

# Makrophagen bei der zentralnervösen Hundestaube : Freunde oder Feinde?

Autor(en): **Griot, C. / Bürge, T. / Brigger, S.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **131 (1989)**

Heft 6

PDF erstellt am: **15.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-591752>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# MAKROPHAGEN BEI DER ZENTRALNERVÖSEN HUNDESTAUPE: FREUNDE ODER FEINDE?

C. GRIOT<sup>1</sup>, T. BÜRGE, S. BRIGGER<sup>1</sup>, A. RICHARD<sup>1</sup>, E. PETERHANS, M. VANDEVELDE

## ZUSAMMENFASSUNG

Gehirnmakrophagen spielen im ZNS eine wichtige Rolle. In dieser Übersichtsarbeit werden einige biologische Eigenschaften der Gehirnmakrophagen sowohl im Tier als auch in der Zellkultur erläutert. Die verschiedenen Methoden und Kriterien zur Identifikation dieser Zelltypen mittels histochemischen und immunozytochemischen Methoden sowie deren morphologische Eigenschaften werden beschrieben. Im zweiten Teil wird die mögliche Beteiligung der Gehirnmakrophagen an der Entstehung der Staupeenzephalitis dargestellt. Wir haben zeigen können, dass Gehirnmakrophagen in Zellkulturen, die mit Staupevirus infiziert sind, durch Antikörper gegen das Staupevirus (im Liquor und Serum von an Staupe erkrankten Hunden) aktiviert werden. Die Stimulation der Gehirnmakrophagen durch diese Antikörper erfolgt über einen Fc-rezeptorabhängigen Mechanismus und hat eine Sekretion von toxischen Sauerstoffderivaten zur Folge. Deren mögliche Beteiligung an der Pathogenese der Staupeenzephalitis werden diskutiert.

**SCHLÜSSELWÖRTER:** Antivirale Antikörper – Chemilumineszenz – Gehirnzellkulturen – Gehirnmakrophagen – Staupevirus – toxische Sauerstoffverbindungen

## MACROPHAGES IN NERVOUS CANINE DISTEMPER: FRIENDS OR FOES?

Brain macrophages play an important role in the CNS. We review some biological aspects of brain macrophages in vivo and in vitro. The criteria and methods used for the identification of these cells are considered. They include some morphological features such as the use of histochemical and immunocytochemical techniques for internal and surface components. In the second part of this review, we describe the role of brain macrophages in canine distemper encephalitis as proposed earlier by us. Studies in cultured dog glial cells infected with canine distemper virus (CDV) have shown that brain macrophages stimulated by anti-CDV antibodies will release reactive oxygen species as measured by chemiluminescence. This response depends on the presence of viral antigens on the surfaces of infected cells and is mediated by the interaction of antigen-bound antibodies with Fc receptors on brain macrophages. These observations support the hypotheses that brain macrophages may contribute to the damage of the white matter observed in canine distemper encephalitis.

**KEY WORDS:** anti-viral antibodies – brain macrophages – chemiluminescence – canine distemper virus – glial cell cultures – toxic oxygen radicals

## EINLEITUNG

Die Makrophagen sind schon seit den Anfängen der mikroskopischen Neuropathologie als wichtige Effektorzellen bei vielen Krankheiten erkannt worden (*del Rio-Hortega*, 1932). Die Funktion und Herkunft dieser Zellen hat viele Neuropathologen fasziniert, so auch Rudolf Fankhauser. Vor allem im Zusammenhang mit seinen Studien über die primären Retikulosen des ZNS (*Fankhauser et al.*, 1972) standen die Makrophagen im Mittelpunkt.

In der vorliegenden Arbeit möchten wir einige neuere Erkenntnisse über die Phagozyten des ZNS, nachfolgend Ge-

hirnmakrophagen genannt, betrachten und unsere eigenen Arbeiten auf diesem Gebiet vorstellen. Insbesondere möchten wir ihre Rolle bei der zentralnervösen Hundestaupe, die trotz Impfung bei uns in letzter Zeit wieder vermehrt vorkommt, näher illustrieren. Diese Krankheit hat viele Human- als auch Veterinärpathologen interessiert, da die multifokale Zerstörung der weissen Substanz im Gehirn und Rückenmark bei der Staupe als Modell für menschliche Entmarkungskrankheiten, insbesondere die multiple Sklerose, anzusehen ist (*Dal Canto und Rabinowitz*, 1982).

Rudolf Fankhauser hat 1951 die verschiedenen Läsionstypen bei der zentralnervösen Staupe eingehend beschrieben. Es sind insbesondere die chronisch-entzündlichen Entmarkungsläsionen (bei denen der Entzündungsprozess zur weiteren Gewebeerstörung führt), die uns beschäftigen. Dies sind nämlich auch die Fälle, die wir wieder vermehrt in der Praxis antreffen. Bei diesen Tieren liegt eine intrathekale antivirale Immunantwort vor (Vandeveld et al., 1986), die uns in Zusammenhang mit der Makrophagenfunktion interessiert. In der folgenden Übersichtsarbeit wollen wir zunächst einige wichtige Eigenschaften der Gehirnmakrophagen in vivo und in vitro betrachten, bevor wir anschliessend unsere eigenen Untersuchungen über diese Zellen und deren Rolle bei der Hundestaupe beschreiben.

Diese Grundlagenforschung, manchmal auch als «Handlangertum» der Kliniker bezeichnet (Gerber, 1989), ist direkt relevant für die Klinik: Nur wenn wir verstehen, wie pathologische Vorgänge genau vor sich gehen, können wir an eine gezielte Therapie denken. Jeder Tierarzt weiss, dass die Prognose der Staupeenzephalitis ungünstig ist. Aber sollte es nicht wohl möglich sein, durch die Manipulation der Makrophagenaktivität den Krankheitsverlauf günstig zu beeinflussen? Um diese Frage zu beantworten, müssen wir aber zuerst herausfinden, was tatsächlich geschieht.

