	DANILENKO et al. (1992)
CD11c	CA11.6A1	IgG1	COBBOLD und METCALFE (1994)

3.1.5.3 Monoklonale markierte Primärantikörper

Fluorescein Isothiozyanat (FITC, Isomer 1**)-konjugierte** Maus **IgG1 Negativkontrolle** (IgG1; Klon: W3/25; Best.-Nr. MCA928F; Charge: 1103) — Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland

R-Phycoerythrin (RPE)-konjugierte Maus **IgG1 Negativkontrolle** (IgG1; Klon: W3/25; Best.-Nr. MCA928PE; Charge: 0505) — Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland

Alexa Fluor® 647-konjugierte Ratte **IgG2b Negativkontrolle** (IgG2b; Klon: LO-DNP-11; Best.-Nr. MCA1125A647; Charge: 0304) — Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland

Fluorescein Isothiozyanat (FITC, Isomer 1**)-konjugierter** Maus gegen kanines **CD3** (IgG1; Klon: CA17.2A12; Best.-Nr. MCA1774F; Charge: 1105) — Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland

R-Phycoerythrin (RPE)-konjugierter Maus gegen kanines **CD21** (IgG1; Klon: CA2.1D6; Best.-Nr. MCA1781PE; Charge: 0704) — Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland

Alexa Fluor® 647-konjugierter Ratte gegen kanines **CD45** (IgG2b; Klon: YKIX 716.13; Best.-Nr. MCA1042A647; Charge: 0304)	Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland
R-Phycoerythrin (RPE)-konjugierter Maus gegen humanes **CD14** (IgG2a; Klon: TÜK4; Best.-Nr. R 0864; Charge: 091/101)	Fa. Dako, Glostrup, Dänemark

3.1.5.4 Monoklonale markierte Sekundärantikörper

$F(ab')_2$-Fragment-spezifisches **R-Phycoerythrin (RPE)-konjugiertes** $F(ab')_2$-Fragment **Ziege gegen murines IgG** (Best.-Nr. 115-116-072; Charge: 67858)	Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland

3.1.6 Computersoftware

BD CellQuest™ Pro Version 5.2.1	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
SPSS 14.0	Fa. SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.
WinSTAT® Add-In Software für Excel	Fa. R. Fitch Software, Bad Krozingen, Deutschland

3.1.7 Hunde

Blut- und Liquorproben wurden von 77 Hunden, die im Zeitraum von April 2006 bis Juli 2007 in der Klinik für Kleintiere der Stiftung Tierärztliche Hochschule mit neurologischen Symptomen vorgestellt wurden, gemessen. Das Probenmaterial wurde im Rahmen der Diagnostik entnommen.

Als Kontrollen diente Blut, das bei routinemäßigen Entnahmen von sieben klinisch gesunden Hunden der Rasse Beagle gewonnen wurde.

Die Tiere, von denen Probenmaterial gewonnen und gemessen wurde, wurden einer der in Tabelle 3.2 aufgeführten Gruppen zugeordnet.

Tab. 3.2: **Übersicht der Tiergruppen**

Gruppen	Anzahl der Hunde	Zuordnungskriterien
Gesunde	7	gesunde Hunde
SRMA mit Symptomen	12	an SRMA erkrankte Hunde, die zum Zeitpunkt der Probengewinnung klinische Symptome der Erkrankung zeigten
SRMA-Verlaufskontrollen	10	an SRMA erkrankte Hunde, die zum Zeitpunkt der Probengewinnung keine klinischen Symptome der Erkrankung zeigten (unter Therapie oder in asymptomatischer Phase)
idiopathische Epilepsie	9	Hunde mit idiopathischer Epilepsie
Rückenmarkstraumata	7	Hunde mit Bandscheibenvorfällen o. Subluxation bzw. Fraktur von Wirbelkörpern
Entzündungen	15	Hunde mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen (siehe S. 30)
Neoplasien	14	Hunde mit verschiedenen Tumoren im ZNS
Andere	18	Hunde, bei denen die Ursache der neurologischen Symptome keiner der zuvor beschriebenen Kategorien zugeordnet werden konnte (siehe S. 31)

bzw. = beziehungsweise; S. = Seite; SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*; o. = oder; ZNS = zentrales Nervensystem

Innerhalb der Gruppe der Entzündungen finden sich sieben Hunde mit einer Meningoenzephalitis und/oder –myelitis. Jeweils zwei Tiere waren an einer Otitis

media/interna (von denen eines zusätzlich eine hypertrophe Polyneuritis aufwies), einer akuten idiopathischen Polyradikuloneuritis oder einer Diskospondylitis erkrankt. Die Diagnose einer Kaumuskelmyositis und einer Plexus brachialis-Neuritis wurde bei je einem Hund gestellt.
Die Gruppe der Patienten, die keiner der anderen Kategorien zugeordnet werden konnten, beinhaltet sechs Hunde mit Infarkten des zentralen Nervensystems und zwei mit einer degenerativen Myelopathie. Bei zwei Tieren waren Verhaltensänderungen ohne erkennbare organische Ursache aufgetreten. Jeweils ein Hund zeigte eine Myelopathie unbekannter Ursache, eine Neuromyopathie unbekannter Ursache, eine Hydrozephalus-induzierte Epilepsie, eine Rückenmarksblutung und eine Kleinhirnhypoplasie. Bei einem Hund wurde die Verdachtsdiagnose eines alten Rückenmarkstraumas, bei einem weiteren die einer funktionellen Durchblutungsstörung des Gehirns gestellt. Ein weiterer Patient litt unter Schmerzzuständen, deren Ursache nicht zu klären war.

Für alle Hunde existieren Messungen zur Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut und, mit Ausnahme der Gesunden, in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit. Zudem liegen Ergebnisse zur Integrinexpression auf den polymorphkernigen Zellen des peripheren Blutes für 81 der 84 Tiere vor. Zwei der Hunde, für die Integrine nicht gemessen werden konnten, entstammen der Gruppe „Neoplasien“, einer gehört in die Gruppe „idiopathische Epilepsie“.

In der Gruppe der Hunde mit Symptomen der SRMA gibt es von einem Individuum eine zweite Messung zum Zeitpunkt eines Rezidivs. Von fünf Hunden, bei denen die Probengewinnung im Rahmen einer SRMA-Verlaufskontrolle erfolgte, existieren weitere Messungen (1 x vier, 1 x zwei und 3 x eine). Auch von zwei der Tiere mit entzündlichen Erkrankungen wurden zu einem weiteren Datum Proben gemessen.

Eine genaue Auflistung der Einzeltiere mit Angaben zu Rasse, Alter, Geschlecht und Status einer Vorbehandlung mit Glukokortikoiden sowie der gestellten Diagnose bietet der Anhang A.

Die Anamnese sowie die Ergebnisse von Allgemeinuntersuchung, neurologischer Untersuchung, Laboruntersuchungen des Blutes, der Gehirnrückenmarksflüssigkeit und, wenn dies als erforderlich erachtet wurde, des Urins, ergänzt durch die Resultate von elektrodiagnostischen (Elektromyographie, Nervleitgeschwindigkeitsmessung, Elektroenzephalographie) und bildgebenden Verfahren (Röntgenuntersuchung, Computertomographie und Kernspintomographie) sowie pathologischen Untersuchungen wurden bei der Erstellung der Diagnosen berücksichtigt.

Die Zuordnung der Tiere zu den einzelnen Gruppen hinsichtlich der Laborergebnisse und der Befunde der bildgebenden Verfahren erfolgte anhand der Kombination der im Folgenden (Tabellen 3.3 und 3.4) aufgeführten Kriterien.

Tab. 3.3: Übersicht der Veränderungen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit und des Blutes bei den Krankheitskategorien

Gruppen	Veränderungen des Liquor cerebro-spinalis	Veränderungen des Blutbildes
SRMA mit Symptomen	neutrophile Pleozytose; Erhöhung des IgA-Gehaltes (TIPOLD und JAGGY 1994)	neutrophile Leukozytose; Erhöhung des IgA-Gehaltes (TIPOLD und JAGGY 1994)
SRMA-Verlaufskontrollen	normale Zellzahl; Erhöhung des IgA-Gehaltes (CIZINAUSKAS et al. 2000)	Erhöhung des IgA-Gehaltes (CIZINAUSKAS et al. 2000)
idiopathische Epilepsie	keine (LORENZ und KORNEGAY 2004)	keine (LORENZ und KORNEGAY 2004)
Rückenmarks-traumata	evtl. leichte Erhöhung von Zellzahl u./o. erhöhtes Totalprotein (THOMSON et al. 1989)	keine
Entzündungen	Pleozytose bei ZNS-Beteiligung; Erhöhung des Totalproteingehaltes (MARISCOLI und JAGGY 1997)	variabel (MARISCOLI und JAGGY 1997)
Neoplasien	variabel (BAILEY und HIGGINS 1986a)	keine
Andere	keine bzw. bei Infarkten evtl. leichte Erhöhung von Zellzahl u./o. erhöhtes Totalprotein (LORENZ und KORNEGAY 2004)	variabel

evtl. = eventuell; SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*; u./o. = und/oder; ZNS = zentrales Nervensystem

Tab. 3.4: Übersicht der Befunde bildgebender Verfahren bei den Krankheitskategorien

Gruppen	röntgenologische Befunde	CT-Befunde	MRT-Befunde
SRMA mit Symptomen	keine	nicht durchgeführt	nach Kontrastmittelgabe Anreicherung von Meningen u. meningealen Gefäßen möglich
SRMA-Verlaufskontrollen	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
idiopathische Epilepsie	keine (LORENZ und KORNEGAY 2004)	nicht durchgeführt	keine (LORENZ und KORNEGAY 2004)
Rückenmarks-traumata	verengte Zwischen-wirbelspalte; verschattete Foramina intervertebralia; Subluxationen; Frakturen (OLBY und THRALL 2004)	nicht durchgeführt	in T2-gewichteten Bildern Verjüngung der hyperintensen Liquorsäule und des epiduralen Fettes; Rückenmarkskompression durch hypointenses Material (OLBY und THRALL 2004)
Entzündungen	osteolytische o. proliferative Veränderungen bei Beteiligung knöcherner Strukturen (OLBY und THRALL 2004); evtl. weichteildichtes Material innerhalb und Sklerosierung der Bulla tympanica bei Otitis media (MUNANA 2004)	evtl. weichteildichtes Material inner-halb und Sklerosierung der Bulla tympanica bei Otitis media (MUNANA 2004)	bei ZNS-Beteiligung: meist multifokal o. diffus; in T2-gewichteten Bildern meist hyperintense Läsionen; Kontrastmittelanreicherung; selten Masseneffekt (LAMB et al. 2005); bei Otitis media evtl. Material variierender Intensität innerhalb der Bulla tympanica; ggf. Kontrastanreicherung des Materials und der Schleimhautauskleidung (STURGES et al. 2006); bei Diskospondylitis veränderte Intensität und Kontrastmittel-anreicherung betroffener Bandscheiben, angrenzender Wirbelendplatten und des umliegenden Gewebes (KRAFT et al. 1998)
Neoplasien	osteolytische o. proliferative Veränderungen bei Beteiligung knöcherner Strukturen; ggf. Metastasen (OLBY und THRALL 2004)	nicht durchgeführt	bei ZNS-Beteiligung: meist fokal; intra- oder extraaxiale Lage; in T1-gewichteten Bildern iso- o. hypointens, in T2-gewichteten Bildern iso- o. hyperintens; variable Kontrastmittelanreicherung; häufig Masseneffekt (KRAFT et al. 1997)

Gruppen	röntgenologische Befunde	CT-Befunde	MRT-Befunde
Andere	variabel	variabel	variabel; bei ZNS-Infarkten: homogene scharf abgegrenzte in T2-gewichteten Bildern hyperintense Läsion hpts. in grauer Substanz des Gehirns bzw. in grauer und weißer Substanz des RM, kein bis minimaler Masseneffekt (GAROSI et al. 2005, GRUNENFELDER et al. 2005, MCCONNELL et al. 2005)

bzw. = beziehungsweise; CT = Computertomograhie; evtl. = eventuell; ggf. = gegebenenfalls; hpts. = hauptsächlich; i.d.R. = in der Regel; MRT = Kernspintomographie; o. = oder; RM = Rückenmarkes; SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*; u. = und; ZNS = zentrales Nervensystem

Desweiteren wurde jedes Individuum als **vorbehandelt** oder **nicht vorbehandelt** eingestuft. Als Vorbehandlung wurde die systemische Gabe von Glukokortikosteroiden innerhalb der vorangegangenen sieben Tage beziehungsweise (bzw.) bei Präparaten mit Depotwirkung innerhalb der vorangegangenen sechs Wochen gewertet.

3.2 Methode

3.2.1 Probengewinnung

3.2.1.1 Entnahme und Untersuchung des Blutes

Die Entnahme von 10 ml Blut in zwei 5 ml fassende Röhrchen mit EDTA-Zusatz (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) für die Immunphänotypisierung sowie von 3 ml in ein 10 ml fassendes Röhrchen mit Gerinnungsaktivator (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) für die Serumgewinnung zur Bestimmung des IgA-Gehaltes, erfolgte am selben Tag wie die Gewinnung des Liquor cerebrospinalis. Als Ort der Punktion wurde die Vena cephalica oder die Vena saphena gewählt.

Aus einem zusätzlich befüllten Röhrchen mit EDTA-Zusatz und einem Fassungsvolumen von 1,3 ml (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) wurde mittels durchflußzytometrischer Messung, die die Größe der Zellen sowie deren Peroxidaseaktivität bestimmt (Advia™ Hematology System, Fa. Siemens, Berlin, Deutschland), ein Blutbild erstellt (die Ergebnisse sind in Anhang B aufgeführt).

3.2.1.2 Gewinnung und Untersuchung der Gehirnrückenmarksflüssigkeit

Die Gehirnrückenmarksflüssigkeit wurde in Vollnarkose unter sterilen Kautelen bei dem in Seitenlage befindlichen Tier aus der Cisterna cerebellomedullaris gewonnen. Die Induktion der Narkose erfolgte mit 0,3 - 0,5 mg/kg KM Diazepam (Diazepam-ratiopharm® 10 Injektionslösung, Fa. Ratiopharm, Ulm, Deutschland), 2 - 3 mg/kg KM (nach Wirkung) Propofol (Narcofol®, Fa. cp-Pharma®, Burgdorf, Deutschland) und gegebenenfalls 0,6 - 0,75 mg/kg KM Levomethadon (L-Polamivet®, Fa. Intervet, Unterschleißheim, Deutschland). Der Erhaltung mittels Inhalationsnarkose diente 1,5 – 3 % Isofluran (Isoba®, Fa. Essex Tierarznei, München, Deutschland) in einem Gemisch aus atmosphärischer Luft und Sauerstoff zu gleichen Teilen. Es wurde maximal 1 ml Liquor pro 5 kg KM entnommen.
Unmittelbar nach Entnahme wurde 90 µl des Liquors im Verhältnis 10:1 mit Türkscher Lösung (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Nach Befüllen der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Fa. Optik Labor, Deutschland) wurde die Gehirnrückenmarksflüssigkeit auf ihren Zellgehalt untersucht. Bei einer Zahl von > 12 Leukozyten/3 µl Liquor cerebrospinalis (CSF) schloß sich eine Differenzierung der enthaltenen Zelltypen nach Zytozentrifugation an (zwei Mal bei 30 x g für 10 min; Hettich Universal, Fa. Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland). Schließlich erfolgte die Färbung der Zellen mit dem Diff-Quik®-Kit (Fa. Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz).
Der Gesamtproteingehalt wurde nach Zusatz einer alkalischen Lösung (U/CSF Protein, Fa. Roche/Hitachi, Mannheim, Deutschland), die zur Denaturierung der Proteine führt, mittels eines turbidimetrischen kinetischen Verfahrens mit dem Hitachi 912 Automatic Analyzer (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) gemessen. Die Resultate der Untersuchung der Gehirnrückenmarksflüssigkeit sind in Anhang B aufgelistet.

Für die Immunphänotypisierung wurden nur solche Proben verwendet, die makroskopisch keine Blutkontamination aufwiesen. Eine Ausnahme bildeten Proben von an SRMA erkrankten Hunden, von denen anzunehmen war, daß die Kontamination nicht iatrogen, sondern durch Gefäßläsionen bedingt war.

3.2.2 Bestimmung des Gehaltes an Immunglobulin A (IgA)

Die IgA-Konzentrationen von Serum und Liquor cerebrospinalis wurden in der Klinik für Kleintiere der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover nach dem von TIPOLD et al. (1994) beschriebenen Protokoll bestimmt (siehe Anhang E). Als Untersuchungsmaterial dienten Serum und Gehirnrückenmarksflüssigkeit bzw. nach Abzentrifugation des Zellpellets deren Überstand. Die Proben waren zuvor bei - 20°C für maximal 4 Wochen gelagert.

3.2.3 Vorversuche

Die Tabelle 3.5 führt die Vorversuche, die im Anschluß beschrieben sind, auf.

Tab. 3.5: Übersicht der Vorversuche

Vorversuche
1. Wahl der Lösung zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen
2. Vergleich der Ergebnisse nach direkter und indirekter Immunphänotypisierung
3. Untersuchung zur Zulässigkeit einer Dreifachfärbung
4. Durchflußzytometrische Bestimmung des Anteils lebender Zellen
5. Evaluierung der Reinheit der Regionen
6. Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der Regionen von Lymphozyten und polymorphkernigen Zellen
7. Bestimmung der Konstanz der Messungen und Auswertungen

3.2.3.1 Wahl der Lösung zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen

Es wurde untersucht, ob die Zugabe einer Lösung zum Blockieren von leukozytären Fc-Rezeptoren vor der Immunphänotypisierung erforderlich ist und ob gepooltes hitzeinaktiviertes (56°C; 30 min) Ziegenserum oder humanes Immunglobulin (hIg; Fa. Globuman Berna®, Serum- und Impfinstitut Bern, Schweiz) für diesen Zweck besser geeignet ist.

In zwei Versuchen wurden die mononukleären Zellen (MNCs) und polymorphkernigen Zellen (PMNCs) des Blutes in Parallelansätzen dem, für die Messungen der Zellen des peripheren Blutes in den Hauptversuchen verwendeten, Färbeprotokoll unterzogen (siehe Anhang E), wobei alle Antikörper evaluiert wurden. Hierzu wurden die MNCs und PMNCs des peripheren Blutes zunächst durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten separiert (Histopaque®1119, Fa. Sigma-Aldrig, St. Louis, MO, U.S.A.; Pancoll human 1,077 g/ml, Fa. PAN™ Biotech, Aidenbach, Deutschland) (WUNDERLI und FELSBURG 1989, DANILENKO et al. 1992, SOMBERG et al. 1992). Nach dreimaligem Waschen, das gegebenenfalls (ggf.) einen Schritt zur hypotonen Lyse enthaltener Erythrozyten einschloß, und anschließendem Einstellen der Zellzahl auf 5 x 10^5 Zellen/Meßansatz wurden zunächst die nicht markierten Primärantikörper zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation und zwei Waschschritten zur Entfernung ungebundener Antikörper erfolgte die Zugabe des markierten Sekundärantikörpers, der sich eine weitere 30-minütige Inkubation sowie zwei Waschschritte anschlossen. Schließlich wurde die Bindung der Antikörper an die Zelloberflächenantigene durchflußzytometrisch dargestellt.

Vor dieser Behandlung blieb die Zugabe einer Lösung zum Blockieren entweder aus, oder es wurde humanes Immunglobulin (in einer Konzentration von 10 mg hIg/ml Zellsuspension) bzw. Ziegenserum (in einer Menge von 1/11 der Zellsuspension) zugegeben. Die Dauer der Inkubation mit den Lösungen betrug 5 min bei 4°C.

Ein Vergleich der Meßansätze fand hinsichtlich des Erscheinungsbildes der Zellpopulationen in den durchflußzytometrischen Messungen statt. Zudem wurde die Anfärbbarkeit der Monozyten mit monoklonalen Antikörpern gegen Oberflächenantigene, die durch diesen Zelltyp nicht exprimiert werden, begutachtet und als ein Indikator für die Möglichkeit unspezifischer Bindungen gewertet.

3.2.3.2 Vergleich der Ergebnisse nach direkter und indirekter Immunphänotypisierung

Zur Beurteilung, ob eine Charakterisierung der Lymphozyten durch die fluorochrommarkierten sowie die nicht fluorochrommarkierten Antikörper der identischen Zellklone einander entsprechende Ergebnisse liefern, wurden zehn Messungen nach dem Protokoll der Hauptversuche (siehe Anhang E) durchgeführt, bei denen zusätzliche Färbungen mit den konjugierten gegen CD3 und CD21 gerichteten Antikörpern (Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland) vorgenommen wurden. Die Messungen erfolgten unter Mitführung der entsprechenden Negativkontrollen, bestehend aus einem Ansatz, dem ausschließlich der Sekundärantikörper (Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland) zugegeben wurde, sowie aus Ansätzen mit IgG1-Isotyp-Negativkontrollen. Diese waren entweder nicht oder mit den Fluorochromen wie die zuvor erwähnten Primärantikörper (Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland) markiert.

3.2.3.3 Untersuchung zur Zulässigkeit einer Dreifachfärbung

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden im Rahmen von zwei Messungen der Hauptversuche (siehe Protokoll in Anhang E) zusätzlich einzeln mit den fluorochrommarkierten gegen CD3, CD21 und CD45 gerichteten monoklonalen Antikörpern (Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland) gefärbt und die Ergebnisse mit denen eines Ansatzes verglichen, bei dem die Immunphänotypisierung in einem Röhrchen als Dreifachfärbung erfolgte. Die mit den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen markierten Isotyp-Negativkontrollen (Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland) wurden mitgeführt.

3.2.3.4 Durchflußzytometrische Bestimmung des Anteils lebender Zellen

Im Rahmen einer Messung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Präparation der Blutzellen (siehe Protokoll in Anhang E) eine Kontrolle auf deren Vitalität durchgeführt. Diese erfolgte mithilfe von To-Pro-3® (Fa. Molecular Probes™, Leiden, Niederlande), das sich in die Nukleinsäuren von Zellen mit beschädigter Zellmembran einlagert (ORMEROD 2000). Eine über 16 Stunden mit Paraformaldehyd (PFA; Fa. Merck, Hannover, Deutschland) inkubierte Probe, die zum einen mit aber auch ohne Zugabe von To-Pro-3® gemessen wurde, diente als Positivkontrolle. Durch den Ansatz ohne Zugabe von To-Pro-3® sollte ausgeschlossenen werden, daß das PFA für die Fluoreszenz verantwortlich ist.
Gemessen wurde direkt im Anschluß an das dreimalige Waschen nach der Zellseparation durch Dichtegradientenzentrifugation und nach dem zweimaligen Waschen im Anschluß an die Inkubation mit dem Sekundärantikörper bzw. bei der Positivkontrolle nach dem zweimaligen Waschen (entsprechend dem Waschvorgang zur Entfernung nicht gebundener Antikörper) im Anschluß an die 16-stündige Inkubation mit PFA.
Die bezogene To-Pro-3®-Lösung wurde zunächst mit PBS im Verhältnis 1:800 verdünnt. In jedes Röhrchen erfolgte anschließend die Gabe von zuvor im Verhältnis 1:20 mit BD FACSFlow™ (Fa. BD Biosciences, Erembodegem, Belgien) verdünnter Gebrauchslösung, so daß die Endkonzentration des Fluorochroms 0,25 µg/ml betrug. Gemessen wurde nach 10-minütiger Inkubationsdauer auf dem Fluoreszenzkanal FL-4.

3.2.3.5 Evaluierung der Reinheit der Regionen

CD14 ist ein Oberflächenrezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid (LPS) und LPS-bindendes Protein, den sowohl PMNCs als auch Monozyten nicht jedoch Lymphozyten exprimieren (ABBAS und LICHTMAN 2003).
Zur Erkennung einer Kontamination der, die Lymphozyten beziehungsweise PMNCs enthaltenden, Regionen erfolgte bei zwei Messungen der Hauptversuche (siehe Protokoll in Anhang E) eine zusätzliche Markierung der Blutzellen mit einem, mit kaninem CD14 kreuzreagierenden (JACOBSEN et al. 1993, TIPOLD et al. 1998b), monoklonalen gegen

humanes CD14 gerichteten Antikörper (Fa. Dako, Glostrup, Dänemark). Dieser war mit R-Phycoerythrin markiert. Bewertet wurde der Anteil der CD14-positiven Zellen als Indikator einer Kontamination mit nicht lymphozytären Leukozyten innerhalb der Lymphozytenregion und der Anteil CD14-negativer Partikel innerhalb der PMNC-Region.
In zwei weiteren Messungen erfolgte eine zusätzliche Markierung der MNCs mit dem Alexa Fluor® 647-markierten gegen kanines CD45 gerichteten Antikörper. Diese Messungen dienten der Einschätzung wie viele der CD14-negativen Partikel innerhalb der Lymphozytenregion Leukozyten waren.

3.2.3.6 Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der Regionen von Lymphozyten und polymorphkernigen Zellen

Um die Einflüsse von unterschiedlichen Techniken zur Festlegung der Regionen auf die Ergebnisse der Auswertung erkennen zu können, wurden die Werte nach sehr engem und sehr großzügigem Setzen der Grenzen verglichen.
Zudem wurde untersucht, ob die Zuhilfenahme der CD3-Expression bzw. der Nichtexpression des CD14-Markers zur Festlegung der Lymphozytenregion bezüglich der Anteile der unterschiedlichen Lymphozytensubpopulationen einander entsprechende Ergebnisse liefern.

3.2.3.7 Bestimmung der Konstanz der Messungen und Auswertungen

Zur Beurteilung wie konstant die Messungen und deren Auswertungen waren, wurden die Lymphozyten des Blutes von fünf Hunden exemplarisch bezüglich ihrer Expression der Oberflächenantigene CD3 und CD21 jeweils in drei Parallelansätzen gemessen. Die Messungen und Auswertungen erfolgten nach dem Protokoll der Hauptversuche (siehe Anhang E). Ein Vergleich der Werte schloß sich an.

3.2.4 Hauptversuche

3.2.4.1 Immunphänotypisierung der Leukozyten des peripheren Blutes

Die Immunphänotypisierung der Leukozyten des peripheren Blutes wurde am Tag der Blutentnahme vorgenommen. Bis zur Messung lagerten die Proben für maximal vier Stunden bei Raumtemperatur.
Sämtliche Färbungen wurden nach der Methode der indirekten Membranimmunfluoreszenz durchgeführt. Der Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen dienten unmarkierte murine gegen kanines CD3, T-Zell-Rezeptor (TCR) α/β, TCRγ/δ, CD4, CD8α, CD21 und CD45RA gerichtete monoklonale Antikörper (Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland bzw. durch Herrn Prof. Dr. P. F. Moore, University of California, Davis, CA, U.S.A., zur Verfügung gestellt). Die polymorphkernigen Blutzellen wurden mittels ebenfalls nicht markierter muriner gegen kanines CD11a, CD11b und CD11c gerichteter monoklonaler Antikörper (Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland bzw. durch Herrn Prof. Dr. P. F. Moore, University of California, Davis, CA, U.S.A., zur Verfügung gestellt) untersucht. Für beide Zellsuspensionen wurden zum Ausschluß unspezifischer Bindungen entsprechende Negativkontrollen mitgeführt, die zum einen aus den Isotyp-Negativkontrollen (murines IgG1 und IgG2a; Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland) und zum anderen aus den Kontrollen mit alleiniger Zugabe des Sekundärantikörpers (R-Phycoerythrin (RPE)-konjugierter Ziege anti-murines IgG-Antikörper, Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland) bestanden.

Zunächst wurden die MNCs und PMNCs durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten separiert. Das angegebene Protokoll orientiert sich an einer Beschreibung der Technik von WUNDERLI und FELSBURG (1989), modifiziert durch SOMBERG et al. (1992), unter Einbeziehung der von DANILENKO et al. (1992) beschriebenen Methode. Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Schritte bietet der Anhang E.

Mittels Histopaque® 1119 (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) und Pancoll human 1,077 g/ml (Fa. PAN™ Biotech, Aidenbach, Deutschland) wurde ein Dichtegradient erstellt

über den das EDTA-Blut nach 1:2 Verdünnung mit PBS geschichtet wurde. Nach Zentrifugation (700 x g; 35 min; 20°C; Beschleunigung/Bremse: 1) konnte die Population der mononukleären Zellen, die über der Phase mit der Dichte von 1077g/l zu liegen kam, sowie die der polymorphkernigen Zellen, die über und teilweise in der Phase mit der Dichte von 1119 g/l lag, geerntet werden (siehe Abb. 3.1).

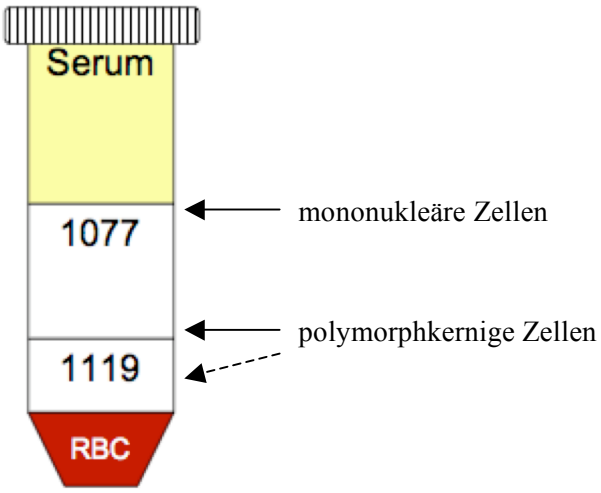


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Phasen nach Dichtegradientenzentrifugation des peripheren Blutes: Die Fraktion der mononukleären Zellen kommt über der Phase mit der Dichte von 1077 g/l zu liegen. Die polymorphkernigen Zellen liegen über und teilweise in der Phase mit der Dichte von 1119 g/l (RBC = rote Blutkörperchen)

Es schlossen sich drei Waschschritte mit PBS an. Die erste und dritte Zentrifugation erfolgte bei 170 x g und 20°C für 10 Minuten, die zweite bei 250 x g und 20°C für ebenfalls 10 Minuten. Anstelle der PBS wurde der Suspension der PMNCs nach der ersten Zentrifugation zum Zwecke einer hypotonen Lyse von roten Blutkörperchen zunächst tridestilliertes Wasser zugegeben, um dann nach zweimaligem behutsamen Schwenken mit der gleichen Menge doppelt konzentrierter PBS aufgefüllt zu werden. Ein entsprechender Lyseschritt wurde bei den MNCs durchgeführt sofern eine makroskopisch erkennbare Erythrozytenkontamination vorlag.

In der Folge wurde die Zahl der in den Suspensionen enthaltenen lebenden Zellen lichtmikroskopisch bestimmt. Die Zellsuspensionen wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit Trypan Blau (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) verdünnt und nach 3-minütiger Inkubation in einer Türk-Zählkammer (Fa. Brand, Wertheim, Deutschland) auf den Gehalt an Zellen untersucht, die wegen ihrer intakten Zellmembran den blauen Farbstoff nicht angenommen hatten.

Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit der Elektrolytlösung CellWASH (Fa. BD Biosciences, Erembodegem, Belgien) auf einen Gehalt von $5x10^5$ Zellen/50 µl eingestellt.

Für die folgende Markierung der Zellen mit den monoklonalen Antikörpern wurden $5x10^5$ Zellen/Antikörper verwendet. Das Protokoll entspricht in leicht abgewandelter Form dem von STEIN et al. (2004) beschriebenen. Eine ausführliche Beschreibung der Einzelschritte liefert der Anhang E.

Aufgrund der Resultate der Vorversuche wurden zunächst die Fc-Rezeptoren blockiert, im Falle der MNC-Suspension mit humanem Immunglobulin (Konzentration: 10 mg hIg/ml Suspension), bei der PMNC-Suspension mit gepooltem hitzeinaktivierten (56°C; 30 min) Ziegenserum (Menge: 1/11 der Suspension). Nach Abwarten von fünf Minuten folgte nach Zugabe der Primärantikörper und Isotyp-Negativkontrollen eine 30-minütige Inkubation bei 4°C in Dunkelheit.
Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper schlossen sich zwei Waschschritte (200 x g; 6 min; 20°C) mit CellWASH an, denen den vorherigen Inkubations- und Waschvorgängen entsprechende Schritte nach Zugabe des Sekundärantikörpers folgten.

Die Verdünnungen der Antikörperlösungen sind in Tabelle 3.6 aufgeführt.

Tab. 3.6: Übersicht der verwendeten Verdünnungen der Antikörperlösungen

Antikörperspezifität	Verdünnung
kanines CD3; kanines CD11a	1:300
kanines CD4	1:3
übrige Oberflächenantigene	1:6
murines IgG ($F(ab')_2$-Fragment)	1:200

Unmittelbar nach dem zweiten Waschschritt zur Entfernung des ungebundenen Sekundärantikörpers wurde die Zellsuspension im Verhältnis 2:5 mit BD FACSFlow™ (Fa. BD Biosciences, Erembodegem, Belgien) verdünnt. Es folgte die durchflußzytometrische Messung (FACSCalibur™ (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) unter Verwendung der Software BD CellQuest™ Pro Version 5.2.1 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)).

Die Einstellungen des Durchflußzytometers gibt die Tabelle 3.7 wider.

Tab. 3.7: Übersicht der für die durchflußzytometrischen Messungen der Zellen des peripheren Blutes verwendeten Einstellungen

Anzahl der gemessenen Events/Röhrchen	10000
Meßrate	≤ 600 Events/Sekunde
Minimalwert (*Threshold*) im Vorwärtsstreulicht, ab dem die Events registriert wurden	325
Verstärkungsmodus des Signals des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes	linear
Verstärkungsmodus des Signals des FL-2-Fluoreszenzkanals	logarithmisch
Kompensation	• FL-2 – 22,7 % FL-1 • FL-2 – 0 % FL-3

3.2.4.2 Auswertung der Messungen der Zellen des peripheren Blutes

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der Software BD CellQuest™ Pro Version 5.2.1. Zur Auswertung einer jeden Messung wurden Regionen festgelegt. Bei den Messungen der MNCs war dies die Region, die die Lymphozyten enthält. Die Festlegung erfolgte durch Bestimmung der CD3-positiven Zellen unter Berücksichtigung der Lage in dem die Charakteristika des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes darstellenden *Dot Plot*. Bei der Messung der PMNCs wurde die Region anhand der Charakteristika des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes bestimmt.
Für die Lymphozyten wurde der Anteil der für das jeweilige Oberflächenmolekül positiven Zellen innerhalb der Region untersucht. Bei den PMNCs wurde ermittelt, wie stark die Fluoreszenzintensität der Integrin-exprimierenden Zellen war. Die Intensität wurde als Maß für die Menge an exprimiertem Antigen gewertet. Die Beschreibung der Fluoreszenzintensität einer Probe erfolgte durch den Median der gemessenen Intensitäten der das Integrin exprimierenden Zellen.
Zur Entscheidung, ab welcher Intensität eine gemessene Zelle als positiv eingestuft wurde, wurde anhand der Negativkontrollen ein *Cut-off* bestimmt. Die Festlegung des *Cut-offs* beruhte auf der Kurvenform der Negativkontrollen und ließ zu, daß maximal 2 % der Zellen im positiven Bereich lagen.
Bei Übertragen dieses Wertes auf die Messungen der markierten Zellen wurde die Form der Kurven, die die Expression der Oberflächenantigene darstellt, in dem Sinne berücksichtigt, daß der *Cut-off* nicht inmitten einer deutlichen Zellpopulation zu liegen kam (siehe Abb. 3.2).

Da für die Negativkontrollen bis zu 2 % positive Zellen akzeptiert werden, erfolgte zur Berechnung der Verhältnisse der Lymphozytensubpopulationen das Aufrunden der Werte von < 2 % auf 2 %.

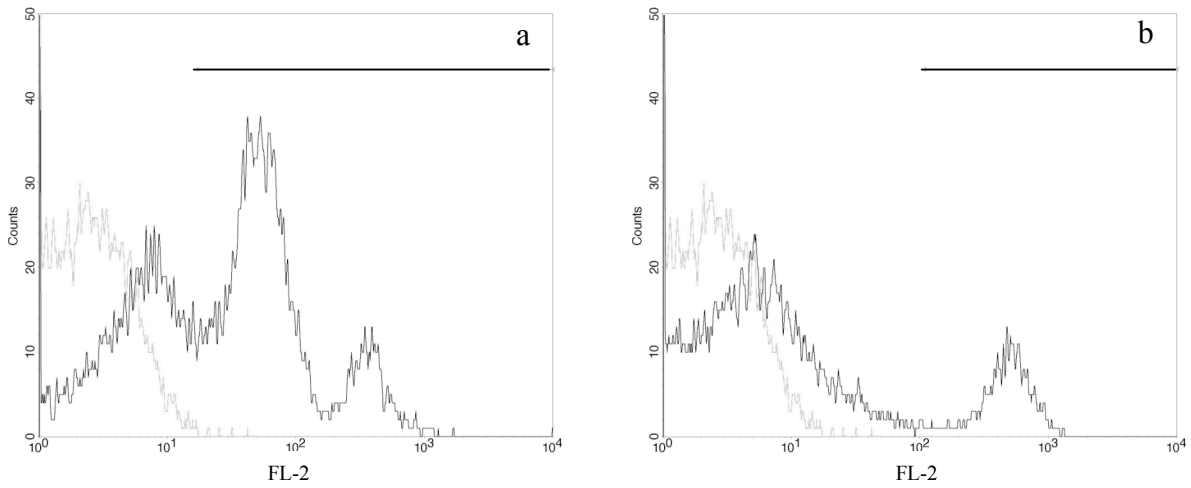


Abb. 3.2: Darstellung der Fluoreszenzintensität der Lymphozyten des peripheren Blutes nach indirekter Immunphänotypisierung als *Histogram Plot*. Die graue Kurve resultiert aus dem Einsatz der IgG1-Isotyp-Negativkontrolle als Primärantikörper, die schwarze Kurve in (a) aus dem des monoklonalen gegen kanines CD3 gerichteten Antikörpers, in (b) aus dem des monoklonalen gegen kanines CD21 gerichteten Antikörpers. Der schwarze Querbalken gibt den Bereich an, in dem die CD3- bzw. CD21-positiven Zellen liegen

3.2.4.3 Immunphänotypisierung der Leukozyten der Gehirnrückenmarksflüssigkeit

Die Charakterisierung der weißen Blutzellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit fand zur Minimierung der Zellverluste unmittelbar im Anschluß an die Gewinnung des Liquors statt.
In Abhängigkeit von der gezählten Anzahl von Leukozyten wurde die Expression der Oberflächenantigene CD3, CD21, CD45, CD4, CD8α sowie CD11b, CD11a und CD11c bestimmt. Die gegen CD3, CD21 und CD45 gerichteten monoklonalen Antikörper waren mit Fluorochromen konjugiert (Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland) und wurden gemeinsam in einer Dreifachfärbung verwendet. Bei einem deutlich erhöhten Gehalt an weißen Blutzellen wurden die Zellen zusätzlich hinsichtlich ihrer Expression der weiteren Oberflächenmarker nach der Methode der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Stets erfolgte das Mitführen angemessener Negativkontrollen. Sie bestanden, sofern nur auf das Vorhandensein CD3-, CD21- und CD45-positiver Zellen untersucht wurde, aus den mit entsprechenden Farbstoffen markierten Isotyp-Negativkontrollen (Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland), die gemeinsam

in einer Dreifachfärbung angewendet wurden. Wurden die Proben zusätzlich mit unmarkierten Primärantikörpern behandelt, so wurde mittels eines weiteren Ansatzes, dem allein der Sekundärantikörper zugegeben wurde, dessen unspezifische Bindung ausgeschlossen.

