

**Aus der
Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl. Ing. V. Jansson**

**EINFLUSS VON P-SELEKTIN UND GPIIB/IIIA
AUF DIE SYNOVIALE MIKROZIRKULATION BEI DER
ANTIGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS**

-

EINE IN VIVO ANALYSE AN DER MAUS

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Philip Manuel Metz**

aus Essen

2006

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Dipl. Ing. V. Jansson

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. A. Schober
Priv. Doz. Dr. U. Wintergerst

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. M. Schmitt-Sody

Dekan: Herr Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2006

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Rheumatoide Arthritis (RA)	1
1.2	Thrombozyten	3
1.3	Adhäsionsmoleküle	8
1.3.1	P-Selektin	10
1.3.2	GPIIb/IIIa	13
2	ZIEL DER STUDIE	15
3	MATERIAL UND METHODEN	16
3.1	Anmerkung	16
3.2	Das Modell	16
3.2.1	Grundlagen	16
3.2.1.1	Versuchstiere	17
3.2.1.2	Arthritisinduktion und Untersuchungszeitpunkte	17
3.2.1.3	Klinische Erscheinung	18
3.2.1.4	Kniegelenksdurchmesser	19
3.2.1.5	Histologische Auswertung	19
3.2.2	Operationen	20
3.2.2.1	Narkosen	20
3.2.2.2	Versuchsaufbau	20
3.2.2.3	Chirurgische Präparation	21
3.2.3	Fluoreszenzmarkierung der Zellen	23
3.2.3.1	Kardiale Punktion und Thrombozytenmarkierung	23
3.2.3.2	Leukozytenfärbung	24
3.2.3.3	Plasmafärbung	25
3.2.4	Intravitalmikroskopie	26
3.2.5	Mikrozirkulatorische Parameter	27
3.2.5.1	Venolendurchmesser	27
3.2.5.2	Erythrozytenfließgeschwindigkeit	27
3.2.5.3	Funktionelle Kapillardichte	27
3.2.5.4	Rollen und Adhärenz der markierten Zellen	27
3.3	Abschnitt 1: Einfluß von thrombozytären bzw. endothelialen P-Selektin auf die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	29
3.3.1	Ziele	29
3.3.2	Versuchsdurchführung	29
3.3.2.1	Versuchsgruppen	29
3.3.2.2	Versuchsprotokoll	31
3.3.2.3	Versuchsablauf	32
3.4	Abschnitt 2: Die Rolle von GPIIb/IIIa für die Thrombozyten und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	33

3.4.1	Tirofiban.....	33
3.4.2	Ziele	34
3.4.3	Versuchsdurchführung	35
3.4.3.1	Versuchsgruppen.....	35
3.4.3.2	Versuchsprotokoll	37
3.4.3.3	Versuchsablauf.....	38
4	STATISTIK.....	39
5	ERGEBNISSE	40
5.1	Abschnitt 1: Einfluß von thrombozytären bzw. endothelialen P-Selektin auf die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	40
5.1.1	Arthritisinduktion.....	40
5.1.1.1	Spontanverhalten.....	40
5.1.1.2	Kniegelenksdurchmesser.....	41
5.1.1.3	Körpergewicht.....	41
5.1.1.4	Histologie	41
5.1.2	Intraoperative Parameter	42
5.1.3	Hämodynamik und Mikromorphologie.....	43
5.1.4	Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion	44
5.1.5	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	46
5.2	Abschnitt 2: Die Rolle von GPIIb/IIIa für die Thrombozyten und Leukozyten Endothelzell-Interaktion	48
5.2.1	Arthritisinduktion.....	48
5.2.1.1	Spontanverhalten.....	48
5.2.1.2	Kniegelenksdurchmesser.....	49
5.2.1.3	Körpergewicht.....	49
5.2.1.4	Histologie	50
5.2.2	Intraoperative Parameter	50
5.2.3	Hämodynamik und Mikromorphologie.....	51
5.2.4	Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion	52
5.2.5	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	53
6	KRITISCHE DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE	56
6.1	Stand der Forschung.....	56
6.2	Zielsetzung	58
6.3	Das Modell	60
6.3.1	Die Antigen-induzierte Arthritis der Maus.....	60
6.3.2	Die chirurgische Präparation.....	61
6.3.3	Die Intravitalmikroskopie	61
6.3.4	Verwendung der Maus	62
6.3.5	Fluoreszenzmarkierung	62
6.3.6	Thrombozytenseparation.....	64
6.4	Abschnitt 1: Einfluß von thrombozytären bzw. endothelialen P-Selektin auf die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	65
6.4.1	Einbettung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Hintergrund.....	65
6.4.2	Einfluß von P-Selektin auf die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	67
6.4.3	Schlußfolgerung	69
6.5	Abschnitt 2: Die Rolle von GPIIb/IIIa für die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	70

6.5.1	Einbettung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Hintergrund.....	70
6.5.2	Einfluß von GPIIb/IIIa auf die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	72
6.5.3	Schlußfolgerung	73
7	ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUßFOLGERUNG	75
8	ABKÜRZUNGEN	77
9	LITERATURVERZEICHNIS	79
10	DANKSAGUNG	90
11	CURRICULUM VITAE.....	92

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis (RA)

Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronisch-inflammatorische Erkrankung, die fortschreitend alle Gelenke des menschlichen Organismus befallen kann. Am Anfang kommt es zu einer Entzündung des Synovialgewebes mit Freisetzung lytischer Enzyme, wobei es konsekutiv zu einer massiven Destruktion der angrenzenden Knorpel und Knochen kommt (1;2).