### GEHIRNMAKROPHAGEN IM TIER

Wie in allen anderen Organsystemen spielen die Makrophagen in nahezu sämtlichen pathologischen Prozessen im ZNS eine wichtige Rolle. Sie sind Effektorzellen bei Abräum- und Heilungsvorgängen und ebenfalls bei der Bekämpfung von Mikroorganismen. Wie wir weiter unten darlegen werden, kann die Stimulation der Effektorfunktionen aber auch für den Wirt nachteilige Folgen haben. Seit vielen Jahrzehnten wird die Herkunft der Makrophagen im Gehirn erforscht. Einige frühere Hypothesen, die sich auf lichtmikroskopische Beobachtungen an normalem und pathologisch verändertem Gewebe (zusammengefasst durch Fankhauser et al., 1972) stützten, wurden durch neuere Untersuchungen mit radioaktiv-markierten Zellen (Oehmichen, 1982, 1983) oder Zellmarkerstudien (mit spezifischen Antikörpern gegen bestimmte Zelltypen; Perry et al., 1985) bestätigt. Nach all diesen Beobachtungen wird jetzt allgemein angenommen, dass bei vielen pathologischen Prozessen (Entzündung, Trauma) Monozyten aus dem Blut durch die Gefässwand der Bluthirnschranke «wandern», wo sie sich zu Makrophagen entwickeln, und

dass andererseits Makrophagen aus «ortsständigen» Zellen entstehen können. Bei bestimmten pathologischen Prozessen dürfte vor allem die Beteiligung dieser zweiten Gruppe wichtig sein.

Wo befinden sich nun diese «ortsständigen» Vorläuferzellen im Gehirn? Man nimmt an, dass es drei mögliche «Quellen» gibt: (i) die Meningealmakrophagen, (ii) die perivaskulären Makrophagen und (iii) die sogenannte Mikroglia, deren Herkunft und Zuordnung umstritten ist. Die Mikroglia sind kleine Zellen mit langen, verzweigten Fortsätzen, die man mit dem Silberimprägnationsverfahren mehr oder weniger spezifisch darstellen kann. Mit spezifischen Antikörpern (Makrophagen-Oberflächenmarker) konnte man an Gehirnschnitten fetaler und neonataler Mäuse neuerdings eindeutig zeigen, dass die Mikroglia von Monozyten abstammen. Diese wandern während der fetalen Entwicklung aus der Blutbahn in das ZNS ein und können so eine wichtige Rolle bei der «Modellierung» des Gehirns spielen, wo es neben proliferativen Prozessen auch stets Abbauvorgänge gibt (Perry et al., 1985; Perry und Gordon, 1988). Ein Teil dieser eingewanderten Zellen bleibt nach Abschluss der Entwicklung im ZNS als Mikroglia zurück. Sie sind äquivalent mit den ruhenden Makrophagen in anderen Organsystemen, wie zum Beispiel den Kupffer-Sternzellen in der Leber oder den Langerhans-Zellen in der Haut (Giulian und Baker, 1986; Perry und Gordon, 1988).

### GEHIRNMAKROPHAGEN IN DER ZELLKULTUR

Untersuchungen an Gehirnmakrophagen können sehr gut in Gehirnzellkulturen durchgeführt werden. Dadurch lassen sich unzählige Experimente mit einem minimalen Verbrauch an Tieren ausführen. Gehirnzellkulturen können entweder aus dem Kleinhirn neugeborener Hunde (überzählige Welpen aus einem Wurf) oder von ganzen Hirnen neugeborener Mäuse hergestellt werden. Durch mechanische Zerkleinerung des Hirngewebes wird eine Zellsuspension hergestellt. Diese wird in Petri-Schalen, welche einzelne montierte Deckgläser enthalten, zusammen mit Nährmedium ausgesät (Zurbriggen und Vandeveld, 1984; Abbildung 1). Etwa 14 Tage nach dem Aussäen entsteht ein zusammenhängender Zellrasen, der verschiedene Zelltypen enthält (sogenannt «gemischte» Gehirnzellkulturen). Hierbei handelt es sich in erster Linie um Astrozyten, die das Grundgerüst der Zellkultur bilden. Die unmittelbar darüberliegende Zellschicht umfasst nebst Oligodendrozyten, den myelinbildenden Zellen des ZNS,

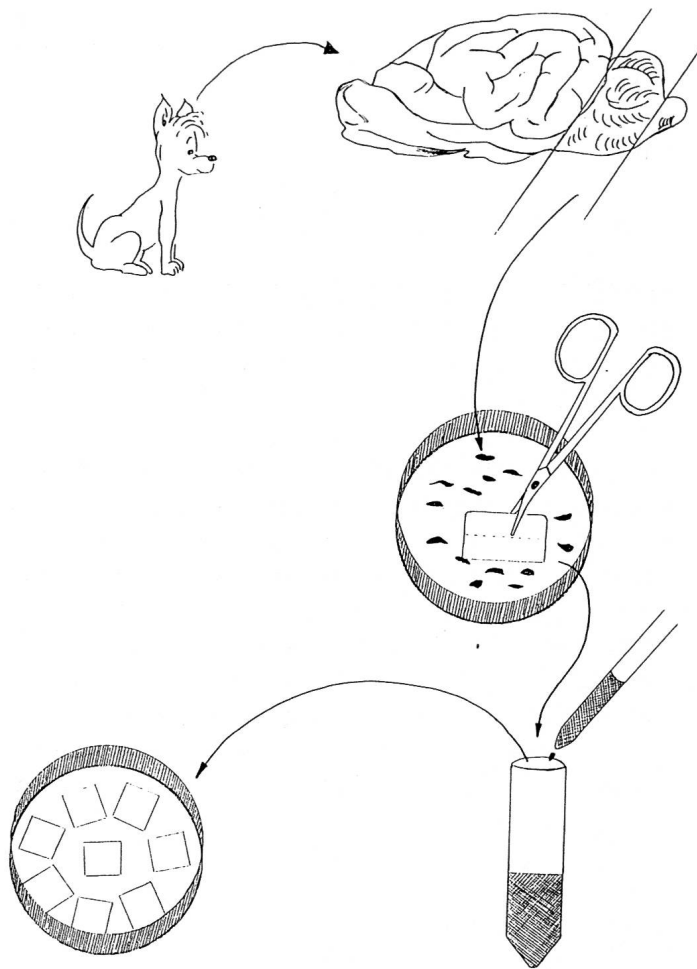


Abb. 1: Herstellung von Gehirnzellkulturen  
Das Kleinhirn neugeborener Hunde wird mechanisch zerkleinert, mit Zellkulturmedium vermischt und anschließend in Petri-Schalen, die montierte Deckgläser enthalten, ausgesät.

auch Gehirnmakrophagen. Diese Zellen stellen 1–5% der gesamten Zellpopulation dar (Bürge et al., 1989) und sind regelmässig über die gesamte Zellkultur verteilt (Abb. 2A).

