

## Neue Gesichtspunkte zur Frage der Entstehung und der pathogenetischen Bedeutung der entzündlichen Reaktion bei Virusinfektionen des ZNS

Immunhistologische, morphologische und virologische  
Untersuchungen am Modell der experimentellen Poliomyelitis

J. SIMON, G. PETERS, K. BLINZINGER, L. BOULGER und D. MAGRATH

Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München  
(Direktor: Prof. Dr. Gerd Peters)

National Institute for Medical Research, Hampstead, London  
(Head of Dept.: Dr. Frank Perkins)

Eingegangen am 15. Februar 1970

*A Reconsideration of the Problem of the Origin and Pathogenetic  
Significance of the Inflammatory Reaction in Viral Infections of the CNS*

*Immunofluorescence, Morphological and Virological Studies  
on the Model of Experimental Poliomyelitis*

**Summary.** 106 rhesus and cynomolgus monkeys were inoculated with 5.5 to 6.8  $\log_{10}$  TCD<sub>50</sub>/0.1 ml of virulent and attenuated Type 3 poliovirus, intraspinally (0.1 ml), subcutaneously (0.5 ml), intramuscularly (0.5 ml) and intravenously (0.5 ml). Inactivated trivalent polio vaccine was used intraspinally (0.1 ml) as control. The animals were sacrificed at time intervals ranging between 12 h and 21 days after inoculation. Light, fluorescence and electron microscopic observations, and virus assays were carried out on the central nervous system of the inoculated animals.

The comparison of the virulent and attenuated infection revealed two parts of the inflammatory reaction. The first, occurring with virulent virus only, consisted mainly of polymorphonuclear cells and macrophages and appeared early in the course of infection. This phase, absorptive in nature, is probably initiated by breakdown products from the damaged nerve cells and represents the "secondary" non-specific inflammatory reaction.

The other inflammatory reaction, seen with both virulent and attenuated virus, consisted of cells of the lymphoplasmocytic series and of macrophages, and is probably induced by the viral antigen. It is the "primary" specific reaction, defensive in nature and represents the local immune-response. Both types of inflammatory reaction aim at the restoration of homeostasis, thus performing a protective function.

The immunofluorescence and the electron microscopy show that the mesenchymal cells of the inflammatory reaction and the vessel walls posses a closer association to the poliovirus than the neurons. The findings indicate the potential capacity of some of the inflammatory cells to replicate the virus or to take it up and thus to serve as a "vector", providing local spread of the virus. This important pathogenic role can be called an aggressive function.

These protective and aggressive mechanisms run parallel within the heterogeneous cell population of the focus of infection but opposing one another. Their mutual relationship appears to determine the course of the infectious process. This process can be considered as an "epidemic" within the cell population. A nerve cell infected with the virus serves to trigger the "epidemic". Its rapid destruction yields breakdown products, which give rise to the inflammatory reaction. The predominantly mobile cells of this inflammatory reaction constitute a dense cell population with extensive mutual contact. If several of these cells become infected during contact with a destroyed nerve cell (neuronophagia) the conditions for rapid spread of virus to further host cells (nerve cells or mesenchymal cells) are very favourable. The damage to increasing numbers of neurons intensifies the inflammatory reaction, which in turn provides an additional host population for the virus. In this way a *vicious circle* can develop if the protective mechanisms, especially immunoglobulins and interferon, do not intervene in time.

*Key-Words:* Viral Encephalomyelitis — Poliomyelitis — Pathogenesis — Inflammatory Reaction — Immunofluorescence.

*Zusammenfassung.* 106 Rhesus- und Cynomolgus-Affen wurden mit virulentem, attenuiertem und inaktiviertem Poliovirus Typ 3 in einer Dosis von  $10^{5,6}$  bis  $10^{6,8}$  TCD<sub>50</sub>/0,1 ml intraspinal, subcutan, i.m. und i.v. inoculiert und nach Überlebenszeiten von 12 Std bis 21 Tagen getötet. Das ZNS wurde histologisch, immunhistochemisch, elektronenmikroskopisch und virologisch untersucht. Beim Vergleich der virulenten und der attenuierten Infektion konnten zwei Komponenten der entzündlichen Reaktion (ER) unterschieden werden. Eine frühzeitig einsetzende, bei der *polymorphe Granulocyten* und *Makrophagen* dominieren, wird vor allem durch die Zerfallsprodukte von geschädigten Nervenzellen ausgelöst. Sie ist als eine *sekundäre, unspezifische, resorative ER* zu bezeichnen. Die andere Form, bei der Elemente der *lymphocytär-plasmacellulären Reihe* und *Makrophagen* vorherrschen, wird durch das *virale Antigen* hervorgerufen. Sie ist als eine *primäre, spezifische, defensive* anzusehen und stellt das *morphologische Substrat* der lokalen *Immunantwort* dar. Beide Typen der ER sind auf die *Erneuerung der Homeostasis* gerichtet, so daß man von einer *protektiven Funktion* sprechen kann. Die Immunfluorescenz sowie die Elektronenmikroskopie zeigen, daß die *mesenchymalen Zellen* der ER und der Gefäßwände mehr Beziehungen zu dem Virus aufweisen als die Nervenzellen. Die Befunde lassen vermuten, daß der ER außer der protektiven Funktion auch eine wichtige *pathogenetische Rolle* zukommt, die man als *aggressive Funktion* bezeichnen kann. Die entzündlichen Elemente scheinen sowohl für die *örtliche Ausbreitung* als auch für die *Replication des Virus* verantwortlich zu sein. Die protektiven und aggressiven Vorgänge im Rahmen der ER verlaufen parallel zueinander und ihr gegenseitiges Verhältnis bestimmt den Trend des *infektiösen Prozesses*. Dieser kann als eine „*Epidemie*“ in der Zellpopulation angesehen werden. Den *Trigger* der „*Epidemie*“ stellen die von dem Virus befallenen *Nervenzellen* dar. Diese werden rasch geschädigt, so daß sie nur relativ wenig Viren produzieren können. Ihre *Zerfallsprodukte* lösen aber die *sekundäre entzündliche Reaktion* aus. Zur Infektion der entzündlichen Elemente kommt es während der *Neuronophagie*. Die meisten infizierten Phagocyten dürften die Eigenschaft der amöboiden Beweglichkeit besitzen, so daß die weitere Verbreitung des Virus in der nunmehr schon sehr dicht gewordenen, bunten Zellpopulation mit zahlreichen potentiellen Wirtszellen rasch erfolgen kann. Der Befall weiterer Nervenzellen bedingt eine Verstärkung der entzündlichen Reaktion, was wiederum einen Zuwachs an potentiellen Wirtszellen zur Folge hat. Auf diese Weise kann sich ein „*circulus vitiosus*“ entwickeln, wenn die

*protektiven Mechanismen* — vor allem die Bildung von Immunglobulinen und Interferon — nicht rechtzeitig zur Wirkung kommen.

*Schlüsselwörter:* Virus-Encephalomyelitis — Poliomyelitis — Pathogenese — Entzündliche Reaktion — Immunfluorescenz.

### Einleitung

Die entzündliche Reaktion (weiter ER) bei den viralen Infektionen des ZNS wird in den klassischen Arbeiten in die Kategorie der „bewußt engen Fassung des Entzündungsbegriffes“ (Spatz, 1930) oder der „selbständigen Entzündung“ (Spielmeyer, 1922) eingeordnet. Hierzu gehören die entzündlichen Reaktionen, die sich unmittelbar an die Einwirkung von pathogenen Erregern anschließen. Die Genese der ER und ihre Bedeutung im Rahmen infektiöser Prozesse waren wiederholt Gegenstand lebhafter Diskussionen (Göttinger Tagung der Deutschen Pathologischen Gesellschaft 1923, Pathologen-Tagung in Breslau, 1944). Manche Probleme sind dabei aber noch offen geblieben. So gibt es Meinungs-differenzen hinsichtlich der Frage, ob die entzündlichen Vorgänge eine *primäre oder sekundäre Reaktion darstellen*. Bei der Poliomyelitis wird die primäre Reaktion auf die Anwesenheit des Virus vor allem mit der oft beobachteten Dissoziation zwischen geringer Nervenzellschädigung und gut ausgeprägter ER begründet (Környey, 1943; Peters et al., 1967). Für die sekundäre Natur der ER bei primärer Nervenzellschädigung setzt sich z. B. Bodian (1948) ein; durch Versuche an Affen konnte er zeigen, daß das Poliovirus keine ER auslöst, wenn vorher die Nervenzellen anderweitig zerstört worden sind. Trotz dieser Differenzen stimmen die meisten Autoren darin überein, daß die ER als eine *Abwehrreaktion anzusehen* ist, der eine *protektive* Funktion zukommt.

Zu einer anderen Beurteilung der Bedeutung der ER gelangte die *Immunfluorescenz*, die den mikroskopischen Nachweis von Virus-antigenen in individuellen Zellen ermöglicht. Sie zeigte, daß nicht nur die Nervenzellen eine Beziehung zu dem Poliovirus aufweisen, sondern auch die mesenchymalen Zellen (Palacios et al., 1963; Kovacs et al., 1963a und b; Kanamitsu et al., 1967). Enge Beziehungen der *mesenchymalen Zellen des RES* und des *lymphatischen Systems* zu den Erregern wurden auch bei vielen anderen viralen Infektionen nachgewiesen (Gresser u. Lang, 1966). Die *in vivo* (Mims, 1964; Mannweiler et al., 1961; Bodian, 1964; Kantoch et al., 1959; Blinzingier et al., 1968, 1969) wie auch *in vitro* (Barski, 1957; Franklin, 1958; Goodman u. Koprowski, 1962a und b; Berg et al., 1961; Roberts, 1962a und b; Johnson, 1964) beobachtete *Virusvermehrung* in diesen Zellen führte zu der Annahme, daß sie eine wichtige Rolle in der Pathogenese von viralen Infektionen spielen (Mims, 1964; Gresser u. Lang, 1966). Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Frage, welche *Beziehungen die mesenchymalen Zellen der ER zum*

*Poliovirus* haben und welche *Bedeutung der ER für die formale Pathogenese* des poliomyelitischen Prozesses zukommt. Die Poliomyelitis haben wir als Modell einer Neuroinfektion gewählt, bei der das Virus vom primär befallenen Organ über den Blutweg (virämische Phase) sekundär in das ZNS als Zielorgan gelangt. Ein derartiges Virus weist neben der Neurotropie auch das breite Spektrum der Viscerotropie auf.