Bevorzugt werden symmetrisch die Finger-, Zehen-, Hand-, und Fußgelenke befallen. Die Synovialis ist hyperplastisch verändert und mit autoreaktiven T- und B-Zellen, sowie Monozyten infiltriert. Von dieser granulierenden, proliferierenden Synovialis (Pannus) wird der Knorpel schließlich überwuchert und zersetzt.

Für die Betroffenen stehen die schmerzhaften Veränderungen der Gelenke im Vordergrund. Diese werden von unspezifischen, allgemeinen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Fieber und Morgensteifigkeit flankiert.

Um diesem Vollbild der Erkrankung entgegenzutreten, werden zu Beginn, besonders in den akuten Schüben nicht steroidale Antirheumatika verabreicht. Ist der Therapieerfolg nicht zufriedenstellend, werden diese mit Kortikosteroiden kombiniert.

Als immunmodulatorische Medikamente stehen zum Beispiel Methotrexat und Sulfasalazin zur Verfügung. Hierbei ist jedoch das weite Spektrum der Nebenwirkungen, wie Immuninsuffizienz, gastroenterale Beschwerden und Resistenzbildungen besonders zu berücksichtigen (3).

In den letzten Jahren kommen vor allen Dingen in spezialisierten Kliniken synthetische Antikörper gegen die stark entzündungsfördernden Enzyme TNF alpha und Interleukin 1 zur Anwendung. Diese Antikörper sind jedoch teuer, haben viele Nebenwirkungen, wie Entzündungsreaktionen, Fieber, Übelkeit, Infektionen und es können sich Resistenzen bilden (4).

Da kurative Behandlungsmöglichkeiten fehlen, schreitet die Erkrankung durch den chronischen Charakter mit einem großen Leidensdruck fort. Schlußendlich können Gelenkersatzprothesen multipler Gelenke oder Invalidität die Folge sein.

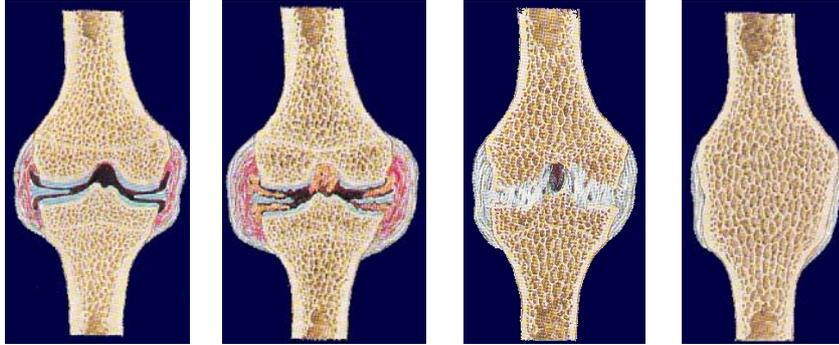


Abbildung 1: Stadien der Entwicklung der Arthritis. Von links nach rechts: entzündlichen Veränderungen, Synovialishyperplasie, Knorpelverlust, Funktionsverlust. (<http://www.rheumanet.org>)

Laut Rheumaliga liegt die Prävalenz der RA bei ca. 1%, die der Spondylarthropathien ebenfalls bei 1% und die des Systemischen Lupus Erythematosus bei 0,2%. Durch rheumatische Erkrankungen kommt es in der Bundesrepublik Deutschland zu einem Ausfall von ca. 52 Mio. Arbeitstagen und es entsteht ein volkswirtschaftlicher Schaden von ca. 10 Mrd. € jährlich. Bei der Arthritis ist das weibliche Geschlecht im Verhältnis 3:1 bevorzugt betroffen und die Lebenserwartung ist um ca. 20% reduziert (<http://www.rheumanet.org/content/m2/k2/index.aspx>).

Obwohl die RA als Autoimmunerkrankung gilt, ist die genaue Ätiologie nach wie vor nicht geklärt.

Allerdings sind bereits erste Einblicke bezüglich der immunologischen und genetischen Prädispositionen der RA möglich. Die hierbei zu Grunde liegenden Mechanismen, wie die Interaktion zwischen Thrombozyten, Leukozyten und Endothel, die Stickstoffsynthese und die Rolle der T-Zellen rücken näher ins wissenschaftliche Interesse. So findet sich in einem frühen Stadium der Erkrankung eine Immigration von aktivierten Entzündungszellen in die Synovialmembran. Dazu zählen Makrophagen, neutrophile Granulozyten und CD4 positive T-Zellen sowie eine gesteigerte Mastzell-Degranulation (5). Durch die gesteigerte Produktion von angiogenen Mediatoren, wie dem Vascular Endothel Growth Faktor (VEGF) kommt es zur Neovaskularisation und folgend zur Invasion von weiteren inflammatorischen Zellen und

Faktoren (6). Zu diesen Faktoren zählen Teile des Komplementsystems wie C5a, Leukotrien B4, Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α) und der Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) (7). Diese unterhalten die Entzündung und provozieren die Infiltration von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Diese Mechanismen führen zu einer Freisetzung großer Mengen an Proteasen, die für die direkte Schädigung der Zellen verantwortlich sind (8).