Die Markierung geschah, wie im Folgenden beschrieben in Anlehnung an das von TIPOLD et al. (1998) beschriebene Protokoll.
Zunächst wurde der Liquor bei 200 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte die Resuspension des Zellpellets in der Elektrolytlösung CellWASH in einer Menge von 50 µl/Meßansatz. War unter Einbeziehung des bei der Liquordiagnostik ermittelten Zellgehaltes eine Konzentration von > 5 x 10^5 Zellen/50µl Zellsuspension zu erwarten, so wurde die Suspension durch Zugabe von CellWASH auf diesen Wert eingestellt. Anschließend wurde zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen den Proben, die der Messung der Lymphozytensubpopulationen dienten, humanes Immunglobulin in einer Konzentration von 10 mg/ml Zellsuspension und den Proben zur Messung der Integrinexpression gepooltes hitzeinaktiviertes (56°C; 30 min) Ziegenserum in einer Menge von 1/10 der Zellsuspension zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 5 Minuten wurden die Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:6 hinzupipettiert. Wurden zudem die nicht markierten Antikörper eingesetzt, so entsprachen die Verdünnungen (inklusive der des Sekundärantikörpers) denen, die bei der Charakterisierung der Zellen des Blutes verwendet wurden (siehe Tab. 3.6). Der 15-minütigen Inkubation bei 4°C in Dunkelheit folgten zwei Waschschritte (200 x g; 6 min; 20°C). Die mit konjugierten Primärantikörpern behandelten Proben wurden nun nach Verdünnung von 2:5 mit BD FACSFlow™ im Durchflußzytometer gemessen. Den mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz untersuchten Proben wurde nach dem Waschen der Sekundärantikörper zugegeben. Die sich anschließenden Inkubations- und Waschschritte entsprachen denen, die zuvor bei Behandlung mit den Primärantikörpern verwendet wurden. Auch die Verdünnung der Zellsuspension mit BD FACSFlow™ erfolgte, wie dies für die Proben mit den konjugierten Primärantikörpern beschrieben wurde. Die durchflußzytometrische Messung schloß sich an.

Die Einstellungen des Durchflußzytometers sind in Tabelle 3.8 aufgeführt.

Tab. 3.8: Übersicht der für die durchflußzytometrischen Messungen der Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit verwendeten Einstellungen

Anzahl der gemessenen Events/Röhrchen	maximal mögliche Menge
Meßrate	≤ 600 Events/Sekunde
Minimalwert (*Threshold*) im Vorwärtsstreulicht, ab dem die Events registriert wurden	325
Verstärkungsmodus des Signals des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes	linear
Verstärkungsmodus der Signale der Fluoreszenz-kanäle FL-1, FL-2 und FL-4	logarithmisch
Kompensation	• FL-1 – 1,5 % FL-2 • FL-2 – 24,1 % FL-1 • FL-2 – 0 % FL-3 • FL-4 – 14,3 % FL-3

3.2.4.4 Auswertung der Messungen der Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der Software BD CellQuest™ Pro Version 5.2.1. Zu diesem Zweck wurden Regionen festgelegt, in denen die Lymphozyten bzw. die PMNCs lagen. Dieses geschah anhand der CD45-Expression unter Berücksichtigung der Lage in der das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht berücksichtigenden Darstellung im *Dot Plot.*

Für die Lymphozyten wurde der Anteil der für das jeweilige Oberflächenmolekül positiven Zellen (bezogen auf den Anteil CD45-positiver Zellen) innerhalb der Region untersucht. Für die Anteile der CD4- und CD8α-exprimierenden Lymphozyten fand eine Bewertung lediglich hinsichtlich ihres Verhältnisses zueinander statt. Bei den PMNCs wurde ermittelt, wie stark die Fluoreszenzintensität der Integrin-exprimierenden Zellen war. Die Intensität wurde als Maß für die Menge an exprimierten Integrinen gewertet. Die Fluoreszenzintensität einer Probe bezüglich eines Oberflächenmoleküls wurde durch den geometrischen Mittelwert der gemessenen Intensitäten der das Integrin exprimierenden Zellen ausgedrückt.

Die Lage des *Cut-offs*, der den Intensitätswert darstellt, ab dem eine Zelle als für einen Oberflächenmarker positiv gewertet wird, wurde anhand der Negativkontrollen derart

festgelegt, daß maximal 2 % der Events im positiven Fluoreszenzbereich lagen. In Ausnahmefällen wurde bei einer insgesamt geringen Anzahl von Events ein höherer Wert akzeptiert. Die Voraussetzung hierfür war, daß die positiven Events der Negativkontrolle, im Gegensatz zu denen nach Antikörperfärbung, eine unregelmäßige Verteilung bezüglich ihres Fluoreszenzverhaltens aufwiesen (siehe Abb. 3.3).

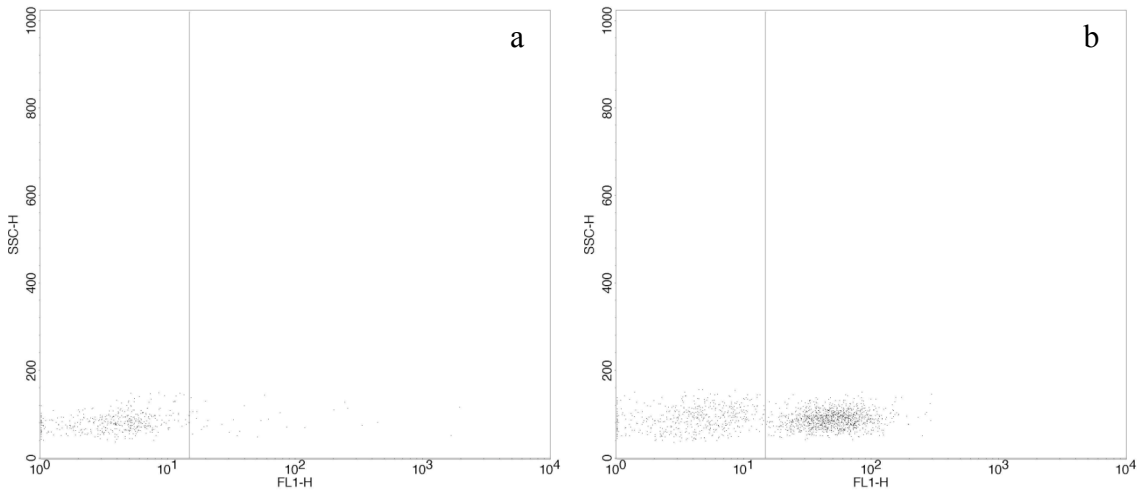


Abb. 3.3: Darstellung der Ergebnisse einer durchflußzytometrischen Messung nach direkter Immunphänotypisierung von Lymphozyten der Gehirnrückenmarksflüssigkeit als *Dot Plots*. Der *Dot Plot* (a) ist das Ergebnis der Markierung der Zellen mit der Fluorescein Isothiozyanat (FITC)-konjugierten IgG1-Isotyp-Negativkontrolle, der *Dot Plot* (b) das der Markierung mit dem FITC-konjugierten gegen kanines CD3 gerichteten monoklonalen Antikörper. Die rechts des senkrechten Strichs gelegenen Zellen wurden als CD3-positiv, die links davon als CD3-negativ gewertet.

3.2.5 Statistische Auswertung

Die Deskription der Meßwerte sowie deren graphische Darstellung in Form von *Box-and-Whisker-Plots* (im Folgenden als *Box Plots* bezeichnet) erfolgte mithilfe des Computerprogrammes WinSTAT® (Fa. R. Fitch Software, Bad Krozingen, Deutschland).

Die Planung der statistischen Berechnungen erfolgte am Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Für die Berechnungen wurde das Statistikprogramm SPSS 14.0 (Fa. SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.) verwendet. Zunächst wurden die Werte der einzelnen Parameter einer jeden Gruppe

hinsichtlich ihrer linearen und logarithmischen Normalverteilung überprüft. Es schloß sich der Wilcoxon-Test für zwei unabhängige Stichproben (= U-Test) an, um Vergleiche zwischen den Gruppen der an SRMA erkrankten Hunden zum Aufdecken signifikanter Unterschiede anstellen zu können. Zudem wurde untersucht, ob sich diese beiden Gruppen von den übrigen signifikant unterscheiden. Für die Vergleiche zwischen Meßwerten aus Blut und Liquor fand der Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben Anwendung. Mithilfe der Spearman-Rangkorrelation wurden mögliche Korrelationen zwischen einzelnen Parametern, zum einen innerhalb der gesamten Stichprobe sowie auch in den Gruppen „SRMA mit Symptomen“ und „SRMA-Verlaufskontrollen“, analysiert.

Bei der Bewertung von Unterschieden und Korrelationen als signifikant wurde eine vergleichsbezogene Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\ \%$ ($p < 0{,}05$) akzeptiert. Als hochsignifikant wurden p-Werte $< 0{,}01$ erachtet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Vorversuche

4.1.1 Wahl der Lösung zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen

Wurde humanes Immunglobulin bei der Immunphänotypisierung von MNCs verwendet, so kam es zu keinen unspezifischen Bindungen von Antikörpern an Monozyten. Nach Blockade mit gepooltem hitzeinaktivierten Ziegenserum beziehungsweise bei Unterlassen des Blockadeschrittes wurden gegen CD3, CD8α und TCRγ/δ gerichtete Antikörper sowie im letzteren Fall der Sekundärantikörper an Monozyten gebunden. Aufgrund dieser Resultate wurde in den Hauptversuchen für die mononukleäre Zellen das humane Immunglobulin verwendet.

Im Unterschied hierzu wiesen polymorphkernige Zellen im Falle einer vorherigen Inkubation mit humanem Immunglobulin eine merklich verstärkte Fluoreszenz gegenüber den Ansätzen, denen keine Lösung bzw. Ziegenserum zur Blockade zugesetzt wurde, auf. Zudem änderte sich die Morphologie der PMNCs nach Blockade mit dem humanen Immunglobulin im Vergleich zu der ohne Zusatz einer Lösung bzw. bei Verwendung von Ziegenserum (siehe Abb. 4.1).

Aus diesem Grund wurden die polymorphkernigen Zellen vor der Immunphänotypisierung mit gepooltem hitzeinaktiviertem Ziegenserum inkubiert.

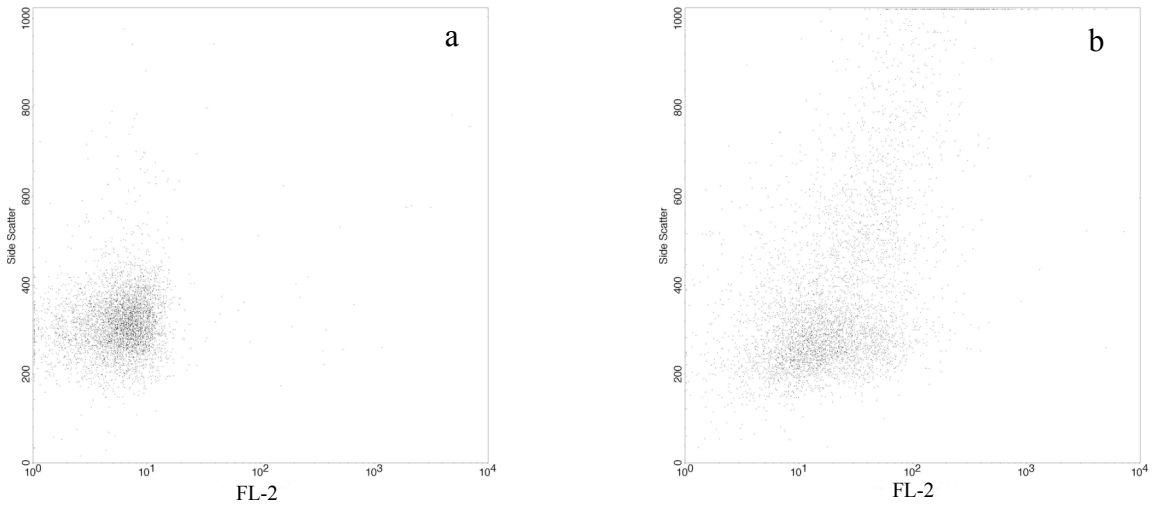


Abb. 4.1: Ergebnis der indirekten Immunphänotypisierung von polymorphkernigen Zellen des peripheren Blutes mit der IgG1-Isotyp-Negativkontrolle nach Vorinkubation (a) mit gepooltem hitzeinaktivierten Ziegenserum (b) mit humanem Immunglobulin (x-Achse: Fluoreszenzintensität FL-2-Kanal, logarithmisch; y-Achse: Fluoreszenzintensität Seitwärtsstreulicht, linear).

4.1.2 Vergleich der Ergebnisse nach direkter und indirekter Immunphänotypisierung

Die Ergebnisse nach Verwendung der fluorochrommarkierten und nicht markierten gegen CD3 und CD21 gerichteten Antikörper, die jeweils von einem identischen Klon stammen, sind in der Tabelle 4.1 aufgeführt. Im Mittel war ein Unterschied für den Anteil der T-Lymphozyten von 5,1 % mit einer Standardabweichung (SD) von 3,18 % zu verzeichnen. Der arithmetische Mittelwert für die Differenz der Anteile der B-Lymphozyten betrug 3,25 % (SD = 3,49 %). Die Werte für das Verhältnis der CD3- zu CD21-positiven Lymphozyten weichen im arithmetischen Mittel um 2,0 (SD = 2,13) voneinander ab. In keiner der Messungen kam es zu einer Umkehr des Verhältnisses von T- zu B-Zellen.

Tab. 4.1: Ergebnisse der Messungen zur Bewertung der Vergleichbarkeit von direkter und indirekter Immunphänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes

Probanden	CD3 [%]	CD3FITC [%]	CD21 [%]	CD21RPE [%]	CD3 [%] : CD21 [%]	CD3FITC [%] : CD21RPE [%]
Hund A	75,55	79,94	9,00	10,11	8,39	7,91
Hund B	60,97	67,96	8,64	14,88	7,06	4,57
Hund C	65,22	68,01	10,62	12,10	6,14	5,62
Hund D	81,10	78,70	7,87	7,12	10,30	11,05
Hund E	95,00	91,46	9,01	20,29	10,54	4,51
Hund F	65,46	72,08	7,76	12,16	8,44	5,93
Hund G	77,32	79,03	7,26	7,57	10,65	10,44
Hund H	71,33	74,60	12,16	16,93	5,87	4,41
Hund I	67,90	75,01	6,28	4,65	10,81	16,13
Hund J	73,04	85,26	3,16	3,66	23,11	23,30

FITC = Fluorescein Isothiozyanat; RPE = R-Phycoerythrin

4.1.3 Untersuchung zur Zulässigkeit einer Dreifachfärbung

Mithilfe der beiden Messungen wurde untersucht, ob sich die markierten Primärantikörper der Spezifitäten CD3, CD21 und CD45 bei Anwendung in einer Dreifachfärbung gegenseitig inhibieren oder zu einer vermehrten Bindung führen.

Die Tabelle 4.2 stellt die Ergebnisse dar. Wegen der Differenzen von maximal 3,31 % wurde es als zulässig erachtet, die Immunphänotypisierung der Lymphozyten der Gehirnrückenmarksflüssigkeit in einer Dreifachfärbung vorzunehmen.

Tab. 4.2: Ergebnisse zweier voneinander unabhängiger Messungen von Lymphozyten des peripheren Blutes: Färbung mit den markierten Antikörpern allein sowie mit den drei markierten Antikörpern in einem Meßansatz

Probanden	CD3FITC in Einfach-färbung [%]	CD3FITC in Dreifach-Färbung [%]	CD21RPE in Einfach-färbung [%]	CD21RPE in Dreifach-Färbung [%]	CD45 Alexa Fluor® 647 in Einfach-färbung [%]	CD45 Alexa Fluor® 647 in Dreifach-Färbung [%]
Hund A	79,94	76,63	10,11	12,53	89,01	90,15
Hund B	67,96	67,49	14,88	15,16	93,48	94,62

FITC = Fluorescein Isothiozyanat; RPE = R-Phycoerythrin

4.1.4 Durchflußzytometrische Bestimmung des Anteils lebender Zellen

Sowohl zum Zeitpunkt der Zugabe des Primärantikörpers als auch zum Zeitpunkt der durchflußzytometrischen Messungen waren > 99 % der Lymphozyten und polymorphkernigen Zellen vital.

4.1.5 Evaluierung der Reinheit der Regionen

In der Lymphozytenregion wurden bei den beiden Messungen 0,68 % bzw. 0,34 % CD14-positive Zellen gemessen. Die Phänotypisierung mit dem markierten gegen CD45 gerichteten Primärantikörper lieferte 89,08 % bzw. 91,95 % für den Panleukozytenmarker positive Partikel. Dieses Ergebnis erlaubt den Schluß, daß die Kontamination der Lymphozytenregion mit Monozyten und Granulozyten, als CD14-positive Zellen, minimal war. Zudem zeigen diese Ergebnisse, daß etwa 10 % der gemessenen Partikel nicht leukozytär waren.

Die Region der polymorphkernigen Zellen enthielt 99,15 % bzw. 99,45 % CD14-positive Zellen.

4.1.6 Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der Regionen von Lymphozyten und polymorphkernigen Zellen

Durch die Untersuchung zum Einfluß der Kriterien, anhand derer die Regionen der Lymphozyten und polymorphkernigen Zellen festgelegt wurden, sollte gezeigt werden, ob und wenn ja in welchem Maße Variationen beim Setzen der Regionen Auswirkungen auf die Ergebnisse haben. Die Abbildung 4.2 zeigt die Lage der unterschiedlich gesetzten Regionen der polymorphkernigen Zellen.

Die folgende Tabelle 4.3 stellt die Werte exemplarisch für die CD3- und die CD21-Expression dar. Die für durchflußzytometrische Messungen akzeptable Differenz von maximal 2,91 % zeigt, daß diese unvermeidbaren Variationen bei Bestimmung der Lage der Regionen zu vernachlässigende Auswirkungen auf die Ergebnisse der Auswertung haben.

Tab. 4.3: Ergebnisse der Messung nach Bestimmung der Lymphozytenregion des peripheren Blutes anhand unterschiedlicher Kriterien

	Anteil CD3-positiver Lymphozyten [%]	**Anteil CD21-positiver Lymphozyten [%]**
Festlegung anhand der CD3-Expression	92,05	5,33
Festlegung anhand des Fehlens der CD14-Expression	92,56	5,25
Festlegung einer engen Region nach rein morphologischen Kriterien	94,35	5,36
Festlegung einer weiten Region nach rein morphologischen Kriterien	91,44	5,20

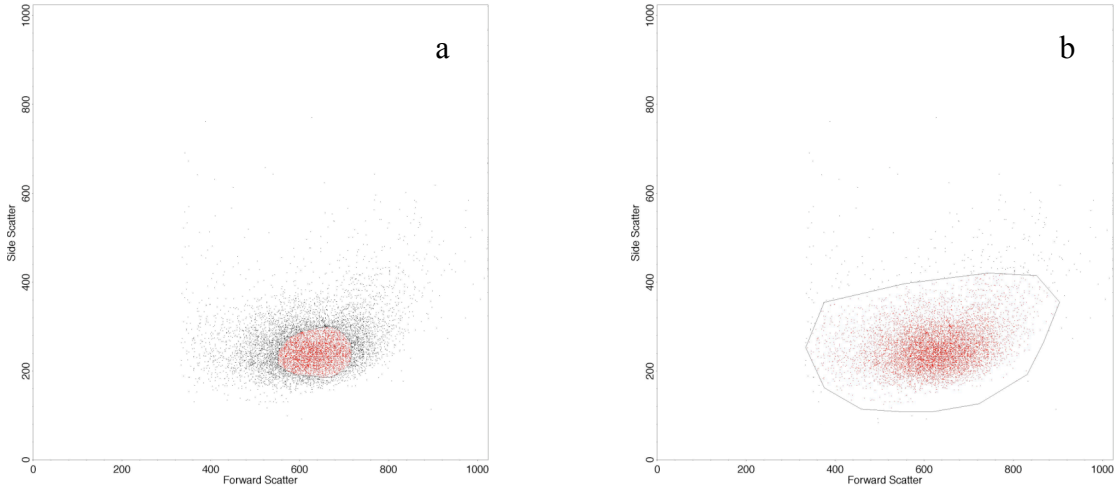


Abb. 4.2: Lage der die polymorphkernigen Zellen des peripheren Blutes enthaltenden Region nach enger (a) und großzügiger (b) Festlegung (x-Achse: Fuoreszenzintensität Vorwärtsstreulicht, linear; y-Achse: Fuoreszenzintensität Seitwärtsstreulicht, linear)

Die Tabelle 4.4 enthält die Resultate für das Ausmaß der Integrinexpression nach enger bzw. großzügiger Festlegung der Region, die die polymorphkernigen Zellen enthält. Wie schon für die Lymphozytenregion gezeigt werden konnte, sind auch in diesem Fall nur geringe Abweichungen festzustellen.

Tab. 4.4: Übersicht der Ergebnisse der Messung von Abbildung 4.2 nach enger bzw. weiter Festlegung der die polymorphkernigen Zellen des peripheren Blutes enthaltenden Region (Angabe als Median der Fluoreszenz der für das Integrin positiven Zellen)

	CD11a [Fluroreszenz-intensität]	**CD11b [Fluroreszenz-intensität]**	**CD11c [Fluroreszenz-intensität]**
enge Region	214,80	1762,36	143,30
weite Region	210,97	1730,94	138,24

bzw. = beziehungsweise

4.1.7 Bestimmung der Konstanz der Messungen und Auswertungen

Die Tabelle 4.5 stellt die Ergebnisse des Vergleichs der drei Parallelmessungen von insgesamt fünf Hunden dar, mit deren Hilfe die Konstanz der Messungen und Auswertungen beispielhaft für den Anteil von T- und B-Lymphozyten im peripheren Blut bestimmt wurde.

Tab. 4.5: Ergebnisse des Vergleichs von drei Parallelmessungen bezüglich des Anteils von T- und B-Zellen, die jeweils vom peripheren Blut von fünf Hunden durchgeführt wurden

Probanden	Anteil CD3-positiver Lymphozyten			Anteil CD21-positiver Lymphozyten		
	Arith. M. [%]	SD [%]	rel. VK (%)	Arith. M. [%]	SD [%]	rel. VK (%)
Hund A	92,80	0,68	0,42	5,99	0,90	8,71
Hund B	73,04	2,33	1,84	3,16	0,37	6,81
Hund C	71,33	4,17	3,38	12,16	1,58	7,52
Hund D	67,88	1,78	1,51	6,28	0,91	8,41
Hund E	77,32	2,21	1,65	7,26	1,11	8,83

Arith. M. = arithmetischer Mittelwert; rel. VK = relativer Variationskoeffizient; SD = Standardabweichung

4.2 Hauptversuche

4.2.1 Immunphänotypisierung der Leukozyten des peripheren Blutes

Bei der Auswertung der Messungen zur Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen wurde der Anteil der für das jeweilige Oberflächenmolekül positiven Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der Events innerhalb der Region gewertet. Mithilfe dieser Werte sowie der Anzahl der Lymphozyten pro Mikroliter Blut (Bestimmung im Rahmen der hämatologischen Laboruntersuchung) erfolgte zudem die Berechnung der absoluten Zahl der Lymphozytensubtypen in einem Mikroliter Blut.

Im Falle der Markierung der Integrine CD11a, CD11b und CD11c war die Quantität der Expression von Interesse. Aus diesem Grund wurde der Median der Fluoreszenzintensitäten aller das Integrin exprimierender polymorphkerniger Zellen gewertet.

Die Meßergebnisse der Einzeltiere sind in den Tabellen der Anhänge C und D dargestellt.

4.2.1.1 Immunphänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes

4.2.1.1.1 T-Zellmarker

4.2.1.1.1.1 CD3

Die Ergebnisse aller Messungen zum Anteil CD3-exprimierender Lymphozyten des peripheren Blutes liegen in einem Bereich von 58,58 % bis 96,53 % (Median: 82,29 %). Die absolute Zahl CD3-positiver Lymphozyten pro Mikroliter Blut befindet sich bei sämtlichen Messungen zwischen 144/µl und 4776/µl mit einem Median von 1594/µl.

Bei Vergleich der Mediane des prozentualen Anteils CD3-positiver Lymphozyten zeigen die Gruppen „Gesunde“, „SRMA mit Symptomen“ und „Rückenmarkstraumata“ mit Werten um 85 % den höchsten Anteil von T-Zellen. Die Mediane der Tiergruppen „idiopathische Epilepsie“, „Entzündungen“ und „Neoplasien“ sind mit etwa 80 % die niedrigsten (siehe Abb. 4.3).

Für den Anteil der CD3-positiven Lymphozyten ergibt der Vergleich der Gruppen „SRMA mit Symptomen“ und „SRMA-Verlaufskontrollen“ miteinander sowie mit den übrigen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede (p-Wert > 0,05).

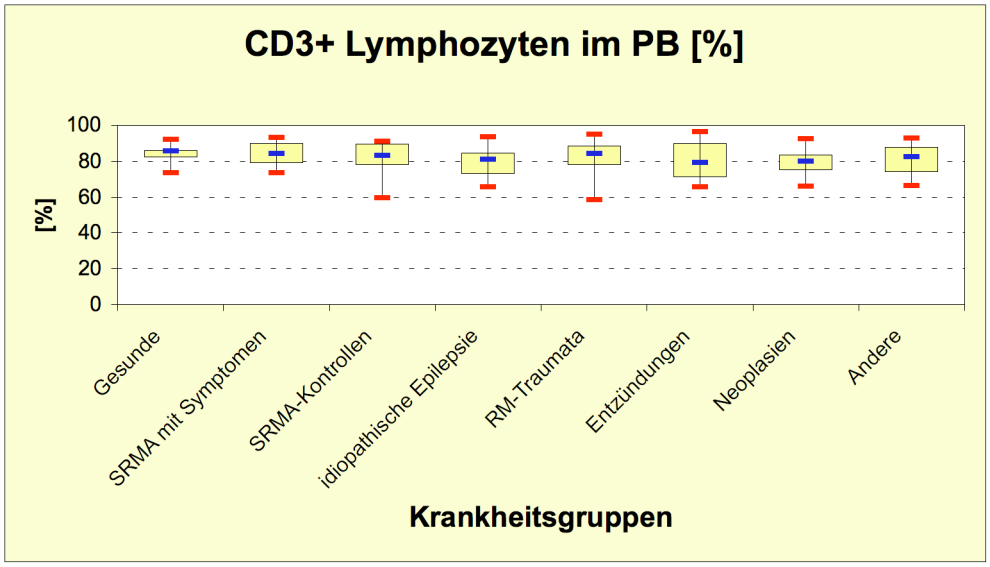


Abb. 4.3: Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung von Lymphozyten des peripheren Blutes mit einem monoklonalen gegen CD3 gerichteten Antikörper (PB = peripheres Blut, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*,) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil.)

Werden die Mediane der absoluten Werte verglichen, so liegen die der Gruppen „Gesunde“, „SRMA mit Symptomen“, „SRMA-Verlaufskontrollen“ und „idiopathische Epilepsie“ mit ≥ 1800/µl über den übrigen, deren Mediane sich in einem Bereich von etwa 1200/µl bis 1500/µl befinden (siehe Abb. 4.4).

Für die absolute Zahl der CD3-positiven Lymphozyten ergibt der Vergleich der Gruppen „SRMA mit Symptomen“ und „SRMA-Verlaufskontrollen“ miteinander sowie mit den übrigen Gruppen keine signifikanten Unterschiede (p-Wert > 0,05).

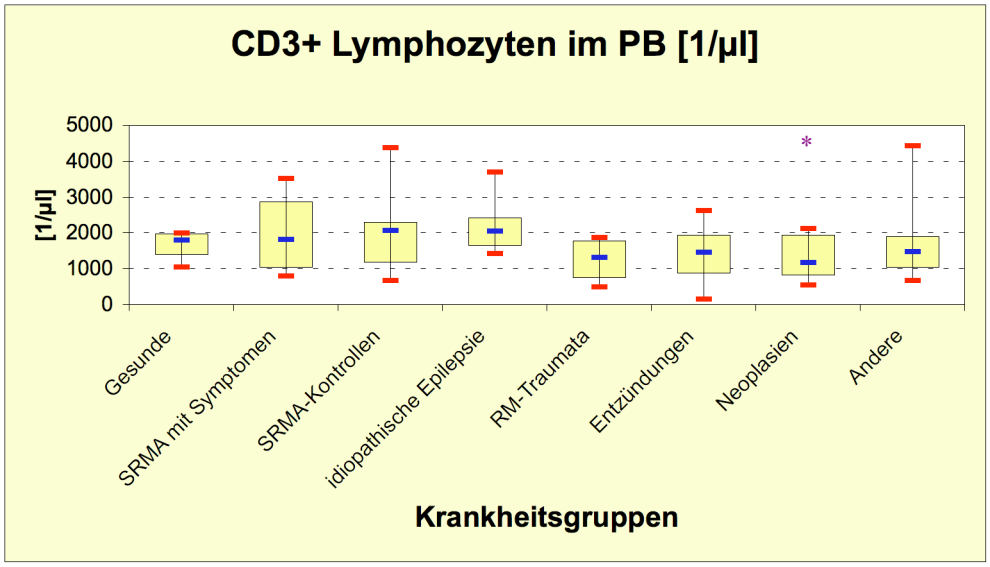


Abb. 4.4: Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes mit einem monoklonalen gegen CD3 gerichteten Antikörper. (PB = peripheres Blut, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Der außerhalb der Spannweitenlinie gelegene Wert (*) wurde als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

4.2.1.1.1.2 T-Zell-Rezeptor α/β

Die Werte aller Proben, die den Anteil der für den T-Zell-Rezeptor α/β positiven Zellen innerhalb der Lymphozytenregion angeben, liegen zwischen 50,69 % und 89,47 % mit einem Median von 73,79 %. Nach Berechnung der in einem Mikroliter Blut enthaltenen Lymphozyten, die diesen Rezeptor exprimieren, ergibt sich eine Streuung im Bereich von 132/µl bis 3400/µl (Median: 1341/µl).

Der Vergleich der Meßwerte zwischen den Krankheitsgruppen zeigt, daß der Median bei den vier Gruppen „Gesunde“, „SRMA mit Symptomen“, „SRMA-Verlaufskontrollen“ und „Neoplasien“ in einem Bereich zwischen 71 % und 73 % positiver Lymphozyten liegt.

Für den Anteil der Lymphozyten, die den T-Zell-Rezeptor α/β exprimieren, ergibt der Vergleich der Gruppen „SRMA mit Symptomen“ und „SRMA-Verlaufskontrollen“

miteinander sowie mit den übrigen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede (p-Wert > 0,05).

Die Medianwerte nach Berechnung der Anzahl in einem Mikroliter Blut enthaltener für diesen T-Zell-Rezeptor positiver Lymphozyten liegen bei dem Großteil der Krankheitsgruppen in einem Bereich von etwa 1500/µl bis 1700/µl. Ein unterhalb von 1300/µl gelegener Wert findet sich bei den Rückenmarkstraumata, Tumoren und Anderen (siehe Abb. 4.5).

Für die absolute Zahl der TCR α/β-positiven Lymphozyten ergibt der Vergleich der Gruppen „SRMA mit Symptomen“ und „SRMA-Verlaufskontrollen“ miteinander sowie mit den übrigen Gruppen keine signifikanten Unterschiede (p-Wert > 0,05).

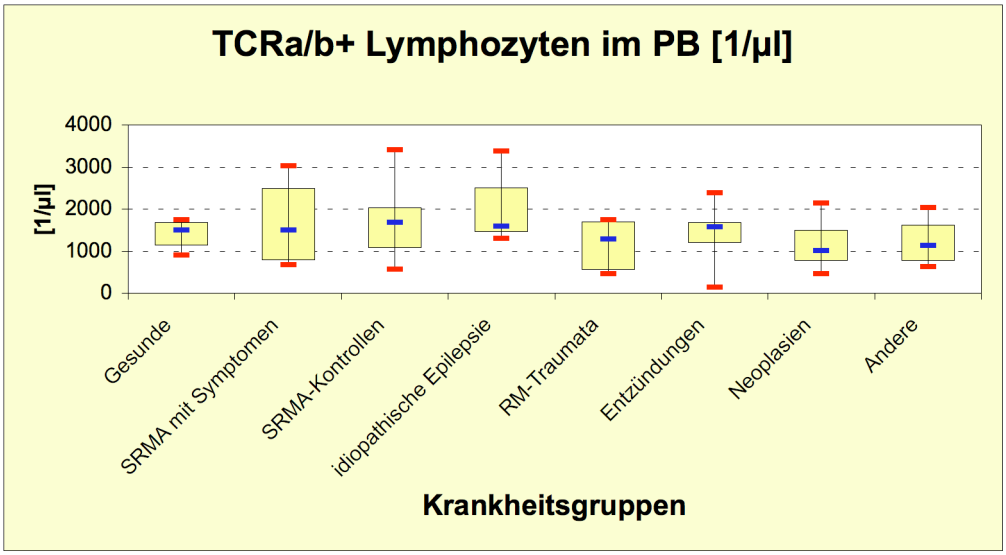


Abb. 4.5: Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes mit einem monoklonalen gegen den TCRα/β gerichteten Antikörper. (PB = peripheres Blut, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*, TCRa/b = TCRα/β = T-Zell-Rezeptor α/β) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil.)

4.2.1.1.1.3 T-Zell-Rezeptor γ/δ

Der Anteil der für den T-Zell-Rezeptor γ/δ positiven Lymphozyten liegt in einem Bereich bis 7,79 %. Der Median der Werte ist mit 1,95 % derart niedrig, daß er auch als das Ergebnis einer Negativkontrolle akzeptiert worden wäre. Die Spannweite der Mediane der Krankheitsgruppen beträgt 1,54 %.

Der Median aller Werte, umgerechnet auf den jeweiligen Gehalt an Lymphozyten pro Mikroliter Blut, ist mit 36 γ/δ-T-Zellen ebenfalls ausgesprochen tief angesiedelt (Spanne: 9/µl bis 375/µl) (siehe Abb. 4.6).

Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund der einheitlich niedrigen Werte verzichtet.

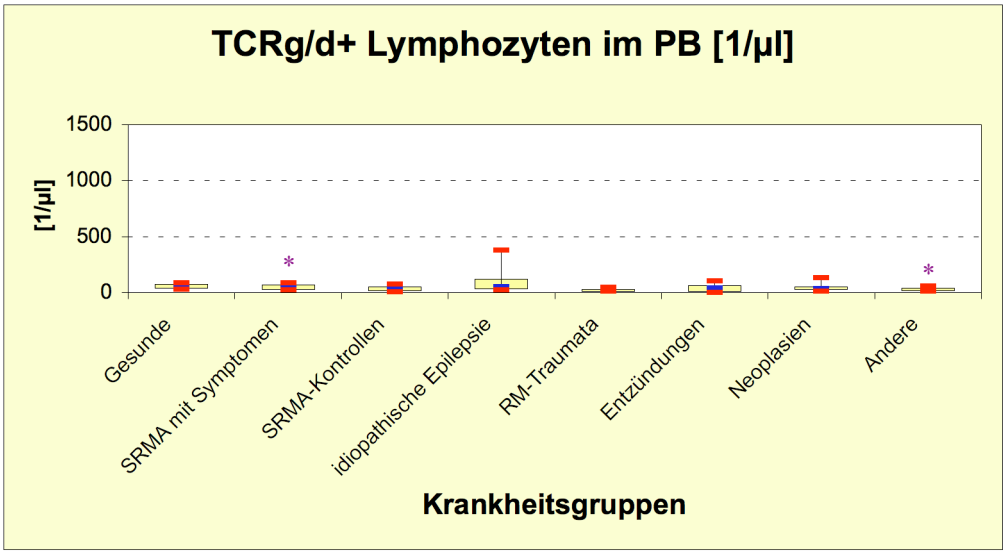


Abb. 4.6: Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes mit einem monoklonalen gegen den TCRγ/δ gerichteten Antikörper. (PB = peripheres Blut, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*, TCRg/d = TCRγ/δ = T-Zell-Rezeptor γ/δ) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Die außerhalb der Spannweitenlinien gelegenen Werte (*) wurden als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

4.2.1.1.1.4 CD4

Die Gesamtheit der Messungen lieferte für den Anteil CD4-positiver T-Lymphozyten Werte im Bereich von 6,70 % bis 60,58 % (Median: 42,70 %). Die absoluten Zahlen liegen zwischen 92 Zellen/µl Blut und 2489 Zellen/µl Blut (Median: 808/µl Blut).
Den höchsten Median mit 47,87 % ergaben die Messungen der akut an SRMA erkrankten Hunde, den niedrigsten die der gesunden Beagle (35,70 %). Die Gruppen mit dem zweithöchsten bzw. zweitniedrigsten Median sind die der Entzündungen bzw. Rückenmarkstraumata (45,89 % bzw. 39,94%). Die Mediane der übrigen Gruppen befinden sich in einem Bereich von 42 % bis 45 %. Während die Streuung bei den „SRMA mit Symptomen“, „Entzündungen“ und „Neoplasien“ groß ist, weisen die Werte der gesunden Beagle eine hohe Konstanz auf (siehe Abb. 4.7).
Die Anteile der CD4-positiven Lymphozyten liegen für die Gruppen „SRMA mit Symptomen“ und „SRMA-Verlaufskontrollen“ signifikant über denen der „Rückenmarkstraumata“ und „Gesunden“ (p-Wert < 0,05). Diese Unterschiede sind, mit Ausnahme desjenigen zwischen den Gruppen „SRMA mit Symptomen“ und „Rückenmarkstraumata“, hochsignifikant (p-Wert < 0,01).

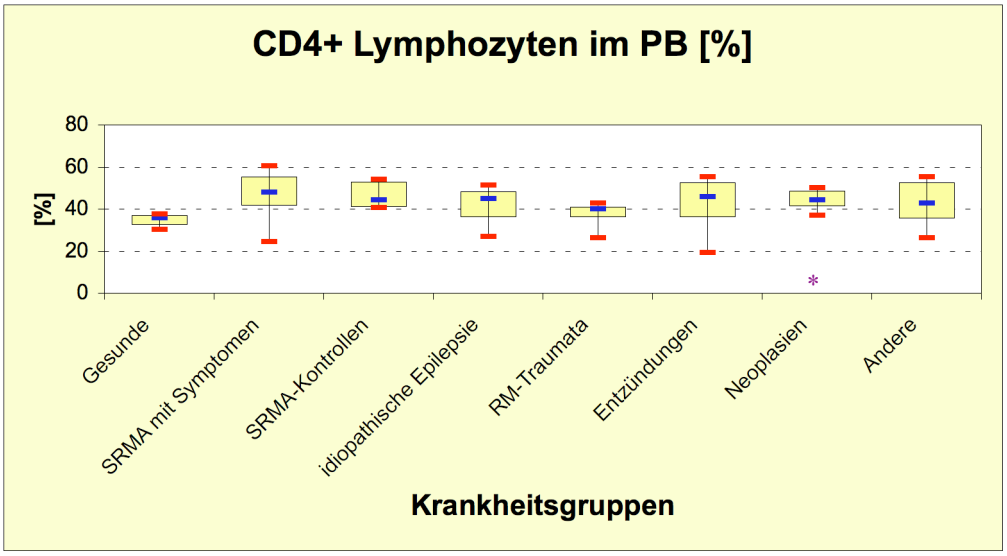


Abb. 4.7: Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes mit einem monoklonalen gegen CD4 gerichteten Antikörper (PB = peripheres Blut, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Der außerhalb der Spannweitenlinie gelegene Wert (*) wurde als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

Die Mediane der errechneten absoluten Zahl der CD4-positiven Lymphozyten erstrecken sich von etwa 600/µl Blut bis 1100/µl Blut. Die Werte der beiden Gruppen mit an SRMA erkrankten Hunden sowie die der idiopathischen Epileptiker sind die höchsten, die der Gesunden und der Hunde mit Neoplasien und Rückenmarkstraumata die niedrigsten (siehe Abb. 4.8).

Für die absolute Zahl der CD4-positiven Lymphozyten zeigt der Vergleich der Gruppen „SRMA mit Symptomen“ und „SRMA-Verlaufskontrollen“ mit den Rückenmarkstraumata jeweils einen signifikanten Unterschied (p-Wert < 0,05).