Die Poliomyelitis hat für die experimentelle Studie folgende Vorteile:

1. Das klassische Bild der Poliomyelitis weist alle Merkmale einer akuten Entzündung des zentralnervösen Gewebes auf.
2. Bei den Polioviren gibt es Varianten mit unterschiedlicher, gut definierbarer Neurovirulenz, mit denen man experimentell eine unterschiedlich schwere Poliomyelitis mit different intensiver ER auslösen kann.

Mit Hilfe der *Immunfluorescenz*, *Histologie*, *Elektronenmikroskopie* und *Virologie* verfolgten wir in sechs Versuchsreihen die Entwicklung des infektiösen Prozesses nach *intraspinaler*, *subcutaner*, *intravenöser* und *intramuskulärer Inoculation* von *attenuierten* und *neurovirulenten* Varianten des *Poliovirus*. An Hand der hierbei gewonnenen Ergebnisse versuchen wir, zuerst die auslösenden Faktoren der ER bei der Poliomyelitis zu ermitteln und dann ihre Rolle in der Pathogenese dieses Prozesses zu eruiieren.

### Material und Methoden

*Virus.* 5 Stämme des Poliovirus Typ 3 mit unterschiedlicher Neurovirulenz wurden verwendet. Ihre Herkunft und ihre virologischen Charakteristika sind bereits in einer anderen Mitteilung ausführlich dargestellt worden (Magrath et al., 1970).

*Versuchstiere.* 35 Cynomolgus- und 74 Rhesus-Affen mit einem Gewicht von 1,5–2,5 kg. Den Tieren wurden unverdünnte Virussuspensionen mit einem Titer von  $10^{5,6}$  bis  $10^{6,8}/0,1$  ml TCD<sub>50</sub> (tissue culture dose, 50% effective) intraspinal (0,1 ml) bzw. subcutan, i.v. oder i.m. (0,5 ml) injiziert. Danach wurden sie täglich klinisch beobachtet und auf Muskelschwäche getestet. In Zeitabständen von 12 Std und 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10 und 21 Tagen wurden die einzelnen Affen narkotisiert und nach der Blutabnahme für die virologischen Untersuchungen getötet. Gewebsblöcke aus dem Gehirn und Rückenmark wurden für die virologische und histologische Untersuchung entnommen.

*Kontrolle.* 8 Affen dienten für Kontrolluntersuchungen. Je 2 von ihnen wurden mit Kochsalzlösung, Lipoprotein, Gewebekulturmedium und markiertem Rinder- $\gamma$ -Globulin inoculiert.

*Histologie.* 12 Ebenen aus dem ZNS wurden mikroskopisch untersucht: 3 aus dem Lumbalmark, 1 aus dem Thoracalmark, 3 aus dem Cervicalmark, 2 aus der Medulla oblongata und je 1 Ebene aus dem Mittelhirn, Thalamus und Cortex.

Ein Teil des Materials wurde in neutralem Formalin fixiert, der andere Teil des Materials wurde schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das formalinfixierte Material diente für die gewöhnliche lichtmikroskopische Untersuchung. Für diese

wurden die Färbungen Nissl, H.-E. Bodian, Cajal und mit Methylgrün-Pyronin durchgeführt.

### *Immunfluorescenz*

Es wurde durchweg die indirekte Methode angewandt. Phosphatpuffer (pH 7,2) wurde zur Verdünnung des Antipolio-Serums und des mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC) markierten Serums, sowie zum Abspülen der Präparate während des Färbe- prozesses verwandt. Zur Vermeidung einer unspezifischen Fluorescenz wurden das Antipolio-Serum und das Conjugat 2mal mit an Aceton getrocknetem Affengehirn- und Affenleberpulver absorbiert. 8  $\mu$  dicke Cryostatschnitte wurden 30 min in Aceton fixiert, 3 mal 5 min gespült und mit 1:20 verdünntem Antipolio-Serum bei 37° C für 30 min inkubiert. Nach dem Abspülen wurden sie mit markiertem Anti- Kaninchen-Serum von der Ziege (Microbiological Associates Inc. Bethesda), das 1:20 verdünnt worden war, bedeckt und für 30 min bei 37° C inkubiert. Die Schnitte wurden 3 mal 5 min abgespült und mit gepuffertem Glycerin (1:9) eingedeckt.

Für die Untersuchung benutzen wir ein großes Zeiss-Forschungsmikroskop mit Fluorescenzeinrichtung.

*Kontrollen.* Es wurden zwei Arten von Kontrollen durchgeführt: a) die Schnitte von infizierten Tieren wurden mit einem heterogenen, hyperimmunen Kaninchen- Serum im ersten Schritt des Färbevorganges bedeckt; b) mit Antipolio-Serum wurden die Schnitte von normalen Affen beschichtet.

### *Elektronenmikroskopie*

Bei 6 Tieren wurde in Pentobarbitalnarkose eine Laminektomie durchgeführt und jeweils eine 1—2 mm dicke Scheibe der Lumbalintumescenz rasch entnommen. Die Fixierung erfolgte in phosphatgepuffertem Glutaraldehyd (Rew- castle, 1965). Unter Lupenkontrolle wurden aus den Rückenmarksscheiben die Vorderhörner herauspräpariert, diese anschließend zerkleinert, in Pufferlösung mit Saccharosezusatz ausgewaschen, mit Osmiumtetroxyd (Palade, 1952) nachfixiert und auf übliche Weise in Epon 812 (Luft, 1961) eingebettet. Die Untersuchung der mit Uranylacetat (Huxley u. Zubay, 1961) und mit Bleicitrat (Reynolds, 1963) nachkontrastierten Ultradünnsehnitte dieses Materials erfolgte in einem Zeiss-Elektronenmikroskop vom Typ EM 9A.

*Virologische Untersuchung.* Die lumbale, thoracale und cervicale Region des Rückenmarks sowie die Medulla oblongata, das Mittelhirn, der Thalamus und der Gyrus praecentralis wurden virologisch untersucht. Die Gewebe wurden in phosphatgepuffter physiologischer Kochsalzlösung zu einer 10%igen Suspension homogenisiert und leicht zentrifugiert, damit sich große Partikel absetzten. Das Homogenat wurde in 10 Schritten verdünnt. Mit je 0,2 ml von jeder Verdünnung (Beginn bei 1:10) wurden 4 Affengewebskulturröhrchen inoculiert, welche 7 Tage bei 37° C inkubiert wurden. Die TCD<sub>50</sub> wurde nach der Methode von Kärber berechnet.

### *Ergebnisse*

*Die histopathologischen Befunde* reichten vom normalen Gewebsbild bis zum zellverödenden Befall (Abb. 3). Die ausführliche Beschreibung der bekannten feingeweblichen Veränderungen unterbleibt. Nur jene Befunde werden erwähnt, die zur Klärung der mit der ER im Zusammenhang stehenden Fragen beitragen. Die Ergebnisse sind in 3 Gruppen

unterteilt: negative Befunde, positive Fluorescenz mit negativen histologischen Befunden und positive Fluorescenz mit positivem Gewebsbefund.

1. *Negative Befunde* wurden in der Inkubationszeit des infektiösen Prozesses erhoben, deren Dauer von der Neurovirulenz des Virus und der Art seiner Verabreichung abhängig war. Völlig negativ blieben die Befunde stets nach der intraspinalen Inoculation des inaktivierten Poliovirus und nach der subcutanen Verabreichung des attenuierten Virus. In diesen Fällen war auch das Ergebnis der virologischen Untersuchung immer negativ.

2. Die Befunde der zweiten Gruppe bezeichnen wir als *solitäre Fluorescenz*. Es handelt sich um eine Fluorescenz im Cytoplasma von vereinzelten Zellen, die *unregelmäßig disseminiert* auftrat, ohne die für die Poliomyelitis typische örtliche Prädilektion zu zeigen. Sie wurde auch in ganz *atypischen Regionen* gefunden, so z. B. im occipitalen oder frontalen Cortex oder im Gyrus postcentralis. Die Fluorescenz war wiederholt in *nichtneuronalen Zellen* (Zellen des Gefäßbindegewebes, Gliazellen) und nur 2 mal in *Nervenzellen* zu beobachten, wobei das histologische Bild unauffällig blieb. Die virologischen Befunde waren teils negativ, z. B. in der occipitalen Region, teils positiv, z. B. in der lumbalen Intumescenz.