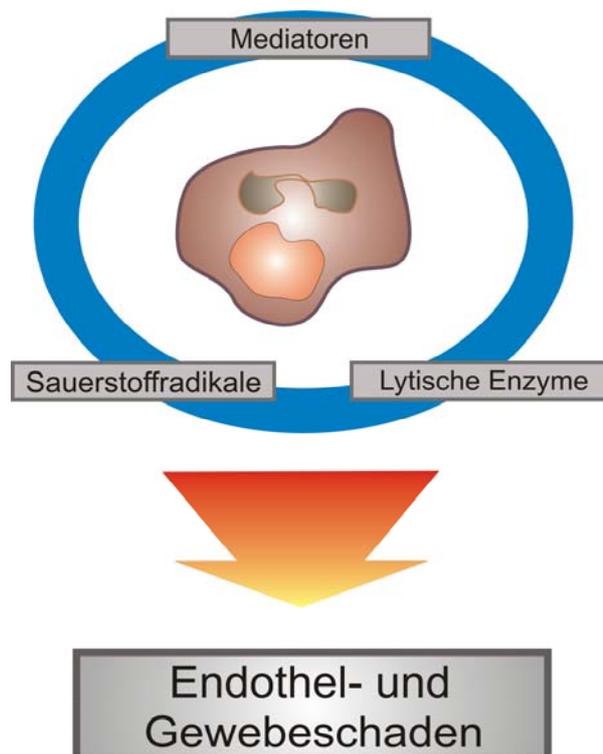


Abbildung 2: Auswirkung der Aktivierung von Leukozyten. Durch Ausschüttung von aktiven Molekülen kommt es konsekutiv zum Schaden am Endothel und dem Synovialgewebe.

1.2 Thrombozyten

Die zellkernlosen Thrombozyten sind mit 2-4 μ m die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutes. Zwischen 150000-400000 Blutplättchen pro μ l Blut zirkulieren unter physiologischen Bedingungen im Blut. Sie werden im Knochenmark und im retikuloendothelialen System durch Abschnürung aus den Megakaryozyten gebildet

und in der Milz gespeichert (9). Ihre zentrale Aufgabe wurde in der Hämostase gesehen, jedoch wurden in jüngster Zeit viele Eigenschaften entdeckt, die denen der Leukozyten ähneln (10).

Daher war die Rolle der Thrombozyten in der Physiologie des Menschen seit ihrer ersten umfassenden Beschreibung durch Bizzozero 1882 auf ihren Einfluß in der primären Blutstillung und Thrombose reduziert (11). Initial wurden sie als Zerfallsprodukte anderer Blutbestandteile durch Nasse 1836 beschrieben und erst Wright entdeckte 1906, daß die Blutplättchen Abschnürungen der Plasmamembran von Megakaryozyten darstellten (12;13). Seit den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts standen dann die Signalkaskaden und der Einfluß von Aspirin auf die Gerinnung im Vordergrund der Forschung (14). Es folgte bis in die neunziger Jahre die Aufarbeitung der Rolle von Thrombozyten in der Hämostase und Gerinnung (15).

Es gibt jedoch zunehmend Hinweise darauf, daß auch Thrombozyten am inflammatorischen Prozeß beteiligt sind. So exprimieren Thrombozyten eine Reihe von Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin, GP IIb/IIIa und Integrine, die Interaktionen anderer Zellpopulationen beeinflussen können. Nach ihrer Aktivierung setzen Thrombozyten proinflammatorische und vasoaktive Substanzen frei, und sie haben die Fähigkeit Leukozyten und andere immunkompetente Zellen zu modulieren (16;17). Außerdem können sie auch direkt bakterizid, antifungal, antiparasitär und sogar anticancerogen wirken (18-20).