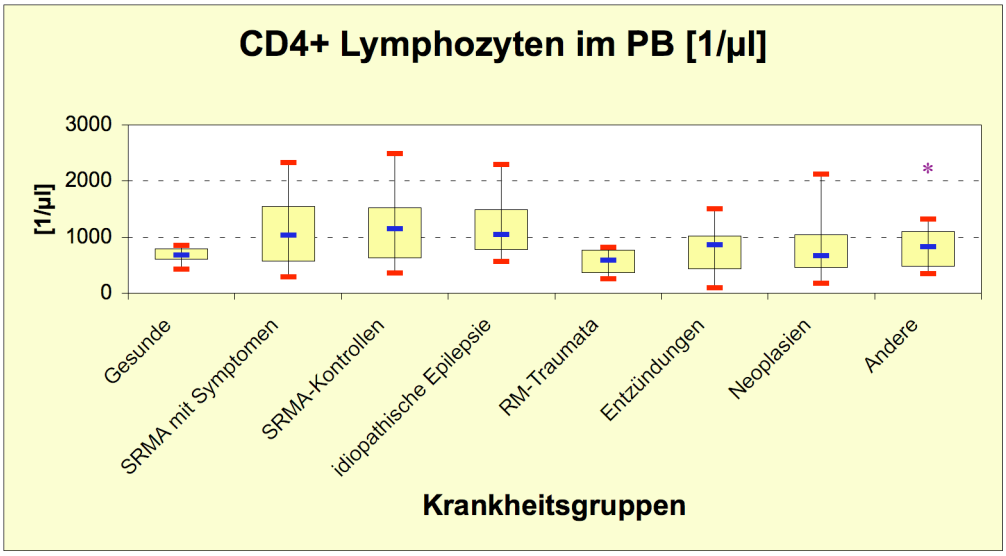


Abb. 4.8: Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes mit einem monoklonalen gegen CD4 gerichteten Antikörper. (PB = peripheres Blut, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Der außerhalb der Spannweitenlinie gelegene Wert (*) wurde als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

4.2.1.1.1.5 CD8α

Der Median aller Messungen zur Bestimmung des Anteils CD8α-positiver Zellen an der Lymphozytenpopulation beträgt 21,77 % bei einem minimalen bzw. maximalen Meßwert von 2,97 % bzw. 59,85 %. Die Ergebnisse nach Bezug auf die absolute im Blut enthaltene Anzahl von Lymphozyten streuen von 30 zytotoxischen T-Zellen/µl Blut bis 2855 zytotoxische T-Zellen/µl Blut (Median: 422/µl Blut).

Die höchsten Werte für den Median finden sich in den Gruppen der Gesunden und der Rückenmarkstraumata (> 30 %). Der niedrigste Median ist der der Gruppe „SRMA mit Symptomen“. Er liegt bei 15,01 % (siehe Abb. 4.9).

Die Anteile der CD8α-positiven Lymphozyten liegen für die Gruppen „SRMA mit Symptomen“ und „SRMA-Verlaufskontrollen“ signifikant unter denen der

„Rückenmarkstraumata“ und „Gesunden“ (p-Wert < 0,05). Diese Unterschiede sind, mit Ausnahme desjenigen zwischen den Gruppen „SRMA-Verlaufskontrollen“ und „Rückenmarkstraumata“, hochsignifikant (p-Wert < 0,01). Zudem weisen Hunde aus der Gruppe „Andere “ Werte auf, die signifikant über denen der Hunde mit Symptomen der SRMA liegen (p-Wert < 0,05).

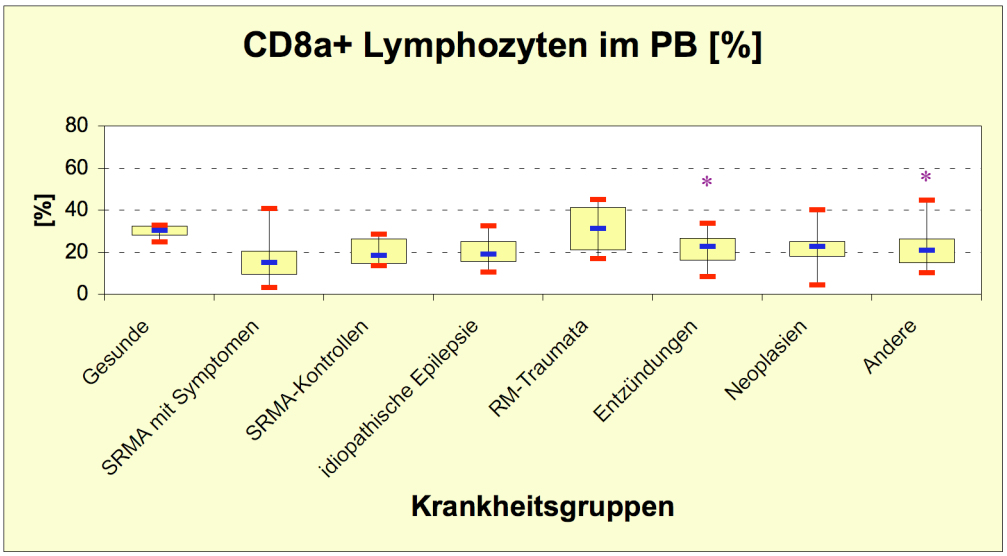


Abb. 4.9: Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes mit einem monoklonalen gegen CD8α gerichteten Antikörper (CD8a = CD8α, PB = peripheres Blut, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Die außerhalb der Spannweitenlinien gelegenen Werte (*) wurden als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

Die Gruppe mit dem niedrigsten Median der Anzahl zytotoxischer T-Zellen/µl Blut ist die der Hunde mit Symptomen der SRMA (299/µl), der höchste Median findet sich bei den gesunden Beaglen (582/µl) (siehe Abb. 4.10).

Für die absolute Zahl der CD8α-positiven Lymphozyten zeigt der Vergleich der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ mit der der gesunden Hunde einen signifikanten Unterschied (p-Wert < 0,05).

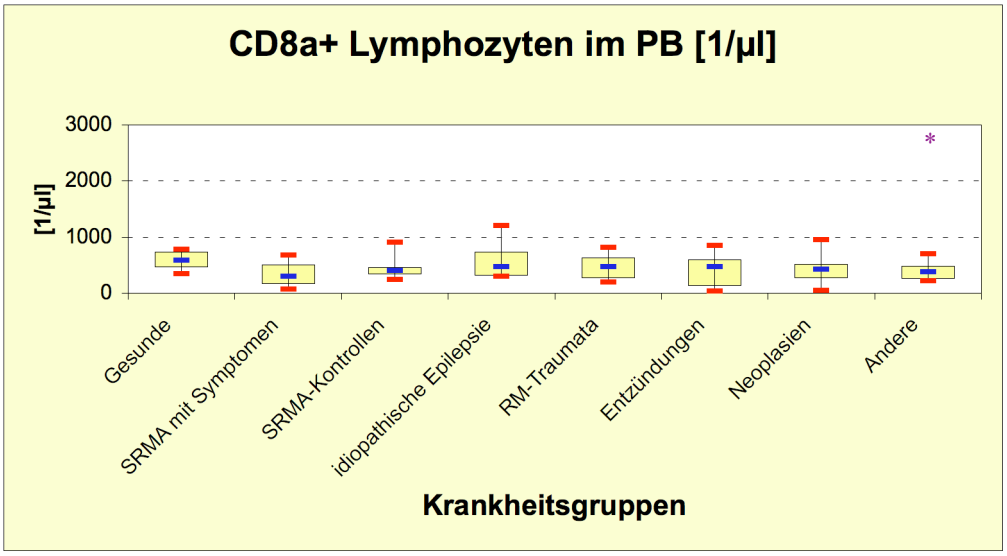


Abb. 4.10: Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes mit einem monoklonalen gegen CD8α gerichteten Antikörper. (CD8a = CD8α, PB = peripheres Blut, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Der außerhalb der Spannweitenlinie gelegene Wert (*) wurde als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

4.2.1.1.2 B-Zellmarker

4.2.1.1.2.1 CD21

Der Anteil der durch das Oberflächenantigen CD21 charakterisierten B-Lymphozyten schwankt bei der gesamten Stichprobe zwischen 1,07 % und 51,87 % mit einem Median von 7,7 %. Die absolute Zahl an B-Zellen, die in einem Mikroliter Blut enthalten ist, zeigt Variationen von 5/µl bis 1292/µl. Der Median der Anzahl liegt bei 124 B-Zellen/µl Blut.

Die Werte der Gruppen „SRMA mit Symptomen“ und „SRMA-Verlaufskontrollen“ liegen signifikant über denen der „Entzündungen“ (p-Wert < 0,05) und hochsignifikant über denen der „Gesunden“ (p-Wert < 0,01) (siehe Abb. 4.11).

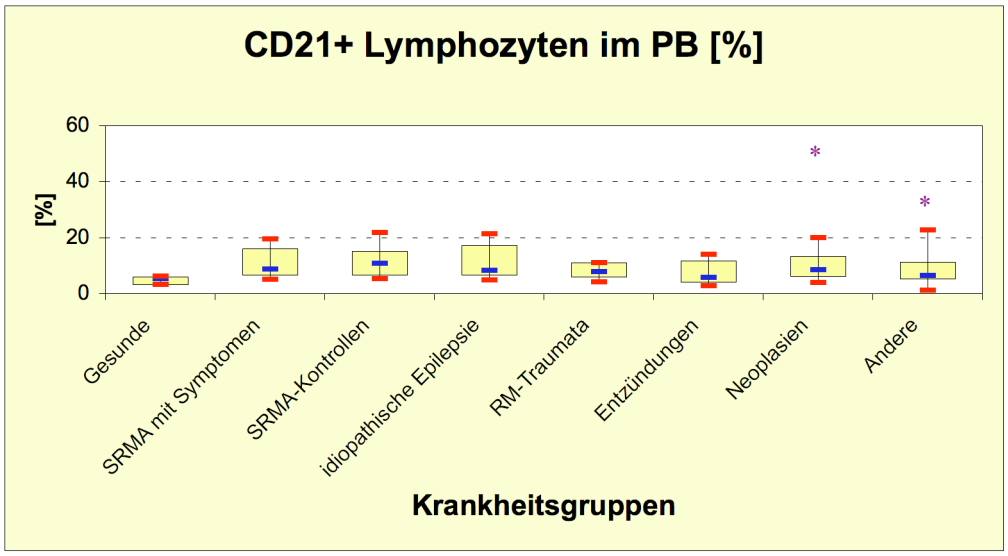


Abb. 4.11: Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes mit einem monoklonalen gegen CD21 gerichteten Antikörper (PB = peripheres Blut, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Die außerhalb der Spannweitenlinie gelegenen Werte (*) wurde als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

Die Betrachtung der in einem Mikroliter Blut enthaltenen Anzahl von B-Zellen läßt bezüglich der Mediane drei Kategorien erkennen. Mediane mit einem Wert von < 120 CD21-positive Lymphozyten/µl Blut zeigen die Gruppen der gesunden Hunde, sowie der Hunde mit Rückenmarkstraumata, Entzündungen und mit den als „Andere“ kategorisierten Erkrankungen. Die beiden Gruppen „SRMA-Verlaufskontrollen“ und „idiopathische Epilepsie“ haben jeweils einen Median von > 270 CD21-positive Lymphozyten/µl Blut, der der übrigen beiden („SRMA mit Symptomen“, „Neoplasien“) liegt in einem Bereich um 175/µl Blut.

Der Übersicht der absoluten Zahl CD21-positiver Lymphozyten dient die Abbildung 4.12. Die absolute Zahl der B-Zellen ist in den Gruppen „SRMA mit Symptomen“ und „SRMA-Verlaufskontrollen“ signifikant über der der „Gesunden“ und „Entzündungen“ gelegen (p-Wert < 0,05).

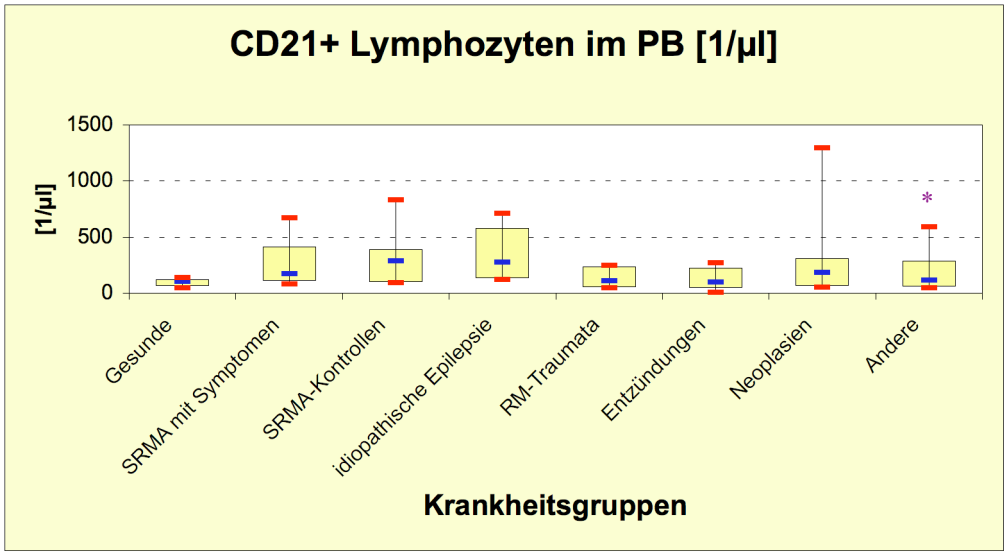


Abb. 4.12: Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes mit einem monoklonalen gegen CD21 gerichteten Antikörper. (PB = peripheres Blut, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*). (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Der außerhalb der Spannweitenlinie gelegene Wert (*) wurde als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

4.2.1.1.3 Lymphozytenaktivierungsmarker

4.2.1.1.3.1 CD45RA

Der Anteil der für den Oberflächenmarker CD45RA positiven Zellen liegt bei den 91 Messungen zwischen 27,75 % und 94,84 % (Median: 73,23 %). Nach Einbeziehung der im

Blut enthaltenen Anzahl von Lymphozyten ergeben sich absolute Werte von 131 CD45RA-positive Lymphozyten/µl Blut bis 4869 CD45RA-positive Lymphozyten/µl Blut. Der Median beträgt 1420 CD45RA-positive Lymphozyten/µl.

Die Gruppe mit dem niedrigsten Median des Prozentsatzes der Lymphozyten, die dieses Oberflächenantigen exprimieren, ist die der gesunden Hunde (61,39 %). Der höchste Median findet sich bei der Gruppe „SRMA mit Symptomen“, der zweithöchste bei den SRMA-Verlaufskontrollen. Sie liegen bei 88,73 % und 81,62 % (siehe Abb. 4.13).

Die Werte der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ liegen hochsignifikant über denen der übrigen Gruppen, ausgenommen derer der „SRMA-Verlaufskontrollen“ (p-Wert < 0,01). Die Messungen der „SRMA-Verlaufskontrollen“ ergaben hochsignifikant höhere Werte als die der „Gesunden“, „Entzündungen“ und „Neoplasien“ (p-Wert < 0,01). Im Vergleich mit denen der Rückenmarkstraumata waren die Anteile für die „SRMA-Verlaufskontrollen“ signifikant höher (p-Wert < 0,05).

Innerhalb der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ ergab die Bestimmung des Anteils der CD45RA-positiven Lymphozyten für die nicht mit Glukokortikoiden vorbehandelten Hunde signifikant höhere Werte als im Falle einer Vorbehandlung (p-Wert < 0,05).

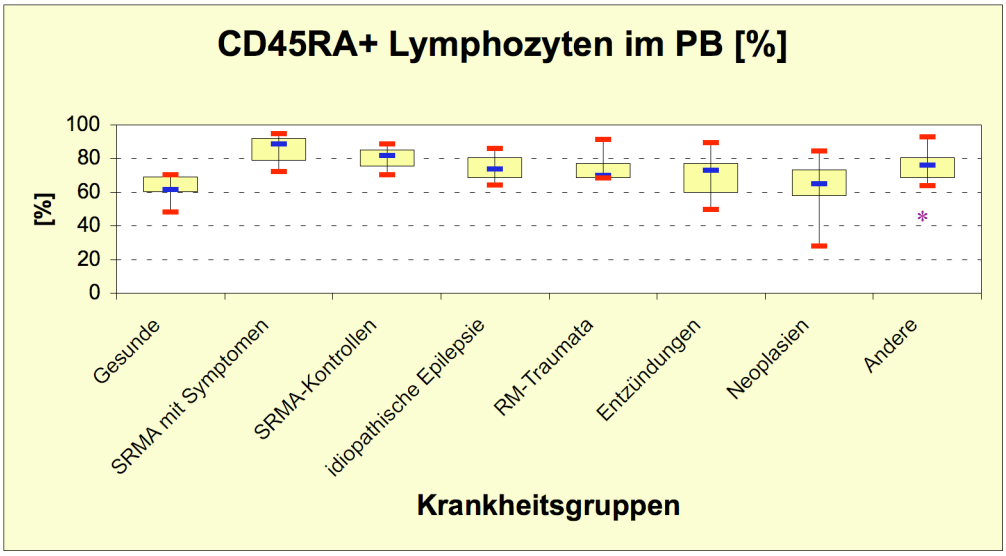


Abb. 4.13: Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes mit einem monoklonalen gegen CD45RA gerichteten Antikörper (PB = peripheres Blut, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Der außerhalb der Spannweitenlinie gelegene Wert (*) wurde als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

Die absoluten Werte der CD45RA-positiven Lymphozyten bezogen auf einen Mikroliter Blut ergeben für die jeweiligen Krankheitsgruppen Mediane von 1000/µl bis 2000/µl.

Die absolute Zahl der CD45RA-positiven Lymphozyten ist innerhalb der Gruppen „SRMA mit Symptomen“ und „SRMA-Verlaufskontrollen“ signifikant über der der „Neoplasien“ gelegen. Für die Hunde mit Symptomen der SRMA zeigt sich zudem ein signifikanter Unterschied zu denen der Gruppe „Entzündungen“ (p-Wert jeweils < 0,05) (siehe Abb. 4.14).

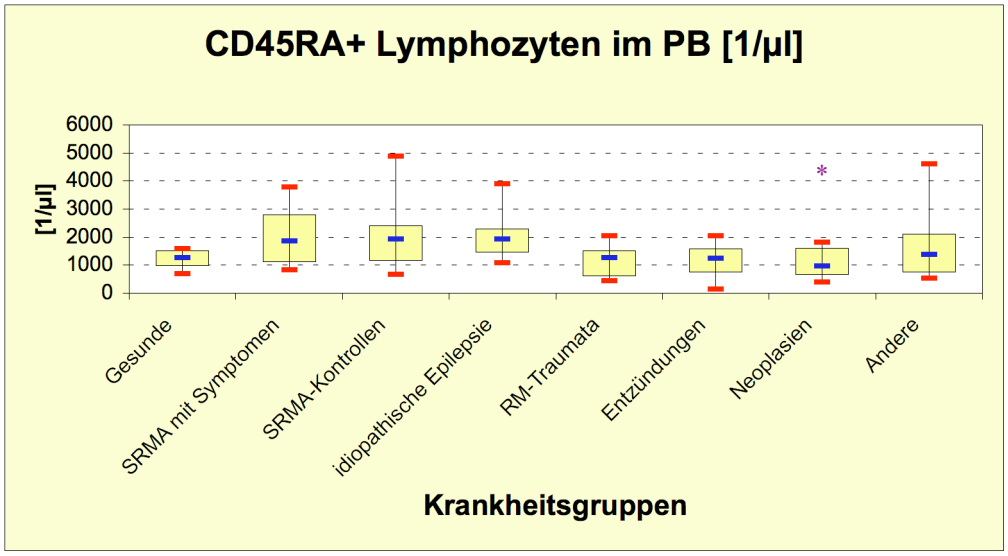


Abb. 4.14: Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes mit einem monoklonalen gegen CD45RA gerichteten Antikörper. (PB = peripheres Blut, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Der außerhalb der Spannweitenlinie gelegene Wert (*) wurde als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

4.2.1.1.4 Verhältnisse der Lymphozytensubpopulationen

4.2.1.1.4.1 Verhältnis von CD3- zu CD21-positiven Lymphozyten

Werden die Anteile der für die Oberflächenmarker CD3 und CD21 positiven Lymphozyten zueinander ins Verhältnis gesetzt, so schwanken diese Quotienten (auf ganze Zahlen gerundet) von 2 bis 87. Der Median dieser Werte beträgt 11.

Während die Gruppen der Gesunden und der Hunde mit Entzündungen einen Medianwert der Quotienten von 17 bzw. 13 aufweisen, liegen die Mediane der anderen Gruppen, ausgenommen der SRMA-Verlaufskontrollen, zwischen 9 und 11. Der Median der „SRMA-Verlaufskontrollen“ beträgt 7 (siehe Abb. 4.15).

Für die Gruppen der Hunde mit SRMA ergibt sich ein hochsignifikanter Unterschied im Vergleich mit den gesunden Tieren (p-Wert < 0,01). Die Werte der „SRMA-Verlaufskontrolle“ sind zudem signifikant niedriger als die der „Entzündungen“ (p-Wert < 0,05).

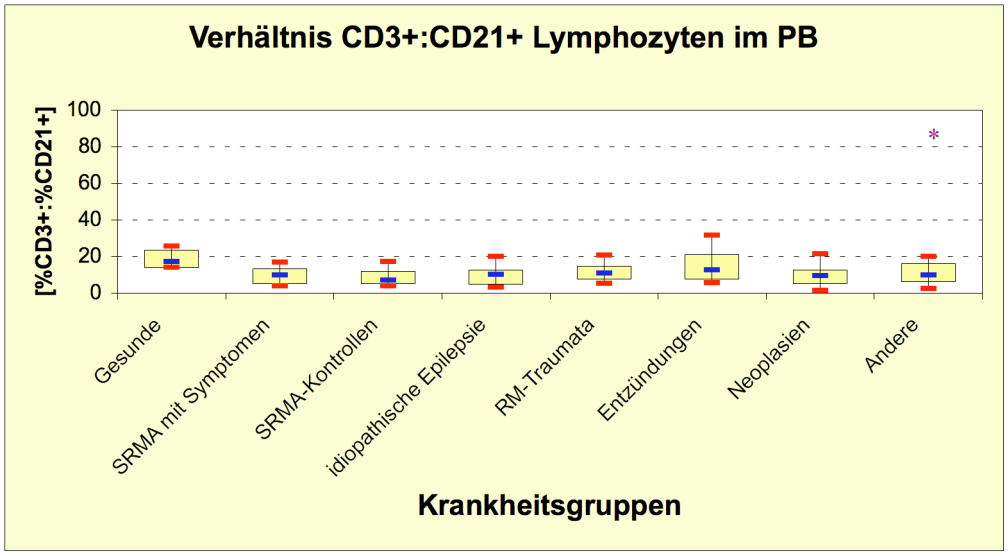


Abb. 4.15: Quotienten der Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung von Lymphozyten des peripheren Blutes mit monoklonalen gegen CD3 und CD21 gerichteten Antikörpern (PB = peripheres Blut, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Der außerhalb der Spannweitenlinie gelegene Wert (*) wurde als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

4.2.1.1.4.2 Verhältnis von CD4- zu CD8α-positiven Lymphozyten

Das Verhältnis der CD4-positiven zu den CD8α-positiven Lymphozyten streut von 0,3 bis 14,2, wobei der Median aller berechneten Quotienten 2,0 beträgt, das heißt, daß doppelt so viele T-Helferzellen wie zytotoxische T-Zellen vorhanden sind.

Ein zugunsten der T-Helferzellen verschobenes Verhältnis fällt bei den Gruppen „SRMA mit Symptomen“ (3,3) und „SRMA-Verlaufskontrollen“ (2,7) auf. Die Mediane der übrigen Gruppen liegen in einem Bereich bis 2,2. Bemerkenswert ist die geringe Streuung (SD = 0,1) innerhalb der Gruppe der gesunden Beagle (siehe Abb. 4.16).

Die Quotienten der beiden Gruppen mit Hunden, die an SRMA erkrankt sind, liegen hochsignifikant über denjenigen der Gesunden und der Hunde mit Rückenmarkstraumata (p-Wert < 0,01).

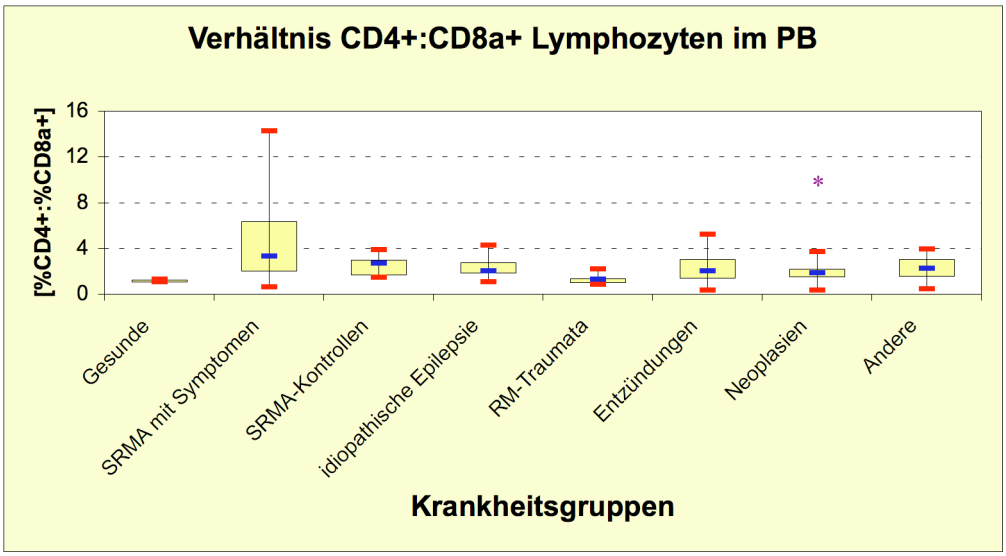


Abb. 4.16: Quotienten der Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung von Lymphozyten des peripheren Blutes mit monoklonalen gegen CD4 und CD8α gerichteten Antikörpern (CD8a = CD8α, PB = peripheres Blut, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Der außerhalb der Spannweitenlinie gelegene Wert (*) wurde als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

4.2.1.1.4.3 Verhältnis von T-Zell-Rezeptor α/β- zu T-Zell-Rezeptor γ/δ- positiven Lymphozyten

Das Verhältnis der T-Zell-Rezeptor α/β-positiven Lymphozyten im peripheren Blut zu denen, die den T-Zell-Rezeptor γ/δ exprimieren, wurde nicht weiter beachtet, da die γ/δ-T-Zellen bei allen Gruppen niedrig waren.

4.2.1.1.4.4 Verhältnisse der Lymphozytensubpopulationen im Verlauf

Von zehn Hunden, bei denen eine SRMA diagnostiziert wurde, existiert mindestens eine zweite Messung, die zum Zeitpunkt einer Verlaufsuntersuchung der Gehirnrückenmarksflüssigkeit sowie des Blutes zur Therapiekontrolle durchgeführt wurde. Für den Hund Nummer 8 gibt es zusätzliche Werte, die am Tag, als das Tier wegen eines Rezidivs vorgestellt wurde, gemessen wurden. Der Verlauf der Verhältnisse der Lymphozytensubpopulationen (T- zu B-Zellen und T-Helfer- zu zytotoxischen T-Zellen) ist in den Abbildungen 4.17 und 4.18 dargestellt.
Bemerkenswert ist, daß der Hund Nummer 9 zwischen der dritten und vierten Kontrolluntersuchung ein Rezidiv erlitt. Leider fehlen Messungen dieser Episode.

Die Ergebnisse der Division des Anteils der CD3-positiven durch den der CD21-positiven Lymphozyten des peripheren Blutes lassen bezüglich ihres zeitlichen Verlaufes einen leichten Trend in Richtung einer anteilsmäßigen Zunahme der B-Zellen erkennen, wobei der Verlauf insgesamt starke Schwankungen aufweist (siehe Abb. 4.17).

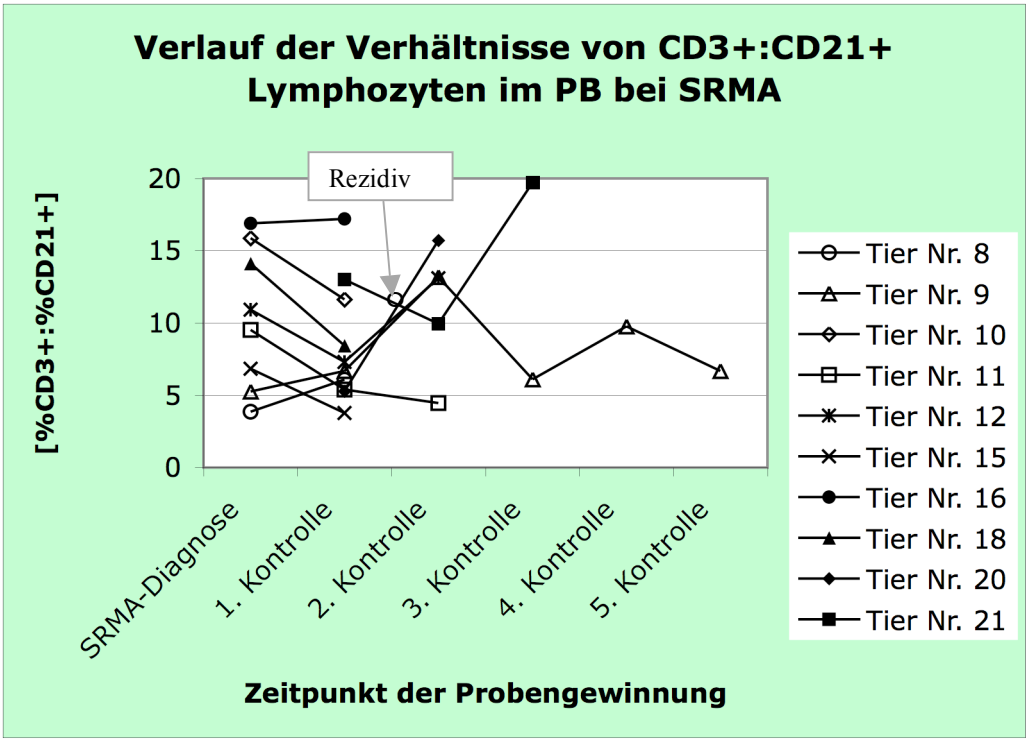


Abb. 4.17: Verlauf für das Verhältnis von T- zu B-Lymphozyten im peripheren Blut (PB) von an SRMA (*Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) erkrankten Hunden (Nr. = Nummer)

Der Verlauf der Verhältnisse der CD4-positiven zu den CD8α-positiven Lymphozyten zeigt beim überwiegenden Teil der Tiere nach Beginn der Therapie eine Abnahme der Werte, wobei diese mitunter sehr gering ausfällt. Die Quotienten bleiben dann unter der Therapie relativ stabil. Das Ergebnis der Division der Meßergebnisse eines Rezidivs zeigt im Vergleich zu dem vorherigen keine nennenswerte Änderung (siehe Abb. 4.18).

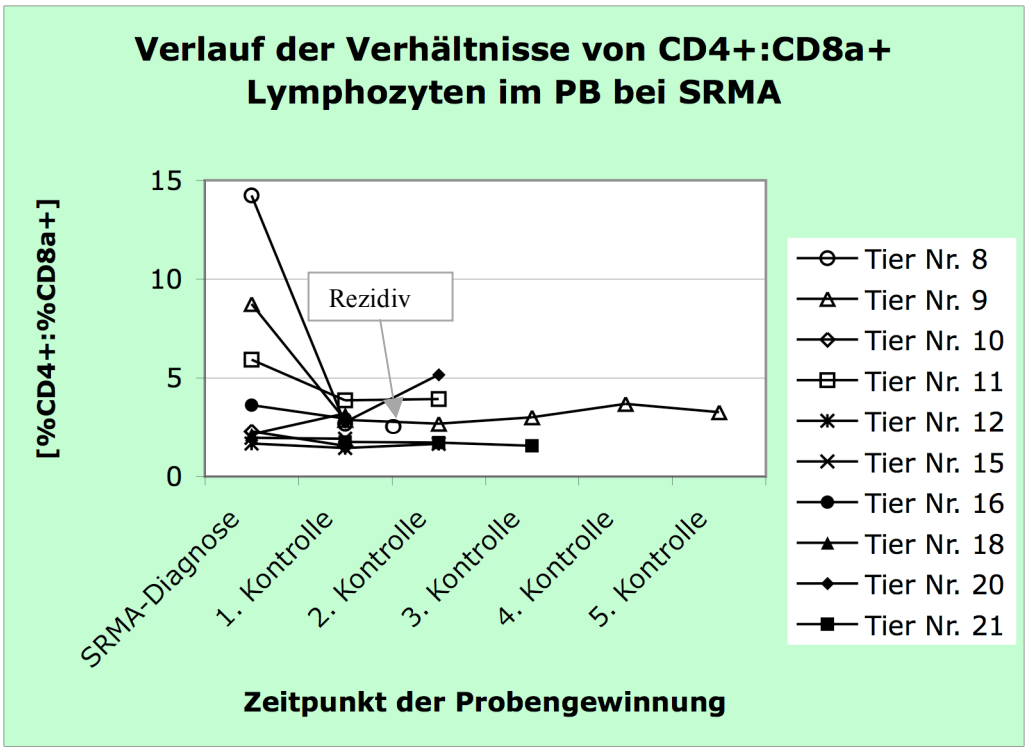


Abb. 4.18: Verlauf für das Verhältnis von CD4- zu CD8-positiven Lymphozyten im peripheren Blut (PB) von an SRMA (*Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) erkrankten Hunden (Nr. = Nummer)

Zudem sind von zwei Hunden mit anderen entzündlichen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) jeweils zwei Messungen von verschiedenen Daten vorhanden (Hunde Nummer 42 und 44; protozoäre Infektionen des ZNS).

Das Verhältnis der T- zu den B-Zellen nahm bei dem Tier mit der Nummer 42 im Verlauf ab (von 20 auf 15), bei dem zweiten Hund blieb das Verhältnis mit einem Wert von 21 stabil. Das Verhältnis der T-Helferzellen zu den zytotoxischen T-Zellen nahm bei dem Hund Nummer 42 leicht ab (von 1,4 auf 1,3), während bei dem anderen Hund eine Zunahme zu verzeichnen war (von 2,1 auf 3,4).

4.2.1.2 Immunphänotypisierung der polymorphkernigen Zellen des peripheren Blutes

4.2.1.2.1 Integrinexpression

4.2.1.2.1.1 CD11a

Die Intensitäten der Fluoreszenz nach indirekter Immunphänotypisierung, bestimmt durch den Median aller PMNCs, die das Integrin exprimieren, liegen in der gesamten Stichprobe im Bereich von 63,21 bis 523,3 (Median: 140,75).
Der maximale Median findet sich bei den Hunden mit SRMA zum Zeitpunkt, als Symptome der Erkrankung gezeigt wurden (212,05). Die Werte sind jedoch nicht statistisch signifikant höher als bei den anderen Gruppen, obwohl die Mediane der übrigen Gruppen deutlich unterhalb dieses Wertes liegen. Der minimale ist der der Gruppe „Andere“ (113,42), der höchste der übrigen ist mit 168,49 der der „Rückenmarkstraumata“. Die Mediane der weiteren Gruppen liegen zwischen 125 und 145. Die Streuung ist bei allen Gruppen beträchtlich (SD = 56 bis 157) (siehe Abb. 4.19).

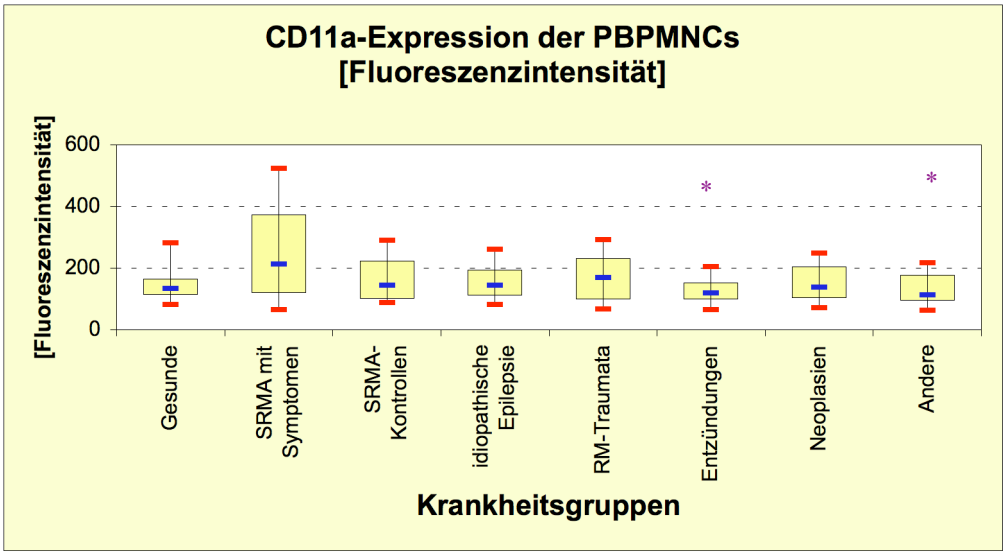


Abb. 4.19: Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung der polymorphkernigen Zellen des peripheren Blutes mit einem monoklonalen gegen CD11a gerichteten Antikörper (PBPMNCs = polymorphkernige Zellen des peripheren Blutes, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*). (Erklärung zur Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Die außerhalb der Spannweitenlinien gelegenen Werte (*) wurden als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

4.2.1.2.1.2 CD11b

Die Resultate der Fluoreszenzintensität nach indirekter Immunphänotypisierung mit dem gegen das Integrin CD11b gerichteten monoklonalen Antikörper, ergeben einen Median von 1472,21, wobei die Werte im Bereich von 289,03 bis 3278,12 lagen.

Der höchste Median einer Gruppe ist der der gesunden Beagle. Er liegt bei 2226,67. Die kleinsten Mediane zeigen die Gruppen „Andere“ und „Neoplasien“ (< 1400). Die kleinste Streuung innerhalb einer Krankheitsgruppe findet sich bei den gesunden Hunden (SD = 176). Bei den anderen liegt die Standardabweichung sämtlich ≥ 400 mit einem maximalen Wert von gut 800 bei den Hunden mit Symptomen der SRMA (siehe Abb. 4.20).

Die Expression des CD11b-Antigens ist auf den Zellen der Gesunden signifikant höher als auf denen der Hunde mit SRMA, sowohl zum Zeitpunkt der Symptome als auch bei den Verlaufskontrollen (p-Wert < 0,05).

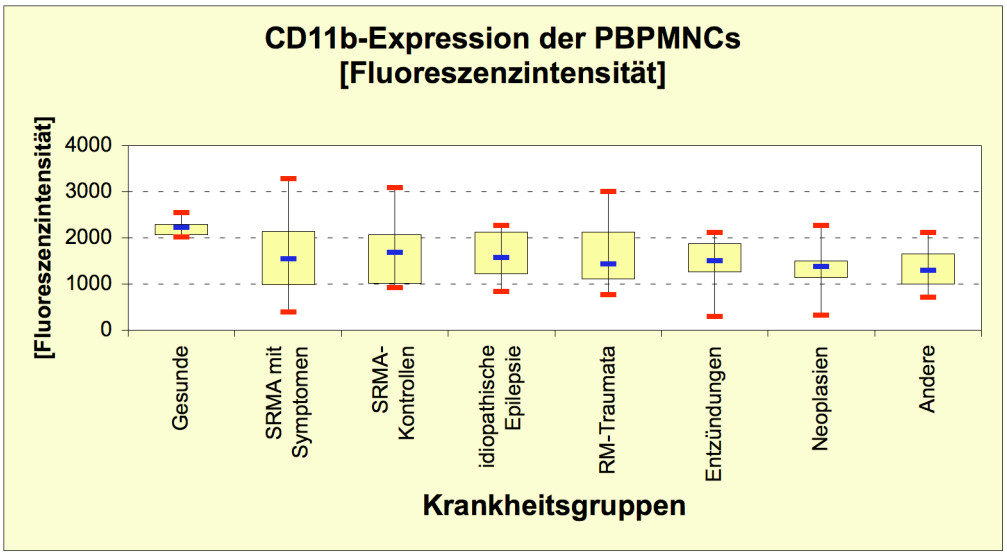


Abb. 4.20: Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung der polymorphkernigen Zellen des peripheren Blutes mit einem monoklonalen gegen CD11b gerichteten Antikörper (PBPMNCs = polymorphkernige Zellen des peripheren Blutes, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*). (Erklärung zur Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil.).)