3. In die dritte Gruppe wurden die Befunde mit ausgedehnter Fluorescenz und eindeutigen histologischen Veränderungen, d. h. mit einer ER in verschiedenen Phasen der Entwicklung, eingegliedert. Die *Immunfluorescenz* war überwiegend in *nichtneuronalen Elementen* anzutreffen, vor allem in entzündlichen Elementen (Abb. 2b, 3b, 4b und c) sowie in Gefäßwand- und Gliazellen. Die Nervenzellen wiesen nach der Inoculation der virulenten Viren in etwa 30–60% eine schwache, wahrscheinlich nur Stunden dauernde Fluorescenz auf (Abb. 1b und c). Nach der Verabreichung der attenuierten Polioviren war bei der Mehrzahl der Nervenzellen keine Fluorescenz bemerkbar (Abb. 4b). Topographisch stimmte die Fluorescenz mit der Verteilung der morphologischen Veränderungen weitgehend überein. Bei der Infektion mit den virulenten Viren zeigte sich dabei das für die Poliomyelitis charakteristische Ausbreitungsmuster. Je nach der Neurovirulenz des inoculierten Virus konnten im Hinblick auf die Gewebsveränderungen jene 2 Typen unterschieden werden, welche von vorausgegangenen Untersuchungen bereits bekannt und als *virulentes* und *attenuiertes Bild* bezeichnet worden sind. Beide Bilder unterschieden sich im Verlauf der Infektion nicht nur nach der *Qualität und Intensität* der ER sowie der Nervenzellschädigung, sondern auch bezüglich des *Ausbreitungsmusters* der Läsionen. Die typischen Merkmale beider Bilder sind in Tab. 1 schematisch zusammengefaßt. Hinsichtlich einer ausführlichen Beschreibung beider Bilder sei

Tabelle 1. Zusammenfassung der Merkmale des virulenten und attenuierten Bildes bei Poliomyelitis

Klinik	Virulentes Bild	Attenuiertes Bild
a) Lähmungen	+++	Ø
b) Tödlicher Verlauf	++	Ø
Histologie		
a) Nervenzellschädigung	+++	±
b) Entzündliches Infiltrat:		
Granulocyten	+++	±
Makrophagen	++	++
Lymphoide Zellen	++ - + + +	++ - + + +
Korrelation der ER zur Nervenzellschädigung	++	Ø
Trend zur Ausbreitung	++	±

Tabelle 2. Zeitlicher Verlauf der entzündlichen Reaktion in den ersten 72 Std nach der intraspinalen Inoculation des neurovirulenten und attenuierten Poliovirus

Std nach der Inoc.	Neurovirulent			Attenuiert		
	Poly- morph.	Ma- kroph.	Lymph.	Poly- morph.	Ma- kroph.	Lymph.
12	++ <sup>a</sup>	±	—	—	—	—
24	+++	++	±	—	—	—
48	++	++	+	±	+	+
72	+	+++	++ - + + +	—	++	++ - + + +

<sup>a</sup> Die Intensität der entzündlichen Reaktion wurde folgendermaßen eingestuft: + Vereinzelte entzündliche Zellen perivasculär oder im Neuropil. ++ Lockere entzündliche Infiltrate perivasculär oder herdförmig im Neuropil. +++ Mantelförmige perivasculäre Infiltrate bei der Mehrzahl der Gefäße und/oder zahlreiche herdförmige Infiltrate im Neuropil. ++++ Mehrschichtige, perivasculäre Infiltrate bei der Mehrzahl der Gefäße und/oder massive diffuse Infiltrate im Neuropil.

auf frühere Arbeiten verwiesen (Simon, 1962, 1965a und b; Simon et al., 1966a und b; Simon, 1967).

Die Entwicklung der ER nach der intraspinalen Inoculation ist in Tab. 2 dargestellt. Bei der Verabreichung des *virulenten* Virus waren nach 12 Std die Veränderungen auf die Umgebung des Stichkanals beschränkt. Die Nervenzellen boten das Bild einer schweren Schädigung oder waren bereits völlig nekrotisch (Abb. 1a). Gleichzeitig erschien eine ausgesprägte ER mit Schwellung und Proliferation der Endothelien der kleinen Gefäße sowie perivasculären Infiltraten, die überwiegend aus polymorphesten Granulocyten und Makrophagen zusammengesetzt

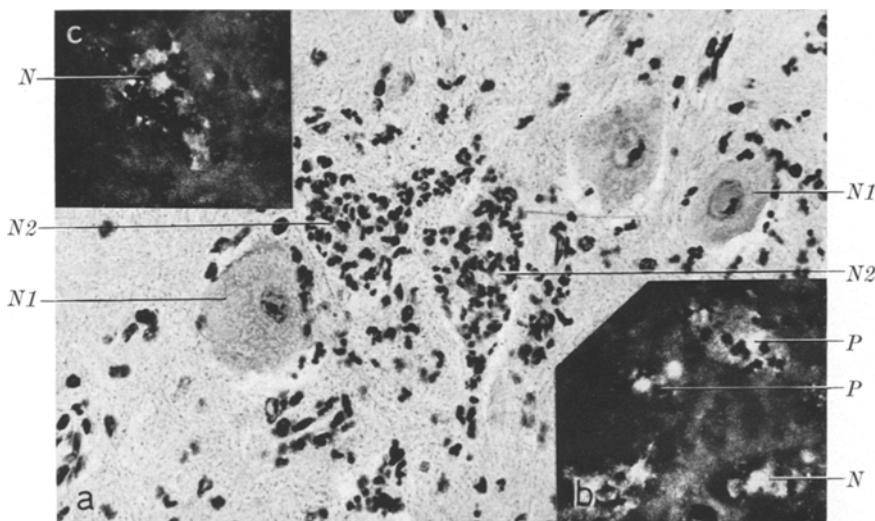


Abb. 1. a Vorderhorn der Lumbalintumescenz 12 Std nach der intraspinalen Inoculation des virulenten Poliovirus. Schwere nekrobiotische Veränderungen der Motoneurone. Beginnende (NI) und fortgeschrittene Neuronophagie (N2), an der sich hauptsächlich polymorphkernige Granulocyten beteiligen.  $350\times$ . b und c Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Die nekrobiotischen Nervenzellen (N) und ein Teil der phagocytierenden Elemente (P) weisen eine deutliche Immunfluoreszenz auf.  $280\times$

waren (Abb. 2a). Nach 24 Std war eine rasche Ausbreitung des Prozesses im Bereich der Lumbalintumescenz mit Zerstörung weiterer Nervenzellen und zunehmender ER festzustellen, wobei die polymorphkernigen Leukocyten noch überwogen, gleichzeitig aber bereits zahlreiche Makrophagen in Erscheinung traten. Außerdem waren einige kleine dunkelkernige Zellen anzutreffen, die am ehesten den kleinen Lymphocyten entsprachen. Nach 48 Std war die Mehrzahl der Nervenzellen untergegangen. In den entzündlichen Infiltraten nahmen die polymorphkernigen Granulocyten zahlenmäßig ab und die Makrophagen zu (Abb. 3a). Bei einem Tier waren perivasculär lymphoide Zellen (kleine, mittlere und große Lymphocyten) zu beobachten. Nach 72 Std waren praktisch alle Motoneurone und die Mehrzahl der anderen spinalen Nervenzellen zerstört. In der ER überwogen die Makrophagen, während die polymorphkernigen Leukocyten nur mehr spärlich anzutreffen waren. In den verbreiterten perivasculären Räumen traten zunehmend Infiltrate aus lymphoïden Zellen und Makrophagen auf.

Eine ähnliche Entwicklung war in anderen „empfindlichen“ Regionen erkennbar, nur war sie hier zeitlich verschoben. In der Cervical-

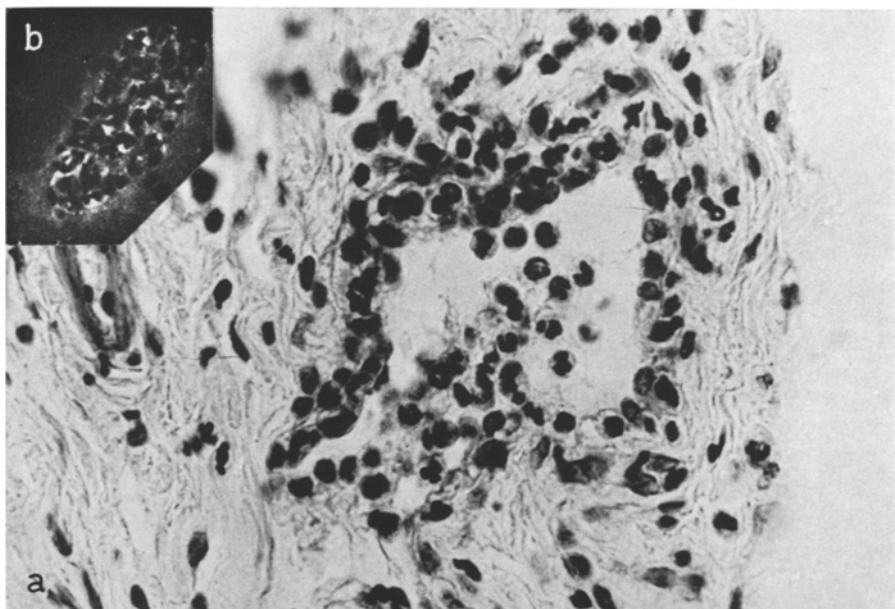


Abb. 2. a Meningeale Vene im Bereich der Lumbalintumescenz 12 Std nach der intraspinalen Inoculation des virulenten Poliovirus. Ausgeprägte entzündliche Reaktion mit polymorphkernigen Granulocyten und Makrophagen. 440×. b Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme: Ein Teil der entzündlichen Elemente zeigt eine deutliche Immunfluoreszenz. 280×

intumescenz fing der Prozeß nach 24 Std an, in der Medulla oblongata und im Mittelhirn nach 48 Std, im Thalamus und im motorischen Cortex nach 72—96 Std.

Bei der intraspinalen Inoculation des attenuierten Virus traten entzündliche Reaktionen in der Lumbalintumescenz erst nach 48—72 Std auf. Die meisten Nervenzellen waren unauffällig; einige wiesen leichtere, als reversibel zu deutende Veränderungen auf. Die entzündlichen Infiltrate bestanden aus lymphoiden Zellen und Makrophagen, die meistens perivaskulär angeordnet waren (Abb. 4a und 5). Vereinzelte polymorphkernige Granulocyten waren nur bei einem Tier zu beobachten. Nach weiteren Tagen konnte man eine Proliferation von lymphoiden Zellen und von Makrophagen feststellen. Häufig traten progressive Formen der Mikroglia, insbesondere Stäbchenzellen, in Erscheinung. Am 21. Tag waren vielfach Plasmoblasten und Plasmocyten in den perivaskulären Infiltraten erkennbar.