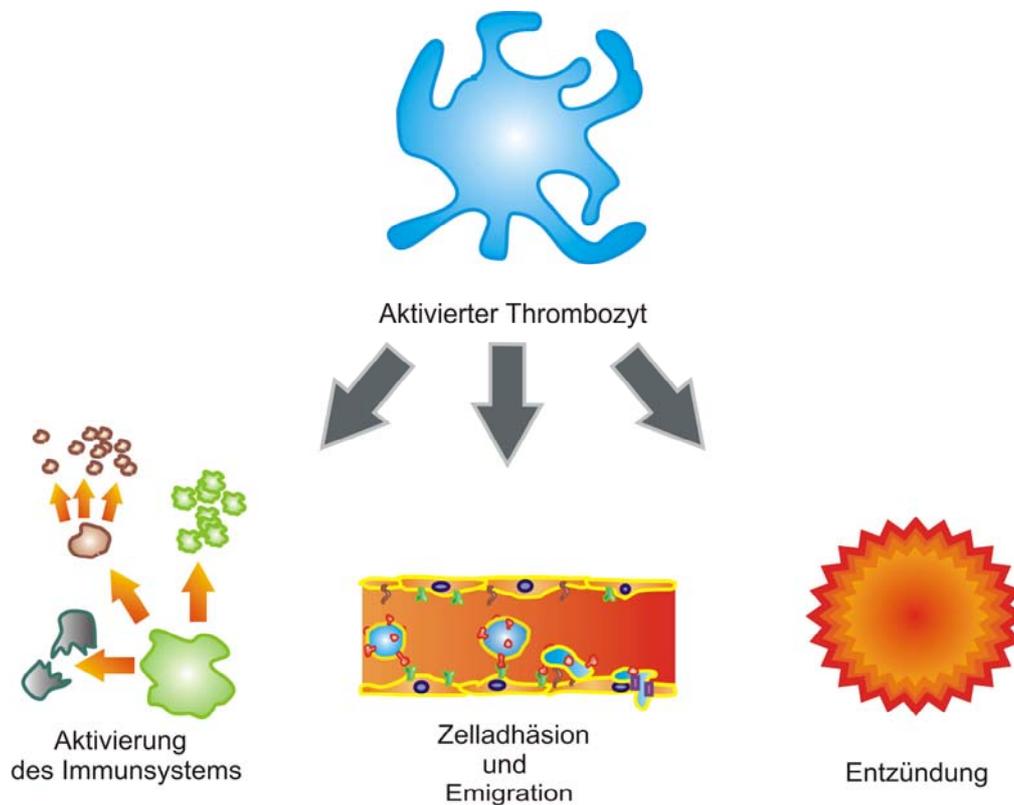


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Fähigkeiten des aktivierten Thrombozyten.

Die Thrombozyten sind somit die ersten immunkompetenten Zellen, die im Bereich einer Gewebsaffektion adhären. Während dieser Akkumulation erfolgt ihre Aktivierung und damit die Freisetzung von chemotaktischen Faktoren (21). Diese Stoffe, die aus den intrazellulären Granula und direkt aus dem Zytoplasma freigesetzt werden, haben die Fähigkeit, die Einwanderung von Leukozyten und immunkompetente Zellen zu modulieren (17). Zu den Chemokinen, die von Thrombozyten ausgeschüttet werden, gehört zum Beispiel Platelet Activating Factor (PAF), der die Funktion von Leukozyten, immunkompetenten Zellen und Endothelzellen moduliert (22;23). Weiter setzen Thrombozyten Adenosin Di-phosphat (ADP), Serotonin, Stickoxid und Thromboxan A2 frei, welche über das Endothel zur Ausschüttung von Endothel Relaxing Factor (24), Prostaglandin I2 (PGI2) und weiterem Stickoxid führen. Zusätzlich

verfügen sie über alpha Granula, die Fibronectin, Fibroblast Growth Factor (FGF) und Transforming Growth Factor (TGF β) beinhalten. Diese Stoffe sind für die Wiederherstellung von beschädigten Endothelzellen nötig, können jedoch zu einer überschießenden Neovaskularisation führen.

Zu den potentesten thrombozytären Faktoren gehören RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted), ENA-78 (epithelial neutrophil-activating protein-78), MIP-1 α (Macrophage inflammatory protein-1 α) und PF 4 (Platelet Faktor 4) (25). RANTES bindet an entzündetes Endothel, wobei es die Adhäsion von Monozyten forciert. Vergleichbar mit der Stimulation durch Antigenkontakt, aktiviert RANTES direkt die T-Zellen (26). Bei Monozyten greift RANTES direkt in die Expression von Genen, die direkten Einfluß auf die Entzündung haben, ein (27). Daneben induziert ENA-78 die Eigenstimulation von β_2 Integrinen, die die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an das Endothel steigert (28). Auch MIP-1 α induziert mit PF4 die Differenzierung von Makrophagen bei entzündlichen Prozessen (25). Neben diesen Effektoren sezernieren aktivierte Thrombozyten große Mengen Stickoxid und synthetisieren durch Cyclooxygenase (COX) inflammatorisch potente Lipide. Zu diesen gehört auch die Phospholipase A2, die vorwiegend von aktivierten Thrombozyten ausgeschüttet wird (29). Hier konnte gezeigt werden, daß die Konzentration dieser Lipase im Synovium und Serum bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis, im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten, signifikant erhöht ist und dies mit dem klinischen Ausmaß der Erkrankung korreliert (30).

Die obigen Prozesse deuten darauf hin, daß die Thrombozyten eine zentrale Stellung bei der inflammatorischen Reaktion des Organismus bei Arthritis einnehmen könnten.

Hilliquin et al. konnte zeigen, daß ein Platelet-activating factor Antagonist die klinischen Symptome bei rheumatoider Arthritis reduziert (31). Darüber hinaus konnte Joseph et al. einen Anstieg der Thrombozyten-Leukozyten-Komplexe bei RA nachweisen (32).

Die Tabelle 1 gibt einen kleinen Überblick über die von Thrombozyten sezernierten Moleküle.