4.2.1.2.1.3 CD11c

Die Fluoreszenzintensitäten der gesamten Stichprobe, bei den durchflußzytometrischen Messungen im Anschluß an die indirekte Immunphänotypisierung mit dem monoklonalen gegen das Integrin CD11c gerichteten Antikörper, liegen in einem Bereich von 26,66 bis 500,29. Der Median dieser Messungen beträgt 147,22.

Der Median der Gruppe „Gesunde“ ist mit 268,96 der mit Abstand höchste. Die übrigen Mediane liegen in einem Bereich von 130 bis gut 160, wobei von diesen die Mediane der

„SRMA mit Symptomen“ und „SRMA-Verlaufskontrollen“ die höchsten sind (siehe Abb. 4.21).

Für das Ausmaß der Expression ergibt der Vergleich der Gruppen „SRMA mit Symptomen“ und „SRMA-Verlaufskontrollen“ miteinander sowie mit den übrigen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede (p-Wert > 0,05).

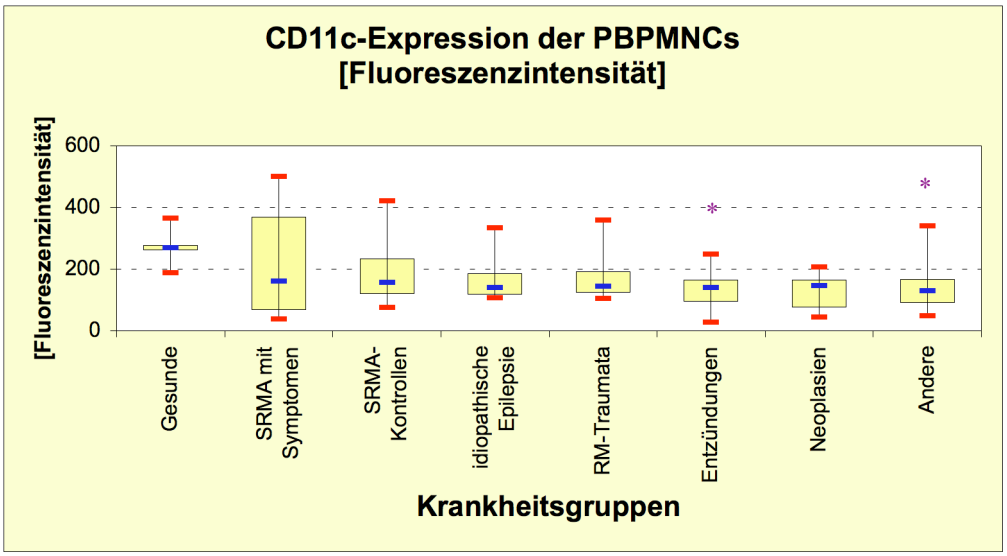
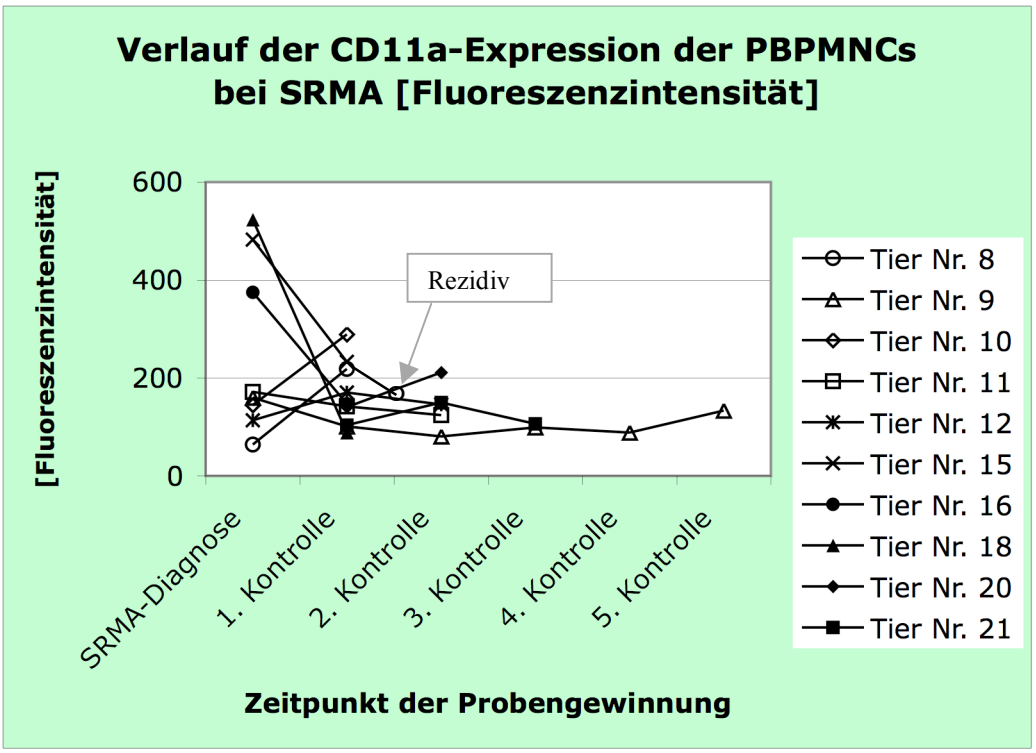


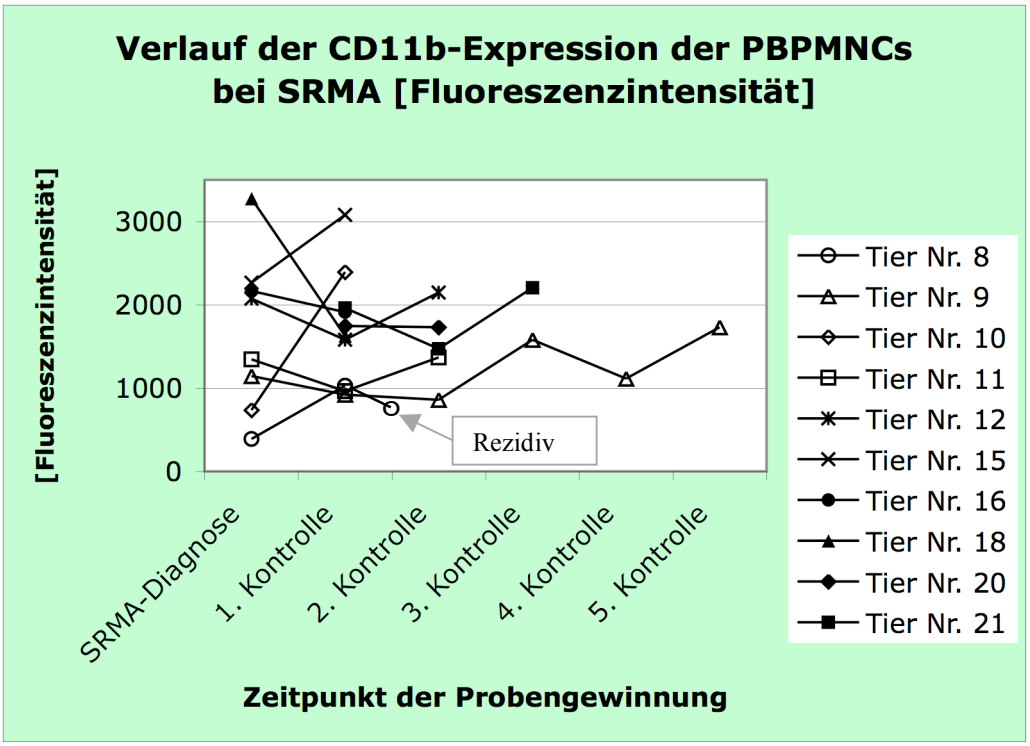
Abb. 4.21: Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung der polymorphkernigen Zellen des peripheren Blutes mit einem monoklonalen gegen CD11c gerichteten Antikörper (PBPMNCs = polymorphkernige Zellen des peripheren Blutes, RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) (Erklärung zur Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Die außerhalb der Spannweitenlinien gelegenen Werte (*) wurden als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

4.2.1.2.1.4 Integrinexpression der polymorphkernigen Zellen im Verlauf

Der Verlauf der Integrinexpression auf den polymorphkernigen Zellen des peripheren Blutes zeigt sich für die untersuchten Antigene CD11a, b und c bei den an SRMA erkrankten Hunden uneinheitlich.

Für die Integrine CD11a und c zeigt sich eine abnehmende bzw. gleichbleibende Tendenz, für CD11c ist kein einheitlicher Trend erkennbar (siehe Abb. 4.22).





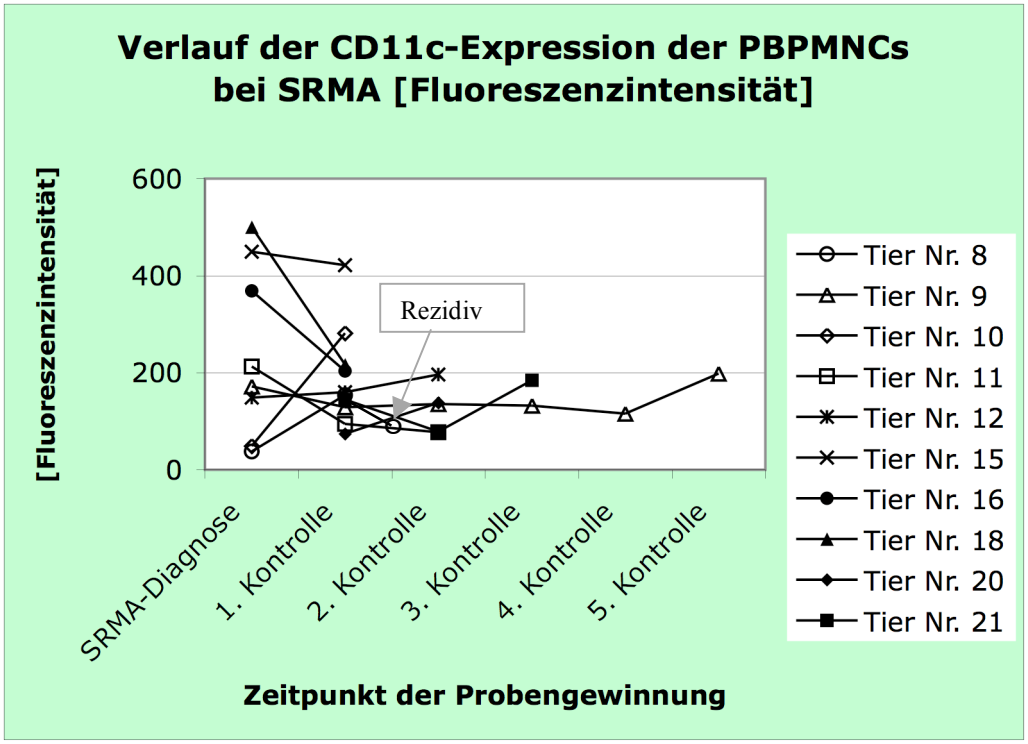


Abb. 4.22: Verlauf für Integrinexpression der polymorphkernigen Zellen des peripheren Blutes (PBPMNCs) von an SRMA (*Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) erkrankten Hunden (Nr. = Nummer)

4.2.2 Immunphänotypisierung der Leukozyten der Gehirnrückenmarksflüssigkeit

Bei den Auswertungen der Messungen der Lymphozyten wurde die Anzahl der für das Oberflächenmolekül positiven Zellen, bezogen auf die Anzahl der Leukozyten der Region, das heißt der CD45-positiven Zellen, gewertet. Im Falle der Markierung der Integrine CD11a, CD11b und CD11c interessiert die Menge des exprimierten Antigens. Aus diesem Grund wurde der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten aller das Integrin exprimierender Events einer Messung innerhalb der PMNC-Region für die Auswertung herangezogen. Der Anhang D enthält die Meßergebnisse der einzelnen Tiere in tabellarischer Form.

Die im Folgenden präsentierten Ergebnisse berücksichtigen zunächst nur eine Messung eines Individuums pro Krankheitsgruppe, auch wenn von einigen Tieren Verlaufsmessungen existieren (siehe Anhang A). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Kapitel 4.2.1.3.2.3 separat dargestellt.

4.2.2.1 Immunphänotypisierung der Lymphozyten der Gehirnrückenmarksflüssigkeit

4.2.2.1.1 T-Zellmarker

4.2.2.1.1.1 CD3

Der Anteil der CD3-positiven an den CD45-positiven Zellen streut von 0,12 % bis 100 %. Der Median der gesamten Stichprobe beträgt 81,19 %.

Die Gruppe „SRMA mit Symptomen“ hat mit einem Median von 60,11 % den niedrigsten Wert. Es folgen die Gruppen „Neoplasien“ und „SRMA-Verlaufskontrollen“ mit 71,75 % bzw. 77,74 %. Die Mediane der übrigen Krankheitsgruppen liegen in dem Bereich von 81 % bis gut 86 %.

Die Standardabweichung ist insbesondere bei den Hunden mit Symptomen der SRMA und bei denen mit Neoplasien beträchtlich (jeweils 23 %) und beträgt bei den „SRMA-Verlaufskontrollen“ knapp 33 % (siehe Abb. 4.23).

Der Anteil der T-Lymphozyten liegt bei den Hunden der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ hochsignifikant unter dem der Gruppen „idiopathische Epilepsie“, „Rückenmarkstraumata“ und „Andere“ (p-Wert < 0,01). Der Vergleich mit den „Entzündungen“ ergibt einen signifikanten Unterschied (p-Wert < 0,05).

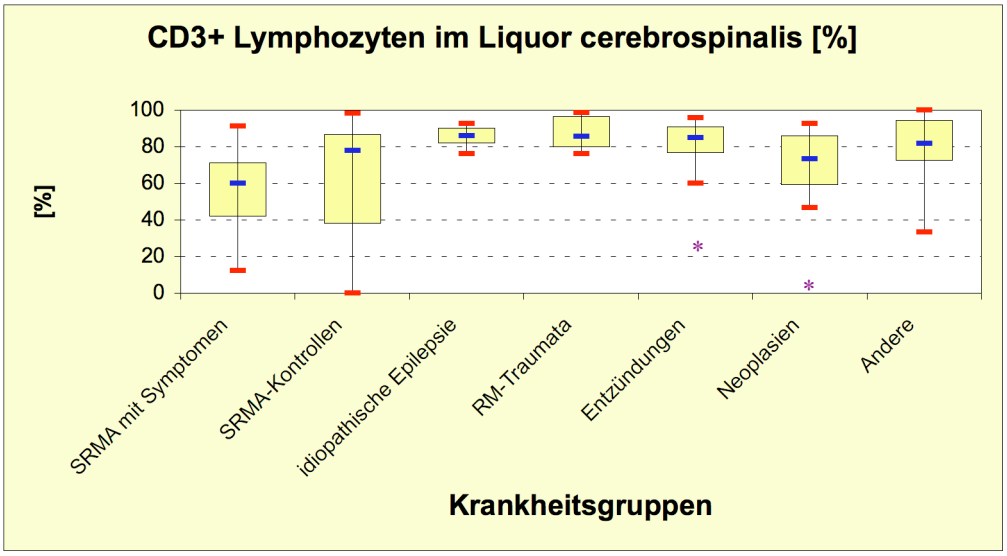


Abb. 4.23: Ergebnisse der direkten Immunphänotypisierung der Lymphozyten des Liquor cerebrospinalis mit einem monoklonalen gegen CD3 gerichteten Antikörper (RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Die außerhalb der Spannweitenlinien gelegenen Werte (*) wurden als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

4.2.2.1.2 B-Zellmarker

4.2.2.1.2.1 CD21

Die Ergebnisse der gesamten Stichprobe bezüglich ihres Anteils CD21-positiver Zellen an denjenigen, die den CD45-Oberflächenmarker exprimieren, führen zu einem Median von 12,21 % (Spanne: 0 % bis 96,92 %).
Die Krankheitsgruppe mit dem höchsten Median ist die der Hunde mit klinischen Symptomen der SRMA bei Probengewinnung. Der Wert liegt bei 39,69 %. Mit Werten von 22,11 %, 15,04 % und 12,21 % folgen die „Neoplasien“, „SRMA-Verlaufskontrollen“ und „Entzündungen“. Die Mediane der übrigen Gruppen liegen bei ≤ 8 %. In allen Krankheitsgruppen traten Messungen auf, bei denen der Liquor keine B-Zellen enthielt. Die Ausnahme bildet hier die Gruppe „SRMA mit Symptomen“. Bei diesen Hunden waren stets CD21-positive Lymphozyten zu messen, der kleinste Wert liegt bei knapp 10 % (siehe Abb. 4.24).
Der Anteil der B-Zellen liegt innerhalb der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ hochsignifikant über dem der Übrigen, ausgenommen der Gruppen „SRMA-Verlaufskontrollen“ und „Neoplasien“ (p-Wert < 0,01). Die Werte der Hunde zum Zeitpunkt der SRMA-Verlaufsuntersuchung sind hochsignifikant bzw. signifikant über denen der Gruppen „idiopathische Epilepsie“ und „Rückenmarkstraumata“ (p-Wert < 0,01 bzw. 0,05).
Anteile von > 50 % B-Zellen wurden bei zehn Tieren gemessen, die ausschließlich aus den beiden Gruppen mit an SRMA erkrankten Hunden sowie aus der Gruppe der Neoplasien stammen.

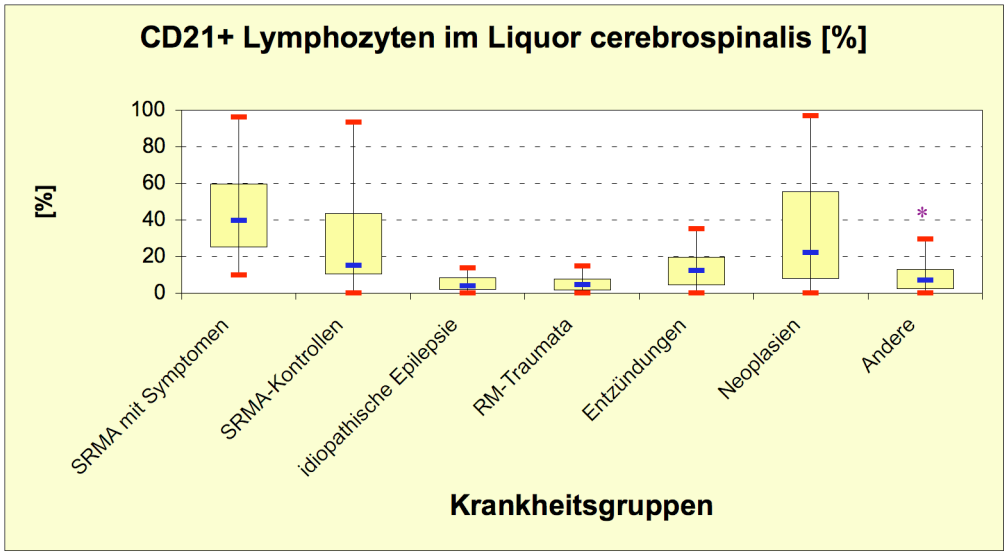


Abb. 4.24: Ergebnisse der direkten Immunphänotypisierung der Lymphozyten des Liquor cerebrospinalis mit einem monoklonalen gegen CD21 gerichteten Antikörper (RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Der außerhalb der Spannweitenlinie gelegene Wert (*) wurde als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

4.2.2.1.3 Verhältnisse der Lymphozytensubpopulationen

4.2.2.1.3.1 Verhältnis von CD3- zu CD21-positiven Lymphozyten

Für die Berechnung des Verhältnisses der CD3- zu CD21-positiven Lymphozyten der Gehirnrückenmarksflüssigkeit wurden alle Meßwerte, die unter 2 % lagen, auf 2 % aufgerundet.

Die Verhältnisse von T- zu B-Lymphozyten der gesamten Stichprobe liegen (nach Rundung auf ganze Zahlen) zwischen 0 und 50. Der Median dieser Werte beträgt 6.

Der Median der Quotienten aus der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ ist mit 1 der mit Abstand kleinste. Es folgen die Mediane der „Neoplasien“, „SRMA-Verlaufskontrollen“ und

„Entzündungen“. Die verbleibenden Krankheitsgruppen haben Mediane, die ein Verhältnis von mehr als zehnmal so vielen T-Lymphozyten wie B-Lymphozyten bedeuten (siehe Abb. 4.25).

Die Quotienten der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ sind hochsignifikant kleiner als die der Krankheitsgruppen „idiopathischen Epilepsie“, „Rückenmarkstraumata“, „Entzündungen“ und „Anderen“ auf (p-Wert < 0,01). Das Verhältnis der T- zu B-Zellen in der Gruppe „SRMA-Verlaufskontrollen“ ist hochsignifikant geringer als in den Gruppen „idiopathische Epilepsie“ und „Rückenmarkstraumata“ (p-Wert < 0,01). Der Unterschied zu den „Anderen“ ist signifikant (p-Wert < 0,05).

Die einzigen Krankheitsgruppen mit Individuen, in deren Gehirnrückenmarksflüssigkeit mehr B- als T-Zellen gemessen werden konnten, sind die der SRMA-Erkrankungen und der Neoplasien.

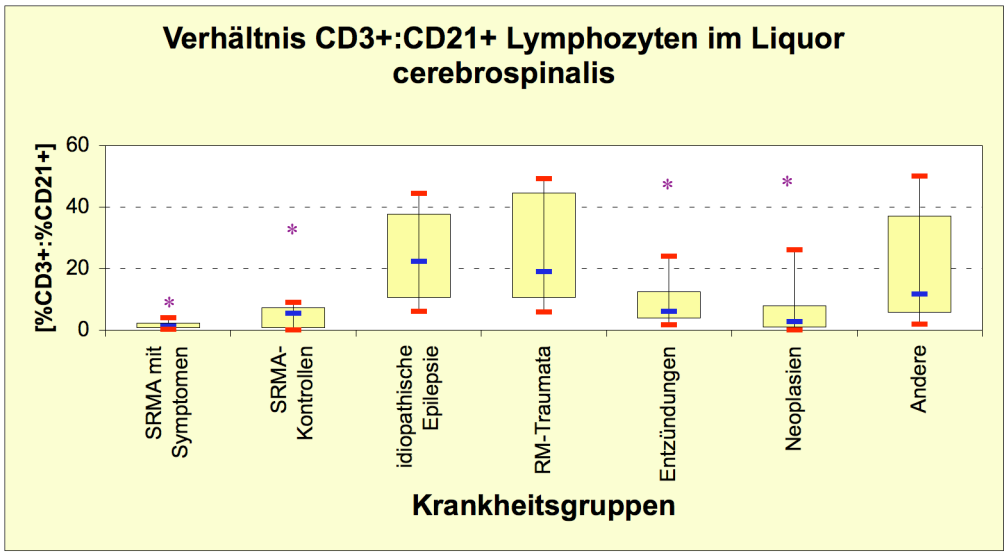


Abb. 4.25: Quotienten der Ergebnisse der direkten Immunphänotypisierung von Lymphozyten der Gehirnrückenmarksflüssigkeit mit monoklonalen gegen CD3 und CD21 gerichteten Antikörpern (RM = Rückenmark, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Die außerhalb der Spannweitenlinie gelegenen Werte (*) wurden als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

Der Vergleich der Verhältnisse von T- zu B-Zellen im peripheren Blut mit dem in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit zeigt, daß die Werte bei acht der 84 Tiere in etwa übereinstimmen (die Quotienten (PB:CSF) liegen zwischen 0,9 und 1,1). Für 30 der Tiere liegt der Quotient unter 0,9, das heißt, daß bei diesen Hunden das Verhältnis im Liquor zu gunsten der T-Lymphozyten verschoben ist. Für die übrigen 46 Hunde wurde gezeigt, daß das Verhältnis in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit vermehrt B-Lymphozyten aufweist. Der Quotient der Verhältnisse von Blut zu Liquor dieser Tiere liegt über 1,1.

Dieser im Vergleich erhöhte Anteil von B-Zellen findet sich bei 100 % der Individuen aus der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ und bei 70 % aus der Gruppe „SRMA-Verlaufskontrollen“. Für die „Neoplasien“ und „Entzündungen“ trifft dies für 64 % bzw. 60 % zu. Hierzu gehören auch die Hunde Nummer 52 (Diagnose: bakterielle Meningomyelitis), 63 und 66 (Verdachts- bzw. bestätigte Diagnose: intrakranielles Meningeom), die jeweils eine neutrophile Pleozytose hatte.

Die Quotienten liegen in der Gruppe der Hunde mit Symptomen der SRMA signifikant (p-Wert < 0,05) über denen der übrigen Gruppen ausgenommen derer der „Neoplasien“. Im Vergleich mit den Krankheitsgruppen „idiopathische Epilepsie“, „Rückenmarkstraumata“ und „Andere“ ist der Unterschied hochsignifikant (p-Wert < 0,01). Für die Gruppe der „SRMA-Verlaufskontrollen“ zeigt sich gegenüber der der „idiopathischen Epilepsie“ und „Rückenmarkstraumata“ ein signifikant höherer Wert (p-Wert < 0,05).

Die Abbildung 4.26 stellt die T- zu B-Zellverhältnisse für das Blut und die Gehirnrückenmarksflüssigkeit in Form von *Box Plots* dar. In der Gruppe der „SRMA mit Symptomen“ weist das CD3:CD21-Verhältnis im Blut hochsignifikant höhere Werte als in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit auf (p-Wert < 0,01).

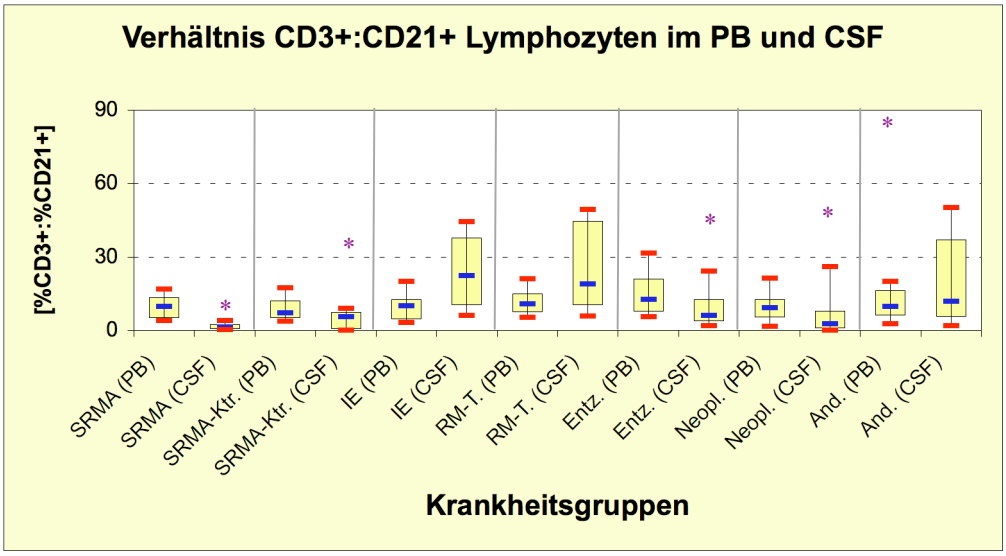


Abb. 4.26: T- zu B-Zellverhältnis im peripheren Blut (PB) sowie im Liquor cerebrospinalis (CSF). (And. = Andere, Entz. = Entzündungen, IE = idiopathische Epilepsie, Neopl. = Neoplasien, RM-T. = Rückenmarkstraumata, SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis*, SRMA-Ktr. = SRMA-Kontrollen) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil. Die außerhalb der Spannweitenlinie gelegenen Werte (*) wurden als Ausreißer identifiziert (Kriterien: > 4 x Standardabweichung bei einem p-Wert von < 0,05).)

4.2.2.1.3.2 Verhältnis von CD4- zu CD8α-positiven Lymphozyten

Für die Hunde der Krankheitsgruppe „SRMA mit Symptomen“ wurde auch im Liquor cerebrospinalis das Verhältnis von T-Helferzellen zu zytotoxischen T-Zellen bestimmt. Die Werte streuen nach Rundung auf eine Dezimalstelle in einem Bereich von 0,4 bis 5,5. Der Median liegt bei 1,8. Das Verhältnis im Liquor ist für die gesamte Gruppe deutlich enger als das im peripheren Blut. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (p-Wert < 0,05).

Werden die Quotienten für ein jedes Individuum verglichen, so zeigen neun der zwölf Hunde (Nummer 8, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 18 und 19) dieses im Vergleich engere Verhältnis in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit. Bei dem Hund Nummer 10 verhält es sich gegenteilig. Die

Hunde Nummer 14 und 15 weisen im Liquor und Blut einen nahezu identischen Quotienten auf.

Das Verhältnis der CD4- zu CD8α-positiven Lymphozyten der Hunde Nummer 48 (Diagnose: Enzephalitis unbekannter Ätiologie) und 63 (Diagnose: Meningeom) in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit liegt in einem ähnlichen Bereich wie das der Hunde mit SRMA. Für das Tier Nummer 66 (Diagnose: Meningeom) hingegen ist das Verhältnis in Richtung der T-Helferzellen verschoben. Während bei dem Hund Nummer 48 wie bei dem Großteil der Hunde mit SRMA ein engeres Verhältnis als im Blut besteht, ist das der anderen beiden zu gunsten der CD4-positiven Lymphozyten verschoben.

Die Abbildung 4.27 erlaubt einen Vergleich der im Blut und der in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit gemessenen Werte.

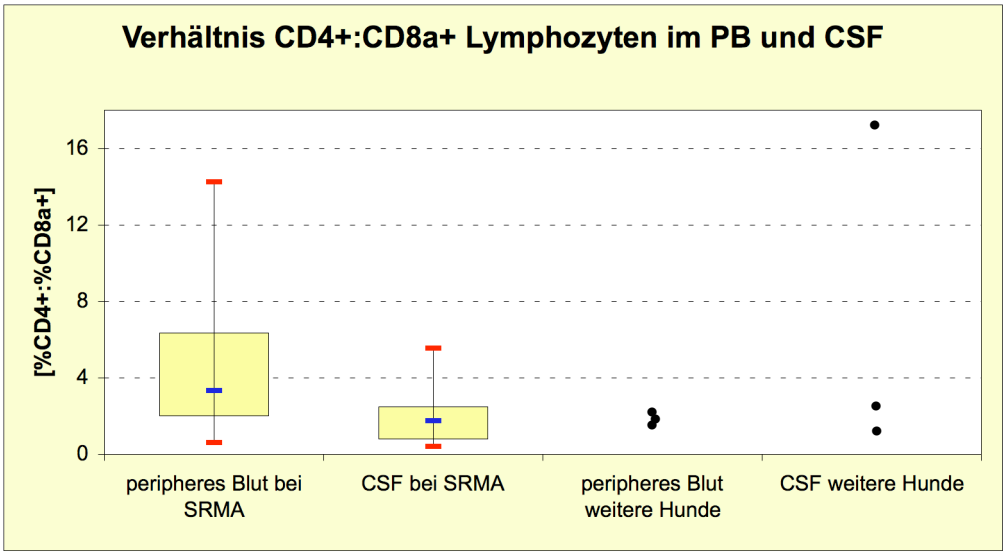


Abb. 4.27: Quotienten der Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung von Lymphozyten des peripheren Blutes (PB) und der Gehirnrückenmarksflüssigkeit (CSF) bei Hunden der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ sowie weiteren Tieren (Nummer 48, 63 und 66) mit monoklonalen gegen CD4 und CD8α gerichteten Antikörpern (CD8a = CD8α) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil.)

4.2.2.1.3.3 Verhältnisse der Lymphozytensubpopulationen im Verlauf

Wird die Entwicklung des T- zu B-Zellvehältnisses im Liquor im Verlauf der steril-eitrigen Meningitis-Arteriitis betrachtet, so zeigt sich, daß es nach Einleitung der Therapie bei dem überwiegenden Teil der Hunde zu einer Verschiebung des Verhältnisse zu gunsten der T-Zellen kommt. Die Hunde Nummer 10 und 12 stellen hier eine Ausnahme dar. Unter der Therapie schwanken die Werte.

Als der Hund Nummer 8 sein Rezidiv erlitt, zeigte er im Vergleich zu den Quotienten bei der SRMA-Diagnose einen relativ hohen Wert (siehe Abb. 4.28).

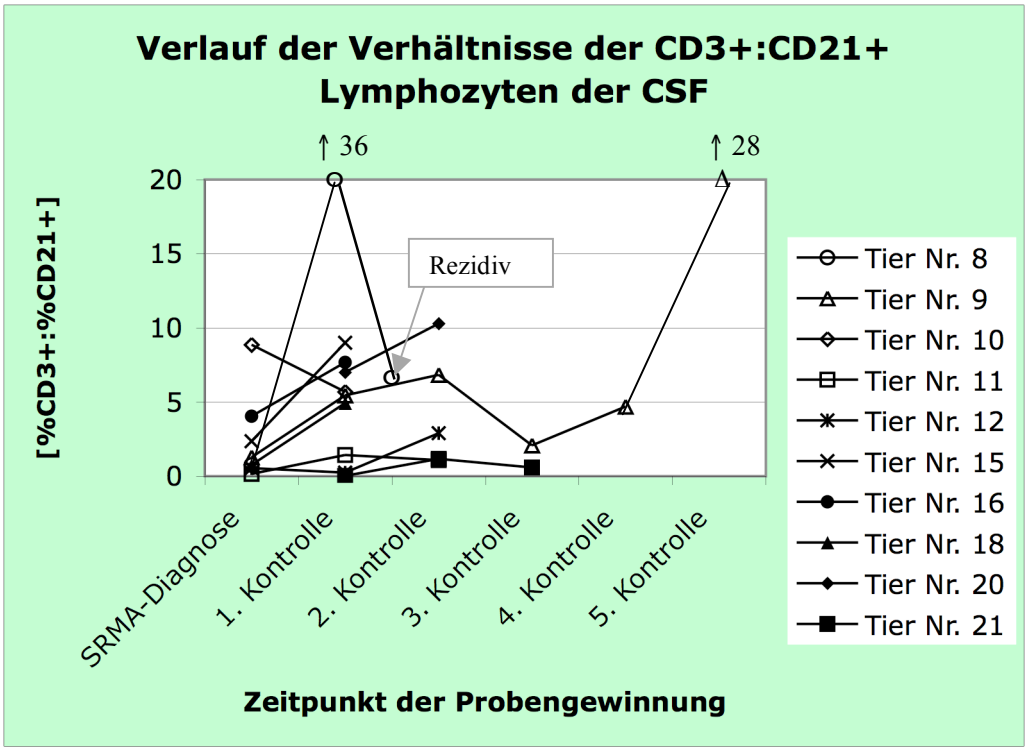


Abb. 4.28: Verlauf für das Verhältnis von T- zu B-Lymphozyten im Liquor cerebrospinalis (CSF) von an SRMA (*Steroid Responsive Meningitis Arteritis*) erkrankten Hunden (Nr. = Nummer))

Der Verlauf bei den Hunden Nummer 42 und 44, bei denen eine protozoäre Infektion des zentralen Nervensystems diagnostiziert wurde, zeigt in beiden Fällen einen Anstieg des, bei beiden schon zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung recht hohen, Quotienten. Im ersten Fall

stieg das T- zu B-Zellverhältnis von 24,0 auf 36,3, bei dem zweiten Patienten von 45,3 auf 58,8.

4.2.2.2 Immunphänotypisierung der polymorphkernigen Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit

4.2.2.2.1 Integrinexpression

4.2.2.2.1.1 CD11a, CD11b und CD11c

Der Median der Fluoreszenzintensitäten nach indirekter Immunphänotypisierung des **CD11a**-Antigens liegt innerhalb der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ mit einem Wert von 365,72 über dem der Messungen dieser Gruppe im Blut (212,05) (siehe Abb. 4.29). Werden die Liquor- und Blutwerte der einzelnen Hunde miteinander verglichen, so findet sich bei jeweils fünf Hunden (Nummer 11, 12, 13, 14 und 17 bzw. 8, 9, 15, 16 und 18) eine stärkere bzw. geringere Expression des Integrins auf den Zellen in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit. Bei dem Hund Nummer 19 zeigt sich eine Übereinstimmung beider Werte.
Für die Gruppe „SRMA mit Symptomen“ besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Expression im Blut und der im Liquor (p-Wert > 0,05).
Die CD11a-Expression der drei Hunde aus anderen Krankheitsgruppen, die jeweils eine neutrophile Pleozytose aufwiesen (Nummer 52, 63 und 66; Diagnosen: bakterielle Meningomyelitis, Meningeom), ist im Liquor cerebrospinalis stets höher als im peripheren Blut.

Die Intensitäten nach **CD11b**-Markierung liegen in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit von den Hunden, die zum Zeitpunkt der Probengewinnung SRMA-bedingte klinische Symptome zeigten, zwischen 259,85 und 3531,09 (Median: 1985,18) (siehe Abb. 4.29). Die Vergleichswerte im Blut streuen zwischen 388,91 und 3278,12 mit einem Median von 1546,08.

Bei der Hälfte der Hunde (Nummer 8, 10, 13, 14, 17 und 19) wurde im Liquor eine höhere Intensität als im Blut gemessen, bei vier Tieren (Nummer 9, 11, 12 und 18) verhielt es sich umgekehrt und bei den Hunden Nummer 15 und 16 stimmen die beiden Werte in etwa überein. Die CD11b-Expression der Liquorzellen des Hundes Nummer 8 zum Zeitpunkt seines SRMA-Rezidivs war um das vierfache höher als die der Blutzellen.
Wie schon im Falle des Integrins CD11a zeigt sich auch für dieses Antigen kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten des Blutes und denen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit (p-Wert > 0,05).
Der Vergleich der Messungen der nicht an SRMA erkrankten Hunde (Nummer 52, 63 und 66) bezüglich der Antigenexpression in Blut und Liquor ergibt, daß die Werte einander entsprechen.

Die geringste gemessene Intensität innerhalb der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ nach Färbung der polymorphkernigen Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit mit dem gegen **CD11c** gerichteten monoklonalen Antikörper beträgt 46,13. Der Maximalwert liegt bei 371,69, der Median bei 223,7 (siehe Abb. 4.29). Die entsprechenden Werte der Messungen des Blutes erstrecken sich von 37,86 bis 500,29 (Median: 160,05).
Bei jeweils fünf der Hunde (Nummer 8, 12, 13, 14 und 17 bzw. 9, 15, 16, 18 und 19) weisen die Zellen des Liquors im Vergleich zu denen des Blutes eine stärkere bzw. schwächere Fluoreszenz auf, bei dem Tier Nummer 11 unterscheiden sich die Werte kaum.
Auch für das dritte Integrin war beim Vergleich der Expression im Blut und im Liquor kein signifikanter Unterschied erkennbar (p-Wert > 0,05).
Die CD11c-Expression auf den polymorphkernigen Zellen des Blutes und des Liquors ist bei den Hunden Nummer 52 und 63 in etwa gleichen Ausmaßes. Für den Hund Nummer 66 wurden in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit höhere Werte gemessen.