Nach der peripheren Verabreichung lösten nur die virulenten Polioviren deutliche morphologische Veränderungen im ZNS aus. Diese unter-

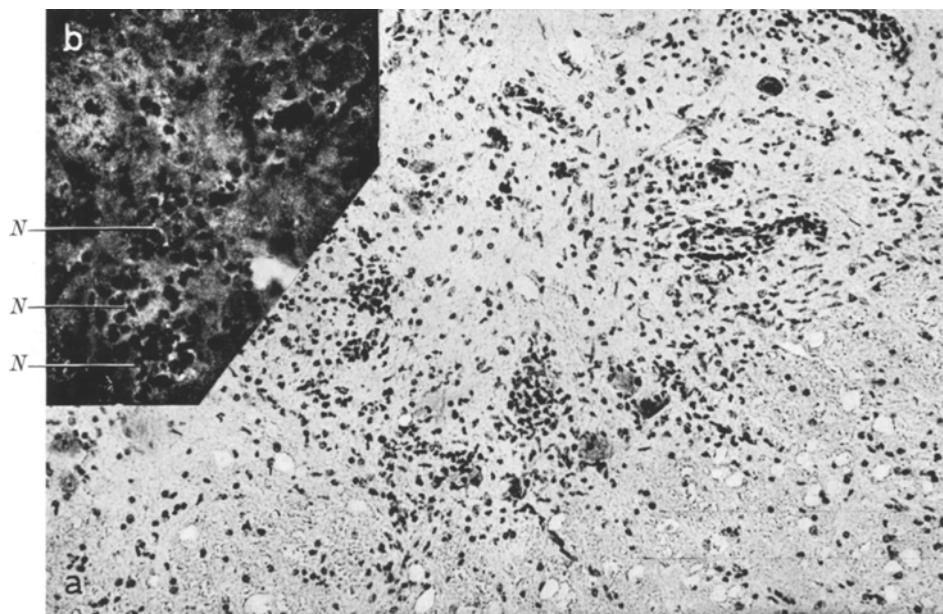


Abb. 3 a und b

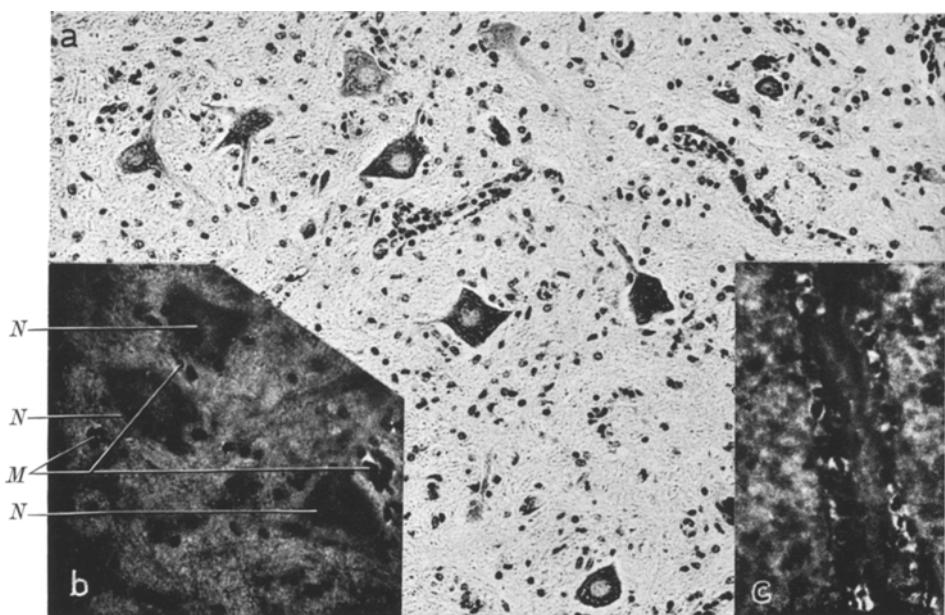


Abb. 4 a, b und c

schieden sich von denen nach der intraspinalen Inoculation hinsichtlich des Zeitpunktes ihres Auftretens, bei einigen Tieren aber auch in quantitativer Hinsicht. Qualitativ zeigte das histologische Bild stets die gleichen Merkmale. Der Prozeß war in allen „empfindlichen“ Regionen nach kurzer Zeit voll ausgeprägt. Die ersten Veränderungen, welche

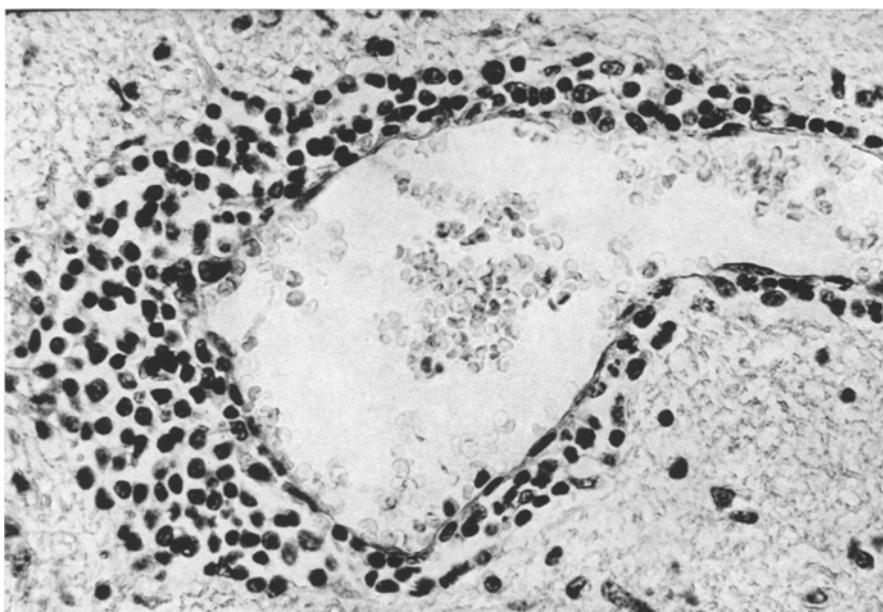


Abb.5. Lumbalintumescenz 72 Std nach der intraspinalen Inoculation des attenuierten Poliovirus. Massives perivaskuläres Infiltrat, welches vornehmlich aus lymphoiden Zellen und Makrophagen besteht.  $350\times$

Abb.3. a Vorderhorn der Lumbalintumescenz 48 Std nach der intraspinalen Inoculation des virulenten Poliovirus. Zerstörung fast aller Nervenzellen und massive entzündliche Reaktion.  $140\times$ . b Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Die Nervenzellen (*N*) zeigen keine Immunfluorescenz. Eine solche weisen dagegen die meisten entzündlichen Elementen auf.  $220\times$

Abb.4. a Vorderhorn der Lumbalintumescenz 3 Tage nach der intraspinalen Inoculation des attenuierten Poliovirus. Die Motoneurone erscheinen unauffällig. Leichte entzündliche Reaktion, an der hauptsächlich lymphoide Zellen und Makrophagen beteiligt sind.  $140\times$ . b Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Während die Nervenzellen (*N*) negativ sind, weisen einzelne mononukleäre Elemente eine Immunfluorescenz auf (*M*).  $280\times$ . c Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Perivaskuläres Infiltrat mit einigen fluoreszierenden mononukleären Zellen.  $220\times$

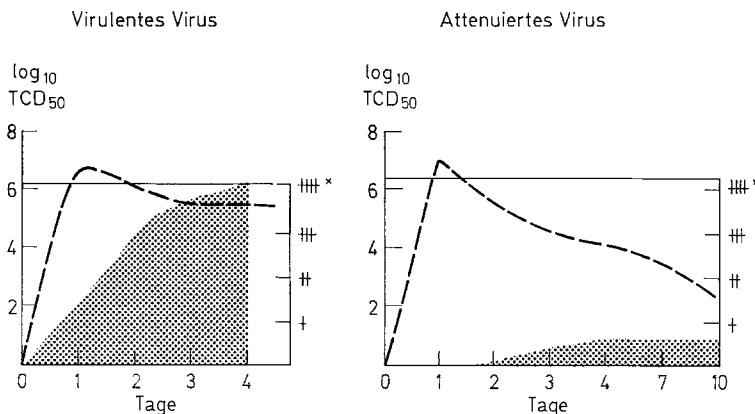


Abb. 6. Schematische Darstellung der Virusvermehrung und der Nervenzellschädigung in der Lumbalintumescenz nach der intraspinalen Inoculation von virulenten („30“, „1292 P“) und attenuierten („99/3“, „1293 B“, „127 B“) Polioviren. Die Schwere der Nervenzellschädigung wurde folgendermaßen eingestuft: + = 0–10% der Nervenzellen geschädigt; ++ = 10–25% der Nervenzellen geschädigt; +++ = 25–50% der Nervenzellen geschädigt; ++++ = 50 bis 100% der Nervenzellen geschädigt. Die waagerechte Linie entspricht der Inoculationsdosis. Die Virusvermehrung weist keine Korrelation zur Nervenzellschädigung auf

bereits am 4. Tag beobachtet werden konnten, zeigten bei den einzelnen Tieren eine unterschiedliche Lokalisation.