Dichte Granula	α Granula	Lysosomen
ATP ADP Ca ²⁺ Serotonin Phosphat Guaninnukleotide	<p>Enzyme α1-Antitrypsin - α2-Makroglobulin - α2-Antiplasmin - C1-Esterase-Inhibitor</p> <p>Adhäsive Proteine - Fibrinogen - Fibronectin - vWF - Thrombospondin - Vitronectin - GPIIb/IIIa</p> <p>Wachstumsfaktoren - PDGF - Transforming growth factor-β - Epidermal growth factor - Endothelial cell growth factor</p> <p>Zytokinähnliche Proteine - Interleukin-1 - CD40-Ligand - Plättchenfaktor-4 - β-Thromboglobulin</p> <p>Koagulationsfraktion - HMWK - Plasminogen - PAI-1 - Faktor V - Faktor XI - Fibrinogen - Protein S</p> <p>α-Arabinoside β-Galactosidase β-Glucuronidase N-Acetylglucosaminidase Elastase Kollagenase Kathepsin</p>	<p>α-Arabinoside β-Galactosidase β-Glucuronidase N-Acetylglucosaminidase Elastase Kollagenase Kathepsin</p>

Abbildung 4: Übersicht über einen Teil der von Thrombozyten freigesetzten Moleküle und deren Herkunftsort. Darstellung: Gawaz et al. (9)

Die bisherigen Ergebnisse der Arbeitsgruppe geben zusätzlich Hinweise auf den Einfluß von Thrombozyten auf die Entzündungsreaktion bei Arthritis. Der Arbeitsgruppe gelang es erstmals in vivo die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion bei AiA zu visualisieren und quantifizieren. So war bei intravitalmikroskopischen Beobachtung der synovialen Mikrozirkulation die Interaktion von Thrombozyten mit dem Endothel in

arthritischen Wildtyptieren gegenüber Mäusen ohne AiA, erhöht. Die Fraktion der rollenden Blutplättchen war um den Faktor 4 vergrößert und die Anzahl der adhären-ten Thrombozyten um das 12fache (33).

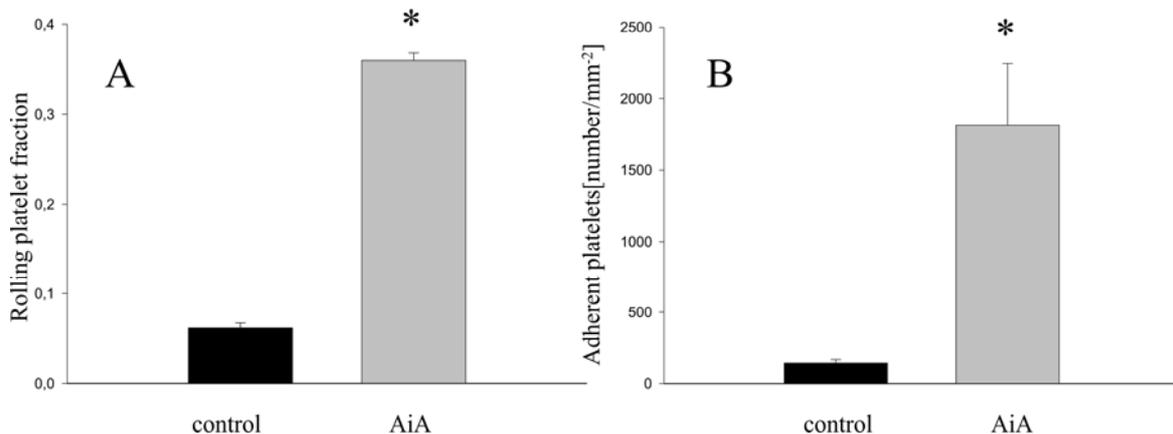


Abbildung 5: Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion bei gesunden C57/Bl6 Mäusen (control) und bei Tieren mit AiA (AiA). n=7, MW±SEM, * = p<0,05 (33)

1.3 Adhäsionsmoleküle

Intensive Interaktion und Kooperation diverser Zellpopulationen sind ein Charakteristikum des Immunsystems. Adhäsionsmoleküle sind Oberflächenrezeptoren von Zellen und spielen eine wichtige Rolle für diese Interaktionen zwischen den Zellarten. Von diesen Mechanismen sind auch die Adhäsion von Thrombozyten und deren Aktivierung abhängig, sowie die Adhäsion von Leukozyten und deren Eintreten durch die Endothelschicht in das Gewebe (34). Des weiteren sind Adhäsionsmoleküle an der Lymphozyteninteraktion mit antigenpräsentierenden Zellen, der T/T und T/B-Zell-Kooperation beteiligt, was wiederum zur Aktivierung und Differenzierung der Lymphozyten führt (35).

Dabei zeigt sich, daß Adhäsionsmoleküle nicht nur mechanische Verbindungsmoleküle sind, sondern wichtige Signalfunktionen besitzen. Ihre Bedeutung bei der Regu-

lation von interzellulären Signalen, offeriert Potential für antientzündliche und immunmodulatorische Interventionen (8;36).

Die im Rahmen der Entzündung wichtigen Adhäsionsmoleküle für die Anlagerung von Thrombozyten und Leukozyten an Endothelzellen, werden in drei Gruppen eingeteilt. Die Gruppe der Selektine werden auf Endothelzellen, Thrombozyten und Leukozyten exprimiert. Die Gruppe der Integrine liegt auf der Membran der Thrombozyten und Leukozyten vor. Die dritte Gruppe ist die Ig-Superfamilie, die auf Endothelzellen vorkommt (37-39).