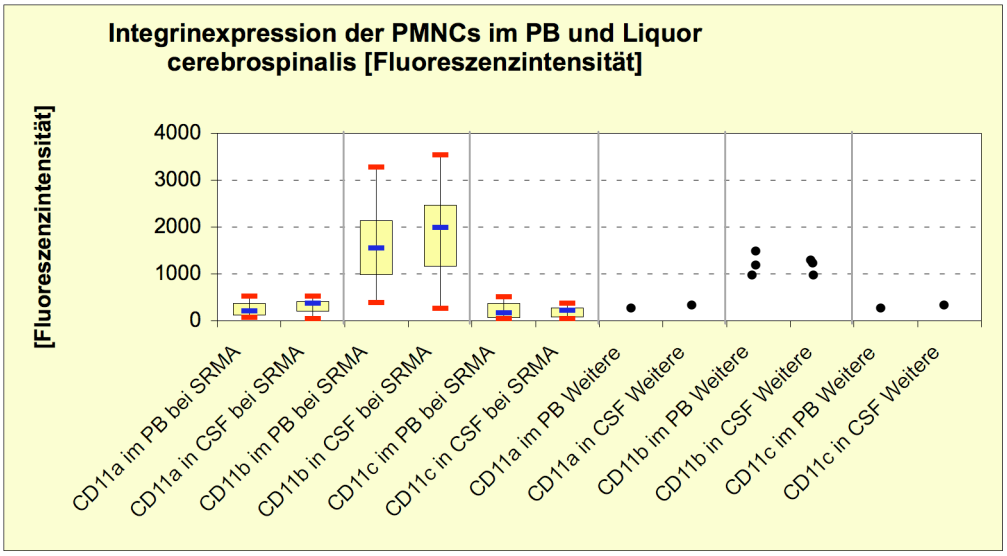


Abb. 4.29: Ergebnisse der indirekten Immunphänotypisierung der PMNCs des peripheren Blutes (PB) und der Gehirnrückenmarksflüssigkeit (CSF) von den Hunden der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ mit monoklonalen, gegen die Integrine CD11a, b und c gerichteten, Antikörpern (PMNCs = polymorphkernige Zellen) (Darstellungsweise als *Box Plot*: Der obere und untere Querstrich geben die Lage des Maximal – bzw. Minimalwertes innerhalb der Krankheitsgruppe, der in der Mitte gelegene die des Medians an. Die Box beschreibt den Abschnitt zwischen dem 1. und 3. Quartil.)

4.2.3 Einflüsse einer Glukokortikosteroidvorbehandlung und Korrelationen von Parametern

Für die Untersuchung auf den **Einfluß einer Glukokortikosteroidvorbehandlung** auf die verschiedenen Parameter wurde sowohl die gesamte Stichprobe als auch die Gruppe „SRMA mit Symptomen“ in eine vorbehandelte und eine nicht vorbehandelte Untereinheit aufgeteilt.
Der Vergleich für die gesamte Stichprobe ergab keine signifikanten Unterschiede.
Bei Betrachtung des Einflusses auf die Tiere mit Symptomen der SRMA zeigt sich bei den vorbehandelten Hunden ein signifikant geringerer Anteil CD45RA-positiver Lymphozyten im peripheren Blut ($p < 0,05$). Während der Median der Vorbehandelten etwa 82 % beträgt, liegt der der nicht vorbehandelten Hunde bei knapp 92 %.

Die Überprüfung auf **Korrelationen** verschiedener Parameter erfolgte sowohl für die **gesamte Stichprobe** als auch für die Krankheitsgruppen **„SRMA mit Symptomen“** und **„SRMA-Verlaufskontrollen“**. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4.6, 4.7 und 4.8 dargestellt.

Tab. 4.6: Signifikante Korrelationen für die gesamte Stichprobe (p-Wert < 0,01)

Parameter	Parameter	SRK
Alter	Verhältnis CD4+:CD8α+ Lymphozyten im PB	- 0,314
Alter	Anteil CD45RA+ Lymphozyten im PB	- 0,698*
CD3+:CD21+ Lymphozyten im PB	Verhältnis CD4+:CD8α+ Lymphozyten im PB	- 0,345
CD11a-Expression der Polymorphkernigen des PB	CD11b-Expression der Polymorphkernigen des PB	+ 0,469*
CD11a-Expression der Polymorphkernigen des PB	CD11c-Expression der Polymorphkernigen des PB	+ 0,488*
CD11b-Expression der Polymorphkernigen des PB	CD11c-Expression der Polymorphkernigen des PB	+ 0,694*
IgA-Gehalt des CSF	Verhältnis CD3+:CD21+ Lymphozyten im CSF	- 0,534*

* = hochsignifikant (p-Wert < 0,001); CSF = Liquor cerebrospinalis; PB = peripheres Blut; SRK = Spearmans Rang-Korrelationskoeffizient

Tab. 4.7: Signifikante Korrelationen in der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ (p-Wert < 0,05)

Parameter	Parameter	SRK
Alter	Verhältnis CD3+:CD21+ Lymphozyten im PB	+ 0,648
Zahl der Neutrophilen im PB	CD11a-Expression der Polymorphkernigen des PB	+ 0,755*
IgA-Gehalt des Serums	Anteil CD4+ Lymphozyten im PB	+ 0,608
CD3+:CD21+ Lymphozyten im PB	Verhältnis CD4+:CD8α+ Lymphozyten im PB	- 0,643
Anteil CD8α+ Lymphozyten im PB	Anteil CD45RA+ Lymphozyten im PB	+ 0,608
CD11a-Expression der Polymorphkernigen des PB	CD11b-Expression der Polymorphkernigen des PB	+ 0,755*
CD11a-Expression der Polymorphkernigen des PB	CD11c-Expression der Polymorphkernigen des PB	+ 0,825*
CD11b-Expression der Polymorphkernigen des PB	CD11c-Expression der Polymorphkernigen des PB	+ 0,867**
Zahl der Leukozyten im CSF	Anteil CD8α+ Lymphozyten im PB	- 0,580
Zahl der Neutrophilen im CSF	Verhältnis CD3+:CD21+ Lymphozyten im PB	- 0,836*
Zahl der Neutrophilen im CSF	Anteil CD45RA+ Lymphozyten im PB	- 0,682
IgA-Gehalt des CSF	Gesamtproteingehalt des CSF	+ 0,803*
IgA-Gehalt des CSF	Verhältnis CD3+:CD21+ Lymphozyten im CSF	- 0,662
Verhältnis CD4+:CD8α+ Lymphozyten im CSF	Anteil CD45RA+ Lymphozyten im PB	- 0,608
CD11b-Expression der Polymorphkernigen des CSF	CD11c-Expression der Polymorphkernigen des CSF	+ 0,645

* = hochsignifikant (p-Wert < 0,01); ** = hochsignifikant (p-Wert < 0,001); CSF = Liquor cerebrospinalis; PB = peripheres Blut; SRK = Spearmans Rang-Korrelationskoeffizient

Tab. 4.8: Signifikante Korrelationen in der Gruppe „SRMA-Verlaufskontrollen“ (p-Wert < 0,01)

Parameter	Parameter	SRK
IgA-Gehalt des CSF	Verhältnis CD3+:CD21+ Lymphozyten im CSF	- 0,815

CSF = Liquor cerebrospinalis; SRK = Spearmans Rang-Korrelationskoeffizient

5 DISKUSSION

Die Ätiologie und Pathogenese der steril-eitrigen Meningitis-Arteriitis (SRMA) sind bis heute weitgehend ungeklärt. Versuche, die Erkrankung durch Blut (SCOTT-MONCRIEFF et al. 1992) bzw. durch den Liquor cerebrospinalis (HARCOURT 1978) erkrankter Tiere zu übertragen, scheiterten. Auch die Bemühungen, Viren durch elektronenmikroskopische Untersuchungen (HARCOURT 1978) sowie durch Transmission auf embryonierte Hühnereier (HARCOURT 1978) und Zellkulturen (HARCOURT 1978, MERIC et al. 1986) nachzuweisen, mißlangen. In einer Studie wurde allerdings die Formation vielkerniger Riesenzellen mit ringförmiger Anordnung der Kerne in der Zellkultur beobachtet. Die Autoren werteten dies als einen Hinweis auf eine mögliche retrovirale Ätiologie der Erkrankung (FELSBURG et al. 1992). Bakterien konnten ebenfalls trotz wiederholter Versuche nicht aus der Gehirnrückenmarksflüssigkeit kranker Hunde isoliert werden (HARCOURT 1978, RUSSO et al. 1983, MERIC et al. 1985, MERIC et al. 1986, KÄLIN et al. 1987, SCOTT-MONCRIEFF et al. 1992, PONCELET und BALLIGAND 1993, TIPOLD und JAGGY 1994, CIZINAUSKAS et al. 2000).

Viele Autoren vermuten, daß eine Fehlregulation des Immunsystems, möglicherweise verursacht durch ein infektiöses Agens oder einen Umweltfaktor, für die Entstehung und Unterhaltung der Erkrankung verantwortlich ist (MERIC et al. 1985, SCOTT-MONCRIEFF et al. 1992, TIPOLD und JAGGY 1994, TIPOLD et al. 1994, TIPOLD et al. 1995).

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, Hinweise auf eine solche Dysregulation bei der Pathogenese der steril-eitrigen Meningitis-Arteriitis zu bekommen.

5.1 Methodik

Zur Charakterisierung der Zellen wurde die Durchflußzytometrie gewählt, weil sie gegenüber alternativen Techniken wie der Immunzytochemie eine Reihe von Vorteilen bietet. Sie ist

einfacher, weniger zeitaufwendig, erlaubt die Markierung mit einer größeren Zahl von Antikörpern, läßt eine größere Anzahl von Zellen auswerten und geht, was insbesondere für die Arbeit mit der zellarmen Gehirnrückenmarksflüssigkeit von Bedeutung ist, mit geringeren Zellverlusten einher (TIPOLD et al. 1998a).

Die Aufbereitung der Proben erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation, weil ein Teil der so gewonnenen Zellen für weiterführende Untersuchungen asserviert wurde. Während humanmedizinische Publikationen eine Abnahme des Anteils zytotoxischer T-Zellen nach Dichtegradientenzentrifugation erwähnen (ROMEU et al. 1992, KUTVIRT et al. 1993), scheint diese Methode der Zellseparation bei Behandlung kaniner Blutzellen nicht zum Verlust einer speziellen Lymphozytensubpopulation zu führen (FALDYNA et al. 2001).

Zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Lösung mit dem humanen Immunglobulin und das gepoolte hitzeinaktivierte Ziegenserum getestet, weil beide Methoden im Zusammenhang mit der indirekten Membranimmunfluoreszenz mit von der Ziege stammenden Sekundärantikörpern beschrieben sind (FALDYNA et al. 2001, STEIN et al. 2004). Die Lösung mit dem humanen Immunglobulin erwies sich bei den Lymphozyten als wirksam, führte aber bei einem Teil der polymorphkernigen Zellen zu einer Erhöhung der Intensität im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. Die Änderung des Fluoreszenzverhaltens wurde als eine Aktivierung oder ein Zugrundegehen der Zellen gedeutet. Dieser Effekt könnte durch eine Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Inhaltsstoffen der Lösung bedingt sein. Einer oder mehrere dieser Stoffe führten möglicherweise auch zu der verstärkten Fluoreszenz der Negativkontrollen, die so bei den Lymphozyten nicht beobachtet worden war. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde das Blocken der beiden Zelltypen auf unterschiedliche Weise durchgeführt.

Die Möglichkeit, daß Antikörper, die durch zugrunde gegangene Zellen aufgenommen wurden, entscheidend zu den Meßergebnissen beigetragen haben (CARTER und ORMEROD 2000), ist für das Blut auszuschließen. Der geringe Anteil der für To-Pro-3® positiven Zellen von jeweils < 0,5 %, sowohl bei den Lymphozyten als auch bei den polymorphkernigen Zellen (PMNCs) des Blutes, spricht gegen einen solchen Fehler.

Bei den Zellen des Liquors hingegen, von denen bekannt ist, daß die Integrität der Zellmembran im Laufe der Präparation bei einem bedeutenden Anteil der Zellen Schaden nimmt (DUX et al. 1994), wäre ein solcher Einfluß durchaus denkbar. Allerdings wäre dies in dem Großteil der Fälle mit einer Änderung von Größe und Granularität der Zellen verbunden gewesen, so daß diese außerhalb der Lymphozytenregion zu liegen gekommen wären. Desweiteren hätten ebenso die Fluorochrom-markierten Isotyp-Negativkontrollen durch diese Zellen aufgenommen werden müssen. Das Mitführen der adäquaten Negativkontrollen schließt einen derartigen Fehler somit aus.

Die Reinheit der Lymphozytenregion, die, wie auch in der *Guideline for Flow Cytometric Immunophenotyping* des National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS (NIAID DAIDS), (CALVELLI et al. 1993) beschrieben, durch den Anteil der für CD14-negativen und CD45-positiven Zellen bestimmt wurde, liegt mit einem Wert von etwa 90 % in dem von dem NIAID DAIDS geforderten Bereich von > 85 %. Ob, wie ebenfalls gefordert, mindestens 90 % der Lymphozyten innerhalb der Region liegen, wurde nicht untersucht. Der Vergleich zwischen den Ergebnissen nach sehr eng und sehr großzügig gesetzten Regionen zeigt jedoch, daß dieser Wert für die Ergebnisse dieser Studie irrelevant ist, da auch, wenn dieser Prozentsatz offensichtlich unterschritten wurde (wie im Falle der engen Region), keine Werte gefunden wurden, die entscheidend von den Ergebnissen abwichen, die nach Festlegung einer einen größeren Anteil der Lymphozyten enthaltenden Region bestimmt wurden.
Die Reinheit der Region der PMNCs wurde nicht durch die Expression bzw. das Fehlen der Expression eines Oberflächenmarkers allein bestimmt. Zunächst wurde gezeigt, daß > 99 % der Zellen CD14-positiv waren. Anhand dieses Befundes konnte eine Kontamination mit den ebenfalls CD14-positiven Monozyten zunächst noch nicht ausgeschlossen werden. Die Tatsache jedoch, daß bei dem weitaus größten Teil der Messungen keine Lymphozyten und in wenigen Fällen nur sehr wenige Lymphozyten gemessen wurden, läßt eine Verunreinigung mit Monozyten als unwahrscheinlich erscheinen.

Die Meßreihe zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zeigt, daß die Variationen bei Messungen von identischen Proben zwar nicht in allen Fällen den strengen Kriterien des NIAID DAIDS, die eine maximale Streuung von 3 % gestatten (CALVELLI et al. 1993), genügen, jedoch in keinem Fall deutlich von dieser Vorgabe abweichen.

Die Immunphänotypisierung von den Zellen des Blutes und der Gehirnrückenmarksflüssigkeit war, wie für den Liquor bereits durch TIPOLD et al. (1998) und DUQUE et al. (2002) beschrieben, zuverlässig möglich und technisch bedingte Fehlmessungen waren nicht zu beklagen.
Auf eine Messung von Patientenmaterial wurde allerdings, wie auch von TIPOLD et al. (1998), in den Fällen, in denen eine Erythrozytenkontamination des Liquors vorlag, verzichtet. Dadurch sollte sichergestellt werden, daß die charakterisierten Zellen tatsächlich aus dem Kompartiment der Gehirnrückenmarksflüssigkeit und nicht aus dem Blut stammten. Dies ist auch der Grund für die nur lückenhaften Daten für den SRMA-Verlauf. Bei den SRMA-Verlaufsuntersuchungen wurden drei von 22 Proben wegen einer solchen Blutkontamination verworfen.

Die Angaben über die prozentualen Anteile an Lymphozyten im peripheren Blut und in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit gesunder Hunde variieren mitunter deutlich (MOORE et al. 1992, CHABANNE et al. 1995, DIRSCHERL et al. 1995, GREELEY et al. 1996, TIPOLD et al. 1998a, BYRNE et al. 2000, FALDYNA et al. 2001, DUQUE et al. 2002, GAUTHIER et al. 2005) (siehe Tab. 5.1).
Die Gründe für diese Schwankungen können vielschichtig sein. So stellen die Wahl der Antikörper, das Alter und die Rasse der Hunde, das verwendete Behandlungsprotokoll sowie die Technik der Auswertung mögliche Einflußfaktoren auf die Ergebnisse dar (GRATAMA et al. 1997, BYRNE et al. 2000, FALDYNA et al. 2001). Auch dürften, aufgrund der enormen Sensitivität der Durchflußzytometrie, selbst kleinste Variationen bei der Labortätigkeit für Schwankungen der Resultate verantwortlich sein. Diese Annahme wird durch den Vorversuch zur Reproduzierbarkeit gestützt, der zeigt, daß selbst bei identischen Proben eine leichte Streuung der Meßergebnisse auftritt. Daher scheint es sinnvoll, daß alle Messungen einer Studie durch dieselbe Person durchgeführt werden und daß ein Vergleich von Werten, um

Aussagen über Besonderheiten bei einer Erkrankung treffen zu können, nur innerhalb einer Studie erfolgt. Bei der Bewertung der Anteile einer Lymphozytensubpopulation muß desweiteren beachtet werden, daß auch bei Gesunden intraindividuelle Schwankungen auftreten. DIRSCHERL et al. (1995) bestimmten den Prozentsatz der T-Helferzellen im Blut eines gesunden Hundes zu vier Zeitpunkten innerhalb eines Jahres und ermittelten bei einem Mittelwert von 44,8 % eine Standardabweichung von 5,9 %. Dieser Befund verdeutlicht die Notwendigkeit einer ausreichend großen Stichprobe, um verläßliche allgemeingültige Aussagen treffen zu können.

Tab. 5.1: Literaturübersicht des nach Immunphänotypisierung durchflußzytometrisch bestimmten Anteils von Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut gesunder Hunde mit Vergleich zu den gesunden Tieren der vorliegenden Studie (die Bestimmung der fettgedruckten Werte erfolgte mit den Antikörperklonen, die auch in dieser Arbeit Anwendung fanden)

Referenz	Alter in Jahren	T-Zellen [% ± SD]	TCR α/β [% ± SD]	TCR γ/δ [% ± SD]	CD4 [% ± SD]	CD8α [% ± SD]	B-Zellen [% ± SD]	CD45RA [% ± SD]
(MOORE et al. 1992)	keine Angaben				**46,4 ± 8,1**	**16,4 ± 8,8**		
(CHABANNE et al. 1995)	5,5 (1-7)				47,5 ± 8,8	19,3 ± 4,0	12,2 ± 6,0	
(DIRSCHERL et al. 1995)	4 (3,5-4,5)				40,0 ± 7,5	19,0 ± 3,6		75,4 ± 12,6
(GREELEY et al. 1996)	5,8	86,1 ± 4,4			44,6 ± 6,5	33,4 ± 6,0	11,4 ± 4,2	
(TIPOLD et al. 1998a)	1	**68 ± 10**	**66 ± 11**	**3,2 ± 2,8**	**45 ± 6**	**20 ± 7**	**22 ± 6**	**79 ± 8**
(BYRNE et al. 2000)	3,7 ± 0,3	**81,2 ± 3,7**			**41,7 ± 9,0**	**28,6 ± 10,0**	**15,4 ± 3,9**	
(FALDYNA et al. 2001)	> 5	**83,6 ± 5,3**		**1,7 ± 1,6**	**40,3 ± 4,2**	**23,1 ± 3,8**	**15,0 ± 6,3**	
(DUQUE et al. 2002)	keine Angaben				**40,1 ± 11,4**	**19,5 ± 7,9**	**18,8 ± 9,1**	
(GAUTHIER et al. 2005)	0,7 ± 2,6	**75,0 ± 8,6**	**75,1 ± 9,5**	1,7 ± 1,0	43,7 ± 6,4	21,4 ± 4,4	**13,4 ± 7,1**	**82,4 ± 8,7**
vorliegende Studie	5,5 ± 0,8	**84,1 ± 5,6**	**71,6 ± 6,2**	**2,9 ± 0,9**	**34,7 ± 2,6**	**29,8 ± 2,9**	**4,8 ± 1,3**	**62,5 ± 7,7**

arith. M. = arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung; TCR = T-Zell-Rezeptor

Die Anteile der CD3-, TCRα/β- und TCRγ/δ-positiven Lymphozyten des peripheren Blutes dieser Arbeit decken sich weitgehend mit denen der zitierten Veröffentlichungen.
Der Prozentsatz der T-Helferzellen liegt unter den Werten der anderen Autoren, während der der zytotoxischen T-Zellen mit den Höheren der anderen Studien vergleichbar ist. Die geringen Standardabweichungen in dieser Arbeit zeigen, daß innerhalb der Beaglegruppe eine große Homogenität herrschte. Die Hunde waren sämtlich mittleren Alters und lebten unter identischen Umwelteinflüssen. Auch die regelmäßigen Blutspenden waren ihnen gemein. Möglicherweise stellen der niedrige Prozentsatz der T-Helferzellen und das relativ enge Verhältnis der CD4- zu CD8-positiven Zellen eine Besonderheit dieser Zuchtlinie dar, wie auch zwischen verschiedenen Rassen Unterschiede bei den Anteilen der Lymphozytensubpopulationen beschrieben sind (BYRNE et al. 2000, FALDYNA et al. 2001).
Der Anteil der für das CD21-Antigen positiven Blutlymphozyten ist der geringste im Vergleich mit den übrigen Publikationen. Tatsächlich sind auch die Schwankungen zwischen den Studien, selbst bei Verwendung der identischen Antikörper, beträchtlich, und die Meßreihen weisen hohe Standardabweichungen auf. Das suboptimale Färbeverhalten des Antikörpers mag hierfür ein Grund sein. Der *Cut-off* konnte nicht ausschließlich anhand der Negativkontrollen bestimmt werden. Zusätzlich war die Einbeziehung der Kurvenform für die CD21-Fluoreszenz erforderlich (siehe Abb. 3.2 (b)), welches eine gewisse Subjektivität bedeutet. Diese Subjektivität mag also für die im Vergleich niedrigen Werte verantwortlich sein. Sie scheint jedoch vertretbar, sofern, wie in dieser Studie geschehen, für sämtliche Auswertungen dieselben Kriterien Anwendung fanden und nur zwischen Gruppen dieser Studie verglichen wird.
Der im Vergleich geringe Anteil der CD45RA-positiven Zellen bei den gesunden Hunden war überraschend. Ein Fehler bei der Handhabung des Antikörpers ist jedoch aufgrund der Befunde innerhalb der anderen Krankheitsgruppen, die sämtlich höhere Werte aufweisen, auszuschließen. Es kann spekuliert werden, daß auch in diesem Fall die große Homogenität der Gruppe bezüglich Haltung und Fütterung und eventuell eine Besonderheit dieser Beaglelinie für diesen geringen Anteil der CD45RA-positiven Zellen verantwortlich ist.

Zusammenfassend ist die Durchflußzytometrie als eine sehr sensible Methode sowohl zur Charakterisierung von Zellen aus dem Blut als auch aus der Gehirnrückenmarksflüssigkeit zu bewerten. Zu beachten ist jedoch die beträchtliche Streuung der Ergebnisse innerhalb der verschiedenen Krankheitsgruppen. Die Vorversuche zeigen, daß diese nicht auf die Technik zurückzuführen ist. Auch die Auswertung, die, wie bereits erwähnt, zu Schwankungen bei den Resultaten führen kann, ist in unserem Fall nicht für die Variation der Werte verantwortlich zu machen. Sämtliche Auswertungen erfolgten stets durch dieselbe Person nach immer gleichen Kriterien, weshalb ein solcher Fehler auszuschließen ist. Vielmehr ist anzunehmen, daß die in klinischen Studien nicht zu vermeidende Heterogenität des Patientenmaterials die Streuung der Ergebnisse bedingt. Daher scheint es sinnvoll, die heterogenen Gruppen mit SRMA vornehmlich mit den ebenfalls heterogenen Gruppen der übrigen Erkrankungen zu vergleichen. Der Vergleich mit den gesunden Hunden, deren Werte die geringste Streuung aufweisen, ist wegen der großen Homogenität dieser Gruppe, die sich auch in den Meßergebnissen widerspiegelt, weniger gut geeignet.

5.2 Ergebnisse

Bezüglich des Anteils von T- und B-Lymphozyten im peripheren Blut zeigen die Werte der Gruppen „SRMA mit Symptomen“ und „SRMA-Verlaufskontrollen“ im Vergleich mit denen der weiteren Krankheitsgruppen keine Auffälligkeiten. Dieses Resultat steht in Kontrast zu dem einer Untersuchung von allerdings nur drei akut an der SRMA erkrankten Hunden, die alle ein deutlich erniedrigtes T- zu B-Zellverhältnis im peripheren Blut aufwiesen (FELSBURG et al. 1992). Dafür, daß die B-Zellen im peripheren Blut dennoch von pathogenetischer Relevanz bei der SRMA sind, spricht allerdings der starke positive Zusammenhang vom Anteil der B-Lymphozyten im peripheren Blut und dem Ausmaß der neutrophilen Pleozytose.

In unserer Studie zeigt das Verhältnis der T-Helfer- zu den zytotoxischen T-Zellen im Blut von Hunden mit Symptomen der SRMA im Vergleich mit den übrigen Gruppen eine stärkere Dominanz der CD4-positiven Zellen. Diese ist vornehmlich durch eine niedrige absolute Zahl der CD8α-positiven Lymphozyten begründet. Der Befund einer Abnahme der CD8-positiven

Zellen stimmt mit Beschreibungen für das Kawasaki-Syndrom überein (BURNS et al. 1991). Es ist nicht möglich zu sagen, ob das hohe CD4:CD8α-Verhältnis SRMA- oder altersbedingt ist, da Vergleichswerte von gleichaltrigen gesunden Individuen nicht vorliegen. Drei Studien demonstrieren übereinstimmend, daß das Verhältnis der CD4- zu CD8-positiven Lymphozyten bei Junghunden generell vergleichsweise hoch ist (GREELEY et al. 1996, BYRNE et al. 2000, FALDYNA et al. 2001). Bei den SRMA-Verlaufsuntersuchungen offenbart sich eine Zunahme der CD8-positiven Zellen, so daß wieder ähnliche Werte wie bei den übrigen Krankheitsgruppen erreicht werden. Ein denkbarer Grund hierfür ist, neben dem Alter der Tiere, zum einen, daß die Glukokortikosteroide einen krankheitsunterhaltenden Prozeß durchbrechen und daß es dadurch wieder zu einem ähnlichen Verhältnis der beiden Lymphozytensubtypen wie bei den Vergleichsgruppen kommt. Als eine weitere Möglichkeit kommt in Betracht, daß die Normalisierung ein direkter Einfluß der Medikamente ist. Letzteres erscheint jedoch als weniger wahrscheinlich, da in einer Studie, die die Auswirkung von Prednison auf die Lymphozytensubpopulationen im Blut von gesunden Hunden untersuchte, eine Abnahme der absoluten Zahl beider Zelltypen in gleichem Maße gezeigt werden konnte (RINKARDT et al. 1999). Im Gegensatz hierzu zeigte sich jedoch in kaninen Lymphknoten nach Prednisongabe eine im Vergleich zu den CD8-positiven Lymphozyten stärkere Abnahme der CD4-positiven (AMMERSBACH et al. 2006). Die absolute Zunahme der CD8-positiven T-Zellen ließe sich hierdurch jedoch nicht erklären.

Der geringe Anteil an CD8-positiven Lymphozyten ist möglicherweise auch pathogenetisch von Bedeutung. Einen Hinweis hierauf gibt die negative Korrelation des Anteils der CD8α-positiven Zellen im peripheren Blut mit dem Ausmaß der Pleozytose. Die Ursache für die Abnahme der CD8-positiven T-Zellen und ihre direkten Folgen auf den Krankheitsprozeß sind unklar. Eventuell handelt es sich bei den CD8-positiven Zellen nicht um zytotoxische T-Zellen, sondern um sogenannte Suppressor-T-Zellen, wie sie für den Menschen beschrieben sind (SUCIU-FOCA et al. 2005). Eine derartige Vermutung wurde bereits durch TIPOLD et al. (1995) geäußert.

Das auffallend hohe CD4:CD8-Verhältnis im peripheren Blut, könnte dafür sprechen, daß ein extrazelluläres Agens als Auslöser der SRMA vorliegt. Die ausgeprägte Beteiligung der T-Helferzellpopulation legt nahe, daß im Zuge der SRMA eine humorale Immunantwort abläuft, wie sie zur Bekämpfung solcher extrazellulären Pathogene einsetzt. Daß dabei vornehmlich

Helferzellen vom Subtyp T_H2 beteiligt sind, kann vermutet werden, und wird in anschließenden Studien untersucht werden. Die große Menge von zirkulierendem IgA spricht für eine derartige ausgeprägte humorale systemische Immunantwort insbesondere auch, weil für die Gruppe „SRMA mit Symptomen“ eine positive Korrelation zwischen dem IgA-Gehalt im Serum und dem Anteil der CD4-positiven Lymphozyten im Blut besteht. Zudem spricht die Tatsache, daß im peripheren Blut ein hoher Anteil von T-Helferzellen mit einem hohen Anteil von B-Zellen einhergeht, für die Beteiligung des T_H2-Subtyps. Auch der sehr hohe Anteil von B-Zellen in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit sowie die dort von TIPOLD et al. (1995) immunhistochemisch nachgewiesenen IgA-positiven Plasmazellen passen in das Bild einer T_H2-dominierten Immunreaktion, bei der Zytokine ausgeschüttet werden, die die B-Zellproliferation und eine vermehrte Immunglobulinsynthese stimulieren (TIZARD 2004). Bei einer intrazellulären Infektion würden im Unterschied hierzu betroffene Zellen in der Regel mithilfe einer großen Zahl CD8-positiver zytotoxischer T-Zellen bekämpft werden.

Neben T-Zell-Co-Rezeptoren wurden auch die T-Zell-Rezeptoren selbst untersucht. Hierbei zeigte sich für die Hunde mit SRMA keine Änderung des Verhältnisses der α/β:γ/δ-T-Zellen im Vergleich mit den übrigen Gruppen. Der Anteil der γ/δ-T-Zellen war stets gering. Die den γ/δ-T-Zellrezeptor exprimierenden Lymphozyten scheinen somit keine pathogenetische Relevanz für die SRMA zu besitzen, wie dies für einige Autoimmunerkrankungen des Menschen bekannt ist (GERLI et al. 1991, WEN et al. 1992).
Die Markierung der Lymphozyten mit dem anti-CD45RA-Antikörper ergab sehr überraschende Resultate. Das CD45-Oberflächenmolekül ist eine transmembranöse Tyrosinphosphatase und kommt in unterschiedlichen Isoformen vor. Die verschiedenen Isoformen sind das Resultat eines alternativen *Splicing* von drei Exons, wobei der durch das *Splicing* hervorgerufene Verlust von extrazellulären Proteindomänen reversibel ist (JOHNSON et al. 1996). In Analogie zu anderen Spezies werden die CD45RA-positiven Lymphozyten auch beim Hund als naiv oder ruhend beschrieben.
Eine ältere Arbeit zeigt für Hunde mit Symptomen der SRMA einen im Vergleich zu Gesunden signifikanten Abfall von CD45RA-positiven T-Zellen, wobei dieser Abfall nach Beginn einer Glukokortikoidtherapie reversibel war (TIPOLD et al. 1997). In der vorliegenden Studie ergibt sich ein anderes Bild. Zum einen waren es die gesunden Beagle,

die den geringsten Anteil dieses Zelltyps aufwiesen. Desweiteren zeigten die akut an SRMA erkrankten Tiere den höchsten Prozentsatz, der dann bis zur ersten Verlaufskontrolle sank, zu diesem Zeitpunkt jedoch noch immer auf einem relativ hohen Niveau war. Die ungleiche Altersstruktur der Gruppen kann ein Grund für diese Resultate sein. Es ist beschrieben, daß bei gesunden Hunden im Alter von vier Monaten > 90 % der T-Zellen diesen Marker exprimieren und daß der Anteil, bis die Tiere 16 Monate alt sind, auf 70 - 80 % sinkt (TING-DE RAVIN et al. 2006). Die hochsignifikante negative Korrelation zwischen dem Alter und dem Anteil der CD45RA-positiven Lymphozyten für die gesamte Stichprobe unterstützt eine derartige Annahme. Die Abnahme des Prozentsatzes CD45RA-positiver Lymphozyten im Blut nach Therapiebeginn ist möglicherweise auf das Alter aber auch auf die Glukokortikoidwirkung zurückzuführen. In Lymphknotenaspiraten von gesunden Hunden, die an drei aufeinanderfolgenden Tagen Prednison bekamen, konnte bei den Lymphozyten ein deutlicher Abfall der Expression dieses Markers verzeichnet werden (AMMERSBACH et al. 2006). Es ist anzunehmen, daß sich zumindest ein Teil der im Blut zirkulierenden Lymphozyten aus diesem Zellpool rekrutiert. Die Vermutung eines Einflusses von Glukokortikoiden wird zudem durch den signifikanten Unterschied zwischen vorbehandelten und nicht vorbehandelten Hunden der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ gestärkt. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, wie sich der Verlauf ohne Therapie gestaltete. Eventuell ist der hohe Anteil der Lymphozyten, die dieses durch das Exon A kodierte Epitop aufweisen, doch nicht ausschließlich altersbedingt, sondern steht tatsächlich im Zusammenhang mit der akuten Phase der SRMA. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß im Zuge der akuten Entzündung durch Aufregulierung der Immunantwort eine vermehrte unspezifische Ausschwemmung von CD45RA-positiven Lymphozyten in die Blutbahn erfolgt. Da keine Gegenfärbung mit anderen Antikörpern durchgeführt wurde, fehlen Informationen darüber, auf welchen Zellen das CD45RA-Molekül vorhanden war. Aufgrund des hohen Anteils der T-Helferzellen kann mit Sicherheit gesagt werden, daß ein bedeutender Teil dieser Zellen auch CD45RA exprimierte. Darüber, ob dieses auch für einen bedeutenden Anteil der B-Zellen gilt, kann hingegen keine Aussage getroffen werden. Für die Maus ist bekannt, daß B-Zellen während ihrer Entwicklung das Antigen exprimieren und bei deren Aktivierung je nach Art der Stimulation ein Wechsel zu anderen Isoformen stattfindet (JOHNSON et al. 1996). Ob Entsprechendes auch für den Hund zutrifft, ist nicht geklärt. Da zwischen den Tierarten große

Variationen bekannt sind (JOHNSON et al. 1996), ist möglicherweise selbst die Annahme, daß das CD45RA-Antigen auch beim Hund auf naive bzw. ruhende T-Lymphozyten hindeutet, falsch. Unter Umständen geben die geplanten weiterführenden Arbeiten, in denen das Zytokinmuster der Lymphozyten bestimmt werden soll, über die Art der Interaktion dieser Zellen und über ihren Aktivierungsstatus nähere Auskunft.

Bei allen Hunden mit Symptomen der SRMA war das T- zu B-Zellverhältnis in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit niedriger als das im peripheren Blut. Das heißt, daß ein favorisierter Übertritt der B-Zellen erfolgte. Zum Zeitpunkt der ersten Verlaufskontrolle traf dies noch auf 70 % der Hunde zu. Diese Ergebnisse decken sich mit Befunden einer früheren Arbeit mit ähnlicher Fragestellung (TIPOLD et al. 1997). Insbesondere im Zusammenhang mit den hohen IgA-Gehalten im Liquorraum, deren Synthese zumindest teilweise intrathekal erfolgt (TIPOLD et al. 1994), ist die übermäßige Rekrutierung der B-Lymphozyten sehr interessant. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß ein gleichsinniger Zusammenhang zwischen dem IgA-Gehalt und dem Anteil CD21-positiver Lymphozyten im Liquor besteht. Diese hohen intrathekalen IgA-Gehalte wiederum können eine mögliche chemotaktische Komponente sein, die die Einwanderung der Neutrophilen in den Subarachnoidalraum anregt (TIPOLD et al. 1995).
Allerdings ist der vermehrte Übertritt der B-Zellen (wie auch die erhöhten IgA-Spiegel in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit) nicht auf diese Krankheitsgruppen beschränkt. In den anderen Krankheitskategorien wurde Entsprechendes jedoch nur für einen geringeren Prozentsatz der Hunde gefunden. Als Vergleich für die Hunde mit SRMA, sind Tiere, bei denen ebenfalls eine mittel- bis hochgradige polymorphkernige Pleozytose gefunden wurde, besonders wichtig. Die Hunde Nummer 52 (bakterielle Meningomyelitis), 63 und 66 (intrakranielles Meningeom) wiesen derartige Befunde auf. Bei den Dreien wurde im Liquor übereinstimmend eine Verschiebung des Lymphozytenverhältnisses in Richtung der B-Zellen und eine Erhöhung des IgA-Gehaltes gefunden.
Die Verhältnisse der CD4- zu CD8-positiven Lymphozyten in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit, die für die Hunde mit Symptomen der steril-eitrigen Meningitis-Arteriitis bestimmt wurden, sind im Vergleich mit denen des Blutes signifikant enger. Obwohl Entsprechendes in der Literatur für Gesunde beschrieben ist (TIPOLD et al.

1998a, DUQUE et al. 2002), kann, da Werte von unveränderten Liquores in dieser Studie fehlen, keine Aussage dahingehend erfolgen, ob sich der Übertritt der T-Helfer- bzw. der zytotoxischen T-Zellen bei den an SRMA erkrankten Hunden in einem besonders niedrigen bzw. hohen Maß vollzog.
Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang allerdings, daß bei den beiden Hunden mit einem intrakraniellen Meningeom und einer Pleozytose mit überwiegend Neutrophilen im CSF ein Anstieg des CD4:CD8-Verhältnisses in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit gefunden wurde. Obwohl zwei Hunde mit Sicherheit nicht für die Gesamtheit der Hunde mit diesen Befunden repräsentativ sind, könnte dies als ein Hinweis darauf gewertet werden, daß die pathogenetischen Prozesse, die die Veränderungen des Liquors herbeiführen, bei der SRMA und bei Meningeomen verschieden sind. Bis heute ist der Grund für die polymorphkernige Pleozytose, die bei etwa 20 % der Hunde in Assoziation mit intrakraniellen Meningeomen auftritt, unklar. Der Verdacht, daß sie durch Nekrosen bedingt ist, konnte nicht bestätigt werden (DICKINSON et al. 2006).

Für die Interaktion zwischen polymorphkernigen Leukozyten und Endothelzellen mit einer anschließenden Extravasation sind unter anderem die auf weißen Blutzellen exprimierten Integrine CD11a, b und c verantwortlich (HARLAN et al. 1991, RADI et al. 2001).
Die Quantität dieser Oberflächenmoleküle wurde für die Neutrophilen des Blutes sowie bei Hunden mit einer starken Pleozytose für die der Gehirnrückenmarksflüssigkeit bestimmt. Die Gruppe, deren Neutrophile des Blutes die tendenziell stärkste Fluoreszenz nach Immunphänotypisierung mit dem anti-CD11a-Antikörper zeigten, war die der Hunde mit Symptomen der SRMA. Nach Einleitung der Therapie nahm die Fluoreszenz bei der Mehrzahl der Tiere ab, um dann im Verlauf eine schwankende Expression zu zeigen.
Für die beiden anderen Integrine ergibt sich ein anderes Bild. Hier zeigen die Zellen der gesunden Beagle überraschenderweise die jeweils stärkste Expression. Daß es sich dabei um eine Besonderheit der homogenen Tiergruppe handelt, kann vermutet werden. Die übrigen Gruppen unterscheiden sich bezüglich ihrer CD11b- und CD11c-Expression kaum. Extremwerte, sowohl besonders hohe als auch besonders niedrige, werden besonders häufig bei den Tieren der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ gefunden. Der Verlauf stellt sich ähnlich

wie für das CD11a-Antigen dar. In der Mehrzahl der Fälle kam es unter der Therapie zunächst zu einem Absinken der Expression, um dann einen undulierenden Verlauf zu zeigen.
Im Zusammenhang mit der Untersuchung der Integrine ist eine Studie zur Behçet-Krankheit interessant. Bei der Erkrankung handelt es sich um eine schubartig verlaufende systemische Vaskulitis des Menschen, die in einigen Fällen auch das ZNS betrifft. Wie bei der SRMA wurde auch bei der Behçet-Krankheit ein erhöhter IgA-Gehalt im Serum (SUNAKAWA und OHSHIO 1989) und bei ZNS-Beteiligung im Liquor gefunden (JONGEN et al. 1992). In der erwähnten Arbeit war der Anteil der CD11a-positiven PMNCs im Blut von Erkrankten signifikant höher als in dem der Kontrollen. Für das CD11b-Molekül konnte kein Unterschied festgestellt werden. In vitro wurden dann Neutrophile von Gesunden mit Patientensera inkubiert. Während die CD11a-Expression auf den Zellen deutlich anstieg, konnte Entsprechendes für das CD11b-Integrin nicht gefunden werden. Mit dem Anstieg der CD11a-Expression ging auch ein gesteigertes Adhäsionsvermögen der Neutrophilen einher. Diese Befunde werden durch ein weiteres Experiment derselben Arbeit ergänzt. Nachdem PMNCs der Kontrollgruppe mit Serum von Kranken inkubiert wurden, erfolgte die Zugabe von monoklonalen Antikörpern. Die Inhibition der Adhäsion an Endothelzellen war nach Blockade von CD11a deutlich stärker als nach der von CD11b (SAHIN et al. 1996).
Die positive Korrelation für die Stärke der Neutrophilie und das Ausmaß der CD11a-Expression im peripheren Blut unterstreicht die möglicherweise wichtige pathogenetische Bedeutung dieses Integrins auch bei Hunden mit SRMA. Beide Parameter scheinen die Schwere der Entzündungsreaktion widerzuspiegeln. Es ist denkbar, daß, in Analogie zu der Behçet-Krankheit, auch bei der SRMA ein erhöhtes Bindevermögen der Neutrophilen am Endothel vorliegt und daß dieses die Immigration der Zellen in den Subarachnoidalraum begünstigt. Die bei den Verlaufskontrollen tendenziell geringere Expression wäre somit eine Erklärung dafür, daß in den subklinischen Phasen keine oder nur sehr wenige Neutrophile in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit zu finden sind. Die Tendenz einer Abregulation könnte durch die Glukokortikoidwirkung erklärt werden. Entsprechende Erkenntnisse liegen für aktivierte humane Neutrophile vor (FILEP et al. 1997). Interessant wäre jedoch, wie zuvor im Zusammenhang mit CD45RA angemerkt, wie sich die Integrinexpression in asymptomatischen Phasen des natürlichen rezidivierenden Krankheitsverlaufes darstellt. Es

ist denkbar, daß die CD11a-Expression in klinischen Phasen aufreguliert wird und daß es in den dazwischen liegenden Zeiträumen wieder zu einer Abregulation kommt.