Es ist möglich, Gehirnmakrophagen *in vitro* histochemisch, immunzytochemisch oder mit Hilfe der Silberimpregnation zu markieren. Histochemisch weist man unspezifische Esterase nach: es wird ein Substrat verwendet, welches mit der Esterase, die im Zytoplasma lokalisiert ist, chemisch reagiert. Weitere Enzyme, wie Lysozyme oder Peroxidase können ebenfalls nachgewiesen werden; zum Teil muss hier allerdings mit unspezifischen Reaktionen mit den übrigen Zellen gerechnet werden. Bei der immunzyto-

chemischen Markierung der Gehirnmakrophagen stehen Oberflächenantigene der Plasmamembran im Vordergrund. Rezeptoren für die Fc-Portion von IgG und funktionelle Eigenschaften wie Phagozytose sind herausragende Merkmale (Sonderer et al., 1987) und können benutzt werden, um Gehirnmakrophagen mit Erythrozyten zu markieren. Hierzu werden unfixierte Gehirnzellkulturen mit Immunglobulin (Ig) – G geladenen Rinder- oder Schaf-Erythrozyten inkubiert. Die Fc-Portion der an die Erythrozyten gebundenen IgG-Moleküle bindet an die Fc-Rezeptoren der Gehirnmakrophagen und ein Teil der an die Zelloberfläche gebundenen Erythrozyten wird phagozytiert. Die Erythrozyten bilden so eine Rosette um die einzelnen Gehirnmakrophagen (Jungi und Peterhans, 1988; Abb. 2A, D). Während den letzten 10 Jahren wurden verschiedene monoklonale Antikörper für die Identifikation von Makrophagen etabliert. Einige dieser Antikörper binden auch an Gehirnmakrophagen wie der M1/70 Antikörper, der das MAC 1 Antigen (Fc-Rezeptor) erkennt (Ho und Springer, 1982). Ein weiterer für die Identifikation von Makrophagen verwendeter monoklonaler Antikörper ist der F 4/80 (uns freundlicherweise von Dr. D. Hume, Canberra, überlassen), der ausschliesslich an ein Glykoprotein in der Plasmamembran von Makrophagen und Gehirnmakrophagen von Mäusen bindet (Austyn und Perry, 1981). Monozyten werden durch diesen Antikörper nicht erkannt (Abb. 2B).

In der Neuropathologie werden Silberimpregnationsverfahren verwendet, um die Gehirnmakrophagen mehr oder weniger spezifisch in Gehirnschnitten darzustellen (del Rio-Hortega, 1932). Interessanterweise bleibt die «Argemtophilie» der Gehirnmakrophagen auch *in vitro* erhalten. Wie in Gehirnschnitten werden allerdings andere Strukturen in der Kultur mitimpregniert (Abb. 2C).

### MORPHOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VON GEHIRNMAKROPHAGEN

Lichtmikroskopisch können zwei Typen von Gehirnmakrophagen unterschieden werden: amöboide und «verzweigte» Gehirnmakrophagen (Abb. 2B, C; Shevach, 1984). Die amöboiden oder «reaktiven» Gehirnmakrophagen können wiederum zwei Formen annehmen: sie treten entweder als runde Zellen («Sombbrero-ähnlich») oder mit langen Filopodien in Erscheinung (Frei et al., 1987). Beide Formen besitzen zarte Mikrovilli, mit denen sie sich an Oberflächen festhalten können. Sie machen etwa 95% aller Gehirnmakrophagen aus. Die zweite Gruppe, «verzweigte» Gehirnmakrophagen genannt, ist durch eine variable Zahl von langen zytoplasmatischen Fortsätzen cha-

rakterisiert. Gehirnmakrophagen mit den verzweigten Fortsätzen entsprechen am ehesten den «ruhenden» Makrophagen, die wir auch in vivo antreffen. Wenn Kulturen, die ausschliesslich aus isolierten Gehirnmakrophagen be-

stehen, mit Zellkulturmedium von gemischten Gehirnzellkulturen inkubiert werden, treten vermehrt die verzweigten Gehirnmakrophagen auf (eigene nicht publizierte Beobachtungen). Dies zeigt deutlich, dass das morphologische Erscheinungsbild der Makrophagen durch ihre «Umgebung» mitbestimmt werden kann.

#### HERKUNFT DER GEHIRNMAKROPHAGEN IN DER ZELLKULTUR

Man würde vermuten, dass die Makrophagen in den Gehirnzellkulturen aus Blutmonozyten stammen, die bei der Präparation der Kulturen «hineingeschleppt» wurden. Dies dürfte aufgrund des folgenden Experimentes ausgeschlossen sein: Werden die narkotisierten Welpen vor Herstellung der Zellkultur mit einer Pufferlösung perfundiert, so wird ein grosser Teil des Blutes entfernt. Anschliessend hergestellte Zellkulturen enthalten ähnlich viel Makrophagen wie die aus nicht perfundierten Tieren hergestellten Kulturen. Die Gehirnmakrophagen stammen also direkt aus dem Gehirn; allerdings ist damit nicht geklärt, ob sie von den perivaskulären oder meningealen Makrophagen abstammen oder aus den «ruhenden» Gehirnmakrophagen hervorgegangen sind.