Die virologischen Untersuchungsergebnisse werden in einer anderen Arbeit mitgeteilt (Magrath et al., 1970). Hier seien nur die Befunde in der Lumbalintumescenz nach der intraspinalen Inoculation der virulenten sowie der attenuierten Polioviren erwähnt, da sie für die hier zu erörternden Fragen von Bedeutung sind. Bei beiden Gruppen kann man auf eine aktive Virusvermehrung schließen, weil der Titer des Virus im Nervengewebe die Inoculationsdosis übersteigt. Die Vermehrung des virulenten Virus unterscheidet sich von der des attenuierten praktisch weder in zeitlicher noch in quantitativer Hinsicht. Der höchste Titer wird schon am 1. Tag erreicht. Danach ist ein sinkender Trend festzustellen, der bei den attenuierten Viren mehr ausgeprägt ist. Eine schematische Darstellung zeigt Abb. 6.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden nur bei der dritten Gruppe der Versuchstiere durchgeführt. Dabei wurden in mononukleären Infiltratzellen (Monocyten, Histiocyten und Makrophagen) (Abb. 7) sowie in Endothelien von intraspinalen Blutgefäßen wiederholt kristallgitterartige Gefüge beobachtet. Diese bestanden aus Partikeln, die hinsichtlich ihrer Form und Größe mit dem Poliovirus

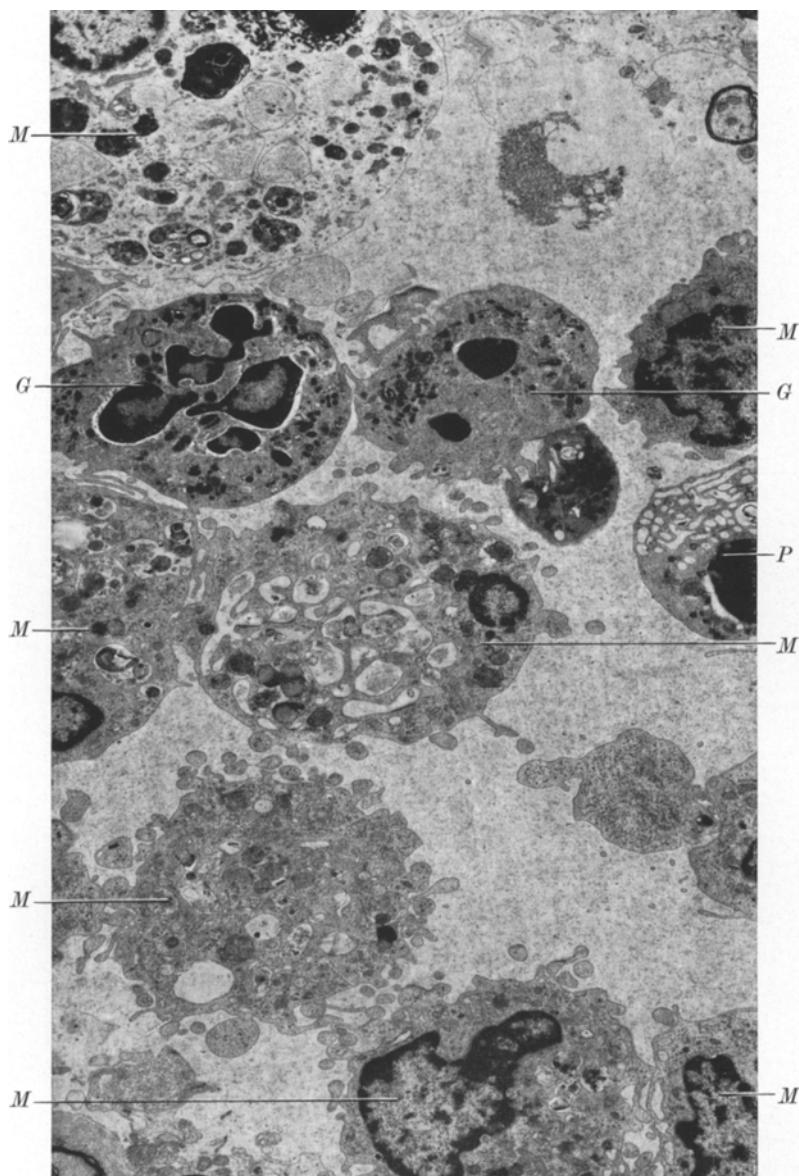


Abb. 7. Vorderhorn der Lumbalintumescenz 6 Tage nach der Inoculation des virulenten Poliovirus. Elektronenmikroskopische Aufnahme von einem völlignekrotischen und entzündlich infiltrierten Gewebsbereich. Das Infiltrat setzt sich hauptsächlich aus histiozytären Elementen bzw. Makrophagen (M) zusammen. Daneben finden sich aber auch polymorphkernige neutrophile Granulocyten (G) und Plasmazellen (P).  $5700\times$



Abb. 8. Vorderhorn der Lumbalintumescenz 6 Tage nach der Inoculation des virulenten Poliovirus. Elektronenmikroskopisches Teilbild eines Histiocytens. Im perikariellen Cytoplasma beobachtet man ein kristallgitterartiges Aggregat von Viruspartikeln (V). N Zellkern; L Lipidtropfen.  $54000\times$

übereinstimmten (Abb. 8). Die kristalloiden Aggregate fanden sich meist frei im Grundcytoplasma, vereinzelt aber auch innerhalb von ektasierten Zisternen des endoplasmatischen Reticulums vor (Blinzinger et al., 1968, 1969). In Nervenzellen konnten die kristallgitterartigen Virusansammlungen dagegen nie nachgewiesen werden. An den Neuronen war kein Befund zu erheben, der die Anwesenheit von Polioviren in ihnen evident machen würde.

### Diskussion

Bei der Betrachtung der Genese der ER gehen wir von der Definition der ER als Antwort des Gewebes auf einen Reiz aus. Eine erste Information hinsichtlich des die ER bei der Poliomyelitis auslösenden Reizes ergibt sich aus dem Vergleich der Zusammensetzung der Infiltrate nach der Infektion mit virulentem und attenuiertem Virus (Tab. 2). Während nach virulenter Infektion die polymorphkernigen Granulocyten, die in etwa 48 Std durch *Makrophagen* ersetzt werden, schon sehr frühzeitig auftreten (nach 12 Std schon deutlich ausgeprägt), sind sie nach attenuierter Infektion entweder gar nicht oder nur ausnahmsweise anzutreffen. Beide Typen der Infektion weisen dagegen Infiltrate aus *lymphoiden Zellen* und *Makrophagen* auf, die nach etwa 48—72 Std aufzutreten pflegen. Diese Tatsache läßt folgern, daß die ER aus 2 *Komponenten* besteht, nämlich einer, in der polymorphkernige Granulocyten und Makrophagen, und einer, in der lymphoide Zellen und Makrophagen dominieren. Die 2 unterschiedlichen Reaktionsformen lassen 2 *differente Reize* annehmen. Ein Reiz macht sich nur nach der virulenten Infektion, der zweite bei beiden Infektionen geltend. Die nur im virulenten Bild auftretende histologische Veränderung ist die *Nervenzellschädigung*. Bei beiden Infektionstypen nachweisbar ist die Virusvermehrung. Wenn man Nervenzellschädigung und Virusvermehrung zu den beiden Komponenten der ER in Korrelation bringt (Tab. 3), stellt man fest, daß eine fehlende Virusaktivität mit einem negativen morphologischen Befunde korreliert (stark gerahmt), die Virusvermehrung mit dem Auftreten der lymphoiden Zellen und Makrophagen verbunden ist (ungerahmt). Wenn das vermehrte Virus eine cytocide Aktivität aufweist, treten auch polymorphkernige Leukocyten und Makrophagen auf (punktiert gerahmt). Demnach ist die Voraussetzung für eine ER die *Virus-Zell-Interaktion*. Diesem Geschehen liegt die Wechselwirkung der *Virusnucleinsäure* mit dem *biochemischen Apparat der Wirtszelle* zugrunde, die 2 voneinander unabhängige Folgen haben kann, nämlich die *Synthese des proviralen Materials* und die Schädigung des *biochemischen Apparats der Wirtszelle*. Die letztere stellt sich auf der cytologischen Ebene als *cytotoxischer Effekt oder Zelltod* mit der Freisetzung von Zerfallsprodukten dar. Das virale Material und die Zerfallsprodukte

Tabelle 3. Beziehungen zwischen der Virusvermehrung, der Nervenzellschädigung und der entzündlichen Reaktion

Poliovirus	Intraspinal	Subcutan
Inaktiviert		
Nervenzellschädigung	—	Granulocyten Makrophagen Lymphoid. Z. Makrophagen
Virusvermehrung	—	— Virusvermehrung
Attuiert		
Nervenzellschädigung	—	Granulocyten Makrophagen Lymphoid. Z. Makrophagen
Virusvermehrung	+++ a +++ b	Nervenzellschädigung Virusvermehrung
Neurovirulent		
Nervenzellschädigung	+++	Granulocyten Makrophagen Lymphoid. Z. Makrophagen
Virusvermehrung	+++	— Virusvermehrung

a Abstufung der Intensität der ER wie in Tab. 4.

b Die Virusvermehrung +++ entspricht einem Titer von  $10^{-5}$  TCD<sub>50</sub> oder einem höheren.

stellen unseres Erachtens die eigentlichen Reize für die Entwicklung der ER dar, wobei die Zerfallsprodukte als *körpereigenes* und das provirale Material als *körperfremdes* Material empfunden werden. Es liegt nahe, daß diese qualitativ unterschiedlichen Produkte verschiedene Mechanismen auslösen, was sich auch im morphologischen Bild manifestiert. Die Zerfallsprodukte rufen die *sekundäre, unspezifische* Entzündung hervor, wie es schon in früheren Arbeiten angenommen worden ist (Pette et al., 1932; Bodian, 1948, 1952a und b, 1955, 1957; Sabin, 1956). Typisch für diese Reaktion ist unserer Meinung nach das frühe Auftreten von phagocytierenden Elementen (Granulocyten, Makrophagen, Mikrogliazellen). Diese häufen sich um die nekrotischen Nervenzellen an oder dringen in diese ein (Neuronophagie, Abb. 1 und 3). Ihre Funktion ist es, die Trümmer der zerstörten Neurone bzw. deren Zerfallsprodukte aufzunehmen, abzubauen oder abzutransportieren. Die Bezeichnung *resorptive ER* ist daher berechtigt.

Andere Mechanismen werden durch das *virale Material* in Gang gesetzt. Dieses setzt sich aus den reifen, den defekten bzw. inkompletten und den inaktivierten Viruspartikeln sowie den Virusuntereinheiten zusammen. Weil dieses Material z. T. *antigene Eigenschaften* besitzt, löst es eine Reihe von Mechanismen aus, deren Komplex als *Immunreaktion* bezeichnet wird. Eine solche Immunreaktion kann durch die Bildung von Immunzellen oder von Immunglobulinen gekennzeichnet sein.