Die auf den ersten Blick recht widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse für die Integrinexpression innerhalb der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ mit den oft auffallend hohen und auffallend niedrigen Werten, beruhen möglicherweise darauf, daß bei sehr starken systemischen Entzündungsreaktionen nach einem initial proinflammatorischen Geschehen (mit einer Aufregulation der Integrine) eine kompensatorische entzündungshemmende Antwort folgt. Dieser Schluß wurde aus einer Arbeit an Hunden gezogen, in der Tiere mit septischen und nicht-septischen Entzündungen eine im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigerte CD11b-Ausprägung auf den PMNCs des Blutes aufwiesen. Im Unterschied dazu zeigten die Messungen aus der Gruppe der Hunde mit einem Sepsis-assoziierten multiplen Organversagen Werte in gleicher Höhe wie innerhalb der Kontrollgruppe (WEISS et al. 2004). Diese Gegenregulation, wie sie für das CD11b-Molekül beschrieben ist, wäre auch für die beiden anderen Integrine denkbar. Die positive Korrelation der Integrine miteinander, wie sie für die gesamte Stichprobe und die Gruppe „SRMA mit Symptomen“ gefunden wurde, spricht für diese Annahme. Unter Umständen ist diese Gegenregulation auch im natürlichen Krankheitsverlauf für den Übergang der klinischen Phase in die subklinische verantwortlich.

Der Vergleich der Quantität der Integrinexpression zwischen den PMNCs des Blutes und der Gehirnrückenmarksflüssigkeit offenbart bei den Tieren der Gruppe „SRMA mit Symptomen“ zwar insgesamt für alle drei Oberflächenmoleküle eine stärkere Expression im Liquor, allerdings trifft dies bei Betrachtung der Einzeltiere nur etwa auf jeweils die Hälfte der Hunde zu. Das bedeutet, daß bei einigen Hunden auch weniger aktivierte Neutrophile, möglicherweise wegen einer gestörten Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke, in den Liquor gelangen oder daß die Integrine unter Umständen nach Übertritt wieder abreguliert werden. Dabei könnte das veränderte Zytokinmuster der Umgebung eine Rolle spielen.

Für die weiteren Hunde mit einer hochgradigen neutrophilen Pleozytose (bakterielle Meningomyelitis, intrakranielle Meningeome) ergibt sich kein gravierend abweichendes Bild. Die Expression der Integrine auf den Neutrophilen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit ist entweder gleichen Ausmaßes wie im Blut oder stärker.

Der im Rahmen dieser Studie gefundene Anteil von akut an SRMA erkrankten Hunden (inklusive des Hundes, der mit einem Rezidiv vorgestellt wurde), die sowohl im Serum als auch in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit einen erhöhten IgA-Spiegel zeigten, liegt bei zehn von 13, wobei erwähnt werden sollte, daß auch bei der Hälfte der gesunden Hunde ein Serum-IgA-Spiegel gefunden wurde, der über dem von TIPOLD et al. (1994) angegebenen Referenzbereich liegt. Werden weiterhin die Referenzwerte von TIPOLD et al. (1994) zugrunde gelegt, so zeigt das Diagnostikum somit eine Sensitivität von knapp 77 %. Die Spezifität liegt bei etwa 87 %. Diese Daten decken sich weitgehend mit denen von TIPOLD et al. (1994). In der zitierten Studie zeigten elf von zwölf Hunden mit Symptomen der SRMA eine Erhöhung des IgA-Gehaltes sowohl im Serum als auch im Liquor. Im Unterschied hierzu konnten BEHR und CAUZINILLE (2006) einen entsprechenden Befund nur bei drei ihrer ebenfalls zwölf Patienten erheben.
Bei allen drei Hunden, in deren Liquor eine polymorphkernige Pleozytose gefunden wurde, ohne eine SRMA zu haben (bakterielle Meningomyelitis, intrakranielle Meningeome), war der IgA-Gehalt in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit erhöht. Bei dem Tier mit dem histopathologisch bestätigten Meningeom trat zusätzlich eine Erhöhung im Serum auf.
Zum Zeitpunkt der SRMA-Verlaufskontrollen sind die IgA-Werte mit Ausnahme eines Hundes regelmäßig in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit erhöht. Eine gleichzeitige Erhöhung im Serum wurde bei vier der insgesamt zehn Patienten gefunden. Im Unterschied hierzu maßen CIZINAUSKAS et al. (2000) bei zehn von zehn an SRMA erkrankten Hunden unter der Therapie gesteigerte IgA-Gehalte in Serum und Liquor. Diese Abweichung läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß die Anzahl von zehn Tieren pro Gruppe zu gering ist, um eine genügend große Stichprobe zu beschreiben, die den tatsächlichen Verlauf des Antikörperspiegels für die Gesamtheit der Erkrankten aufzeigt. Auch wenn beide Studien bezüglich der IgA-Gehalte im Serum widersprüchliche Ergebnisse liefern, so hat die Hypothese, daß die persistierenden hohen intrathekalen IgA-Gehalte möglicherweise die Folge einer andauernden Antigenstimulation sind (TIPOLD et al. 1995), weiterhin bestand.

Eine Limitation dieser Studie ist die unterschiedliche Altersstruktur der Gruppen. Aufgrund dieser Tatsache dürfen Vergleiche zwischen ihnen nur mit Vorsicht gezogen werden, und ein möglicher Alterseinfluß muß stets bedacht werden. Vom Alter besser passende

Vergleichsgruppen konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht zusammengestellt werden, weil der überwiegende Teil der Patienten, bei denen die Indikation einer Liquorpunktion gegeben ist, Adulte sind.
Zudem wäre es erstrebenswert gewesen, eine größere Zahl von Verlaufsuntersuchungen für die Hunde mit steril-eitriger Meningitis-Arteriitis zu haben. Hier stellte die Kontamination von Proben der Gehirnrückenmarksflüssigkeit mit Erythrozyten ein großes Problem dar. Wir entschieden in diesem Zusammenhang, daß es wichtiger war, eine Zellpopulation zu bestimmen, die auch tatsächlich aus dem Liquor stammte, als möglichst lückenlose Daten für den Krankheitsverlauf zu generieren.
Schließlich wäre eine größere Zahl von Kontrolltieren mit ebenfalls einer mittel- bis hochgradigen neutrophilen Pleozytose wünschenswert gewesen. In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß ein solches Zellbild neben der SRMA fast ausschließlich bei bakteriellen Meningoenzephalomyelitiden, die sehr selten vorkommen (RADAELLI und PLATT 2002), und bei < 10 % der Hunde mit intrakraniellen Meningeomen zu finden ist (DICKINSON et al. 2006).

Obwohl die Immunphänotypisierung der Blut- und Liquorzellen eine einfach durchführbare Technik ist, erweist sich diese Methode weder für die Diagnose der SRMA noch für deren Therapiekontrolle als brauchbar. Der Grund hierfür liegt darin, daß die Befunde, die bei den erkrankten Hunden erhoben wurden, nicht für SRMA einzigartig sind und daß die Meßergebnisse der Verlaufsuntersuchungen beträchtlich variieren. Hierbei kam es wegen der großen Streuung selbst in den Fällen, in denen statistisch signifikante Unterschiede vorlagen, zu Überschneidungen der verschiedenen Krankheitsgruppen. Hinzu kommt, daß die Messungen mit einem hohen zeitlichen Aufwand verbunden sind und daß die Immunphänotypisierung wegen der Empfindlichkeit der Liquorzellen stets unmittelbar im Anschluß an die Gewinnung vorgenommen werden muß. Insbesondere dieses Erfordernis schränkt die Brauchbarkeit dieser Technik für die Routinediagnostik und Therapiekontrolle auch grundsätzlich stark ein. Dennoch ist die Methode der Immunphänotypisierung mit anschließender durchflußzytometrischer Messung für Pathogenesestudien sehr wertvoll. Im Speziellen die Kombination mit Untersuchungen zur Funktion der Zelltypen, wie sie für weiterführende Studien geplant ist, wird eine Aussage darüber erlauben, ob die

immunpathologischen Vorgänge bei der SRMA denen gleichen, wie sie bei jedem Insult ablaufen, oder ob der Entzündungsablauf bei der SRMA eine spezifische Immunantwort darstellt und unter Umständen in seiner Form einzigartig ist.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Malte Schwartz

Durchflußzytometrische Untersuchungen von Leukozyten in Blut und Liquor cerebrospinalis bei Hunden mit steril-eitriger Meningitis-Arteriitis

Die steril-eitrige Meningitis-Arteriitis (SRMA) ist eine rezidivierend verlaufende Entzündung des zentralen Nervensystems mit einer bisher weitgehend ungeklärten Ätiologie und Pathogenese. Es wird vermutet, daß eine Fehlregulation des Immunsystems für die Entstehung und Unterhaltung verantwortlich ist, wobei deren Auslöser unbekannt ist. Im Zuge dieser Fehlregulation kommt es zu erhöhten IgA-Gehalten sowohl im Serum als auch im Liquor cerebrospinalis (CSF). Ziel dieser Arbeit war es daher zu klären, ob spezifische Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut (PB) bzw. CSF überwiegen und diese IgA-Produktion erklären können.

Die Messungen erfolgten durchflußzytometrisch mittels Membranimmunfluoreszenz. Lymphozyten des PB von an SRMA erkrankten Hunden (sowohl in Phasen mit Symptomen (n = 12) als auch in subklinischen Perioden unter Kortikosteroidtherapie (n = 10)) wurden anhand ihrer Expression der Oberflächenmarker CD3, CD4, CD8α, T-Zell-Rezeptor α/β und -γ/δ, CD21 und CD45RA charakterisiert. Als Vergleichsgruppen dienten, neben gesunden Beaglen (n = 7), Hunde mit idiopathischer Epilepsie (n = 9), Rückenmarkstraumata (n = 7), weiteren Entzündungen (n = 15) und Neoplasien (n = 14) des Nervensystems sowie mit anderen neurologischen Erkrankungen (n = 18). Zudem wurden die Lymphozyten des CSF von kranken Tieren auf ihre Expression von CD3 und CD21, bei Vorliegen einer deutlichen Pleozytose zusätzlich auf die von CD4 und CD8α, untersucht. Darüber hinaus wurde das Ausmaß der Integrinexpression (CD11a, b und c) auf den polymorphkernigen Zellen des PB bestimmt. Im Falle einer deutlichen neutrophilen Pleozytose erfolgten die Messungen auch für Neutrophile des CSF.

Insgesamt wiesen die Ergebnisse bei allen Krankheitsgruppen eine große Streuung auf. Im Vergleich zu den anderen Gruppen fiel bei Hunden mit SRMA ein erhöhter B-Zellgehalt im CSF auf. Im PB waren die CD4+-Zellen im Verhältnis zu den CD8α+-Zellen vermehrt vertreten. Das Verhältnis von T- zu B-Zellen im CSF korreliert negativ mit der Höhe des intrathekalen IgA-Gehaltes, sowohl in symptomatischen Phasen als auch unter Therapie ($p < 0,05$; Spearmans Rang-Korrelationskoeffizient - 0,662 bzw. - 0,815). Die Verschiebung der Zellpopulationen kann gut die starke humorale Immunantwort bei SRMA erklären. Im Verlauf nach Glukokortikosteroidtherapie näherten sich diese Werte denen der anderen Krankheitsgruppen. Die Verhältnisse waren jedoch weiterhin in Richtung der B- bzw. CD4+-Lymphozyten verschoben. Zusätzlich konnten bei an SRMA erkrankten Hunden in der symptomatischen Phase die höchsten Werte von CD45RA+ Lymphozyten gesehen werden. Eine weitere Differenzierung mithilfe von Doppelfärbungen fand nicht statt. Dieses Phänomen kann als altersspezifisch oder als unspezifische Rekrutierung von Zellen bei einer gesteigerten Immunantwort angesehen werden. Die Messung der Integrine an neutrophilen Granulozyten ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Krankheitsgruppen, jedoch konnte ein Trend zu einer erhöhten CD11a-Expression bei Hunden mit Symptomen der SRMA festgestellt werden. Diese erhöhte Expression könnte die verstärkte Einwanderung neutrophiler Granulozyten in den Liquorraum erklären bzw. Ausdruck der Schwere der Entzündungsreaktion sein. Bezüglich der anderen Parameter konnten keine Unterschiede zwischen den an SRMA erkrankten Hunde und den übrigen Gruppen gefunden werden. Weiterführende funktionelle Untersuchungen sollen diese Verschiebung von Leukozytenpopulationen bei SRMA näher erklären.

7 SUMMARY

Malte Schwartz

Characterization of leukocytes in peripheral blood and cerebrospinal fluid in dogs with Steroid-responsive Meningitis-Arteritis using flow cytometry

Steroid-responsive Meningitis-Arteritis (SRMA) is an inflammatory disorder of the central nervous system with a recurrent course of disease. Until today there is little known about its etiology and pathogenesis. SRMA is thought to result from a dysregulation of the immune system, however, the cause for this remains unknown. Affected individuals show an increase in IgA levels in serum and in cerebrospinal fluid (CSF).
The aim of the study was to characterize lymphocyte populations in peripheral blood (PB) and CSF to explain the excessive IgA production.

The characterization was done through immunophenotyping of cells followed by their flow cytometric measurement. Immunostaining of PB lymphocytes was performed for the markers CD3, CD4, CD8α, T cell receptor α/β and γ/δ, CD21 and CD45RA in dogs suffering from SRMA in periods with clinical signs (n = 12) and in periods without signs during glucocorticosteroid treatment (n = 10). For comparison these parameters were investigated in healthy beagles (n = 7) and in dogs with idiopathic epilepsy (n = 9), spinal cord traumata (n = 7), other inflammatory (n = 15) and neoplastic (n = 14) neurologic diseases as well as in dogs with miscellaneous disorders of the nervous system (n = 18). In addition, lymphocytes of the CSF of diseased dogs were investigated for their expression of CD3 and CD21 and in cases of a marked pleocytosis also for their CD4 and CD8α expression. Furthermore the integrin (CD11a, b and c) expression on polymorphonuclear cells of the PB was quantified. In case of a neutrophilic pleocytosis the same measurements were performed for CSF neutrophils.

In all groups of diseased animals results showed considerable variations. In comparison to the other groups, in dogs with SRMA B cells were increased in CSF. In PB CD4+ lymphocytes

predominated. The T : B cell ratio in CSF correlated negatively with intrathecal IgA levels in symptomatic phases and under glucocorticosteroid treatment ($p < 0.05$; Spearman´s rank correlation coefficient - 0.662 and - 0.815). This shift in lymphocyte populations can well explain the strong humoral immune response in SRMA. During the course of SRMA under glucocorticosteroid treatment ratios of lymphocyte subpopulations became similar to those of the other groups. Nevertheless, ratios were still shifted in favour of B and CD4+ lymphocytes. Additionally the percentage of CD45RA+ lymphocytes in PB was highest in the group of dogs in symptomatic phases of SRMA. A further differentiation of these cells with double staining was not performed. This phenomenon could be related to the age of the dogs or to unspecific recruitment of cells during excessive immune response. Measurements of integrin expression on neutrophils did not show significant differences between the groups of diseased dogs, however a trend towards higher CD11a expressions was present in dogs with symptoms of SRMA. This finding could explain the increased migration of neutrophils into the subarachnoidal space. Alternatively, the CD11a expression may reflect the degree of inflammation. Regarding the other parameters there were no differences between dogs with SRMA and the other disease entities. Further functional studies will help to gain more knowledge about the mechanisms leading to the observed shift in leukocyte populations.

8 Literaturverzeichnis

ABATE, O., E. BOLLO, D. LOTTI, u. S. BO (1998):
Cytological, immunocytochemical and biochemical cerebrospinal fluid investigations in selected central nervous system disorders of dogs.
Zentralbl Veterinärmed B. 45, 73-85

ABBAS, A. K., u. A. H. LICHTMAN (2003):
Cellular and Molecular Immunology.
5. Aufl., Saunders, Philadelphia, PA, USA, S. 20, 105-125, 506-521

AMMERSBACH, M. A., S. A. KRUTH, W. SEARS, u. D. BIENZLE (2006):
The effect of glucocorticoids on canine lymphocyte marker expression and apoptosis.
J Vet Intern Med. 20, 1166-1171

BAILEY, C. S., u. R. J. HIGGINS (1985):
Comparison of total white blood cell count and total protein content of lumbar and cisternal cerebrospinal fluid of healthy dogs.
Am J Vet Res. 46, 1162-1165

BAILEY, C. S., u. R. J. HIGGINS (1986a):
Characteristics of cisternal cerebrospinal fluid associated with primary brain tumors in the dog: a retrospective study.
J Am Vet Med Assoc. 188, 414-417

BAILEY, C. S., u. R. J. HIGGINS (1986b):
Characteristics of cerebrospinal fluid associated with canine granulomatous meningoencephalomyelitis: a retrospective study.
J Am Vet Med Assoc. 188, 418-421

BATTERSBY, I. A., K. F. MURPHY, S. TASKER, u. K. PAPASOULIOTIS (2006):
Retrospective study of fever in dogs: laboratory testing, diagnoses and influence of prior treatment.
J Small Anim Pract. 47, 370-376

BEHR, S., u. L. CAUZINILLE (2006):
Aseptic suppurative meningitis in juvenile boxer dogs: retrospective study of 12 cases.
J Am Anim Hosp Assoc. 42, 277-282

BEHR, S., C. TRUMEL, L. CAUZINILLE, F. PALENCHE, u. J. P. BRAUN (2006):
High resolution protein electrophoresis of 100 paired canine cerebrospinal fluid and serum.
J Vet Intern Med. 20, 657-662

BERNARD, A., L. BOUMSELL, u. C. HILL (1984):
Joint Report of the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens by the Investigators of the Participating Laboratories.
In: A. Bernard, L. Boumsell, J. Dausset, C. Milstein und S. F. Schlossman (Hrsg.): Human Leucocyte Differentiation Antigens Detected by Monoclonal Antibodies: Specification-Classification-Nomenclature.
Springer-Verlag, Berlin, Aufl., S. 9-14

BICHSEL, P., M. VANDEVELDE, E. VANDEVELDE, U. AFFOLTER, u. H. PFISTER (1984):
Immunoelectrophoretic determination of albumin and IgG in serum and cerebrospinal fluid in dogs with neurological diseases.
Res Vet Sci. 37, 101-107

BOHN, A. A., T. B. WILLS, C. L. WEST, R. L. TUCKER, u. R. S. BAGLEY (2006):
Cerebrospinal fluid analysis and magnetic resonance imaging in the diagnosis of neurologic disease in dogs: a retrospective study.
Vet Clin Pathol. 35, 315-320

BRODERSEN, R., F. BIJLSMA, K. GORI, K. T. JENSEN, W. CHEN, J. DOMINGUEZ, K. HAVERSON, P. F. MOORE, A. SAALMULLER, D. SACHS, W. J. SLIERENDRECHT, C. STOKES, O. VAINIO, F. ZUCKERMANN, u. B. AASTED (1998):
Analysis of the immunological cross reactivities of 213 well characterized monoclonal antibodies with specificities against various leucocyte surface antigens of human and 11 animal species.
Vet Immunol Immunopathol. 64, 1-13

BROOKS, P. N. (1984):
Necrotizing vasculitis in a group of Beagles.
Laboratory Animals 18, 285-290

BURNS, J. C., P. J. FELSBURG, H. WILSON, F. S. ROSEN, u. L. T. GLICKMAN (1991):
Canine pain syndrome is a model for the study of Kawasaki disease.
Perspect Biol Med. 35, 68-73

BUTCHER, E. C. (1996):
Overview: Cell Adhesion Receptors in the Immune System.
In: L. A. Herzenberg, D. M. Weir, L. A. Herzenberg und C. Blackwell (Hrsg.): Weir´s Handbook of Experimental Immunology 5th Edition: Volume II - Cell Surface and Messenger Molecules of the Immune System.
Blackwell Science, Cambridge, MA, USA, 5. Aufl., S. 1-7

BYRNE, K. M., H. W. KIM, B. P. CHEW, G. A. REINHART, u. M. G. HAYEK (2000):
A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes.
Vet Immunol Immunopathol. 73, 167-182

CALVELLI, T., T. N. DENNY, H. PAXTON, R. GELMAN, u. J. KAGAN (1993):
Guideline for flow cytometric immunophenotyping: a report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS.
Cytometry. 14, 702-715

CARTER, N. P., u. M. G. ORMEROD (2000):
Introduction to the principles of flow cytometry.
In: M. G. Ormerod (Hrsg.): Flow Cytometry: a practical approach.
Oxford University Press, New York, 3. Aufl., S. 1-22

CASWELL, J. L., u. S. G. NYKAMP (2003):
Intradural vasculitis and hemorrhage in full sibling Welsh springer spaniels.
Can Vet J. 44, 137-139

CHABANNE, L., T. MARCHAL, P. DENEROLLE, J. P. MAGNOL, C. FOURNEL, J. C. MONIER, u. D. RIGAL (1995):
Lymphocyte subset abnormalities in German shepherd dog pyoderma (GSP).
Vet Immunol Immunopathol. 49, 189-198

CHRISMAN, C. L. (1992):
Cerebrospinal fluid analysis.
Vet Clin North Am Small Anim Pract. 22, 781-810

CIZINAUSKAS, S., A. JAGGY, u. A. TIPOLD (2000):
Long-term treatment of dogs with steroid-responsive meningitis-arteritis: clinical, laboratory and therapeutic results.
J Small Anim Pract. 41, 295-301

CIZINAUSKAS, S., A. TIPOLD, R. FATZER, A. BURNENS, u. A. JAGGY (2001):
Streptococcal meningoencephalomyelitis in 3 dogs.
J Vet Intern Med. 15, 157-161

COBBOLD, S., u. S. METCALFE (1994):
Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW).
Tissue Antigens. 43, 137-154

COOK, J. R., JR., u. D. B. DENICOLA (1988):
Cerebrospinal fluid.
Vet Clin North Am Small Anim Pract. 18, 475-499

CRAM, L. S. (2002):
Flow cytometry, an overview.
Methods Cell Sci. 24, 1-9

DANILENKO, D. M., P. F. MOORE, u. P. V. ROSSITTO (1992):
Canine leukocyte cell adhesion molecules (LeuCAMs): characterization of the CD11/CD18 family.
Tissue Antigens. 40, 13-21

DE LAHUNTA, A. (1983):
Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology.
2. Aufl., WB Sauders Co, Philadelphia, S. 30-52

DI TERLIZZI, R., u. S. PLATT (2006):
The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part I - Function and composition.
Vet J. 172, 422-431

DICKINSON, P. J., B. K. STURGES, P. H. KASS, u. R. A. LECOUTEUR (2006):
Characteristics of cisternal cerebrospinal fluid associated with intracranial meningiomas in dogs: 56 cases (1985-2004).
J Am Vet Med Assoc. 228, 564-567

DIRSCHERL, P., W. BEISKER, E. KREMMER, A. MIHALKOV, C. VOSS, u. A. ZIESENIS (1995):
Immunophenotyping of canine bronchoalveolar and peripheral blood lymphocytes.
Vet Immunol Immunopathol. 48, 1-10

DUQUE, C., J. PARENT, u. D. BIENZLE (2002):
The immunophenotype of blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells in dogs.
J Vet Intern Med. 16, 714-719

DUX, R., A. KINDLER-ROHRBORN, M. ANNAS, P. FAUSTMANN, K. LENNARTZ, u. C. W. ZIMMERMANN (1994):
A standardized protocol for flow cytometric analysis of cells isolated from cerebrospinal fluid.
J Neurol Sci. 121, 74-78

EASLEY, J. R. (1979):
Necrotizing vasculitis: An overview.
J Am Anim Hosp Assoc. 15, 207-211

FALDYNA, M., L. LEVA, P. KNOTIGOVA, u. M. TOMAN (2001):
Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs--a flow cytometric study.
Vet Immunol Immunopathol. 82, 23-37

FELSBURG, P. J., H. HOGENESCH, R. L. SOMBERG, P. W. SNYDER, u. L. T. GLICKMAN (1992):
Immunologic abnormalities in canine juvenile polyarteritis syndrome: a naturally occurring animal model of Kawasaki disease.
Clin Immunol Immunopathol. 65, 110-118

FILEP, J. G., A. DELALANDRE, Y. PAYETTE, u. E. FOLDES-FILEP (1997):
Glucocorticoid receptor regulates expression of L-selectin and CD11/CD18 on human neutrophils.
Circulation. 96, 295-301

GANDINI, G., E. BRINI, D. BELLOTTI, u. M. CIPONE (2003):
Clinical and clinicopathologic findings in three dogs with steroid-responsive meningitis-arteritis (SRMA).
Vet Res Commun. 27 Suppl 1, 763-765

GAROSI, L., J. E. MCCONNELL, S. R. PLATT, G. BARONE, J. C. BARON, A. DE LAHUNTA, u. S. J. SCHATZBERG (2005):
Results of diagnostic investigations and long-term outcome of 33 dogs with brain infarction (2000-2004).
J Vet Intern Med. 19, 725-731

GAUTHIER, M. J., I. AUBERT, A. ABRAMS-OGG, J. P. WOODS, u. D. BIENZLE (2005):
The immunophenotype of peripheral blood lymphocytes in clinically healthy dogs and dogs with lymphoma in remission.
J Vet Intern Med. 19, 193-199

GERHARDT, A., R. RISSE, u. A. MEYER-LINDENBERG (1998):
Nekrotisierende Vaskulitis der Leptomeninx cerebralis und spinalis bei einem Berner Sennenhund.
Dtsch Tierärztl Wochenschr. 105, 139-141

GERLI, R., E. AGEA, A. BERTOTTO, R. TOGNELLINI, L. FLENGHI, F. SPINOZZI, A. VELARDI, u. F. GRIGNANI (1991):
Analysis of T cells bearing different isotypic forms of the gamma/delta T cell receptor in patients with systemic autoimmune diseases.
J Rheumatol. 18, 1504-1510

GRATAMA, J. W., J. KRAAN, R. VAN DEN BEEMD, B. HOOIBRINK, D. R. VAN BOCKSTAELE, u. H. HOOIJKAAS (1997):
Analysis of variation in results of flow cytometric lymphocyte immunophenotyping in a multicenter study.
Cytometry. 30, 166-177

GREELEY, E. H., R. D. KEALY, J. M. BALLAM, D. F. LAWLER, u. M. SEGRE (1996):
The influence of age on the canine immune system.
Vet Immunol Immunopathol. 55, 1-10

GRUNENFELDER, F. I., D. WEISHAUPT, R. GREEN, u. F. STEFFEN (2005):
Magnetic resonance imaging findings in spinal cord infarction in three small breed dogs.
Vet Radiol Ultrasound. 46, 91-96

HARCOURT, R. A. (1978):
Polyarteritis in a colony of beagles.
Vet Rec. 102, 519-522

HARLAN, J. M., N. B. VEDDER, R. K. WINN, u. C. L. RICE (1991):
Mechanisms and consequences of leukocyte-endothelial interaction.
West J Med. 155, 365-369

HARTMAN, H. A. (1987):
Idiopathic extramural coronary arteritis in beagle and mongrel dogs.
Vet Pathol. 24, 537-544

HARTMAN, H. A. (1989):
Spontaneous extramural coronary arteritis in dogs.
Toxicol Pathol. 17, 138-144

HAYES, T. J., G. K. ROBERTS, u. W. H. HALLIWELL (1989):
An idiopathic febrile necrotizing arteritis syndrome in the dog: beagle pain syndrome.
Toxicol Pathol. 17, 129-137

HOFF, E. J., u. M. VANDEVELDE (1981):
Necrotizing vasculitis in the central nervous systems of two dogs.
Vet Pathol. 18, 219-223

HOGENESCH, H., P. W. SNYDER, J. C. SCOTT-MONCRIEFF, L. T. GLICKMAN, u. P. J. FELSBURG (1995):
Interleukin-6 activity in dogs with juvenile polyarteritis syndrome: effect of corticosteroids.
Clin Immunol Immunopathol. 77, 107-110

HURTT, A. E., u. M. O. SMITH (1997):
Effects of iatrogenic blood contamination on results of cerebrospinal fluid analysis in clinically normal dogs and dogs with neurologic disease.
J Am Vet Med Assoc. 211, 866-867

IRVING, G., u. C. CHRISMAN (1990):
Long-term outcome of five cases of corticosteroid-responsive meningomyelitis.
J Am Anim Hosp Assoc. 26, 324-328

JACOBS, M. R., S. M. COCHRANE, J. H. LUMSDEN, u. A. M. NORRIS (1990):
Relationship of cerebrospinal fluid protein concentration determined bye dye-binding and urinary dipstick methodologies.
Can Vet J. 31, 587-588

JACOBSEN, C. N., B. AASTED, M. K. BROE, u. J. L. PETERSEN (1993):
Reactivities of 20 anti-human monoclonal antibodies with leucocytes from ten different animal species.
Vet Immunol Immunopathol. 39, 461-466

JAMISON, E. M., u. J. H. LUMSDEN (1988):
Cerebrospinal fluid analysis in the dog: methodology and interpretation.
Semin Vet Med Surg (Small Anim). 3, 122-132

JANEWAY, C. A., P. TRAVERS, M. WALPORT, u. M. SHLOMCHIK (2002):
Immunologie.
5. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 58-60, 90-91, 112-126, 210-224, 241-255, 707-724

JOHNSON, P., A. MAITI, u. D. H. W. NG (1996):
CD45: A Family of Leukocyte-Specific Cell Surface Glycoproteins.
In: L. A. Herzenberg, D. M. Weir, L. A. Herzenberg und C. Blackwell (Hrsg.): Weir´s Handbook of Experimental Immunology 5th Edition: Volume II - Cell Surface and Messenger Molecules of the Immune System.
Blackwell Science, Cambridge, MA, USA, 5. Aufl., S. 1-16

JONGEN, P. J., H. E. DAELMANS, B. BRUNEEL, u. M. R. DEN HARTOG (1992):
Humoral and cellular immunologic study of cerebrospinal fluid in a patient with Behcet encephalitis.
Arch Neurol. 49, 1075-1078

JOSHUA, J., u. J. ISHMAEL (1968):
Pain syndrome associated with spinal hemorrhage in the dog.
Vet Rec. 83, 165-169

KÄLIN, S., P. ARNOLD, A. HAGEN, G. LOTT-STOLZ, U. NIEDERHAUSER, u. P. RÜSCH (1987):
Sterile, eitrige Meningitis und generalisierte Vaskulitis, verursacht durch ein neues Medikament zur Nidationsverhütung beim Hund.
Schweiz Arch Tierheilkd. 129, 335-342

KEMI, M., T. USUI, I. NARAMA, u. R. TAKAHASHI (1990):
Histopathology of spontaneous panarteritis in beagle dogs.
Nippon Juigaku Zasshi. 52, 55-61

KORNEGAY, J. N., M. D. LORENZ, u. R. D. ZENOBLE (1978):
Bacterial meningoencephalitis in two dogs.
J Am Vet Med Assoc. 173, 1334-1336

KRAFT, S. L., P. R. GAVIN, C. DEHAAN, M. MOORE, L. R. WENDLING, u. C. W. LEATHERS (1997):
Retrospective review of 50 canine intracranial tumors evaluated by magnetic resonance imaging.
J Vet Intern Med. 11, 218-225

KRAFT, S. L., J. M. MUSSMAN, T. SMITH, D. S. BILLER, u. J. J. HOSKINSON (1998):
Magnetic resonance imaging of presumptive lumbosacral discospondylitis in a dog.
Vet Radiol Ultrasound. 39, 9-13

KRAKOWKA, S., W. FENNER, u. J. A. MIELE (1981):
Quantitative determination of serum origin cerebrospinal fluid proteins in the dog.
Am J Vet Res. 42, 1975-1977

KUTVIRT, S. G., S. L. LEWIS, u. T. L. SIMON (1993):
Lymphocyte phenotypes in infants are altered by separation of blood on density gradients.
Br J Biomed Sci. 50, 321-328

LAI, L., N. ALAVERDI, Z. CHEN, F. G. M. KROESE, N. A. BOS, u. E. C.-M. HUANG (1996):
Monoclonal Antibodies to Human, Mouse, and Rat Cluster of Differentiation (CD) Antigens.
In: L. A. Herzenberg, D. M. Weir, L. A. Herzenberg und C. Blackwell (Hrsg.): Weir´s Handbook of Experimental Immunology 5th Edition: Volume II - Cell Surface and Messenger Molecules of the Immune System.
Blackwell Science, Cambridge, MA, USA, 5. Aufl., S. 1-37

LAI, L., u. E. C.-M. HUANG (1996):
Overview: Mammalian Cell Surface Antigens.
In: L. A. Herzenberg, D. M. Weir, L. A. Herzenberg und C. Blackwell (Hrsg.): Weir´s Handbook of Experimental Immunology 5th Edition: Volume II - Cell Surface and Messenger Molecules of the Immune System.
Blackwell Science, Cambridge, MA, USA, 5. Aufl., S. 1-2

LAMB, C. R., P. J. CROSON, R. CAPPELLO, u. G. B. CHERUBINI (2005):
Magnetic resonance imaging findings in 25 dogs with inflammatory cerebrospinal fluid.
Vet Radiol Ultrasound. 46, 17-22

LOKEN, M. R., C. L. GREEN, u. D. A. WELLS (2000):
Immunofluorescence of surface markers.
In: M. G. Ormerod (Hrsg.): Flow Cytometry: a practical approach.
Oxford University Press, New York, 3. Aufl., S. 61-82

LORENZ, M. D., u. J. N. KORNEGAY (2004):
Handbook of Veterinary Neurology.
4. Aufl., Saunders, St. Louis, Missouri, USA, S. 91-109, 323-344

MARISCOLI, M., u. A. JAGGY (1997):
Clinical and electroencephalographic findings of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: a retrospective study.
J Vet Med B. 44, 1-18

MAYHEW, I. G., u. C. R. BEAL (1980):
Techinques of analysis of cerebrospinal fluid.
Vet Clin North Am Small Anim Pract. 10, 155-176

MCCONNELL, J. F., L. GAROSI, u. S. R. PLATT (2005):
Magnetic resonance imaging findings of presumed cerebellar cerebrovascular accident in twelve dogs.
Vet Radiol Ultrasound. 46, 1-10

MERIC, S. M., V. PERMAN, u. R. M. HARDY (1985):
Corticosteroid-responsive meningitis in ten dogs.
J Am Anim Hosp Assoc. 21, 677-684

MERIC, S. M., G. CHILD, u. R. J. HIGGINS (1986):
Necrotizing vasculitis of the spinal pachyleptomeningeal arteries in three Bernese mountain dog littermates.
J Am Anim Hosp Assoc. 21, 459-465

MERIC, S. M. (1988):
Canine meningitis. A changing emphasis.
J Vet Intern Med. 2, 26-35

MOORE, P. F., P. V. ROSSITTO, u. D. M. DANILENKO (1990):
Canine leukocyte integrins: characterization of a CD18 homologue.
Tissue Antigens. 36, 211-220

MOORE, P. F., P. V. ROSSITTO, D. M. DANILENKO, J. J. WIELENGA, R. F. RAFF, u. E. SEVERNS (1992):
Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T-lymphocyte subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils.
Tissue Antigens. 40, 75-85

MOORE, P. F., u. P. V. ROSSITTO (1993):
Development of monoclonal antibodies to canine T cell receptor complex (TCR/CD3) and their utilization in the diagnosis of T cell neoplasia.
Vet Pathol. 30, 457

MOORE, P. F., P. V. ROSSITTO, u. T. OLIVRY (1994):
Development of monoclonal antibodies to canine T cell receptor-1 (TCR-γδ) and their utilization in the diagnosis of epidermotropic cutaneous T cell lymphoma.
Vet Pathol. 31, 597

MUNANA, K. R. (2004):
Head tilt and nystagmus.
In: S. R. Platt und N. J. Olby (Hrsg.): BSAVA Manual of Canine and Feline Neurology.
British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, Großbritannien, 3 Aufl., S. 155-171

OLBY, N. J., u. D. E. THRALL (2004):
Neuroradiology.
In: S. R. Platt und N. J. Olby (Hrsg.): BSAVA Manual of Canine and Feline Neurology.
British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, Großbritannien, 3 Aufl., S. 70-83

ORMEROD, M. G. (2000):
Fluorescece and fluorochromes.
In: M. G. Ormerod (Hrsg.): Flow Cytometry: a practical approach.
Oxford University Press, New York, 3. Aufl., S. 23-34

PONCELET, L., u. M. BALLIGAND (1993):
Steroid responsive meningitis in three boxer dogs.
Vet Rec. 132, 361-362

PRESTHUS, J. (1991):
Aseptic suppurative meningitis in Bernese mountain dogs.
The European Journal of Companion Animal Practice. 1, 24-28

RADAELLI, S. T., u. S. R. PLATT (2002):
Bacterial meningoencephalomyelitis in dogs: a retrospective study of 23 cases (1990-1999).
J Vet Intern Med. 16, 159-163

RADI, Z. A., M. E. KEHRLI, JR., u. M. R. ACKERMANN (2001):
Cell adhesion molecules, leukocyte trafficking, and strategies to reduce leukocyte infiltration.
J Vet Intern Med. 15, 516-529

RIESEBERG, M., C. KASPER, K. F. REARDON, u. T. SCHEPER (2001):
Flow cytometry in biotechnology.
Appl Microbiol Biotechnol. 56, 350-360

RINKARDT, N. E., S. A. KRUTH, u. A. KAUSHIK (1999):
The effects of prednisone and azathioprine on circulating immunoglobulin levels and lymphocyte subpopulations in normal dogs.
Can J Vet Res. 63, 18-24

ROMEU, M. A., M. MESTRE, L. GONZALEZ, A. VALLS, J. VERDAGUER, M. COROMINAS, J. BAS, E. MASSIP, u. E. BUENDIA (1992):
Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults. Comparison of fresh whole blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation.
J Immunol Methods. 154, 7-10