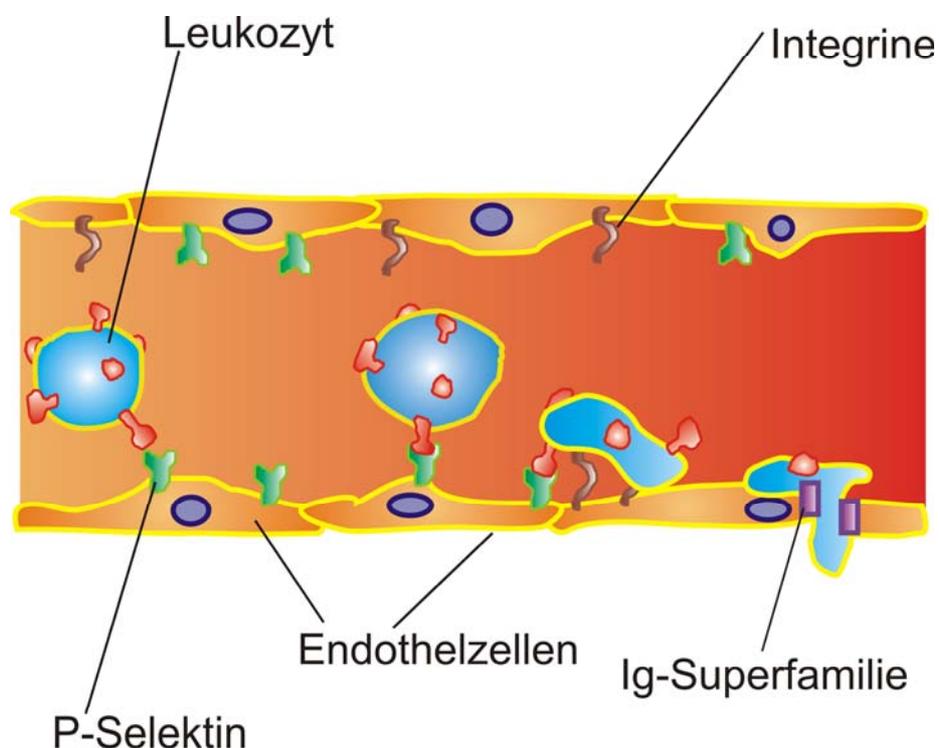


Abbildung 6: Kontakt zwischen Leukozyt und Endothelzellen. Links: Rollen mit Kontakt über Selektine. Mitte: Interaktion der Zelle mit Integrinen der Gefäßwand. Rechts: Transmigration durch die Gefäßwand.

Die Selektine sind für die transienten Interaktionen zwischen Endothelzellen und Thrombozyten oder Leukozyten verantwortlich. Auch hier gibt es drei Untergruppen: L-Selektine auf Leukozyten, E-Selektine auf Endothelzellen und P-Selektin auf Thrombozyten, welches jedoch in geringerem Maße auch auf Endothelzellen nachgewiesen werden kann (40;41). Die Selektine erkennen von anderen Zellen exprimierte Carbonhydrate und binden lose an diese. Sie vermitteln den ersten Kontakt

zwischen den Leukozyten und dem Endothel, dem so genannten „Rollen“, wobei die Verbindungen nicht stabil sind. Gefolgt vom Rollen kommt es zur so genannten „Adhäsion“, wobei die Integrine der Leukozyten fest an die interzellulären Adhäsionsmoleküle, die zu der Ig-Superfamilie gezählt werden, binden. Die fest gebundenen Leukozyten können nun durch Diapedese in das subendotheliale entzündete Gewebe eindringen (42;43).

Somit vermittelt das P-Selektin den losen Kontakt, das so genannte Rollen, zwischen den Leukozyten und dem Endothel.

1.3.1 P-Selektin

Thrombozyten und auch Endothelzellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche den Rezeptor CD62P, das so genannte P-Selektin. Der extrazelluläre Teil des CD62P besteht wie bei allen Selektinen aus einer NH₂-terminalen Lectin Domäne, gefolgt von einer einzelnen dem epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ähnlichen Sequenz, an die eine Komplement bindungsfähige Domäne angeschlossen ist. Das Adhäsionsmolekül besitzt nur einen einzelnen transmembranären Abschnitt und einen sehr kurzen intrazellulären Anteil (44).