#### GEHIRNMAKROPHAGEN ALS EFFEKTORZELLEN

Grundsätzlich lassen sich Gehirnmakrophagen ähnlich wie andere Makrophagen in vitro aktivieren. Der funktionelle Ausdruck der «Aktivierung» der Makrophagen ist ein sehr komplexer Vorgang. Die Aktivierung von Gehirnmakrophagen kann entweder auf rezeptorabhängigem oder -unabhängigem Weg stattfinden (Peterhans et al., 1988). Bestimmte chemische Substanzen, wie der Tumorpromotor Phorbol-Myristate-Azetat, stimulieren Gehirnmakrophagen über einen rezeptorunabhängigen Mechanismus (Sonderer et al., 1987). Fc-Fragmente von Antikörpern hingegen können Gehirnmakrophagen über spezifische Rezeptoren, die sogenannten Fc-Rezeptoren, aktivieren. Gehirnmakrophagen können nach Stimulation, ähnlich wie Makrophagen anderer Gewebe, wahrscheinlich eine Vielzahl von Produkten, sogenannte Zytokine, freisetzen. Im Gegensatz zu den Makrophagenprodukten, ist die funktionelle Bedeutung dieser Substanzen im Gehirn noch weitgehend unklar. Eingehend untersucht wurden die Sekretionsprodukte der Gehirnmakrophagen von Ratten und Mäusen. So konnten Frei et al. (1987) zeigen, dass aktivierte Gehirnmakrophagen die Fähigkeit haben, den sogenannten Tumor Nekrosis Faktor (TNF) zu sezernieren. Dieser

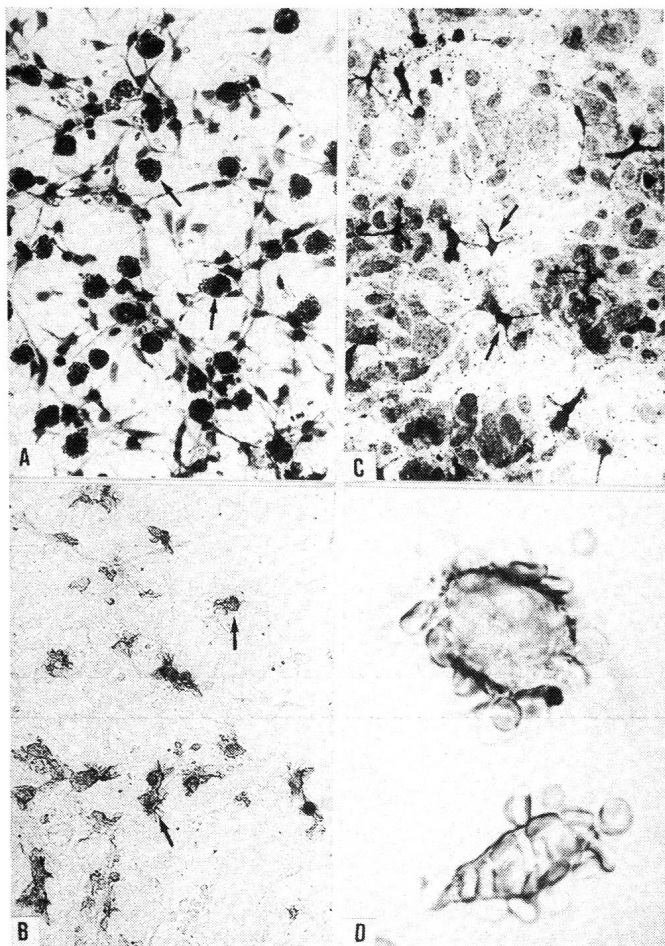


Abb. 2: Gehirnmakrophagen in der Zellkultur (A): Zahlreiche Makrophagen (Pfeil) in der Hirngewebekultur des Hundes sind mit dem Erythrozyten-Rosetten Assay markiert. Die unterliegende Zellschicht besteht vor allem aus Astrozyten. Die Kultur ist leicht mit Hämatoxylin gegengefärbt (x250). (B): Mit dem monoklonalen Antikörper F 4/80 spezifisch markierte Makrophagen (Pfeil) in Hirngewebekultur der Maus. Die zahlreichen feinen Ausläufer sind typisch für die Makrophagen (x100). (C): Mit der Silberimpregnation markierte, verzweigte Makrophagen (Pfeil) in der Hirngewebekultur der Maus. Auch andere Gliazellen werden mitimpregniert (x250). (D): Isolierte Gehirnmakrophagen der Maus mit dem monoklonalen Antikörper F 4/80 und dem Erythrozyten-Rosetten Assay doppelmarkiert (x360).

Faktor, der ursprünglich im Serum von Mäusen und Kaninchen nach Injektion von Mykobakterien oder Endotoxin isoliert wurde, kann, wie der Name schon sagt, in gewissen Tumoren Nekrose verursachen (*Beutler und Cerami, 1987*). *Giulian et al. (1986)* zeigten, dass Gehirnmakrophagen ebenfalls Interleukin-1 produzieren. Dieser Stoff verursacht unter anderem Fieber. Neben diesen Substanzen können Gehirnmakrophagen nach Stimulierung aus molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) eine Reihe von instabilen Produkten wie Superoxid ( $O_2^-$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) herstellen (*Giulian et al., 1986; Colton und Gilbert, 1987; Sonderer et al., 1987; Bürge et al., 1989; Griot et al., 1989; Abb. 3*). Einige dieser Sauerstoff-Abkömmlinge sind toxisch, sowohl für Mikroorganismen als auch für körpereigene Zellen (*Halliwell und Gutteridge, 1984*). Die Produktion und sich daraus ergebenden Konsequenzen dieser Sauerstoffabkömmlinge stehen im Zentrum unserer weiter unten beschriebenen Untersuchungen (*Abb. 3*).

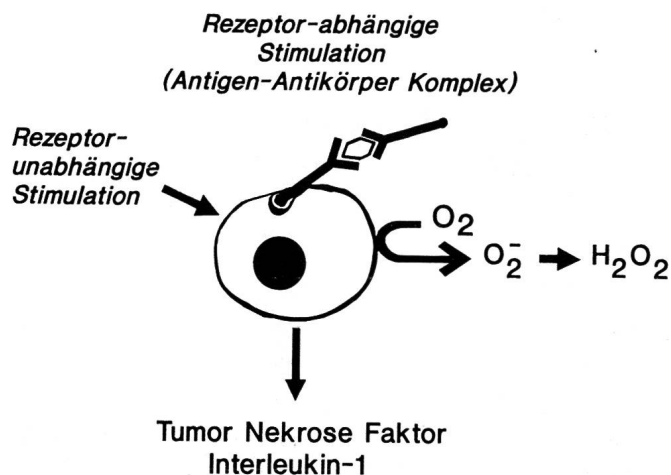


Abb. 3: Aktivierung von Makrophagen  
Makrophagen können auf zwei Arten stimuliert werden: Rezeptor-unabhängig oder rezeptor-abhängig durch einen Antigen-Antikörper Komplex. Diese Stimulation hat eine Sekretion von Zytokinen zur Folge von denen hier Tumor Nekrose Faktor und Interleukin-1 dargestellt sind. Zudem werden aus molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) die instabilen Produkte Superoxide ( $O_2^-$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) gebildet.