RUBEN, Z., P. DESLEX, G. NASH, N. I. REDMOND, M. PONCET, u. D. C. DODD (1989):
Spontaneous disseminated panarteritis in laboratory beagle dogs in a toxicity study: a possible genetic predilection.
Toxicol Pathol. 17, 145-152

RUSSO, E. A., G. E. LEES, u. C. L. HALL (1983):
Corticosteroid-responsive aseptic suppurative meningitis in three dogs.
Southwestern Veterinarian. 35, 197-201

SAALMÜLLER, A., J. K. LUNNEY, C. DAUBENBERGER, W. DAVIS, U. FISCHER, T. W. GOBEL, P. GRIEBEL, E. HOLLEMWEGUER, T. LASCO, R. MEISTER, H. J. SCHUBERTH, K. SESTAK, P. SOPP, F. STEINBACH, W. XIAO-WEI, u. B. AASTED (2005):
Summary of the animal homologue section of HLDA8.
Cell Immunol. 236, 51-58

SAHIN, S., T. AKOGLU, H. DIRESKENELI, L. S. SEN, u. R. LAWRENCE (1996):
Neutrophil adhesion to endothelial cells and factors affecting adhesion in patients with Behcet's disease.
Ann Rheum Dis. 55, 128-133

SCOTT-MONCRIEFF, J. C., P. W. SNYDER, L. T. GLICKMAN, E. L. DAVIS, u. P. J. FELSBURG (1992):
Systemic necrotizing vasculitis in nine young beagles.
J Am Vet Med Assoc. 201, 1553-1558

SMITH-MAXIE, L. L., J. P. PARENT, J. RAND, B. P. WILCOCK, u. A. M. NORRIS (1989):
Cerebrospinal fluid analysis and clinical outcome of eight dogs with eosinophilic meningoencephalomyelitis.
J Vet Intern Med. 3, 167-174

SNYDER, J. M., F. S. SHOFER, T. J. VAN WINKLE, u. C. MASSICOTTE (2006):
Canine intracranial primary neoplasia: 173 cases (1986-2003).
J Vet Intern Med. 20, 669-675

SNYDER, P. W., E. A. KAZACOS, J. C. SCOTT-MONCRIEFF, H. HOGENESCH, W. W. CARLTON, L. T. GLICKMAN, u. P. J. FELSBURG (1995):
Pathologic features of naturally occurring juvenile polyarteritis in beagle dogs.
Vet Pathol. 32, 337-345

SOMBERG, R. L., J. P. ROBINSON, u. P. J. FELSBURG (1992):
Detection of canine interleukin-2 receptors by flow cytometry.
Vet Immunol Immunopathol. 33, 17-24

SORJONEN, D. C., J. N. JANET, u. R. D. SCHULTZ (1981):
Qualitative and quantitative determination of albumin, IgG, IgM and IgA in normal cerebrospinal fluid of dogs.
J Am Anim Hosp Assoc. 17, 833-839

SORJONEN, D. C. (1987):
Total protein, albumin quota, and electrophoretic patterns in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system disorders.
Am J Vet Res. 48, 301-305

SORJONEN, D. C., D. L. GOLDEN, D. C. LEVESQUE, A. SHORES, u. M. P. MOORE (1991):
Cerebrospinal fluid protein electrophoresis: a clinical evaluation of a previously reported diagnostic technique.
Prog Vet Neurol. 2, 261-267

SPENCER, A., u. P. GREAVES (1987):
Periarteritis in a beagle colony.
J Comp Pathol. 97, 121-128

STEIN, V. M., M. CZUB, R. HANSEN, W. LEIBOLD, P. F. MOORE, A. ZURBRIGGEN, u. A. TIPOLD (2004):
Characterization of canine microglial cells isolated ex vivo.
Vet Immunol Immunopathol. 99, 73-85

STEJSKAL, V., N. HAVU, u. T. MALMFORS (1982):
Necrotizing vasculitis as an immunological complication in toxicity study.
Arch Toxicol Suppl. 5, 283-286

STURGES, B. K., P. J. DICKINSON, G. D. KORTZ, W. L. BERRY, K. M. VERNAU, E. R. WISNER, u. R. A. LECOUTEUR (2006):
Clinical signs, magnetic resonance imaging features, and outcome after surgical and medical treatment of otogenic intracranial infection in 11 cats and 4 dogs.
J Vet Intern Med. 20, 648-656

SUCIU-FOCA, N., J. S. MANAVALAN, L. SCOTTO, S. KIM-SCHULZE, S. GALLUZZO, A. J. NAIYER, J. FAN, G. VLAD, u. R. CORTESINI (2005):
Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review.
Int Immunopharmacol. 5, 7-11

SUNAKAWA, M., u. G. OHSHIO (1989):
Serum secretory IgA levels in patients with Behcet disease.
Metab Pediatr Syst Ophthalmol. 12, 110-112

THOMSON, C. E., J. N. KORNEGAY, u. J. B. STEVENS (1989):
Canine intervertebral disc disease: Changes in the cerebrospinal fluid.
J Small Anim Pract. 30, 685-688

THOMSON, C. E., J. N. KORNEGAY, u. J. B. STEVENS (1990):
Analysis of cerebrospinal fluid from the cerebellomedullary and lumbar cisterns of dogs with focal neurologic disease: 145 cases (1985-1987).
J Am Vet Med Assoc. 196, 1841-1844

TING-DE RAVIN, S. S., D. R. KENNEDY, N. NAUMANN, J. S. KENNEDY, U. CHOI, B. J. HARTNETT, G. F. LINTON, N. L. WHITING-THEOBALD, P. F. MOORE, W. VERNAU, H. L. MALECH, u. P. J. FELSBURG (2006):
Correction of canine X-linked severe combined immunodeficiency by in vivo retroviral gene therapy.
Blood 107, 3091-3097

TIPOLD, A., H. PFISTER, u. M. VANDEVELDE (1993):
Determination of the IgG index for the detection of intrathecal immunoglobulin synthesis in dogs using an ELISA.
Res Vet Sci. 54, 40-44

TIPOLD, A., u. A. JAGGY (1994):
Steroid responsive meningitis-arteritis in dogs: Long-term study of 32 cases.
J Small Anim Pract. 35, 311-316

TIPOLD, A., H. PFISTER, A. ZURBRIGGEN, u. M. VANDEVELDE (1994):
Intrathecal synthesis of major immunoglobulin classes in inflammatory diseases of the canine CNS.
Vet Immunol Immunopathol. 42, 149-159

TIPOLD, A. (1995):
Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: a retrospective study.
J Vet Intern Med. 9, 304-314

TIPOLD, A., M. VANDEVELDE, u. A. ZURBRIGGEN (1995):
Neuroimmunological studies in steroid-responsive meningitis-arteritis in dogs.
Res Vet Sci. 58, 103-108

TIPOLD, A., D. FAISSLER, T. W. JUNGI, u. M. VANDEVELDE (1997):
Lymphocyte subsets during the course of steroid-responsive meningitis-arteritis in dogs.
The Immunologist. Supplement 1, 34

TIPOLD, A., P. MOORE, T. W. JUNGI, H. SAGER, u. M. VANDEVELDE (1998a):
Lymphocyte subsets and CD45RA positive T-cells in normal canine cerebrospinal fluid.
J Neuroimmunol. 82, 90-95

TIPOLD, A., A. ZURBRIGGEN, P. MOORE, V. SCHIJNS, u. T. W. JUNGI (1998b):
Generation and functional characterisation of canine bone marrow-derived macrophages.
Res Vet Sci. 64, 125-132

TIPOLD, A. (2000):
Steroid-Responsive Meningitis-Arteritis in Dogs.
In: J. D. Bonagura (Hrsg.): Kirk´s Current Veterinary Therapie XIII - Small Animal Practice.
13. Aufl., S. 978-981

TIPOLD, A. (2003):
Cerebrospinal Fluid.
[Internet: http://www.ivis.org/advances/Vite/tipold/chapter_frm.asp?LA=1]

TIZARD, I. R. (2004):
Veterinary Immunology: An Introduction.
7. Aufl., Saunders, Elsevier, Philadelphia, USA, S. 105-116, 463-466

VANDEVELDE, M., u. R. FANKHAUSER (1972):
Zur Pathologie der Rückenmarksblutungen beim Hund.
Schweiz Arch Tierheilkd. 114, 463-475

VANDEVELDE, M., u. J. S. SPANO (1977):
Cerebrospinal fluid cytology in canine neurologic disease.
Am J Vet Res. 38, 1827-1832

WEISS, D. J., M. WELLE, A. MORTIZ, u. B. WALCHECK (2004):
Evaluation of leukocyte cell surface markers in dogs with septic and nonseptic inflammatory diseases.
Am J Vet Res. 65, 59-63

WEN, L., M. PEAKMAN, G. MIELI-VERGANI, u. D. VERGANI (1992):
Elevation of activated gamma delta T cell receptor bearing T lymphocytes in patients with autoimmune chronic liver disease.
Clin Exp Immunol. 89, 78-82

WILSON, J. W., u. J. B. STEVENS (1977):
Effects of blood contamination on cerebrospinal fluid analysis.
J Am Vet Med Assoc. 171, 256-258

WRIGHT, J. A. (1978):
Evaluation of cerebrospinal fluid in the dog.
Vet Rec. 103, 48-51

WUNDERLI, P. S., u. P. J. FELSBURG (1989):
An improved method for the isolation of enriched canine peripheral blood mononuclear cell and peripheral blood lymphocyte preparations.
Vet Immunol Immunopathol. 20, 335-344

ZOLA, H. (2006)
HCDM - Human Cell Differentiation Molecules - Previously HLDA8.
(www.hlda8.org)

9 Anhang

Anhang A

Die folgenden Tabellen A.1 bis A.8 liefern für die Tiere der einzelnen Krankheitsgruppen Informationen zu Rasse, Alter, Geschlecht sowie zur Diagnose und zum Bestehen einer Vorbehandlung mit Glukokortikoiden. Zudem ist aufgeführt, von welchen Hunden durchflußzytometrische Messungen der mononukleären und polymorphnukleären Zellen des peripheren Blutes sowie der Zellen des Liquor cerebrospinalis vorliegen.

Tab. A.1: Hunde der Kategorie „Gesunde“ (n = 7)

Hund Nr.	**Rasse**	**Alter in Jahren**	**Geschlecht**	**Diagnose**	**Vorbehandlung mit Glukokortikoiden**	**Messung PBMNCs**	**Messung PBPMNCs**	**Messung CSFCs**
1	Beagle	6,25	mk	gesund	nein	x	x	
2	Beagle	6,5	mk	gesund	nein	x	x	
3	Beagle	6,5	mk	gesund	nein	x	x	
4	Beagle	5	mk	gesund	nein	x	x	
5	Beagle	4,75	mk	gesund	nein	x	x	
6	Beagle	5	wk	gesund	nein	x	x	
7	Beagle	5	mk	gesund	nein	x	x	

CSFCs = Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit; mk = männlich kastriert; n = Anzahl; Nr. = Nummer; PBMNCs = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes; PBPMNCs = polymorphkernige Zellen des peripheren Blutes; wk = weiblich kastriert; x = Messung vorhanden

Tab. A.2: Hunde der Kategorie „SRMA mit Symptomen“ (n = 12 + 1)

Hund Nr.	**Rasse**	**Alter in Jahren**	**Geschlecht**	**Diagnose**	**Vorbehandlung mit Glukokortikoiden**	**Messung PBMNCs**	**Messung PBPMNCs**	**Messung CSFCs**
8	Beagle	0,5	m	SRMA	ja	x	x	x
9	Boxer	0,75	m	SRMA	nein	x	x	x
10	Mix (< 20 kg)	0,75	w	SRMA	nein	x	x	x
11	Boxer	1,25	m	SRMA	nein	x	x	x
12	DSH	0,75	w	SRMA	nein	x	x	x
13	Boxer	0,5	w	SRMA	ja	x	x	x
14	Brandelbracke	0,75	w	SRMA	nein	x	x	x
15	Mix (< 20 kg)	1,25	w	SRMA	ja	x	x	x
16	JRT	1,5	m	SRMA	nein	x	x	x
17	Boxer	0,75	w	SRMA	nein	x	x	x
18	JRT	1	wk	SRMA	nein	x	x	x
19	Boxer	0,5	w	SRMA	nein	x	x	x
Tiere, bei denen eine Messung zum Zeitpunkt eines Rezidivs erfolgte								
8	Beagle	0,75	m	SRMA-Rezidiv	ja	x	x	x

CSFCs = Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit; DSH = Deutscher Schäferhund; JRT = Jack Russell Terrier; kg = Kilogramm; m = männlich; n = Anzahl; Nr. = Nummer; PBMNCs = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes; PBPMNCs = polymorphkernige Zellen des peripheren Blutes; SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis;* w = weiblich; wk = weiblich kastriert; x = Messung vorhanden

Tab. A.3: Hunde der Kategorie „SRMA-Verlaufskontrollen“ (n = 10 + 9)

Hund Nr.	**Rasse**	**Alter in Jahren**	**Geschlecht**	**Diagnose**	**Vorbehandlung mit Glukokortikoiden**	**Messung PBMNCs**	**Messung PBPMNCs**	**Messung CSFCs**
8	Beagle	0,5	m	SRMA-Verlaufskontrolle #2	ja	x	x	x
9	Boxer	1	m	SRMA-Verlaufskontrolle #2	ja	x	x	x
10	Mix (< 20 kg)	1	w	SRMA-Verlaufskontrolle #1	ja	x	x	x
11	Boxer	1,5	m	SRMA-Verlaufskontrolle #1	ja	x	x	x
12	DSH	0,75	w	SRMA-Verlaufskontrolle #1	ja	x	x	x
15	Mix (< 20 kg)	1,5	w	SRMA-Verlaufskontrolle #2	ja	x	x	x
16	JRT	1,5	m	SRMA-Verlaufskontrolle #1	ja	x	x	x
18	JRT	1	wk	SRMA-Verlaufskontrolle #1	ja	x	x	x
20	Dobermann	1	m	SRMA zu Beginn einer asymptomatischen Phase	nein	x	x	x
21	Labrador Retriever	5	w	SRMA-Verlaufskontrolle #1 (protrahierte Form)	ja	x	x	x
Tiere, bei denen Messungen zu einem weiteren Zeitpunkt erfolgten								
9	Boxer	1	m	SRMA-Verlaufskontrolle #3	ja	x	x	x

9	Boxer	1,25	m	SRMA-Verlaufs-kontrolle #1 nach Rezidiv	ja	x	x	x
9	Boxer	1,5	m	SRMA-Verlaufs-kontrolle #2 nach Rezidiv	ja	x	x	x
9	Boxer	1,5	m	SRMA-Verlaufs-kontrolle #3 nach Rezidiv	ja	x	x	x
11	Boxer	1,5	m	SRMA-Verlaufs-kontrolle #2	ja	x	x	x
12	DSH	1,5	w	SRMA-Verlaufs-kontrolle #5	ja	x	x	x
20	Dober-mann	1	m	SRMA-Verlaufs-kontrolle #1	nein	x	x	x
21	Labrador Retriever	5	w	SRMA-Verlaufs-kontrolle #2 (protrahierte Form)	ja	x	x	x
21	Labrador Retriever	5,25	w	SRMA-Verlaufs-kontrolle #3 (protrahierte Form)	ja	x	x	x

= Nummer; CSFCs = Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit; DSH = Deutscher Schäferhund; JRT = Jack Russell Terrier; kg = Kilogramm; m = männlich; n = Anzahl; Nr. = Nummer; PBMNCs = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes; PBPMNCs = polymorphkernige Zellen des peripheren Blutes; SRMA = *Steroid Responsive Meningitis Arteritis;* w = weiblich; wk = weiblich kastriert; x = Messung vorhanden

Tab. A.4: Hunde der Kategorie „idiopathische Epilepsie“ (n = 9)

Hund Nr.	**Rasse**	**Alter in Jahren**	**Geschlecht**	**Diagnose**	**Vorbehandl-ung mit Gluko-kortikoiden**	**Messung PBMNCs**	**Messung PBPMNCs**	**Messung CSFCs**
22	Mix (< 20 kg)	9,5	m	idiopathische Epilepsie	ja	x		x
23	Golden Retriever	5,5	m	idiopathische Epilepsie	nein	x	x	x
24	Mix (> 20 kg)	2,5	mk	idiopathische Epilepsie	nein	x	x	x
25	Dachs-bracke	3,5	w	idiopathische Epilepsie	nein	x	x	x
26	Labrador Retriever	1,75	w	idiopathische Epilepsie	nein	x	x	x
27	Mix (> 20 kg)	8,5	w	idiopathische Epilepsie	nein	x	x	x
28	JRT	5,75	w	idiopathische Epilepsie	nein	x	x	x
29	Mix (> 20 kg)	3,75	mk	idiopathische Epilepsie	nein	x	x	x
30	Beagle	3,75	mk	idiopathische Epilepsie	nein	x	x	x

CSFCs = Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit; JRT = Jack Russell Terrier; kg = Kilogramm; m = männlich; mk = männlich kastriert; n = Anzahl; Nr. = Nummer; PBMNCs = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes; PBPMNCs = polymorphkernige Zellen des peripheren Blutes; w = weiblich; x = Messung vorhanden

Tab. A.5: Hunde der Kategorie „Rückenmarkstraumata“ (n = 7)

Hund Nr.	**Rasse**	**Alter in Jahren**	**Geschlecht**	**Diagnose**	**Vorbehandl-ung mit Gluko-kortikoiden**	**Messung PBMNCs**	**Messung PBPMNCs**	**Messung CSFCs**
31	Deutsch Langhaar	0,25	w	Wirbelfraktur	nein	x	x	x
32	Rauhhaar-teckel	8	wk	Diskusprolaps	ja	x	x	x
33	Hovawart	11,25	m	Diskusprolaps	nein	x	x	x
34	Beagle	8,5	wk	Diskusprolaps	nein	x	x	x
35	Mix (> 20 kg)	10,25	w	Diskusprolaps	ja	x	x	x
36	Mix (> 20 kg)	7	wk	zervikales Malformation/ Malartikulation Syndrom	nein	x	x	x
37	Mix (> 20 kg)	6	mk	Diskusprolaps	ja	x	x	x

CSFCs = Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit; Kanad. = Kanadischer; kg = Kilogramm; m = männlich; mk = männlich kastriert; n = Anzahl; Nr. = Nummer; PBMNCs = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes; PBPMNCs = polymorphkernige Zellen des peripheren Blutes; w = weiblich; wk = weiblich kastriert; x = Messung vorhanden

Tab. A.6: Hunde der Kategorie „Entzündungen“ (n = 15 + 2)

Hund Nr.	**Rasse**	**Alter in Jahren**	**Geschlecht**	**Diagnose**	**Vorbehandlung mit Glukokortikoiden**	**Messung PBMNCs**	**Messung PBPMNCs**	**Messung CSFCs**
38	Mix (> 20 kg)	11,5	m	Plexusneuritis	nein	x	x	x
39	Staffordshire Terrier	11,5	w	Otitis media/ interna und hypertrophe Polyneuritis	ja	x	x	x
40	Mix (< 20 kg)	8,5	m	Meningoenzephalitis unbekannter Ursache	nein	x	x	x
41	Westhighland White Terrier	7,75	w	V.a. granulomatöse Meningoenzephalitis	nein	x	x	x
42	Mix (> 20 kg)	8,25	mk	Erstuntersuchung: Toxoplasmose und Neosporose des ZNS	nein	x	x	x
43	Golden Retriever	8	mk	Kaumuskelmyositis	ja	x	x	x
44	Mix (< 20 kg)	3,75	wk	Erstuntersuchung: Neosporose des ZNS	nein	x	x	x
45	Airdale Terrier	8,75	m	akute idiopathische Polyradikuloneuritis	ja	x	x	x
46	Mix (> 20 kg)	7	mk	Diskospondylitis L7/S1	nein	x	x	x
47	Boxer	9,75	m	Otitis media/interna	nein	x	x	x
48	Beagle	1	m	Enzephalitis unbekannter Ursache	ja	x	x	x
49	Mix (> 20 kg)	7,75	wk	akute idiopathische Polyradikuloneuritis	nein	x	x	x

50	Labrador Retriever	5,75	m	Disko-spondylitis L7/S1	nein	x	x	x
51	Mix (> 20 kg)	4,25	mk	Osteomyelitis C6-Th1 mit Myelitis	nein	x	x	x
52	Rauhhaar-teckel	6,5	m	bakterielle Meningo-myelitis	ja	x	x	x
Tiere, bei denen Messungen zu einem weiteren Zeitpunkt erfolgten								
42	Mix (> 20 kg)	8,5	mk	Zweit-untersuchung: gesund	nein	x	x	x
44	Mix (< 20 kg)	3,75	wk	Zweit-untersuchung: Neosporose des ZNS	nein	x	x	x

C6 = 6. Halswirbel; CSFCs = Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit; kg = Kilogramm; L7 = 7. Lendenwirbel; m = männlich; mk = männlich kastriert; n = Anzahl; Nr. = Nummer; PBMNCs = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes; PBPMNCs = polymorphkernige Zellen des peripheren Blutes; S1 = 1. Segment des Kreuzbeins; Th1 = erster Brustwirbel; V.a. = Verdacht auf; w = weiblich; wk = weiblich kastriert; x = Messung vorhanden; ZNS = zentrales Nervensystem

Tab. A.7: Hunde der Kategorie „Neoplasien“ (n = 14)

Hund Nr.	**Rasse**	**Alter in Jahren**	**Geschlecht**	**Diagnose**	**Vorbehandl-ung mit Gluko-kortikoiden**	**Messung PBMNCs**	**Messung PBPMNCs**	**Messung CSFCs**
53	Cocker Spaniel	8,25	w	epitheliale Neoplasie im Bereich des Os temporale und der Bulla tympanica	nein	x		x
54	Rhodesian Ridgeback	7,5	w	Neoplasie im Bereich der Sella turcica (V.a. Meningeom)	nein	x	x	x
55	Mix (> 20 kg)	2,75	w	extradurales malignes Blastom der Lenden-wirbelsäule	ja	x	x	x
56	Boxer	6,25	m	extraaxiale Neoplasie in der Fossa cranii caudalis (V.a. Meningeom)	nein	x		x
57	Labrador Retriever	4,25	mk	Neoplasie am Boden des linken lateralen Ventrikels (V.a. Choroid-plexustumor)	ja	x	x	x
58	Golden Retriever	9	m	Neoplasie im Bulbus olfactorius (V.a. Meningeom)	nein	x	x	x
59	Rottweiler	9,5	m	malignes Blastom der Lenden-wirbelsäule	nein	x	x	x

60	Mix (> 20 kg)	5,5	mk	spindel-zelliges Blastom des Rückenmarks der Halswirbel-säule	nein	x	x	x
61	Mix (> 20 kg)	5	mk	Neoplasie des Kleinhirns (V.a. Medullo-blastom)	ja	x	x	x
62	Dober-mann	9,25	wk	Sarkom der Rücken-marks-segmente L3/L4 (V.a. Nerven-scheiden-tumor)	nein	x	x	x
63	Franz-ösische Bulldogge	9	w	Neoplasie im Keinhirn-brücken-winkel (V.a. Meningeom)	nein	x	x	x
64	Mix (< 20 kg)	14,5	w	Hypophysen-tumor	nein	x	x	x
65	Hovawart	10,75	wk	Neoplasie des zervikalen Rücken-marks (V.a. Nerven-scheiden-tumor)	nein	x	x	x
66	Boxer	7,75	wk	Meningeom im Bereich Mesenzephal-on/Pons	ja	x	x	x

CSFCs = Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit; kg = Kilogramm; L3/L4 = 3. und 4. Segment des lumbalen Rückenmarks; m = männlich; mk = männlich kastriert; n = Anzahl; Nr. = Nummer; PBMNCs = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes; PBPMNCs = polymorphkernige Zellen des peripheren Blutes; V.a. = Verdacht auf; w = weiblich; wk = weiblich kastriert; x = Messung vorhanden; ZNS = zentrales Nervensystem

Tab. A.8: Hunde der Kategorie „Andere“ (n = 18)

Hund Nr.	Rasse	Alter in Jahren	Geschlecht	Diagnose	Vorbehandlung mit Glukokortikoiden	Messung PBMNCs	Messung PBPMNCs	Messung CSFCs
67	DSH	0,75	m	Myelopathie unbekannter Ursache	nein	x	x	x
68	Golden Retriever	1,75	m	Neuromyopathie unbekannter Ursache	nein	x	x	x
69	Mix (> 20 kg)	8,5	wk	degenerative Myelopathie	nein	x	x	x
70	Mix (> 20 kg)	6,75	w	Rückenmarksinfarkt	ja	x	x	x
71	Hovawart	8	m	degenerative Myelopathie	nein	x	x	x
72	Zwergschnauzer	3,25	m	Rückenmarksinfarkt	nein	x	x	x
73	Polnischer Hirtenhund	2	m	Hydrozephalusinduzierte Epilepsie	nein	x	x	x
74	Berner Sennenhund	2	m	Verhaltensänderung unbekannter Ursache	nein	x	x	x
75	Belgischer Schäferhund	6,5	wk	Infarkt im Gehirn	ja	x	x	x
76	American Staffordshire Terrier	3,75	m	V.a. funktionelle Durchblutungsstörung des Zuflusses zum Gehirn	nein	x	x	x
77	Basset Griffon	7	m	Schmerzzustände unbekannter Ursache	ja	x	x	x
78	Spanischer Wasserhund	8,75	m	Infarkt im Gehirn	nein	x	x	x
79	Mix (< 20 kg)	10,5	mk	V.a. altes Rückenmarkstrauma (mit Paraparese)	nein	x	x	x

80	Labrador Retriever	6	mk	Rückenmarks-infarkt	nein	x	x	x
81	Zwerg-pudel	3	m	Verhaltens-änderung nach Ketamin/ Xylazin-Narkose	nein	x	x	x
82	DSH	1	m	Kleinhirn-hypoplasie	nein	x	x	x
83	Boxer	5,5	m	Rückenmarks-blutung	ja	x	x	x
84	Bobtail	8	w	Rückenmarks-infarkt	ja	x	x	x

CSFCs = Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit; DSH = Deutscher Schäferhund; kg = Kilogramm; m = männlich; mk = männlich kastriert; n = Anzahl; Nr. = Nummer; PBMNCs = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes; PBPMNCs = polymorphkernige Zellen des peripheren Blutes; V.a. = Verdacht auf; w = weiblich; wk = weiblich kastriert; x = Messung vorhanden

Anhang B

In den sich anschließenden Tabellen B.1 bis B.8 sind die Befunde der hämatologischen Untersuchungen (Anzahl von Leukozyten, Lymphozyten und Neutrophilen sowie Menge des IgA-Gehaltes) sowie der Liquordiagnostik (Anzahl von Leukozyten, Menge des Totalproteins und des IgA-Gehaltes) der einzelnen Hunde, sortiert nach Krankheitsgruppen, aufgeführt.

Tab. B.1: Blut- und Liquorbefunde der Hunde der Kategorie „Gesunde“

Hund Nr.	**Leuko-zyten im Blut [10^3/µl]**	**Lympho-zyten im Blut [10^3/µl]**	**Neutro-phile im Blut [10^3/µl]**	**Leukozyten im Liquor [1/3µl]**	**Totalprotein im Liquor [mg/dl]**	**IgA im Blut [µg/ml]**	**IgA im Liquor [µg/ml]**
1	6,33	2,07	3,85				
2	7,69	2,38	4,92			98	
3	5,18	1,67	3,22			160	
4	6,09	1,41	4,23			106	
5	6,83	2,17	4,27			193	
6	7,92	2,31	5,14			57	
7	6,87	1,62	4,87			87	

IgA = Immunglobulin A; µg = Mikrogramm; µl = Mikroliter; mg = Milligramm; ml = Milliliter; Nr. = Nummer; ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Tab. B.2: Blut- und Liquorbefunde der Hunde der Kategorie „SRMA mit Symptomen“

Hund Nr	**Leuko-zyten im Blut [10^3/µl]**	**Lympho-zyten im Blut [10^3/µl]**	**Neutro-phile im Blut [10^3/µl]**	**Leukozyten im Liquor [1/3µl]**	**Totalprotein im Liquor [mg/dl]**	**IgA im Blut [µg/ml]**	**IgA im Liquor [µg/ml]**
8	31,70	2,22	23,14	6650	205	160	2,00
9	16,50	2,97	11,72	5800	64	111	1,19
10	18,30	3,29	13,73	4350	76	81	1,20
11	24,50	1,72	21,32	9720	99	368	1,30
12	11,90	0,95	8,93	3970	368	170	2,00
13	24,70	1,73	20,75	25600	102	388	2,00
14	28,63	1,15	23,48	916	32	121	0,74
15	26,62	1,07	23,69	5440	78	126	0,54
16	33,20	2,32	27,89	54	12	195	0,18
17	24,00	3,84	18,24	3008	46	250	0,87
18	48,06	2,40	41,80	2400	94	226	14,77
19	33,52	4,12	25,31	1024	269	515	5,60
Tiere, bei denen eine Messung zum Zeitpunkt eines Rezidivs erfolgte							
8	17,10	2,22	12,83	16	16	75	0,47

IgA = Immunglobulin A; µg = Mikrogramm; µl = Mikroliter; mg = Milligramm; ml = Milliliter; Nr. = Nummer

Tab. B.3: Blut- und Liquorbefunde der Hunde der Kategorie „SRMA-Verlaufskontrollen“

Hund Nr.	Leuko-zyten im Blut [10^3/µl]	Lympho-zyten im Blut [10^3/µl]	Neutro-phile im Blut [10^3/µl]	Leukozyten im Liquor [1/3µl]	Totalprotein im Liquor [mg/dl]	IgA im Blut [µg/ml]	IgA im Liquor [µg/ml]
8	15,00	3,75	10,50	1	16	52	0,43
9	9,00	2,25	5,94	4	12	84	0,48
10	13,10	1,44	9,95	2	11	34	0,27
11	9,00	2,88	5,40	2	14	165	1,92
12	7,10	0,85	6,11	2	14	85	2,00
15	7,06	1,48	4,94	2	13	77	0,45
16	9,98	2,30	7,39	1	14	62	0,08
18	18,07	2,53	14,28	1	14	65	1,73
20	26,20	5,50	18,66	10	16	251	0,23
21	9,80	1,57	7,74	1	14	160	2,00
Tiere, bei denen eine Messung zu einem weiteren Zeitpunkt erfolgte							
9	7,20	2,02	4,46	2	11	71	0,36
9	9,20	2,30	6,16	1	11	44	0,49
9	10,00	2,30	6,90	1	12	74	0,72
9	14,78	3,10	10,64	1	11	53	1,08
11	11,10	2,11	8,21	1	13	128	1,68
12	8,06	2,58	4,43	2	13	117	1,20
20	14,00	2,24	10,08	6	22	480	0,38
21	9,50	2,09	6,84	1	16	73	1,94
21	10,80	1,84	8,21	1	17	80	1,62

IgA = Immunglobulin A; µg = Mikrogramm; µl = Mikroliter; mg = Milligramm; ml = Milliliter; Nr. = Nummer; ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Tab. B.4: Blut- und Liquorbefunde der Hunde der Kategorie „idiopathische Epilepsie“

Hund Nr.	Leuko-zyten im Blut [10^3/µl]	Lympho-zyten im Blut [10^3/µl]	Neutro-phile im Blut [10^3/µl]	Leukozyten im Liquor [1/3µl]	Totalprotein im Liquor [mg/dl]	IgA im Blut [µg/ml]	IgA im Liquor [µg/ml]
22	20,70	2,07	18,01	1	11	75	0,06
23	10,80	3,35	6,91	1	12		
24	10,30	3,40	5,67	1	13	52	0,03
25	15,10	4,83	7,55	1	10	183	0,08
26	8,30	2,32	4,98	1	11	152	0,07
27				1	15	154	0,05
28	10,00	2,60	6,40	1	20	88	0,37
29	5,90	2,01	3,42	1	5	136	0,07
30	6,14	1,66	3,93	1	10	261	0,05

IgA = Immunglobulin A; µg = Mikrogramm; µl = Mikroliter; mg = Milligramm; ml = Milliliter; Nr. = Nummer; ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Tab. B.5: Blut- und Liquorbefunde der Hunde der Kategorie „Rückenmarkstraumata“

Hund Nr.	Leuko-zyten im Blut [10^3/µl]	Lympho-zyten im Blut [10^3/µl]	Neutro-phile im Blut [10^3/µl]	Leukozyten im Liquor [1/3µl]	Totalprotein im Liquor [mg/dl]	IgA im Blut [µg/ml]	IgA im Liquor [µg/ml]
31	22,30	2,23	17,39	1	14	259	0,06
32	17,20	1,38	14,45	1	11		0,07
33	8,10	0,89	6,32	1	21	124	0,14
34	13,50	1,97	10,81	1	10	240	0,14
35	9,00	1,80	6,57	1	15	167	0,13
36	4,40	0,62	3,30	3	11	72	0,06
37	11,10	2,11	7,55	0	12	98	0,15

IgA = Immunglobulin A; µg = Mikrogramm; µl = Mikroliter; mg = Milligramm; ml = Milliliter; Nr. = Nummer; ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Tab. B.6: Blut- und Liquorbefunde der Hunde der Kategorie „Entzündungen“

Hund Nr.	**Leuko-zyten im Blut [10^3/µl]**	**Lympho-zyten im Blut [10^3/µl]**	**Neutro-phile im Blut [10^3/µl]**	**Leukozyten im Liquor [1/3µl]**	**Totalprotein im Liquor [mg/dl]**	**IgA im Blut [µg/ml]**	**IgA im Liquor [µg/ml]**
38	6,40	1,60	4,10	3	34	66	0,11
39	5,70	0,91	4,28	5	23	152	0,29
40	7,10	1,35	5,18	19	13	45	0,17
41	17,10	3,08	12,83	11	22		2,00
42	10,20	2,04	7,55	11	19	90	0,24
43	6,70	2,01	3,82	1	15	204	0,13
44	8,90	2,76	5,70	4	15	162	0,12
45	16,30	2,28	12,23	6	160	120	0,25
46	17,10	0,17	14,36	1	18	144	0,06
47	6,30	1,77	3,98	1	34	85	0,49
48	12,40	2,23	9,18	1176	38	88	2,00
49	9,20	1,66	7,18	2	15	86	0,13
50	8,52	1,62	6,31	2	14	380	0,21
51	13,50	2,03	10,80	4	28	120	0,49
52	13,68	0,85	11,29	116	72	94	1,38
Tiere, bei denen eine Messung zu einem weiteren Zeitpunkt erfolgte							
42	10,20	2,14	7,04	1	20	131	0,29
44	6,40	2,24	3,65	7	15		0,03

IgA = Immunglobulin A; µg = Mikrogramm; µl = Mikroliter; mg = Milligramm; ml = Milliliter; Nr. = Nummer; ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Tab. B.7: Blut- und Liquorbefunde der Hunde der Kategorie „Neoplasien“

Hund Nr.	Leukozyten im Blut [10^3/µl]	Lymphozyten im Blut [10^3/µl]	Neutrophile im Blut [10^3/µl]	Leukozyten im Liquor [1/3µl]	Totalprotein im Liquor [mg/dl]	IgA im Blut [µg/ml]	IgA im Liquor [µg/ml]
53	11,30	1,13	9,04	4	21	149	0,35
54	8,35	2,51	4,76	1	14	85	0,06
55	8,20	5,33	1,97	2	17	38	0,05
56	9,10	2,55	5,55	2	10	170	0,12
57	7,60	2,81	3,95	1	27	90	0,28
58	8,00	1,36	6,00	1	17	55	0,13
59	8,20	1,72	5,58	1	35	52	0,56
60	7,50	1,43	4,28	2	23	113	0,13
61	6,70	2,14	4,15	1	15	141	0,17
62	6,80	1,56	4,01	1	27	72	0,26
63	18,40	0,92	16,19	690	54	66	0,52
64	8,90	2,49	5,70	2	20	83	0,69
65	6,40	0,64	5,31	1	21	83	0,69
66	10,40	1,04	8,53	5632	158	122	2,00

IgA = Immunglobulin A; µg = Mikrogramm; µl = Mikroliter; mg = Milligramm; ml = Milliliter; Nr. = Nummer; ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Tab. B.8: Blut- und Liquorbefunde der Hunde der Kategorie „Andere“

Hund Nr.	Leuko-zyten im Blut [10^3/µl]	Lympho-zyten im Blut [10^3/µl]	Neutro-phile im Blut [10^3/µl]	Leukozyten im Liquor [1/3µl]	Totalprotein im Liquor [mg/dl]	IgA im Blut [µg/ml]	IgA im Liquor [µg/ml]
67	12,20	5,37	5,73	2	12	117	0,03
68	8,70	1,74	6,18	1	13	104	0,06
69	7,10	2,06	3,98	1	12	101	0,04
70	24,20	1,21	21,78	1	18	225	0,12
71	6,90	1,04	5,24	1	17	161	0,09
72	10,30	1,65	7,62	3	19	47	0,04
73	7,20	1,80	5,04	1	11	86	0,07
74	13,10	3,80	7,99	1	11	2770	0,11
75	5,60	1,06	3,92	1	9	93	0,02
76	6,00	0,96	4,32	1	20	116	0,11
77	9,50	2,00	7,03	1	17	81	0,14
78	14,90	4,77	9,39	8	17	61	2,00
79	11,60	1,28	9,40	1	15	162	0,13
80	9,30	1,30	7,35	1	19	248	0,20
81	8,10	2,84	4,86	2	12	66	0,52
82	11,30	2,37	6,78	1	13	179	0,03
83	21,80	1,96	17,88	1	19	45	0,75
84	12,10	1,01	10,53	2	20	2000	1,18

IgA = Immunglobulin A; µg = Mikrogramm; µl = Mikroliter; mg = Milligramm; ml = Milliliter; Nr. = Nummer; ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Anhang C

Die Tabellen C.1 bis C.8 geben die Meßwerte der Durchflußzytometrie für die Anteile der Lymphozytensubpopulation an der Gesamtzahl der Events innerhalb der Lymphozytenregion an. Bei den Oberflächenmarkern handelt es sich um CD3, T-Zell-Rezeptor α/β, T-Zell-Rezeptor γ/δ, CD4, CD8α, CD21 und CD45RA. Die Gliederung erfolgte nach Krankheitsgruppen.