Bei der Poliomyelitis bestehen für die Bildung von *Immunzellen* mit der Erscheinung der Hypersensibilität des Spättyps, wie sie z. B. bei den Myxovirusinfektionen beschrieben worden ist (Speel et al., 1968), keine Anhaltspunkte. Das hängt wahrscheinlich mit der Struktur des viralen Antigens und den daraus folgenden Mechanismen der Virusreplikation zusammen.

Die *Bildung humoraler Antikörper* setzt rasch ein. Mit empfindlichen serologischen Methoden wurden die IgM-Globuline bei einer Primärantwort nach 6—24 Std, die IgG-Globuline nach 1,5—2 Tagen gefunden (Svehag et al., 1964) Auch bei unseren Versuchen konnten wir humorale Antikörper nachweisen. Die Immunglobulinbildung als eine immunologische Antwort auf das virale Antigen ist bei der Poliomyelitis ein unbestrittenes Phänomen. Es erhebt sich aber die Frage, ob sich im ZNS eine *lokale Immunreaktion* entfalten kann, die morphologisch in Form von Infiltraten aus lymphoiden Zellen mit beigemischten Makrophagen in Erscheinung tritt. Für eine lokale Immunreaktion spricht die Zusammensetzung der meist perivaskulär angeordneten Infiltrate aus Makrophagen und Zellen der lymphocytär-plasmacellulären Reihe. Die letzteren, die zu den Immunocyten gehören, sind in verschiedenen Entwicklungsstadien anzutreffen, wie man sie gleichzeitig in den Lymphknoten und in der Milz beobachten kann. Nach der Methylgrün-Pyroninfärbung sind sowohl in den lymphatischen Geweben als auch in den

entzündlichen Infiltraten innerhalb des ZNS zahlreiche pyroninophile Zellen nachweisbar (Simon et al., 1970). Diese haben bekanntlich einen erhöhten RNS-Gehalt im Cytoplasma, was für eine gesteigerte Proteinsynthese spricht. Da bei den immunhistochemischen Untersuchungen nach der Anwendung von markiertem Antirhesus-Globulin eine deutliche Fluorescenz in einzelnen lymphoiden Elementen zu erkennen war, dürfte die gesteigerte Proteinsynthese zumindest teilweise mit einer Immunoglobulinbildung im Zusammenhang stehen.

Voraussetzung für eine örtliche Immunreaktion ist die in bezug auf Quantität und Dauer überschwellig werdende lokale Synthese des viralen Antigens. Dafür sprechen die negativen Befunde nach der intraspinalen Verabreichung des inaktivierten Poliovirus, das, obwohl es gut definierbare antigene Eigenschaften besitzt, keine lokale Immunantwort auslöst. Für den *Abbau und Abtransport dieses inaktiven Materials sorgen offensichtlich die bereits vorhandenen, ortsständigen Zellen*. In gleicher Weise kommt es nach der subcutanen Inoculation des attenuierten Virus zu keiner nachweisbaren lokalen Vermehrung des Virus im ZNS, so daß die ER ausbleibt. Aber auch das virulente, subcutan inoculierte Virus löst nicht immer eine ER aus, auch wenn das virale Antigen in den Zellen des Nervengewebes immunhistochemisch nachweisbar ist. Darauf weisen die Befunde der *solitären Fluorescenz* (2. Gruppe der Befunde) hin, die unseres Erachtens auf zweierlei Weise interpretiert werden können. Frühzeitige Befunde in den für das Ausbreitungsmuster der Poliomyelitis typischen Bereichen sind als Anfangsstadium des infektiösen Prozesses anzusehen. Für die Fluorescenz der nichtneuronalen Zellen in atypischen Bereichen, z. B. im occipitalen oder frontalen Cortex, wo auch später keine ER vorkommt, bietet sich eine andere Erklärung an: das ins Nervengewebe eingedrungene Virus kann nur mit nichtneuronalen Zellen reagieren, weil die Nervenzellen hier unempfindlich sind. Die bekannte Unempfindlichkeit bestimmter Nervenzelltypen gegenüber dem Poliovirus ist nach Holland (1961) auf das ungeeignete Receptorsystem derselben zurückzuführen. Allein aufgrund der fluorescenzmikroskopischen Befunde kann nicht entschieden werden, ob es bei den mit Viren reagierenden Zellen nur zu einer Viropexis gekommen ist, oder ob das Virus in ihnen auch vermehrt wird (s. S. 321). Jedenfalls weist das Fehlen von lichtmikroskopisch erfaßbaren Gewebsveränderungen darauf hin, daß der Reiz unterschwellig geblieben ist. Der Prozeß wird in einem morphologisch inapparenten Stadium gestoppt.

Die Funktion der primären ER ist es, die Ausdehnung des infektiösen Prozesses zu verhindern. Durch die Produktion von *Immunoglobulinen* wird die Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle blockiert und der Infektionsherd erlischt. Es ist daher erlaubt, von einer *spezifischen defensiven ER* zu sprechen.

Die bisher besprochenen Funktionen der ER, die *resorptive und die defensive*, sind letzten Endes auf die Wiederherstellung der durch das Virus gestörten Homeostasis gerichtet und können als *protektiv* bezeichnet werden. Bei dem vollentwickelten Prozeß stellen die Zellen der *sekundären* und der *primären* ER eine bunte Zellpopulation dar. Im Vergleich zu normalen Verhältnissen nimmt durch sie die Zellzahl und damit auch die Zelldichte im zentralnervösen Gewebe erheblich zu. Da nun jedes einzelne entzündliche Element den für eine Nucleinsäure- und Proteinsynthese erforderlichen biochemischen Apparat besitzt, dürfte die Kapazität eines entzündlich veränderten Gewebes für die Neubildung dieser Substanzen pro Volumeneinheit beträchtlich erhöht sein. Dieser Umstand kann für die wirksame Abwehr einer viralen Infektion sehr günstig sein, wenn die auf engstem Raum erfolgende Zunahme der cellulären Syntheseleistungen in den Dienst der protektiven Funktion (Bildung von Immunglobulinen, Interferon etc.) gestellt wird. Er kann aber ebenso ungünstig, ja sogar gefährlich werden, wenn ein Virus imstande ist, eine vornehmlich aus mesenchymalen Elementen bestehende Zellpopulation für seine Replikation zu benützen. Daß das Poliovirus dies vermag, lassen unsere immunhistochemischen, elektronenmikroskopischen und virologischen Befunde vermuten. Die deutliche *Fluorescenz* in zahlreichen *mesenchymalen Zellen*, insbesondere in entzündlichen Elementen, läßt folgern, daß die Beziehungen des viralen Antigens zu den nichtneuronalen Zellen häufiger und ausgeprägter sind als zu den Nervenzellen. Für die Fluorescenz in den nichtneuronalen Elementen gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten der Interpretation; sie kann nämlich grundsätzlich auf einer *Endocytose* des viralen Antigens oder auf einer aktiven *Vermehrung* desselben beruhen.

Um die Möglichkeit zu überprüfen, ob sich markiertes Material nach seiner Aufnahme durch Zellen in Form einer Fluorescenz nachweisen läßt, haben wir mit FITC gekoppeltes Rinder- $\gamma$ -Globulin (0,1 ml) 2 Affen intraspinal inoculiert, die Tiere nach 48 Std getötet und untersucht. In zahlreichen mononukleären Zellen in der Umgebung des Stichkanals war eine deutliche Fluorescenz zu sehen (Abb. 9).

Zu analogen Ergebnissen sind Goodman u. Koprowski (1962a) bei *in vitro* Versuchen gekommen. Das infektiöse West Nile-Virus vermehrte sich in Peritonealmakrophagen, was sich als eine Fluorescenz im Cytoplasma derselben manifestierte. Eine ähnliche Fluorescenz war aber auch dann zu finden, wenn ein durch UV-Bestrahlung oder durch Hydroxylamin inaktiviertes Virus angewandt wurde, das von den Makrophagen aufgenommen worden war. Diese Beobachtungen bestätigen, daß auch *pinocytiertes bzw. phagocytiertes Material*, darunter Viruspartikel, eine *Fluorescenz* in den Zellen hervorzurufen vermag. Das pinocytierte bzw. phagocytierte Material kann von den Zellen auf verschiedene Weise

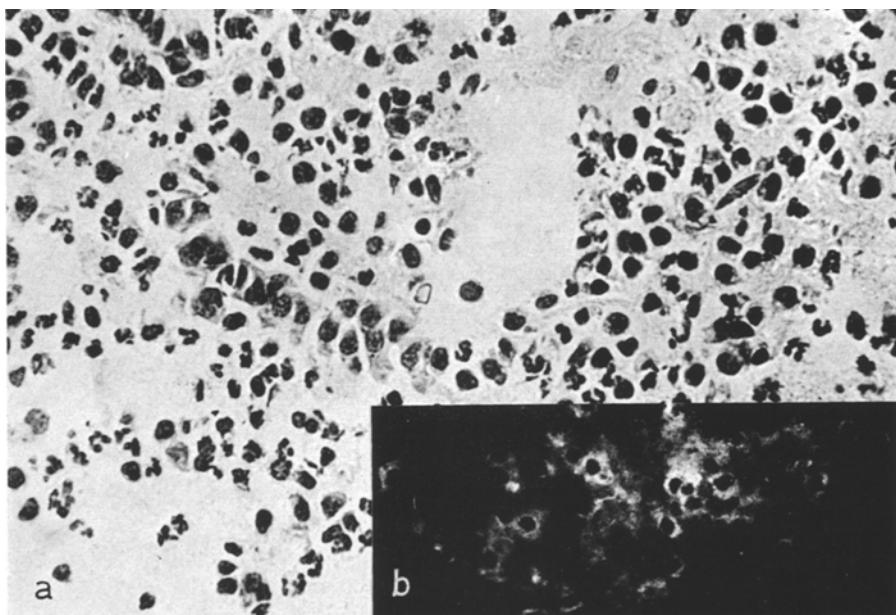


Abb. 9. a Lumbarintumescenz 48 Std nach der intraspinalen Inoculation von markiertem  $\gamma$ -Globulin des Rindes. Peritraumatische Reaktion mit polymorphkernigen Granulocyten und Makrophagen. 440 $\times$ . b Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Deutliche Fluoreszenz in zahlreichen entzündlichen Elementen. 280 $\times$

behandelt werden. Das infektiöse Virus kann aufgenommen werden, ohne inaktiviert und abgebaut zu werden. Solch ein Vorgang kann bei den kurzlebigen polymorphkernigen Granulocyten angenommen werden (Gresser u. Lang, 1966). Köhler (1960a und b) sowie Köhler u. Springer (1962) isolierten infektiöses Poliovirus aus den Leukocyten von spontan erkrankten Menschen und von experimentell infizierten Tieren. Die *Phagocyten* spielen in diesem Falle die pathogenetisch wichtige *Rolle des Trägers* (s. S. 322). Welche der phagocytierenden Zellen die virucide Aktivität gegenüber dem infektiösen Virus entfalten und wie wirksam diese Aktivität ist, können wir nicht entscheiden. Man muß sich aber vor Augen halten, daß die infektiösen Partikel nur einen geringen Teil des viralen Materials bilden. Das sonstige Material (defekte, inkomplette und inaktivierte Partikel) wird nach der Endocytose wahrscheinlich als Antigen verarbeitet.