Es war schon lange bekannt, dass verschiedene Arten von Phagozyten (Makrophagen, Monozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten) nach deren Stimulierung Licht freisetzen. Diese Lichtemission wird als Chemilumines-

zenz bezeichnet und geht auf die Produktion von instabilen Sauerstoff-Abkömmlingen zurück (*Allen, 1986*). Diese empfindliche Technik wurde erstmals durch *Sonderer et al., (1987)* zum Studium der Reaktion von Gehirnmakrophagen auf verschiedene Stimuli verwendet.

### ROLLE DER GEHIRNMAKROPHAGEN BEI DER STAUPEENZEPHALITIS

Hundestaupe, verursacht durch ein Morbilli-Virus, ruft zuerst eine massive Immunsuppression mit hochgradiger Lymphopenie hervor. Allgemeine Symptome dieser systemischen Krankheit wie Husten, Nasenausfluss, Konjunktivitis, Erbrechen und Durchfall treten in der Regel 1–2 Wochen nach der Infektion auf. Bei der klassischen Verlaufsform kommt es bald zu schweren ZNS-Störungen, die in der Folge zum Tode des Tieres führen können. Bei einzelnen Tieren können die primär nicht-entzündlichen ZNS-Läsionen einen chronisch-progredienten entzündlichen Verlauf annehmen. Die klassische Verlaufsform der Staupe treffen wir interessanterweise nur noch selten in der Klinik an, es sind vielmehr jene Fälle im Vordergrund, welche nur ZNS-Störungen zeigen.

Bei früheren morphologischen Untersuchungen (*Fankhauser, 1951*) wurden grosse Zahlen von Makrophagen in den chronischen Staupelesionen gesehen, was spätere Untersucher (*Wisniewski et al., 1972*) zur Spekulation veranlasste, dass die Makrophagen zur Gewebeerstörung beitragen können. Wir haben (*Vandeveldt et al., 1986*) festgestellt, dass es bei der entzündlichen Staupeenzephalitis zur Produktion von antiviralen Antikörpern im Gehirn selber kommt und dass dieser Vorgang mit dem Entfernen des Staupevirus aus den Gehirnläsionen einher zu gehen scheint (*Bollo et al., 1986*). Allerdings war nicht klar, wie diese immunologischen Vorgänge – die im Prinzip einen positiven Effekt haben, nämlich die Virusentfernung aus den Läsionen – auch zu Gewebeerstörung mit Verschlechterung der klinischen Symptomen führen. Unabhängig von diesen Beobachtungen hat *Peterhans (1987)* gezeigt, dass Virus-Antikörper-Komplexe die Fähigkeit haben, Makrophagen zur Freisetzung von toxischem Sauerstoff anzuregen.

Im Gehirn von Hunden mit Staupeenzephalitis sind nun die verschiedenen Elemente vorhanden, die für eine solche Reaktion nötig sind: zahlreiche Makrophagen, staupevirusinfizierte Zellen (*Mutinelli et al., 1987*) und antivirale Antikörper. Wir wollten jetzt untersuchen, ob diese Konstellation tatsächlich zu derart potentiell gefährlichen Makrophagenreaktionen führen kann.

**KONZEPT DER GEHIRNMAKROPHAGEN AKTIVIERUNG IN VITRO**

Das von uns verwendete Testsystem kann die Verhältnisse in vivo gut nachahmen: Wenn wir Gehirnzellkulturen mit dem Staupevirus (Stamm A 75/17, freundlicherweise von Dr. M. Appel, Cornell University, Ithaca, New York) inkubieren, stellen wir nach zirka 21 Tagen mit Hilfe von immunzytochemischen Methoden fest, dass der überwiegende Teil der Gliazellen (Astrozyten und Makrophagen, nicht aber Oligodendrozyten; Zurbriggen et al., 1986; Zurbriggen et al., 1987) Staupevirusantigen an der Oberfläche präsentieren. Im weiteren befinden sich zahlreiche Gehirnmakrophagen in engem Kontakt mit den infizierten Zellen.

Ein erstes Experiment zeigte, dass Gehirnmakrophagen in Gliazellkulturen, sowohl wenn mit Staupevirus infiziert wie auch in nicht-infizierten Kulturen, mit verschiedenen Agentien (z. B. Phorbol-Myristate-Azetat) stimuliert werden können. Diese Stimulation ist als Lichtemission (Chemilumineszenz) sichtbar. Ein weiteres Experiment zeigte, dass nach der Zugabe von IgG-gereinigtem Hyperimmuns serum (von einem gegen Staupe geimpften Hund) eine Stimulation der Gehirnmakrophagen in mit Staupevirus infizierten Zellkulturen erfolgt. Dies findet jedoch *nicht* in normalen (nicht-infizierten) Kulturen statt. Falls  $F(ab')_2$  Fragmente (Antikörper ohne ihre Fc-Portion) von diesem Hyperimmuns serum auf infizierten Gehirnzellkulturen getestet werden, so ist keine Chemilumineszenz sichtbar. Das heisst, dass in diesem Falle die Makrophagen *nicht* aktiviert werden. Die Rekonstitution dieser  $F(ab')_2$  Fragmente durch einen zweiten, gegen das Hundeserum gerichteten Antikörper hat hingegen wieder eine Lichtemission zur Folge (Abb. 4). Bei der Zugabe von Staupevirus oder Hyperimmuns serum in nicht-infizierte Kulturen ist kein Effekt sichtbar, wohl aber, wenn Staupevirus-Immunkomplex oder IgG-geladene Erythrozyten hinzugegeben werden.