Tab. C.1: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen des peripheren Blutes bei Hunden der Kategorie „Gesunde“

Hund Nr.	CD3 [%]	T-Zell-Rezeptor α/β [%]	T-Zell-Rezeptor γ/δ [%]	CD4 [%]	CD8α [%]	CD21 [%]	CD45RA [%]
1	92,05	81,49	3,44	32,60	28,13	5,33	61,39
2	82,51	72,98	3,52	35,71	32,72	3,21	61,04
3	86,04	69,85	4,32	36,98	28,35	6,11	69,13
4	73,50	63,89	3,00	30,13	24,62	3,12	47,98
5	82,94	76,65	1,96	35,70	30,32	5,47	70,16
6	85,73	64,88	2,21	34,40	31,83	6,05	67,97
7	86,07	71,12	1,77	37,59	32,29	4,32	60,13

Nr. = Nummer; Angabe als Anteil der für das Oberflächenantigen positiven Zellen an Anzahl der gemessenen Events innerhalb der Lymphozytenregion

Tab. C.2: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen des peripheren Blutes bei Hunden der Kategorie „SRMA mit Symptomen“

Hund Nr.	CD3 [%]	T-Zell-Rezeptor α/β [%]	T-Zell-Rezeptor γ/δ [%]	CD4 [%]	CD8α [%]	CD21 [%]	CD45RA [%]
8	75,60		1,52	42,30	2,97	19,54	71,99
9	78,94		2,64	51,40	5,88	15,02	81,82
10	92,09	72,42	1,75	47,12	20,65	5,80	89,04
11	80,97	71,08	1,47	60,58	10,24	8,51	78,17
12	93,03	76,83	2,33	47,81	28,66	8,52	94,08
13	86,31	69,46	1,63	58,84	9,04	16,93	87,21
14	80,01	71,16	3,85	24,49	40,75	7,02	92,14
15	73,60	62,12	4,25	37,61	19,13	10,77	76,20
16	83,24	76,42	3,12	50,82	14,07	4,93	91,32
17	89,44	78,82	1,57	47,93	15,95	9,11	94,84
18	89,94	83,88	1,00	41,63	19,42	6,37	88,41
19	85,14	67,48	2,10	56,39	12,59	16,25	91,86
Tiere, bei denen eine Messung zum Zeitpunkt eines Rezidivs erfolgte							
8	75,64	60,18	3,75	44,86	17,96	6,60	84,95

Nr. = Nummer; Angabe als Anteil der für das Oberflächenantigen positiven Zellen an Anzahl der gemessenen Events innerhalb der Lymphozytenregion; ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Tab. C.3: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen des peripheren Blutes bei Hunden der Kategorie „SRMA-Verlaufskontrollen“

Hund Nr.	CD3 [%]	T-Zell-Rezeptor α/β [%]	T-Zell-Rezeptor γ/δ [%]	CD4 [%]	CD8α [%]	CD21 [%]	CD45RA [%]
8	59,58	57,35	2,00	40,73	15,20	9,79	73,23
9	91,19	72,79	0,38	53,12	18,46	13,67	85,08
10	75,16	74,96	1,10	41,06	26,40	6,46	84,99
11	84,67	59,70	1,53	52,57	13,63	15,67	79,65
12	78,92	66,64	1,80	41,33	28,54	10,80	79,05
15	81,70	72,15	3,56	42,93	22,51	21,70	70,38
16	90,54	82,37	1,91	54,09	18,46	5,26	83,81
18	89,16	79,04	1,95	43,10	13,46	10,58	83,58
20	79,65	61,81	3,13	45,26	16,45	15,05	88,52
21	87,74	81,32	1,88	45,72	26,21	6,75	76,40
Tiere, bei denen eine Messung zu einem weiteren Zeitpunkt erfolgte							
9	67,91	57,76	3,55	45,49	17,05	5,15	79,65
9	80,56	69,66	2,23	48,86	16,28	13,18	79,57
9	77,07	68,62	0,91	44,50	12,07	7,89	68,60
9	70,70	59,44	1,31	44,29	13,57	10,57	64,53
11	75,57	74,63	1,66	57,66	14,67	16,92	83,19
12	84,22	78,65	4,24	41,94	25,47	6,43	88,35
20	87,65	76,24	2,88	58,18	11,28	5,58	83,55
21	81,38	69,72	1,03	35,04	20,45	8,18	71,20
21	92,84	84,87	1,57	46,29	29,78	4,71	79,94

Nr. = Nummer; Angabe als Anteil der für das Oberflächenantigen positiven Zellen an Anzahl der gemessenen Events innerhalb der Lymphozytenregion

Tab. C.4: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen des peripheren Blutes bei Hunden der Kategorie „idiopathische Epilepsie“

Hund Nr.	CD3 [%]	T-Zell-Rezeptor α/β [%]	T-Zell-Rezeptor γ/δ [%]	CD4 [%]	CD8α [%]	CD21 [%]	CD45RA [%]
22	80,51	74,83	2,50	26,92	14,60	21,25	70,32
23	65,69		1,05	44,88	10,46	21,21	68,03
24	69,82		0,74	41,91	16,34	11,06	
25	76,52	69,71	7,77	47,38	24,95	12,93	80,74
26	81,03	70,47	5,30	34,09	32,48	7,34	85,85
27	84,62	75,61	4,52	48,99	17,45	5,92	73,45
28	93,43	84,85	4,38	47,69	25,37	4,71	74,23
29	81,94	75,51	2,44	38,37	19,12	8,17	80,55
30	84,77	77,97	2,35	51,19	18,94	7,67	64,19

Nr. = Nummer; Angabe als Anteil der für das Oberflächenantigen positiven Zellen an Anzahl der gemessenen Events innerhalb der Lymphozytenregion; ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Tab. C.5: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen des peripheren Blutes bei Hunden der Kategorie „Rückenmarkstraumata“

Hund Nr.	CD3 [%]	T-Zell-Rezeptor α/β [%]	T-Zell-Rezeptor γ/δ [%]	CD4 [%]	CD8α [%]	CD21 [%]	CD45RA [%]
31	58,58		0,74	26,32	21,08	11,08	91,08
32	84,33	84,54	0,65	42,71	41,15	4,04	69,76
33	83,75	67,22	2,53	40,84	30,29	10,06	68,41
34	94,86	88,10	1,46	40,99	31,70	7,69	77,08
35	88,57	77,14	0,77	38,31	44,88	5,94	69,97
36	77,96	74,84	4,95	39,94	31,14	7,26	68,62
37	84,10	79,21	2,05	36,47	16,74	11,01	71,81

Nr. = Nummer; Angabe als Anteil der für das Oberflächenantigen positiven Zellen an Anzahl der gemessenen Events innerhalb der Lymphozytenregion; ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Tab. C.6: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen des peripheren Blutes bei Hunden der Kategorie „Entzündungen“

Hund Nr.	CD3 [%]	T-Zell-Rezeptor α/β [%]	T-Zell-Rezeptor γ/δ [%]	CD4 [%]	CD8α [%]	CD21 [%]	CD45RA [%]
38	78,48		0,63	27,31	8,16	14,02	49,64
39	76,37		0,85	36,33	11,09	9,19	59,91
40	65,71		1,71	52,40	10,03	5,64	51,03
41	75,90	74,64	0,48	36,44	27,51	8,14	59,11
42	83,36	74,86	3,34	46,11	32,26	4,13	72,91
43	96,53	80,82	2,01	43,95	22,11	13,40	78,53
44	94,49	86,10	3,82	54,39	26,38	4,51	73,90
45	91,84	73,79	3,71	40,22	20,82	11,71	68,57
46	84,80	77,56	1,54	54,17	17,82	2,69	77,17
47	70,08	67,14	2,84	28,37	33,61	12,09	63,31
48	71,15	72,97	2,22	45,89	22,93	4,24	70,96
49	81,88	84,64	1,17	51,83	20,85	2,96	72,75
50	90,06	75,94	2,45	50,12	26,02	7,15	76,93
51	79,33	81,64	3,24	55,39	23,46	2,67	73,94
52	70,05	68,73	0,93	19,11	57,67	5,35	89,30
Tiere, bei denen eine Messung zu einem weiteren Zeitpunkt erfolgte							
42	82,60	76,14	5,21	43,07	32,81	5,49	70,64
44	70,98	66,36	2,73	49,15	14,54	3,36	57,91

Nr. = Nummer; Angabe als Anteil der für das Oberflächenantigen positiven Zellen an Anzahl der gemessenen Events innerhalb der Lymphozytenregion; ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Tab. C.7: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen des peripheren Blutes bei Hunden der Kategorie „Neoplasien“

Hund Nr.	CD3 [%]	T-Zell-Rezeptor α/β [%]	T-Zell-Rezeptor γ/δ [%]	CD4 [%]	CD8α [%]	CD21 [%]	CD45RA [%]
53	76,71	89,47	1,86	46,74	4,42	6,14	46,07
54	75,65	85,20	1,18	41,33	17,89	11,87	61,86
55	89,61		2,02	39,77	17,91	19,85	81,95
56	74,85		1,31	36,83	21,43	10,19	64,09
57	75,55	61,38	1,30	47,59	12,84	9,00	64,24
58	85,56	72,84	2,36	44,29	32,60	8,37	69,89
59	66,06	50,69	7,79	42,62	23,20	14,66	68,09
60	81,68	71,56	4,72	41,71	39,92	3,82	81,47
61	92,30	70,16	0,47	49,95	22,81	16,19	84,41
62	80,56	76,38	1,95	49,43	22,42	6,37	46,70
63	81,02	69,60	3,60	42,69	24,19	7,55	70,46
64	79,44		1,11	6,70	20,17	51,87	27,75
65	82,92	72,43	6,49	50,22	23,24	7,71	61,79
66	74,94	74,21	4,38	45,41	27,55	5,58	65,52

Nr. = Nummer; Angabe als Anteil der für das Oberflächenantigen positiven Zellen an Anzahl der gemessenen Events innerhalb der Lymphozytenregion; ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Tab. C.8: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen des peripheren Blutes bei Hunden der Kategorie „Andere“

Hund Nr.	CD3 [%]	T-Zell-Rezeptor α/β [%]	T-Zell-Rezeptor γ/δ [%]	CD4 [%]	CD8α [%]	CD21 [%]	CD45RA [%]
67	66,19		1,04	40,51	10,24	11,01	85,88
68	85,99		1,17	42,58	15,82	20,21	80,15
69	82,58		1,90	53,80	13,97	11,25	81,29
70	87,37	62,63	0,84	28,29	40,74	5,30	43,31
71	83,62	75,15	1,67	33,35	44,46	4,20	70,43
72	86,75	75,87	0,84	49,62	27,77	5,16	74,22
73	73,70	68,99	1,00	55,18	19,00	5,90	79,98
74	82,09	53,50	1,53	34,62	10,07	22,68	92,58
75	91,96	73,90	2,97	40,12	23,90	35,44	67,12
76	68,95	65,88	2,33	43,18	22,62	7,13	72,09
77	89,07	86,69	0,98	54,64	20,84	5,63	67,21
78	92,89			26,16	59,85	1,07	66,02
79	82,49	79,82	2,37	49,07	30,31	4,37	63,85
80	90,30	78,50	1,81	41,58	20,07	9,47	76,06
81	79,97	65,70	3,14	36,28	24,59	12,15	80,04
82	71,19	66,81	1,34	49,25	20,61	6,09	87,03
83	78,20	65,04	1,32	52,24	14,21	8,50	71,48
84	74,27	64,96	3,89	53,91	21,16	6,43	76,56

Nr. = Nummer; Angabe als Anteil der für das Oberflächenantigen positiven Zellen an Anzahl der gemessenen Events innerhalb der Lymphozytenregion; ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Anhang D

Die sich anschließenden Tabellen D.1 bis D.8 beinhalten die Meßwerte für die Integrinexpression (CD11a, CD11b und CD11c) der polymorphkernigen Zellen des peripheren Blutes sowie für den Anteil der CD3- bzw. CD21-positiven Lymphozyten in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit (bezogen auf die Zahl CD45-posivitiver Events innerhalb der Lymphozytenregion). Die Tabelle D.9 gibt zudem die Ergebnisse zusätzlicher, nur bei einigen Hunden durchgeführter, Immunphänotypisierungen von Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit wider.

Tab. D.1: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung der Integrinexpression der polymorphkernigen Zellen des peripheren Blute sowie der Lymphozytensubpopulationen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit bei Hunden der Kategorie „Gesunde“

Hund Nr.	CD11a [Fluoreszenz-intensität]	CD11b [Fluoreszenz-intensität]	CD11c [Fluoreszenz-intensität]	CD3 [%]	CD21 [%]
1	281,33	2267,09	268,96		
2	133,35	2548,30	365,17		
3	165,48	2226,67	276,32		
4	145,90	2287,57	261,80		
5	82,05	2128,75	187,69		
6	115,48	2072,08	266,55		
7	132,16	2016,91	273,84		

Nr. = Nummer; die Werte der Fluoreszenzintensität stellen den Median aller für das jeweilige Integrin (= CD11a, b und c) positiver Zellen innerhalb der Region der polymorphkernigen Zellen dar; ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Tab. D.2: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung der Integrinexpression der polymorphkernigen Zellen des peripheren Blute sowie der Lymphozytensubpopulationen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit bei Hunden der Kategorie „SRMA mit Symptomen“

Hund Nr.	CD11a [Fluoreszenz-intensität]	CD11b [Fluoreszenz-intensität]	CD11c [Fluoreszenz-intensität]	CD3 [%]	CD21 [%]
8	63,78	388,91	37,86	72,90	96,26
9	159,63	1144,44	171,54	57,63	45,54
10	144,60	736,53	49,14	87,58	9,89
11	171,54	1345,57	212,88	12,37	80,84
12	113,42	2072,08	148,55	32,39	60,66
13	313,40	982,17	130,97	66,15	33,85
14	252,55	1746,58	58,82	66,40	24,90
15	482,61	2267,09	449,10	62,59	26,67
16	375,16	2167,39	368,96	91,33	22,65
17	77,04	1018,15	100,00	54,48	32,43
18	523,30	3278,12	500,29	42,15	56,40
19	365,17	1945,64	368,47	41,94	48,39
Tiere, bei denen eine Messung zum Zeitpunkt eines Rezidivs erfolgte					
8	159,63	649,38	98,22	86,67	13,33

Nr. = Nummer; die Werte der Fluoreszenzintensität stellen den Median aller für das jeweilige Integrin (= CD11a, b und c) positiver Zellen innerhalb der Region der polymorphkernigen Zellen dar; die Meßwerte für die Anteile der Lymphozytensubpopulationen wurden auf die Zahl CD45-positiver Zellen der Lymphozytenregion bezogen (dieser Wert ist in der Tabelle angeben)

Tab. D.3: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung der Integrinexpression der polymorphkernigen Zellen des peripheren Blute sowie der Lymphozytensubpopulationen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit bei Hunden der Kategorie „SRMA-Verlaufskontrollen“

Hund Nr.	CD11a [Fluoreszenz-intensität]	CD11b [Fluoreszenz-intensität]	CD11c [Fluoreszenz-intensität]	CD3 [%]	CD21 [%]
8	218,70	1027,35	153,99	72,73	0,00
9	100,90	922,24	128,64	72,42	13,28
10	289,03	2392,80	281,33	98,11	17,25
11	142,02	964,66	94,75	44,58	31,08
12	170,01	1582,04	159,63	18,60	81,40
15	232,91	3078,09	421,70	92,31	10,26
16	147,22	1910,95	203,51	83,13	10,84
18	88,17	1625,31	216,74	82,74	16,80
20	140,75	1746,58	74,32	84,86	12,12
21	103,66	1963,22	144,60	0,12	93,30
Tiere, bei denen eine Messung zu einem weiteren Zeitpunkt erfolgte					
9	80,58	858,21	135,77	69,97	10,23
9	99,10	1582,04	132,16	48,85	23,56
9	88,17	1113,97	115,48	82,43	17,57
9	133,35	1730,94	198,10	76,37	2,74
11	124,09	1369,99	77,04	54,00	49,99
12	145,90	2147,99	196,32	68,67	23,71
20	210,97	1730,94	138,24	78,89	7,66
21	149,89	1472,21	78,44	59,33	50,66
21	106,50	2206,73	184,34	48,82	82,67

Nr. = Nummer; die Werte der Fluoreszenzintensität stellen den Median aller für das jeweilige Integrin (= CD11a, b und c) positiver Zellen innerhalb der Region der polymorphkernigen Zellen dar; die Meßwerte für die Anteile der Lymphozytensubpopulationen wurden auf die Zahl CD45-positiver Zellen der Lymphozytenregion bezogen (dieser Wert ist in der Tabelle angeben)

Tab. D.4: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung der Integrinexpression der polymorphkernigen Zellen des peripheren Blute sowie der Lymphozytensubpopulationen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit bei Hunden der Kategorie „idiopathische Epilepsie“

Hund Nr.	CD11a [Fluoreszenz-intensität]	CD11b [Fluoreszenz-intensität]	CD11c [Fluoreszenz-intensität]	CD3 [%]	CD21 [%]
22				92,68	7,82
23	259,46	1218,81	130,97	88,89	4,00
24	106,50	835,36	115,48	76,31	2,24
25	177,83	2267,09	333,76	81,26	3,61
26	198,10	1382,37	105,54	88,71	0,00
27	130,97	2226,67	194,56	82,76	1,72
28	135,77	1810,56	156,79	91,77	5,48
29	149,89	1762,36	126,35	86,03	9,22
30	81,31	1218,81	147,22	84,48	13,79

Nr. = Nummer; die Werte der Fluoreszenzintensität stellen den Median aller für das jeweilige Integrin (= CD11a, b und c) positiver Zellen innerhalb der Region der polymorphkernigen Zellen dar; die Meßwerte für die Anteile der Lymphozytensubpopulationen wurden auf die Zahl CD45-positiver Zellen der Lymphozytenregion bezogen (dieser Wert ist in der Tabelle angeben); ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Tab. D.5: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung der Integrinexpression der polymorphkernigen Zellen des peripheren Blute sowie der Lymphozytensubpopulationen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit bei Hunden der Kategorie „Rückenmarkstraumata“

Hund Nr.	CD11a [Fluoreszenz-intensität]	CD11b [Fluoreszenz-intensität]	CD11c [Fluoreszenz-intensität]	CD3 [%]	CD21 [%]
31	66,71	1144,44	103,66	85,71	14,71
32	100,90	770,40	144,60	79,91	1,79
33	129,80	1113,97	135,77	76,00	4,01
34	230,82	1826,92	124,09	96,13	5,58
35	226,71	2996,14	358,66	98,54	0,00
36	168,49	1433,01	158,20	82,82	7,82
37	291,64	2128,75	191,10	96,51	4,65

Nr. = Nummer; die Werte der Fluoreszenzintensität stellen den Median aller für das jeweilige Integrin (= CD11a, b und c) positiver Zellen innerhalb der Region der polymorphkernigen Zellen dar; die Meßwerte für die Anteile der Lymphozytensubpopulationen wurden auf die Zahl CD45-positiver Zellen der Lymphozytenregion bezogen (dieser Wert ist in der Tabelle angeben)

Tab. D.6: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung der Integrinexpression der polymorphkernigen Zellen des peripheren Blute sowie der Lymphozytensubpopulationen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit bei Hunden der Kategorie „Entzündungen“

Hund Nr.	**CD11a [Fluoreszenz-intensität]**	**CD11b [Fluoreszenz-intensität]**	**CD11c [Fluoreszenz-intensität]**	**CD3 [%]**	**CD21 [%]**
38	63,78	289,03	26,66	23,03	3,71
39	104,60	1263,46	50,48	86,52	16,72
40	112,40	991,05	79,15	87,72	10,24
41	170,01	1345,57	148,55	60,07	35,14
42	145,90	1472,21	137,00	87,27	3,63
43	125,21	2109,69	203,51	95,96	4,67
44	109,41	1539,93	142,02	90,52	0,00
45	106,50	1910,95	189,38	76,90	20,99
46	457,25	1700,08	399,54	81,12	13,83
47	203,51	1420,18	248,05	91,37	7,96
48	72,99	1498,93	100,90	76,31	24,60
49	170,01	1876,88	156,79	78,48	19,77
50	129,80	2090,80	147,22	92,04	5,81
51	142,02	1553,84	129,80	83,12	12,21
52	85,05	1154,78	137,00	63,18	15,76
Tiere, bei denen eine Messung zu einem weiteren Zeitpunkt erfolgte					
42	286,44	1640,00	140,75	70,39	1,94
44	168,49	1860,08	117,57	84,89	1,44

Nr. = Nummer; die Werte der Fluoreszenzintensität stellen den Median aller für das jeweilige Integrin (= CD11a, b und c) positiver Zellen innerhalb der Region der polymorphkernigen Zellen dar; die Meßwerte für die Anteile der Lymphozytensubpopulationen wurden auf die Zahl CD45-positiver Zellen der Lymphozytenregion bezogen (dieser Wert ist in der Tabelle angeben)

Tab. D.7: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung der Integrinexpression der polymorphkernigen Zellen des peripheren Blute sowie der Lymphozytensubpopulationen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit bei Hunden der Kategorie „Neoplasien“

Hund Nr.	**CD11a [Fluoreszenz-intensität]**	**CD11b [Fluoreszenz-intensität]**	**CD11c [Fluoreszenz-intensität]**	**CD3 [%]**	**CD21 [%]**
53				89,27	14,28
54	81,31	324,88	43,32	73,16	17,08
55	191,10	1420,18	162,53	80,96	57,88
56				50,50	66,25
57	135,77	1382,37	205,35	88,38	18,54
58	103,20	1165,22	174,66	83,56	8,88
59	113,42	1124,04	118,64	63,22	5,19
60	138,24	1512,47	165,48	92,64	0,00
61	71,05	1369,99	151,25	75,35	2,90
62	214,80	1298,02	152,61	55,23	41,38
63	144,60	938,98	52,80	70,33	25,67
64	248,05	2167,39	105,54	67,34	31,23
65	207,21	2267,09	139,49	46,82	54,52
66	106,50	1445,96	67,93	3,25	96,92

Nr. = Nummer; die Werte der Fluoreszenzintensität stellen den Median aller für das jeweilige Integrin (= CD11a, b und c) positiver Zellen innerhalb der Region der polymorphkernigen Zellen dar; die Meßwerte für die Anteile der Lymphozytensubpopulationen wurden auf die Zahl CD45-positiver Zellen der Lymphozytenregion bezogen (dieser Wert ist in der Tabelle angeben); ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Tab. D.8: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung der Integrinexpression der polymorphkernigen Zellen des peripheren Blute sowie der Lymphozytensubpopulationen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit bei Hunden der Kategorie „Andere“

Hund Nr.	CD11a [Fluoreszenz-intensität]	CD11b [Fluoreszenz-intensität]	CD11c [Fluoreszenz-intensität]	CD3 [%]	CD21 [%]
67	101,82	1104,00	84,29	95,00	0,00
68	80,58	1027,35	129,80	33,26	13,18
69	91,40	805,84	105,54	80,00	11,11
70	63,21	897,69	121,88	98,67	2,67
71	107,46	1582,04	162,53	80,65	12,90
72	114,44	1084,32	100,90	82,95	14,72
73	78,44	710,50	79,15	70,00	5,00
74	176,24	835,36	112,40	75,00	18,75
75	179,43	1104,00	140,75	100,00	0,00
76	104,60	1778,28	192,82	63,72	10,62
77	112,40	1715,44	130,97	91,57	4,50
78	482,61	1472,21	474,00	94,11	0,91
79	216,74	1778,28	171,54	98,25	4,07
80	199,89	1357,73	196,32	90,83	2,44
81	116,52	1640,00	144,60	52,60	29,55
82	162,53	1309,75	77,04	81,86	6,98
83	108,43	1286,40	47,40		41,31
84	181,06	2109,69	339,82	81,82	9,08

Nr. = Nummer; die Werte der Fluoreszenzintensität stellen den Median aller für das jeweilige Integrin (= CD11a, b und c) positiver Zellen innerhalb der Region der polymorphkernigen Zellen dar; die Meßwerte für die Anteile der Lymphozytensubpopulationen wurden auf die Zahl CD45-positiver Zellen der Lymphozytenregion bezogen (dieser Wert ist in der Tabelle angeben); ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Tab. D.9: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung der Integrinexpression der polymorphkernigen Zellen sowie des Verhältnisses der Oberflächenmarker CD4 und CD8α der Lymphozyten in beiden Fällen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit

Hund Nr.	**CD11a [Fluoreszenz-intensität]**	**CD11b [Fluoreszenz-intensität]**	**CD11c [Fluoreszenz-intensität]**	**CD4 : CD8α [% : %]**
8	44,78	810,65	56,95	5,54
8		2529,74		
9	51,15	259,85	46,13	1,86
10		1715,49		4,04
11	473,39	974,75	207,03	2,52
12	313,43	1774,47	259,68	0,70
13	526,79	1970,54	275,64	1,66
14	416,38	3531,09	223,70	0,53
15	376,89	2199,27	241,15	2,12
16	201,79	1999,81	75,40	2,41
17	361,06	2297,79	218,37	1,19
18	379,04	2817,22	371,69	0,41
19	365,72	2520,56	293,44	1,11
48				1,00
52	170,67	1221,53	165,86	
63	207,23	979,06	65,67	2,46
66	207,05	1388,66	146,12	17,81

Nr. = Nummer; die Werte der Fluoreszenzintensität stellen das geometrische Mittel aller für das jeweilige Integrin (= CD11a, b und c) positiver Zellen innerhalb der Region der polymorphkernigen Zellen dar; die Meßwerte für die Anteile der Lymphozytensubpopulationen wurden auf die Zahl CD45-positiver Zellen der Lymphozytenregion bezogen und dann ins Verhältnis zueinander gesetzt (dieser Wert ist in der Tabelle angeben); ein leeres Feld bedeutet, daß keine Meßwerte vorliegen

Anhang E

Nachfolgend sind die detaillierten Protokolle des *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) zur IgA-Messung sowie der Methoden der Hauptversuche aufgeführt.

IgA-ELISA

Die Messungen der IgA-Gehalte im Serum und in der Gehirnrückenmarksflüssigkeit mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurden nach dem von TIPOLD et al. (1994) vorgestellten Protokoll wie folgt durchgeführt.

1. Beschichtung der Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Best.-Nr. 9477585; Fa. Nunc Maxisorp, Basel, Schweiz) mit dem zuvor mit 0,1 M Na-Carbonat-Bicarbonat (pH 9,6) im Verhältnis 1:750 verdünnten polyklonalen Primärantikörper (Ziege gegen kanines IgA Antikörper; Best.-Nr. A40-104A, Fa. Bethyl, Montgomery, TX, U.S.A.) in einer Menge von 100 µl/Vertiefung
2. Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur in feuchter Kammer
3. dreimaliges Waschen mit 400 µl des Waschpuffers (eine 0,9%NaCl-Lösung mit 0,5 % Tween 20) pro Vertiefung
4. Auftragen der zuvor mit Tris-NaCl-Puffer (0,02 M Tris (pH 8,0) mit 0,5 M NaCl und 0,5 % Tween 20) verdünnten Serum- und Liquorproben sowie des Standards aus gepoolten kaninen Serumproben in einer Menge von 100 µl/ Vertiefung
    a) Verdünnung des Serums: 1:100 und 1:1000
    b) Verdünnung des Liquors: 1:10
    c) Verdünnung des Standards: ausgehend von einer 1:100 Verdünnung der gepoolten Serumproben (enthält unverdünnt 30 mg/100 ml) acht Verdünnungsstufen mit schrittweiser Verdünnung von 1:3
5. Inkubation für 90 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer
6. Wiederholen von 3.

7. Zugabe des Sekundärantikörpers (monoklonaler Maus gegen kanines IgA-Antikörper; Best.-Nr. MCA 631, Fa. Serotec, Düsseldorf, Deutschland) nach seiner Verdünnung mit Tris-NaCl-Puffer im Verhältnis 1:100 in einer Menge von 100 µl/ Vertiefung
8. Wiederholen von 5. und 3.
9. Zugabe von 100 µl des Konjugates pro Vertiefung (Peroxidase-konjugierter Esel gegen murines IgG Antikörper; Best.-Nr. 715-035-151, Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland) nach vorheriger Verdünnung mit Tris-NaCl-Puffer im Verhältnis 1:2000
10. Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer
11. Wiederholen von 3.
12. Zugabe von 100 µl der Substratlösung pro Vertiefung (o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid (Best.-Nr. P8287, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.); Herstellung erfolgt nach Herstellerangabe, wobei der verwendete Puffer aus 1 Kapsel mit Perborat und Phosphat-Citrat-Puffer (Best.-Nr. P4922, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.), die in 100 ml Aqua tridest. gelöst wurde, besteht)
13. Inkubation für ca. 5 min bei Raumtemperatur bis sich eine Gelbfärbung einstellt
14. Zugabe von 3 M Schwefelsäure als Stoplösung in einer Menge von 50 µl/ Vertiefung
15. photometrische Auswertung bei einer Wellenlänge von 490 nm mithilfe des ELISA-Readers (Fa. Dynatech MR 5000, Denkendorf, Deutschland) und der Computersoftware MicroWin (3. Version; Fa. Mikrotek, Overath, Deutschland)

<u>Dichtegradientenzentrifugation und sich anschließende Waschschritte</u>

Das Protokoll ist der Beschreibung durch WUNDERLI und FELSBURG (1989) entnommen und wurde nach SOMBERG et al. (1992) und DANILENKO et al. (1992) modifiziert.

1. Gabe von jeweils 2 ml Histopaque® 1119 (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) in 2 der 15 ml Röhrchen mit Schraubverschluß
2. vorsichtiges Überschichten mit jeweils 2 ml Pancoll human 1,077 g/ml (Fa. PAN™ Biotech, Aidenbach, Deutschland), so daß dieses als zweite Phase über dem Histopaque® 1119 zu liegen kommt

3. Verdünnen des EDTA-Blutes (2 x 5 ml) mit der gleichen Menge phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) in einem 50 ml Röhrchen mit Schraubverschluß
4. vorsichtige Gabe von jeweils 10 ml des verdünnten Blutes in die beiden 15 ml Röhrchen, so daß dieses eine dritte Phase über den beiden farblosen transparenten bildet
5. Zentrifugation (700 x g; 35 min; 20°C; Beschleunigung/Bremse: 1)
6. behutsames Abpipettieren und Verwerfen der obersten Phase (Serum), so daß ca. 1 cm des Serums über der darunter liegenden Zellschicht verbleibt
7. vorsichtiges Abpipettieren der zwischen den beiden obersten Phasen gelegenen mononukleären Zellen (MNCs), und Überführen derselben in ein mit 10 ml PBS gefülltes 15 ml Röhrchen (Röhrchen A)
8. Abpipettieren der unter den MNCs gelegenen Phase (Pancoll human 1,077 g/ml) inklusive der verbliebenen MNCs, so daß ca. 1 cm des Pancoll human 1,077 g/ml über der darunter liegenden Zellschicht bleibt
9. vorsichtiges Abpipettieren der, unterhalb des Pancoll human 1,077 g/ml und teilweise direkt über dem am Boden des Röhrchens befindlichen Erythrozytenpellet gelegenen, polymorphnukleäre Zell (PMNCs)-Fraktion, und Überführen derselben in ein mit 10 ml PBS gefülltes 15 ml Röhrchen (Röhrchen B)

Die so gewonnenen Zellfraktionen wurden durch sich anschließende Waschschritte für die Immunphänotypisierung vorbereitet.

1. Zentrifugation der Röhrchen A und B (170 x g; 10 min; 20°C; Beschleunigung/Bremse: 4)
2. Verwerfen des Überstands und behutsames Resuspendieren der Zellen
3. Zugabe von 10 ml PBS in das Röhrchen A bzw. im Falle einer makroskopisch sichtbaren Erythrozytenkontamination hypotone Erythrolyse wie unter 4.
4. zur hypotonen Lyse der in Röhrchen B enthaltenen Erythrozyten Zugabe von 5 ml tridestilliertem Wasser, zweimaliges vorsichtiges Schwenken und Auffüllen mit 5 ml doppelt konzentrierter PBS

5. Zentrifugation der Röhrchen A und B (250 x g; 10 min; 20°C; Beschleunigung/Bremse: 4)
6. Verwerfen des Überstands und behutsames Resuspendieren der Zellen
7. Zugabe von je 10 ml PBS in die Röhrchen A und B
8. Zentrifugation der Röhrchen A und B (170 x g; 10 min; 20°C; Beschleunigung/Bremse: 4)
9. Verwerfen des Überstands und behutsames Resuspendieren der Zellen

Indirekte Immunphänotypisierung der Zellen des peripheren Blutes

Das Protokoll wurde von STEIN et al. (2004) übernommen und leicht modifiziert. Die beschriebenen Schritte schließen sich dem Einstellen der Zellzahl auf 5 x 10^5 Zellen/50 µl an.

1. Zugabe der Lösungen zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen und Inkubation für 5 min bei 4°C
   a) Gabe von 31,3 µl der Lösung mit humanem Immunglobulin (hIg) (Fa. Globuman Berna®, Serum- und Impfinstitut Bern, Schweiz) in die 500 µl MNC-Suspension (entspricht einer Konzentration von 10 mg hIg/ml Zellsuspension)
   b) Gabe von 25 µl gepooltem hitzeinaktiviertem (56°C; 30 min) Ziegenserum in die 250 µl PMNC-Suspension (entspricht einer Menge von 1/11 der Zellsuspension)
2. Pipettieren von jeweils 50 µl der Suspensionen in die entsprechend beschrifteten 5 ml fassenden Röhrchen, aus denen schließlich auch die durchflußzytometrische Messung erfolgt
3. Zugabe von jeweils 10 µl der Primärantikörper und Isotyp-Negativkontrollen (MNCs: IgG1 und IgG2a; PMNCs: IgG1) (entspricht einer Verdünnung von 1:6) beziehungsweise (bzw.) von 10 µl der Elektrolytlösung CellWASH (Fa. BD Biosciences, Erembodegem, Belgien) für die Negativkontrollen zum Ausschluß unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers

a) von dem gegen CD4 gerichteten Primärantikörper wird entsprechend den Herstellerangaben 25 µl hinzugegeben (entspricht einer Verdünnung von 1:3)
b) die gegen CD3 und CD11a gerichteten Primärantikörper waren zuvor mit CellWASH im Verhältnis 1:50 verdünnt worden (entspricht einer Verdünnung von 1:300)

4. Inkubation für 30 min bei 4°C im Kühlschrank unter Abdeckung mit Verschlußfolie
5. als Waschschritt Zugabe von jeweils 2 ml CellWASH pro Röhrchen und anschließende Zentrifugation (200 x g; 6 min; 20°C; Beschleunigung/Bremse: 4)
6. nach Abgießen des Überstands und vorsichtigem Resuspendieren der Zellpellets Wiederholung des vorherigen Schrittes und abermaliges vorsichtiges Resuspendieren
7. nach Verdünnung des Sekundärantikörpers mit CellWASH in einem Verhältnis von 1:100 Zugabe von jeweils 50 µl/Röhrchen (entspricht einer Verdünnung von 1:200)
8. Wiederholen der Schritte 4.-6.
9. Zugabe von jeweils 75 µl BD FACSFlow™ (Fa. BD Biosciences, Erembodegem, Belgien) pro Röhrchen (entspricht einer Verdünnung der Zellsuspension von 2:5)
10. unmittelbar im Anschluß Messung der Proben in der Durchflußzytometrie (FACSCalibur™ (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) unter Verwendung der Software BD CellQuest™ Pro Version 5.2.1 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland))
    a) direkt vor der Messung behutsames Vortexen der Röhrchen
    b) während der Messung Lagerung der noch zu messenden Röhrchen bei 4°C im Kühlschrank

Die Schritte 1.,3. und 7. erfolgen unter der Sterilbank unter Verwendung von Einweg-Latexhandschuhen nach vorheriger Desinfektion.

<u>Immunphänotypisierung der Zellen der Gehirnrückenmarksflüssigkeit</u>

Das Protokoll entstammt der Publikation von TIPOLD et al. (1998) und wurde in einigen Punkten modifiziert.

1. Überführen des Liquors in das 5 ml Röhrchen, in dem im Anschluß die Färbung für die Marker CD3, CD21 und CD45 vorgenommen wird, und Zentrifugation (200 x g; 10 min; 20°C; Beschleunigung/Bremse: 4)
2. vorsichtiges Abpipettieren des Überstands
3. Zusatz von 50 µl der Elektrolytlösung CellWASH für jeweils ein zu messendes Röhrchen und anschließendes vorsichtiges Resuspendieren des Zellpellets (sofern nach Zugabe der Lösung unter Berücksichtigung der bestimmten Zellzahl und der verwendeten Menge an Liquor eine Zellkonzentration von > 5 x 10^5/50 µl zu erwarten ist, wird die Zellzahl durch entsprechende Verdünnung mit CellWASH auf eine Konzentration von 5 x 10^5/50 µl eingestellt)
4. Abnahme des Volumens der Zellsuspension, welches für die Charakterisierung der Oberflächenantigene CD11a, CD11b und CD11c benötigt wird
5. Zugabe der Lösungen zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen und Inkubation für 5 min bei 4°C
    a) pro Meßansatz zur Charakterisierung der MNCs 3,13 µl der Lösung mit humanem Immunglobulin (hIg), welches einer Konzentration von 10 mg hIg/ml Zellsuspension entspricht
    b) pro Meßansatz zur Charakterisierung der PMNCs 5 µl gepooltes hitzeinaktiviertes (56°C; 30 min) Ziegenserum (entspricht einer Menge von 1/11 der Zellsuspension)
6. Zugabe von jeweils 10 µl der Primärantikörper und Isotyp-Negativkontrollen (entspricht einer Verdünnung von 1:6) bzw. für die Negativkontrolle zum Ausschluß einer unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers 10 µl CellWASH in die entsprechend beschrifteten 5 ml fassenden Röhrchen aus denen schließlich auch die durchflußzytometrische Messung erfolgt
    a) von dem gegen CD4 gerichteten Primärantikörper wird entsprechend den Herstellerangaben 25 µl hinzugegeben (entspricht einer Verdünnung von 1:3)
    b) der gegen CD11a gerichtete Primärantikörper war zuvor im Verhältnis von 1:50 mit CellWASH verdünnt worden (entspricht einer Verdünnung von 1:300)
7. Inkubation für 15 min bei 4°C im Kühlschrank unter Abdeckung mit Verschlußfolie

8. Zugabe von jeweils 2 ml CellWASH pro Röhrchen und anschließende Zentrifugation (200 x g; 6 min; 20°C; Beschleunigung/Bremse: 4)
9. nach Abgießen des Überstands und vorsichtigem Resuspendieren der Zellpellets Wiederholung des vorherigen Schrittes und abermaliges vorsichtiges Resuspendieren

Das Protokoll für die Ansätze mit markierten Primärantikörpern setzt sich bei 12. fort. Im Falle einer Anwendung der indirekten Immunfluoreszenz sind zusätzlich die Schritte 10. und 11. vorzunehmen.

10. nach Verdünnung des Sekundärantikörpers mit CellWASH in einem Verhältnis von 1:100 Zugabe von jeweils 50 µl/Röhrchen (entspricht einer Verdünnung von 1:200)
11. Wiederholung der Schritte 7. bis 9.
12. Zugabe von 75 µl BD FACSFlow™ pro Röhrchen (entspricht einer Verdünnung der Zellsuspension von 2:5)
13. Messung der Proben in der Durchflußzytometrie unmittelbar im Anschluß
    a) direkt vor der Messung behutsames Vortexen der Röhrchen
    b) während der Messung Lagerung der noch zu messenden Röhrchen bei 4°C im Kühlschrank

Die Schritte 5.,6. und 10. erfolgen unter der Sterilbank unter Verwendung von Einweg-Latexhandschuhen nach vorheriger Desinfektion.

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Tipold. Es hat mir viel Freude bereitet, einen Beitrag zur Erforschung der SRMA leisten zu können, und es war ein schönes Gefühl zu wissen, daß ich mich jederzeit auf ihre engagierte Unterstützung verlassen konnte.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Nolte für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien.

Frau Regina Carlson danke ich für die Einweisung in die Technik der Durchflußzytometrie und für die Hilfestellungen, die sie mir auch in vielen anderen Bereichen geben konnte. Zudem möchte ich mich für das wunderbare Arbeitsklima im Labor bedanken. Außerdem wurden die Messungen des IgA-Gehaltes durch Frau Carlson durchgeführt. Auch dafür vielen Dank!

Alle Mitarbeiter aus dem Labor der Klinik für Kleintiere haben mir durch die Routineuntersuchungen von Blut und Liquor sehr geholfen. Danke!

Bei Herrn Dr. Rohn möchte ich mich für die Hilfe bei der Planung der statistischen Auswertung bedanken.

Meine Kollegen aus der Klinik für Kleintiere, und hier insbesondere diejenigen aus der Abteilung Neurologie, haben mich stets unterstützt. Dafür ein riesengroßes Dankeschön!

Jonas und Henning standen mir im Kampf mit dem Computer zur Seite. Ihr ward mir eine große Hilfe!

Bei meinen Tiermedizinerfreunden bedanke ich mich für die große Unterstützung, die mir stets zuteil wurde. Dabei danke ich insbesondere Daphne für das Korrekturlesen in letzter Minute!!

Auch meinen Nichttiermedizinerfreunden bin ich zu großem Dank verpflichtet. Mit ihrer Hilfe gelang es mir, auch die anderen außerhalb der Tiermedizin wichtigen Dinge nicht aus den Augen zu verlieren.

Bei dem Schweizerischen Klub für Berner Sennenhunde bedanke ich mich für die gewährte finanzielle Unterstützung ebenso wie bei dem Niedersächsischen Ministerium für Wissenschaft und Kultur.