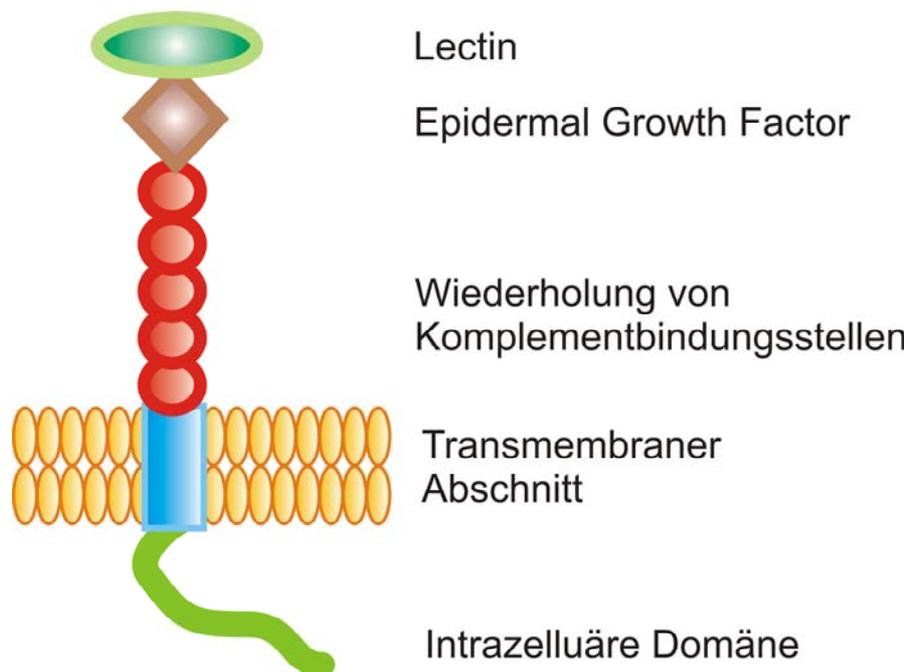


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Adhäsionsmoleküls P-Selektin. Oben Lectin Domäne mit Aktivem Zentrum des Proteins.

Bei Patienten mit Arthritis ist ein erhöhtes gelöstes P-Selektin im Blut ein molekularer Marker der Erkrankung (45). Des Weiteren ist die Inhibition von P-Selektin durch seine zentrale Rolle ein viel versprechendes Ziel bei der pharmakologischen Behandlung der Entzündung (39). P-Selektin wird in den α -Granula der Thrombozyten und in den Weibel-Palade-Körpern der Endothelzellen gespeichert. Bei Stimulation kann das P-Selektin der Endothelzellen innerhalb weniger Minuten mobilisiert werden, wohingegen das CD62P der Thrombozyten innerhalb von Sekunden an der Oberfläche erscheint. Innerhalb von 5-10min erreicht die Expression von P-Selektin auf der Oberfläche der Thrombozyten ihr Maximum, um innerhalb von 20-30min wieder auf ihr Ausgangsniveau abzufallen (46;47).

Als Ligand des P-Selektins fungiert in über 90% der P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1).

In einer vorangegangenen Arbeit konnte bereits gezeigt werden, daß P-Selektin Defizienz bei Mäusen mit AiA, die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten mit dem Endothel reduziert.

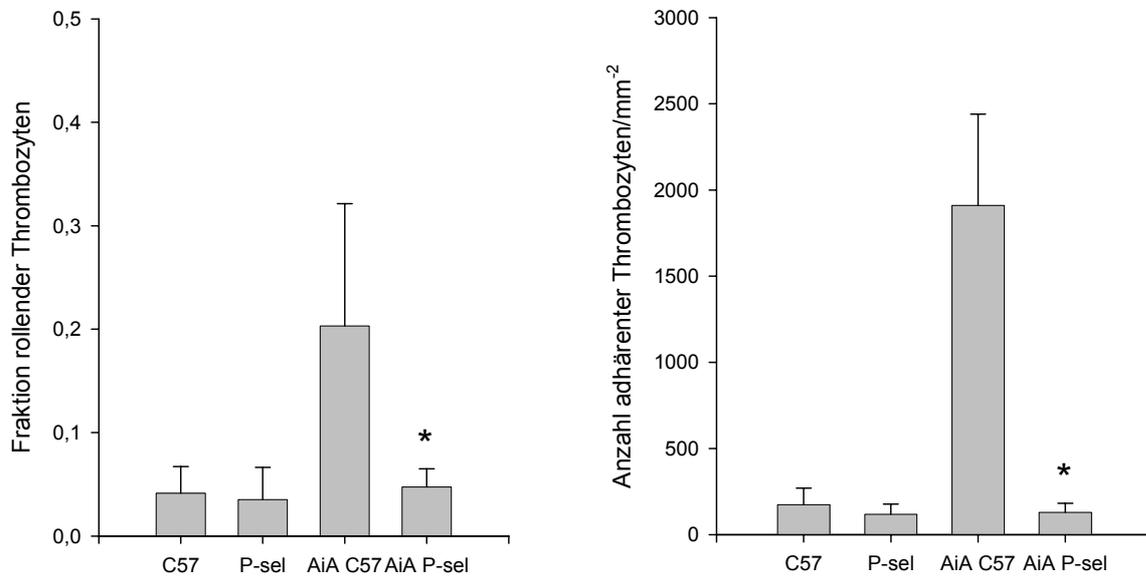


Abbildung 8: Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion bei Wildtyp C57/Bl6 Tieren und bei P-Selektin defizienten Mäusen. n=7, MW±SEM, * = p<0,05 Gruppe 4 vs. 3