Aus all diesen Beobachtungen wurde folgendes Konzept vorgeschlagen: Antikörper gegen Staupevirus binden an Virusantigen, welches an der Oberfläche von Gliazellen (Astrozyten, *nicht* aber Oligodendrozyten; Zurbriggen et al., 1987) exprimiert wird. In der Folge bilden diese Antikörper eine «Brücke» zwischen ZIELZELLE (Astrozyten) und Fc-Rezeptor der EFFEKTORZELLE (Gehirnmakrophagen), die sich in unmittelbarer Nähe der Astrozyten befindet. Diese rezeptorabhängige Stimulation der Gehirnmakrophagen führt unter anderem zur Freisetzung von reaktivem Sauerstoff (Abb. 5). Es handelt sich also um eine anti-

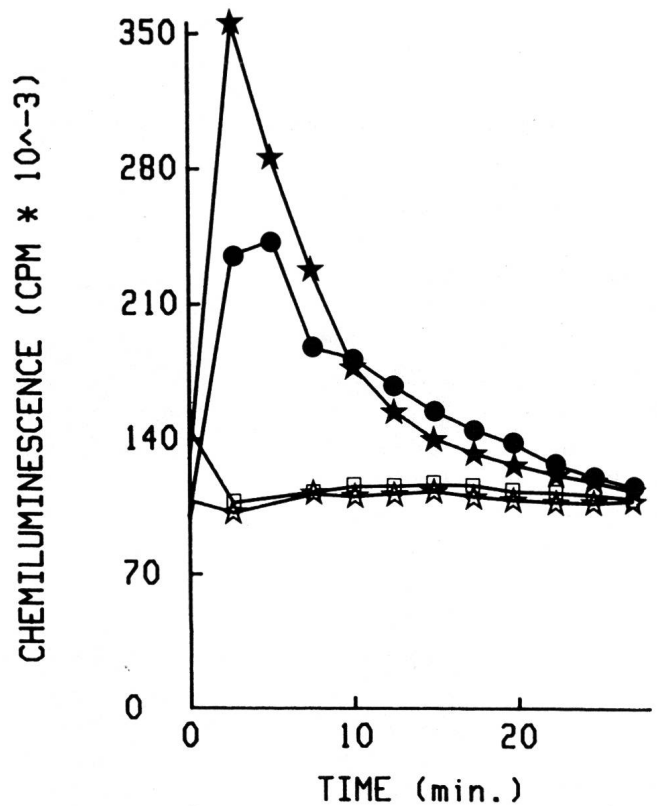


Abb. 4: Die Rolle der Antikörper Fc-Portion bei der Induktion von Chemilumineszenz in mit Staupevirus infizierter Hundehirnzellkultur

Hyperimmuns serum eines gegen Staupe geimpften Hundes aktiviert die Makrophagen und hat eine Lichtemission zur Folge (●).  $F(ab')_2$  Fragmente desselben Serums vermögen keine Chemilumineszenz auszulösen (□). Falls ein zweiter Antikörper (vom Kaninchen) gegen Hunde  $F(ab')_2$  Fragmente mitinkubiert wird, erfolgt wieder eine Makrophagenaktivierung (◆). Der Kaninchen-Antikörper allein kann keine Chemilumineszenz auslösen (◇). Die Fc-Portion des Hyperimmuns serums ist für die Lichtemission verantwortlich. Die Aktivierung des Makrophagen erfolgt über ihre Fc-Rezeptoren.

körperabhängige – zell-vermittelte Zytotoxizität (Bürge et al., 1989). Es ist denkbar, dass bei anhaltender Stimulation der Makrophagen nicht nur die virusinfizierten Zellen, sondern auch solche in der unmittelbaren Nachbarschaft mitgeschädigt werden.

Bei der Staupe treten ebenfalls Antikörper gegen Myelinbestandteile auf (Krakowka et al., 1973). Lange Zeit nahm man darum an, dass autoimmune Vorgänge bei der Zerstörung des Myelins eine wichtige Rolle spielen können. Wir

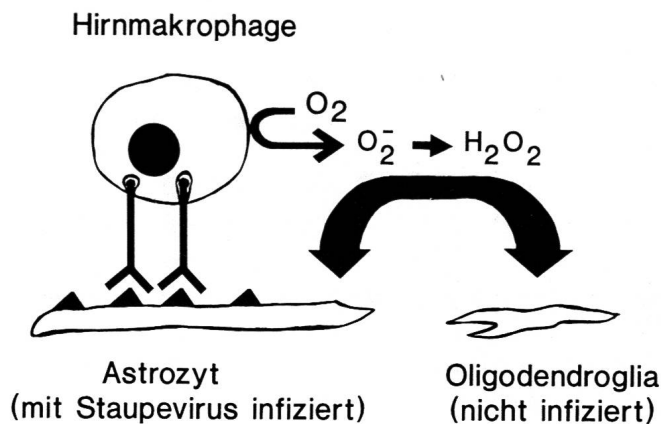


Abb. 5: Modell der Aktivierung von Gehirnmakrophagen in Staupevirus infizierten Zellkulturen

Bei der Zugabe von Antikörper gegen Staupevirus binden diese an Staupevirusantigen, das auf der Oberfläche von infizierten Astrozyten (ZIELZELLE) exprimiert wird. Es kommt zu einer «Brückenbildung» zwischen den gebundenen Antikörpern und Fc-Rezeptoren (binden das Fc-Fragment der Antikörper) von Makrophagen (EFFEKTORZELLE), welche in unmittelbarer Nähe sind. Diese Aktivierung hat unter anderem eine Sekretion von instabilen reaktiven Sauerstoffprodukten ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) zur Folge, welche toxisch für die umliegenden Zellen sein können. Ein ähnlicher Vorgang könnte sich bei der Staupeenzephalitis abspielen und an der Entstehung der Entmarkungsläsionen mitverantwortlich sein.

untersuchten deshalb eine grössere Anzahl von Seren und Liquorproben von Hunden mit verschiedenen Verlaufsformen der Staupe. Dabei konnten wir zwei Beobachtungen machen: (i) im Liquor von Tieren mit chronisch-entzündlicher Entmarkung sind Antikörper gegen Staupevirus vorhanden, die Gehirnmakrophagen *in vitro* aktivieren; (ii) Antimyelin-Antikörper, ebenfalls im Serum und Liquor vorhanden, können hingegen Gehirnmakrophagen in unserem Testsystem nicht aktivieren.