Für die Annahme einer *Virusvermehrung* in den fluoreszierenden entzündlichen Elementen lassen sich folgende Argumente anführen: die elektronenmikroskopischen Beobachtungen von kristallgitterartigen Virusaggregaten im Grundcytoplasma und im endoplasmatischen Reticulum von Endothelien und mononukleären Zellen (Mannweiler et al., 1961; Bodian, 1964; Blinzingier et al., 1968, 1969) sind als Hinweis auf eine lebhafte Virusvermehrung in diesen Elementen zu werten. Ähnliche Befunde sind von Nelson et al. (1964) bei der MM-Polioencephalitis der Maus, von Kantoch et al. (1959) bei Coxsackie A-Infektion und von Koestner et al. (1966) bei der Schweine-Poliomyelitis beschrieben worden. Eine wichtige Unterstützung für unsere Annahme bieten auch die *virologischen Befunde* in der lumbalen Intumescenz 24 Std nach der intraspinalen Inoculation des virulenten und attenuierten Poliovirus (Abb. 6). Bei beiden Gruppen wurde eine *gleichzeitige aktive Virusvermehrung* festgestellt, die beim *virulenten Virus* mit einer schweren Schädigung oder Zerstörung der Neurone, beim *attenuierten Virus* aber ohne eine nachweisbare histologische Nervenzellschädigung einhergeht. Aus diesen Befunden läßt sich folgern, daß das Virus überwiegend in den *nichtneuronalen Zellen* repliziert wurde. Die potentielle Fähigkeit bestimmter Entzündungszellen zur Virusvermehrung und die enorme Zahl dieser Elemente in einem poliomyelitischen Herd sprechen dafür, daß sie wichtige *Produzenten des Virus* darstellen. Neben dem schon besprochenen protektiven Effekt der ER kann man demnach aufgrund histochemischer, elektronenmikroskopischer und virologischer Befunde auch einen *aggressiven Effekt* unterstellen. Dieser erscheint als eine Folge der *Aberration* des Metabolismus der infizierten Zellen, die von dem *viralen Genom* induziert wird.

Bei der virulenten Infektion ist eine *Fluoreszenz* nur in 30—60% der *Nervenzellen* zu erkennen. Beim attenuierten Bild ist eine Fluoreszenz nur in Ausnahmefällen anzutreffen. Diese Befunde lassen vermuten, daß die Virus-Nervenzell-Interaktion, je nach den Eigenschaften des Virus und der Nervenzelle, auf zweierlei Weise verläuft. Das *virulente Virus* dringt in die empfindliche Nervenzelle ein. Durch eine *cytotoxische Wirkung* führt es die rasche Zerstörung der metabolisch hochspezialisierten Nervenzelle herbei, so daß die *Virusvermehrung gering* ist oder ganz unterbleibt. Das attenuierte Virus ist meistens nicht imstande, mit den Nervenzellen zu reagieren, was nach Holland (1961) u. a. auf einen Mangel an geeigneten Rezeptoren zurückzuführen ist.

Die *Nervenzellen* scheinen demnach *keine bedeutenden Virusproduzenten* bei der Poliomyelitis zu sein. Diese Annahme wird durch virologische Befunde gestützt. Auch die Elektronenmikroskopie erbringt keine Hinweise für eine lebhafte Virusvermehrung in den Nervenzellen (Bodian, 1964; Blinzingier et al., 1968, 1969).

Zusammenfassend sollen alle bisher diskutierten Mechanismen in den *gesamten Ablauf des poliomyelitischen Prozesses* eingeordnet und somit die Bedeutung der ER für die Polioinfektion im ZNS dargelegt werden. Der Anschaulichkeit wegen vergleichen wir den Prozeß mit einer „*Epidemie*“ in der Zellpopulation. Am Anfang der „*Epidemie*“ steht der *Befall der Nervenzelle* durch das virulente Virus. Die cytocide Wirkung des Virus führt zu einer raschen Zerstörung der Nervenzelle. Infolgedessen ist die Virusvermehrung in ihr gering, bzw. der Vermehrungscyclus wird unterbrochen, so daß nur wenig und vielleicht sogar nur *inkomplettes Material* freigesetzt wird. Die *Zerfallsprodukte* und das *provirale Material* lösen die Mechanismen der *resorptiven und der defensiven Entzündung* aus. Die *entzündlichen Elemente* bilden eine *neue Zellpopulation*, die durch Leukodiapedese und lebhafte Proliferation rasch anwächst. Hierdurch entsteht eine gefährliche „*epidemiologische Situation*“. Der Ausbruch der „*Epidemie*“ kann durch die Neuronophagie ausgelöst werden, bei der die Phagocyten nicht nur die Trümmer der nekrotischen Nervenzellen, sondern wohl vielfach auch die aus den letzteren freigesetzten Viruspartikel aufnehmen. Diesen Vorgang kann man im Fluoreszenzbild verfolgen. Die beschädigte, schwach fluoreszierende Nervenzelle ist von nichtfluoreszierenden Granulocyten oder Makrophagen umgeben. In weiteren Stadien der Neuronophagie erscheint auch eine Fluoreszenz im Cytoplasma der eingedrungenen Phagocyten. Die mit Viren beladenen Phagocyten dienen als „*Vektor*“ des Virus und sorgen für seine schnelle Ausbreitung. Wichtig ist dabei, daß das aufgenommene Virus bis zum Zerfall seines Trägers vor der Wirkung humoraler Faktoren (Interferon, Antikörper) geschützt wird. In den „*empfindlichen*“ Phagocyten besteht die Möglichkeit der Virusvermehrung. Nach dem Zerfall der Virusträger oder -produzenten können die freigesetzten Viruspartikel auf weitere Zellen übergreifen. Die Bedingungen dafür sind in der dichten, teilweise beweglichen Zellpopulation mit zahlreichen „*empfindlichen*“ Zellen sehr günstig; alle Voraussetzungen für eine rasche „*epidemische*“ Ausbreitung des Prozesses sind gegeben. Die Chance des Befalls für die Nervenzellen sowie für andere „*empfindliche*“ Zellen scheint etwa gleich. Während die mesenchymalen Zellen für die Virusproduktion sorgen, locken die beschädigten Nervenzellen weitere entzündliche Elemente an. So kann sich ein Circulus vitiosus entwickeln. Parallel zu diesem Vorgang laufen die *protektiven Mechanismen* mit der Synthese verschiedener Stoffe, die unspezifisch (Interferon) oder spezifisch (Immunoglobuline) das Virus inaktivieren. Außerdem machen sich noch andere unspezifische Faktoren, wie erhöhte Temperatur, lokale Hyperacidose, Hypoxie, Zerfallsprodukte, die das Virus binden, u. a. geltend. Der Ablauf der Infektion hängt davon ab, wieviel Viruspartikel dem Abwehrmechanismus entgehen und eine

Replication neuer Viren induzieren, anders ausgedrückt, wieviel Partikel durch celluläre (Endocytose) und humorale Mechanismen (Interferon, Immunglobuline usw.) liquidiert werden und wieviel durch „empfindliche“ Zellen vermehrt werden. Die Frage nach den entscheidenden Faktoren, die zweifellos mit den Eigenschaften des Virus sowie dem Zustand des Organismus zusammenhängen, muß einstweilen noch offenbleiben. Es ist nicht ausgeschlossen, daß allein die Unempfindlichkeit der Zellen des RES und des lymphatischen Systems, also auch der entzündlichen Elemente, für die Resistenz des ganzen Organismus maßgebend ist. Darauf weisen die Beobachtungen von Mims beim Ectromelie-Virus (1964), von Gallily et al. (1964) beim Maus-Hepatitis-Virus, von Theis u. Koprowski (1961) sowie Goodman u. Koprowski (1962) beim West Nile-Virus hin.

Die Beobachtung der engen Beziehungen vieler Viren zu den mesenchymalen Zellen des RES und des lymphatischen Systems (Gresser et al., 1966) läßt annehmen, daß die vom Virus induzierte Umwandlung der protektiven Funktionen der ER in aggressive Funktionen eine wichtige pathogenetische Rolle auch bei anderen viralen Infektionen spielt. Dies ist besonders bei denjenigen Viren zu erwarten, welche ein Organ als Eintrittspforte benutzen und über den Blutweg ein anderes Organ als sogenanntes Zielorgan befallen. Bei diesem Infektionsweg geraten nämlich die Viruspartikel in einen wiederholten Kontakt zu den mesenchymalen Zellen des Abwehrsystems. Die Art und Weise der Reaktion des letzteren könnte entscheiden, ob das Zielorgan erreicht wird oder nicht.

### Literatur

- Barski, G.: Multiplication of poliovirus in RES cells without generalized cytopathogenic effect. *Science* **125**, 448 (1957).
- Berg, R. B.: Multiplication of Echo 9 virus in suspensions of human leucocytes. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **108**, 742–744 (1961).
- Rosenthal, M. S.: Propagation of measles virus in suspensions of human and monkey leukocytes. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **106**, 581–585 (1961).
- Blinzinger, K., Simon, J., Magrath, D., Boulger, L.: Elektronenmikroskopische Beobachtungen bei experimenteller Poliomyelitis. *Experientia (Basel)* **24**, 1095–1096 (1968).
- — — Poliovirus crystals within the endoplasmic reticulum of endothelial and mononuclear cells in the monkey spinal cord. *Science* **163**, 1336–1337 (1969).
- Bodian, D.: The virus, the nerve cell and paralysis: a study of experimental poliomyelitis in the spinal cord. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **83**, 1–107 (1948).
- A reconsideration of the pathogenesis of poliomyelitis. *Amer. J. Hyg.* **55**, 414–438 (1952a).
- Pathogenesis of poliomyelitis. *Amer. J. Publ. Hlth* **42**, 1388–1402 (1952b).

- Bodian, D.: Emerging concept of poliomyelitis infection. *Science* **122**, 105–108 (1955).
- Mechanism of infection with polioviruses. In: *Cellular biology of nucleic acids and viruses. Spec. Publ. N. Y. Acad. Sci.* **5**, 57–73 (1957).
- An electron-microscopic study of the monkey spinal cord. *Bull. Johns Hopkins* **1**, 13–119 (1964).
- Franklin, R. M.: The growth of fowl plague virus in tissue cultures of chicken macrophages and giant cells. *Virology* **6**, 81–95 (1958).
- Gallily, G., Warwick, A., Bang, F. B.: Effect of cortisone on genetic resistance to mouse hepatitis virus in vivo and in vitro. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **51**, 1158–1164 (1964).
- Goodman, G. T., Koprowski, H.: Macrophages as a cellular expression of inherited natural resistance. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **48**, 160–165 (1962a).
- — Study of the mechanism of innate resistance to virus infection. *J. cell. comp. Physiol.* **59**, 333–373 (1962b).
- Gresser, I., Lang, D. J.: Relationships between viruses and leucocytes. *Progr. med. Virology* **8**, 62–130 (1966).
- Holland, J. J.: Receptor affinities as major determinants of enterovirus tissue tropisms in humans. *Virology* **15**, 312–326 (1961).
- Huxley, H. E., Zubay, G.: Preferential staining of nucleic acid-containing structures for electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **11**, 273–295 (1961).
- Johnson, R. T.: The pathogenesis of herpes virus encephalitis. II. A cellular basis for the development of resistance with age. *J. exp. Med.* **120**, 359–374 (1964).
- Kanamitsu, M., Kasamaki, A., Ogawa, M.: Immunofluorescent study on the pathogenesis of oral infection of poliomyelitis in monkeys. *Jap. J. med. Sci. Biol.* **20**, 175–194 (1967).
- Kantoch, M., Zapf, K.: Electronmicroscopic studies on the localisation of Coxsackie viruses in leucocytes. *Arch. Immunol. Ter. dośw.* **7**, 607–613 (1959).
- Koestner, A., Kasza, L., Holman, J. E.: Electronmicroscopic evaluation of the pathogenesis of porcine polioencephalitis. *Amer. J. Path.* **2**, 325–337 (1966).
- Köhler, H.: Die Rolle der Leukozyten als Virusträger. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **180**, 140–144 (1960a).
- Neue Wege bei der Isolierung des Poliomyelitis-Virus aus dem Blut an Kinderlähmung erkrankter Menschen. *Zbl. Bakt., I. Abt.* **180**, 145–146 (1960b).
- Springer, D.: Isolierung von phagozytiertem Virus aus Leukozyten infizierter Tiere. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **186**, 287–291 (1962).
- Környey, St.: Akute, nichtspezifische, nichtteitlige entzündliche Krankheiten des Gehirns u. Rückenmarks beim Menschen. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **36**, 96–184 (1943).
- Kovacs, E., Baratawidjaja, R. K., Hamvas, J. K., Morrissey, L., Labzofsky, N.: Direct visualization of fluorescent labelled poliovirus in cells. *Life Sci.* **2**, 902 to 909 (1963a).
- — Labzofsky, N. A.: Visualisation of poliovirus type 3 in paraffin sections of monkey spinal cord by indirect immuno-fluorescence. *Nature (Lond.)* **2**, 497–498 (1963b).
- Luft, J. H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. biophys. biochem. Cytol.* **9**, 409–414 (1961).
- Magrath, D. I., Boulger, L. R., Simon, J.: The growth and spread of type 3 poliovirus of differing neurovirulence after injection into lumbar region of the spinal cord of cynomolgus monkeys. (Im Druck.)

- Mannweiler, Kl., Palacios, O.: Ultrastrukturelle Veränderungen am ZNS von Rhesusaffen nach Infektion mit Poliomyelitis-Virus. *Z. Naturforsch.* **16b**, 705 (1961).
- Mims, C. A.: Aspects of the pathogenesis of virus diseases. *Bact. Rev.* **28**, 30—71 (1964).
- Nelson, E., Hager, H., Kovacs, E.: Intracytoplasmic virus crystal formation and other alterations in polymorphonuclear leucocytes in mouse polioencephalitis (M. M. strain). *Amer. J. Path.* **44**, 29—51 (1964).
- Palacios, O., Mannweiler, Kl.: Virological and immunological studies on experimental polio-infection in rhesus monkeys. VIII. *Europ. Symp. of Poliomyelitis*, pp. 462—464 (1963).
- Palade, G. E.: A study of fixation for electron microscopy. *J. exp. Med.* **95**, 285—298 (1952).
- Peters, G., Unterharnscheidt, F.: Zur Neuropathologie der Poliomyelitis des Menschen, unter besonderer Berücksichtigung des „encephalitischen Symptomenkomplexes“ und der Spezifität histologischer Läsionen. In: *Symp. Ser. in Immunobiol. Standard*. Vol. 2, pp. 19—30. Basel-New York: Karger 1967.
- Pette, H.: Wandlung epidemiologischer und pathogenetischer Gedankengänge bei der Poliomyelitis. *Klin. Wschr.* **27**, 321—330 (1949).
- Demme, H., Környey, St.: Studium über experimentelle Poliomyelitis. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **128**, 125—252 (1932).
- Rewcastle, N. B.: Glutaric acid dialdehyde; a routine fixative for central nervous system electronmicroscopy. *Nature (Lond.)* **205**, 207—208 (1965).
- Reynolds, E. S.: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electronmicroscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208—212 (1963).
- Roberts, J. A.: Histopathogenesis of mousepox. I. Respiratory infection. *Brit. J. exp. Path.* **43**, 451—461 (1962a).
- Histopathogenesis of mousepox. II. Cutaneous infection. *Brit. J. exp. Path.* **43**, 462—468 (1962b).
- Roberts, K. B.: The localisation of antigens and the sites of antibody formation. In: H. Florey: *Lectures on general Pathology*, pp. 328—346. London: Lloyd-Luke (Medical Books) 1945.
- Sabin, A. B.: Pathogenesis of poliomyelitis. *Science* **123**, 1151—1157 (1956).
- Simon, J.: Poliomyelitis; klinische und experimentelle Studie. Thomayer's Sammlung: Prag: Zdrav. Naklad. 1962.
- Neurovirulence for monkeys of Sabin's type 1 poliovirus passed through human intestines as compared with attenuated and virulent poliovirus strains. *J. Hyg. Epidem. (Praha)* **8**, 506—523 (1965a).
- Properties of a new type 3 attenuated poliovirus. II. Neurovirulence tests on monkeys. *Arch. ges. Virusforsch.* **15**, 220—233 (1965b).
- Pathology of poliomyelitis in monkeys. In: *Symp. Ser. in Immunobiol. Standardization*, Vol. 2, pp. 31—38. Basel-New York: Karger 1967.
- Peters, G., Blinzingger, K., Magrath, D., Boulger, L.: Neue Gesichtspunkte zur Pathogenese der Poliomyelitis. (Im Druck) (1970).
- Unterharnscheidt, F., Bonin, O., Günther, O., Schmidt, K., Schmidt, I.: The properties of a new attenuated type 3 poliovirus. VII. Double comparison of neurotropic properties of USOL-D bac and Sabin's type 1 attenuated poliovirus (LSC a b): *Arch. ges. Virusforsch.* **3**, 363—369 (1966a).
- Vonka, V., Janda, Z.: The properties of attenuated type 3 poliovirus USOL-D bac. The results of neurovirulence test in monkeys. *Boll. Ist. sieroter. milan.* **45**, 62—66 (1966b).

- Spatz, H.: Bumkes Handbuch der Geisteskrankheiten, Bd. XI, S. 157—172. Berlin: Springer 1930.
- Speel, L. F., Osborn, J. E., Walker, D. L.: An immuno-cytopathogenic interaction between sensitized leucocytes and epithelial cells carrying a persistent noncytoidal myxovirus infection. *J. Immunol.* **3**, 409—417 (1968).
- Spielmeyer, W.: Histopathologie des Nervensystems, S. 406—455. Berlin: Springer 1922.
- Svehag, S., Mandel, B.: The formation and properties of poliovirusneutralizing antibody. II. 19 S and 7 S antibody formation: Differences in antigen dose requirement for sustained synthesis, anamnesis and sensitivity to X-irradiation. *J. exp. Med.* **119**, 21—39 (1964).
- Theis, G., Koprowski, H.: A cellular basis for virus resistance. *Fed. Proc.* **20**, 265 (1961).

Dr. J. Simon  
Max-Planck-Institut für Psychiatrie  
D-8000 München 23, Kraepelinstraße 2