Wir schliessen daraus, dass das Zusammenspiel von antiviralen Antikörpern zusammen mit Gehirnmakrophagen eine Rolle bei der Entmarkung, wie sie bei chronischer entzündlicher Staupe auftritt, spielen könnte. Da Antimyelin-Antikörper diese Fähigkeit nicht besitzen, spekulieren wir, dass die autoimmune Komponente bei der Hundestaupe eher eine untergeordnete Rolle spielen dürfte.

### EIN BLICK IN DIE ZUKUNFT

Unsere bisherigen Arbeiten haben ergeben, dass Gehirnmakrophagen bei der Staupeenzephalitis sowohl als «Freunde» als auch als «Feinde» auftreten können. Falls nun das Letztere eher zutreffen sollte, könnte man über Ansatzmöglichkeiten zur Therapie der Staupeenzephalitis spekulieren.

Als logische Konsequenz unserer bisherigen Arbeiten untersuchen wir den Effekt von verschiedenen toxischen Sauerstoff-Metaboliten auf Gehirnzellen. Wir haben bis anhin festgestellt, dass in unseren Gehirnzellkulturen Oligodendrozyten empfindlicher auf die Behandlung mit  $O_2^-$  reagieren als die übrigen Gliazellen (Griot et al., zur Publikation eingereicht). Der toxische Effekt ist teilweise auch mit sogenannten «Radikalfängern» vermeidbar. Es müssen noch weitere Studien durchgeführt werden, um den biochemischen Mechanismus, der hierfür verantwortlich ist, zu evaluieren. Daraus eröffnen sich vielleicht neue Perspektiven in der Behandlung von Enzephalitiden, bei denen Sauerstoff-Metaboliten eine Rolle spielen.

### LITERATURVERZEICHNIS

- Allen R. C. (1986): Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence. A kinetic approach to analysis. *Methods Enzymol.* 133: 449–493. — Austyn J. M., Gordon S. (1981): F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* 11: 805–815. — Beutler B., Cerami A. (1987): Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N. Engl. J. Med.* 316, 7: 379–385. — Bollo E., Zurbriggen A., Vandeveld M., Fankhauser R. (1986): Canine distemper virus clearance in chronic inflammatory demyelination. *Acta Neuropathol. (Berlin)* 72: 69–73. — Bürge T., Griot C., Vandeveld M., Peterhans E. (1989): Antiviral antibodies stimulate the production of reactive oxygen species in cultured dog brain cells infected with canine distemper virus. *J. Virol.*, in press. — Colton C. A., Gilbert D. L. (1987): Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett.* 223: 284–288. — Dal Canto M. C., Rabinowitz S. G. (1982): Experimental models of virus-induced demyelination of the central nervous system. *Ann. Neurol.* 11: 109–115. — del Rio-Hortega P. (1932): Microglia. In «Cytology and cellular pathology of the nervous system» (W. Penfield, ed.) Hafner, New York (reprinted 1966) 2: 481–534. — Fankhauser R. (1951): Encephalitis und Hard-pad-Symptom beim Hunde, eine kritische Übersicht. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 93: 715–821. — Fankhauser R., Fatzer R., Luginbühl H., Mac-



Grath J. T. (1972): Reticulosis of the central nervous system (CNS) in dogs. *Adv. Vet. Sc. Comp. Med.* 16: 35–71. — Frei K., Siepl C., Groscurth P., Bodmer S., Schwerdel C., Fontana A. (1987): Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon- $\gamma$  treated microglial cells. *Eur. J. Immunol.* 17: 1271–1278. — Gerber H. (1989): Gedanken zur tierärztlichen Ausbildung. *Swiss Vet* 6, 3: 7–15. — Giulian D., Baker T. J. (1986): Characterisation of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J. Neurosci.* 6: 2163–2178. — Giulian D., Baker T. J., Shih L. N., Lachmann L. B. (1986): Interleukin 1 of the central nervous system is produced by amoeboid microglia. *J. Exp. Med.* 164: 594–604. — Griot C., Bürge T., Vandeveld M., Peterhans E. (1989): Antibody-induced generation of reactive oxygen radicals by brain macrophages in canine distemper encephalitis—a mechanism for bystander demyelination. *Acta Neuropathol.* (Berlin), in press. — Halliwell B., Gutteridge J. M. (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1–14. — Ho M. K., Springer T. A. (1982): MAC — 1 antigen: quantitative expression in macrophage populations and tissues, and immunofluorescent localisation in spleen. *J. Immunol.* 128: 1221–1225. — Jungi T. W., Peterhans E. (1988): Change in the chemiluminescence reactivity pattern during in vitro differentiation of human monocytes to macrophages. *Blut* 56: 213–220. — Krakowka S., McCullough B., Koestner A., Olsen R. (1973): Myelin-specific autoantibodies associated with central nervous system demyelination in canine distemper virus infection. *Infect. Immunity* 8: 819. — Mutinelli F., Vandeveld M., Griot C., Richard A. (1988): Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination. *Acta Neuropathol.* (Berlin) 77: 333–334. — Oehmichen M. (1982): Functional properties of microglia. In «Recent advances in neuropathology» Churchill Livingstone, Edinburgh, 2: 83–107. — Oehmichen M. (1983): Inflammatory cells in the central nervous system: an integrating concept based on recent research in pathology, immunology and forensic research. In «Progress in neuropathology» H. Zimmermann (ed.), Raven Press, New York. 277–335. — Perry V., Hume D., Gordon S. (1985): Immunohistochemical localisation of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neurosci.* 15, 2: 313–326. — Perry V., Gordon S. (1988): Macrophages and microglia in the nervous system. *TINS* 11, 6: 273–276. — Peterhans E. (1987): Virus- and antibody — induced chemiluminescence. In «Chemiluminescence» K. Van Dyke and V. Castranova (eds), CRC Press, Boca Raton Fla. USA 2: 59–91. — Peterhans E., Jungi T. W., Stocker R. (1988): Autotoxicity and reactive oxygen in viral disease.

In «Oxy-radicals in molecular biology and pathology» P. A. Cerutti, I. Fridovich, J. M. McCord (eds), UCLA symposia on molecular and cellular biology, New Series, 82: 543–562. — Shevach E. M. (1984): Macrophages and other accessory cells. In W. E. Paul (ed), *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York. 71–107. — Sonderer B., Wild P., Wyler R., Fontana A., Peterhans E., Schwyzer M. (1987): Murine glial cells in culture can be stimulated to generate reactive oxygen. *J. Leukocyte Biol.* 42: 463–473. — Wisniewski H., Raine C., Kay W. (1972): Observations on viral demyelinating encephalomyelitis: Canine distemper. *Lab. Invest.* 26: 589–599. — Zurbriggen A., Vandeveld M. (1984): Morphological and immunocytochemical characterisation of mixed glial cell cultures derived from neonatal canine brain. *Res. Vet. Sci.* 36: 270–275. — Zurbriggen A., Vandeveld M., Dumas M. (1986): Secondary degeneration of oligodendrocytes in canine distemper virus infection in vitro. *Lab. Invest.* 54, 4: 424–431. — Zurbriggen A., Vandeveld M., Dumas M., Griot C., Bollo E. (1987): Oligodendroglial pathology in canine distemper virus infection in vitro. *Acta Neuropathol.* (Berlin) 74: 366–373. — Vandeveld M., Zurbriggen A., Steck A., Bichsel P. (1986): Studies on the intrathecal humoral immune response in canine distemper encephalitis. *J. Neuroimmunol.* 11: 41–51.

#### **Le rôle des macrophages dans la forme nerveuse de la maladie de Carré du chien: amis ou ennemis?**

Les macrophages du cerveau jouent un rôle important dans le système nerveux central. Dans ce travail quelques aspects biologiques des macrophages du cerveau in vivo et in vitro sont décrits. Les différentes méthodes et critères pour l'identification de ces cellules à l'aide de méthodes histochimiques et immunocytochimiques ainsi que leur particularités morphologiques sont expliquées. Ainsi le rôle des macrophages du cerveau dans la pathogenèse de la maladie de Carré est discuté. Des macrophages du cerveau in vitro infectés avec le virus de la maladie de Carré sont activés par des anticorps contre le virus de la maladie de Carré (dans le liquide céphalorachidien et le sérum de chiens atteints). La stimulation de ces macrophages par ces anticorps se fait par un mécanisme dépendant d'un récepteur Fc. Elle est suivie par une sécrétion de dérivés toxiques d'oxygène. Le rôle de dérivés toxiques dans la pathogenèse de l'encéphalite est discuté.

#### **I macrofagi nella forma nervosa del cimurro del cane: amici o nemici?**

I macrofagi del cervello svolgono un ruolo importante nel sistema nervoso centrale. In questo lavoro vengono de-

scritti alcuni aspetti biologici dei macrofagi del cervello per quanto concerne il funzionamento in vivo e in vitro. Vengono pure spiegati e descritti i diversi metodi e i criteri per l'identificazione di queste cellule, tra cui metodi istochimici e immunocitochimici, come pure le loro particolarità morfologiche. In secondo luogo viene discussa l'eventuale partecipazione dei macrofagi alla patogenesi dell'encefalite dovuta al cimurro. Abbiamo fatto notare come sia possibile l'attivazione di macrofagi del cervello, posti in culture di cellule contaminate dal cimurro, inserendovi anticorpi estratti dal liquido cefalorachidiano e dal siero di cani infetti dallo stesso virus. La stimolazione di suddetti macrofagi tramite anticorpi avviene attraverso un meccanismo dipendente da un recettore Fc. La reazione è seguita da una secrezione di derivati tossici d'ossigeno. Viene pure discusso il ruolo di questi derivati tossici nella patogenesi dell'encefalite.



**Universität Bern**

### **Kardiomyopathie des Rindes**

Zur Erforschung der Kardiomyopathie des Rindes (CMP) ist an der Klinik für Nutztiere und Pferde der Universität Bern ein neues Projekt angelaufen, das vom «Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung» bezahlt wird.

Wir bitten Kolleginnen und Kollegen, uns die in ihrer Praxis auftretenden Fälle oder Verdachtsfälle von CMP telefonisch zu melden. Wir würden den entsprechenden Tieren anschliessend gerne Harn- und Blutproben entnehmen.

Allfällige Meldungen sind zu richten an:  
Herrn Dr. H. Graber, Klinik für Nutztiere und Pferde der Universität Bern, Bremgartenstrasse 109 a, 3012 Bern.  
Telefon: 031- 23 83 83

### **VERDANKUNGEN**

Die vorliegende Arbeit wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Projekt Nr. 3.956.87 (M.V.) und Nr. 3.636.87 (E.P.), der Schweizerischen Multiplen Sklerose Gesellschaft und der Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an der Universität Bern unterstützt. An dieser Stelle soll allen beteiligten Institutionen unser Dank für die langjährige finanzielle Unterstützung ausgesprochen werden.

Adresse: Dr. C. Griot  
Institut für Tierneurologie  
Bremgartenstrasse 109a  
3001 Bern

Manuskriptengang: 14. April 1989

## **Nafpenzal<sup>®</sup> T**

**Die weltweit bewährte Alternative für den Euterschutz:  
Penicillin-Nafcillin- Dihydrostreptomycin**

Der kleine Injektor –  
weltweit millionenfach  
bewährt:  
– breites Spektrum  
– sicher  
– gut verträglich

**Zusammensetzung**  
Benzylpenicillinum procainicum 300 000 U.I.,  
Nafcillinum 100 mg (ut N. natriicum),  
Dihydrostreptomycinum 100 mg,  
(ut D. sulfuricum) pro vase (3 g).

**Hersteller**  
MYCOFARM INTERNATIONAL B.V.,  
NL-5831 AD Boxmeer



Packungen zu 4 Injektoren

**VETERINARIA VAG**

CH-8045 Zürich Grubenstrasse 40 Tel. 01 - 462 16 20