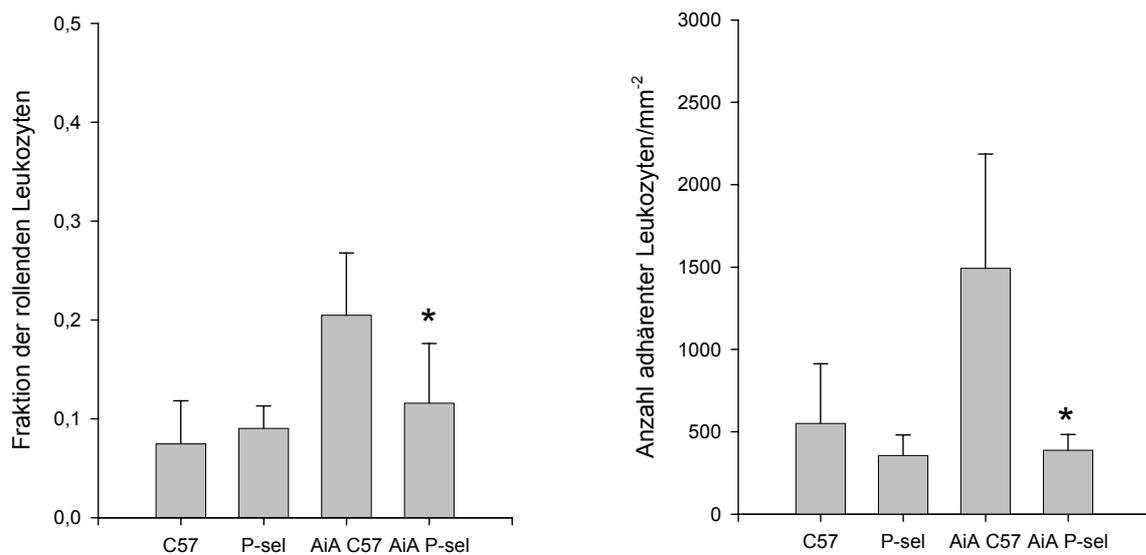


Abbildung 9: Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bei Wildtyp C57/Bl6 Tieren und bei P-Selektin defizienten Mäusen. n=7, MW±SEM, * = p<0,05 Gruppe 4 vs. 3

1.3.2 GPIIb/IIIa

Das Glykoprotein IIb/IIIa gehört zu der Integrin-Superfamilie und ist quantitativ das häufigste Membranpeptid der Thrombozyten. Nachweisbar ist es ausschließlich auf der Plasmamembran, dem offenen kanalikulären System und den α -Granula der Thrombozyten.

Der GPIIb/IIIa Rezeptor kann mehrere Moleküle binden und ist somit ein multifaktorieller Rezeptor. Unter diesen Proteinen ist Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibro- und Vitronektin genauer bekannt, wobei quantitativ und qualitativ die Bindung von Fibrinogen im Vordergrund steht. Durch diese Bindung an Fibrinogen kann wiederum über GPIIb/IIIa Rezeptoren auf anderen Thrombozyten ein Netzwerk vieler Blutplättchen entstehen (48-50).

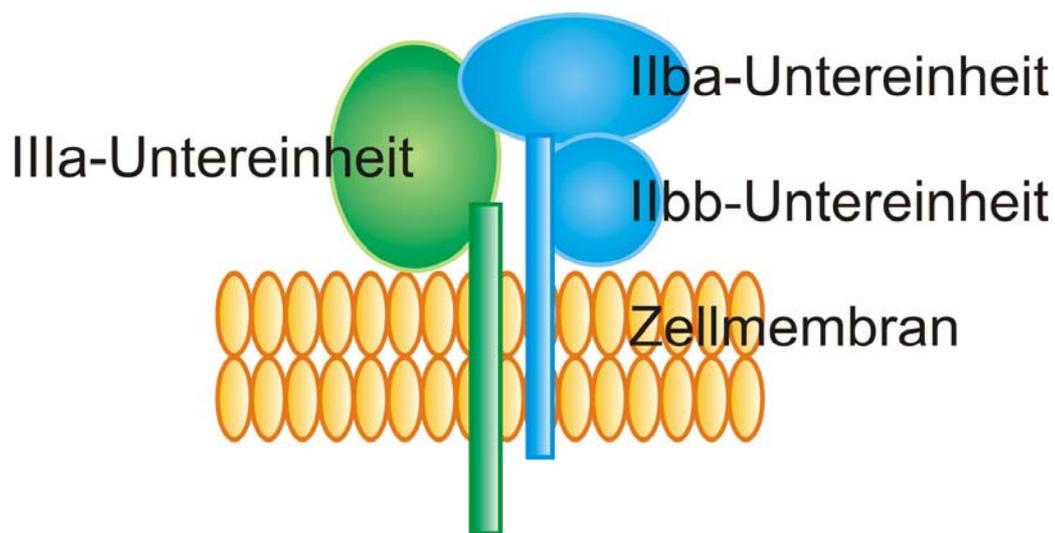


Abbildung 10: Schematische Darstellung des GPIIb/IIIa Rezeptors mit den zwei hauptsächlichen Untereinheiten IIIa und IIb, wobei sich letztere in a und b Untereinheiten teilt.

Voraussetzung für diesen Ablauf ist jedoch die Aktivierung der Thrombozyten, die mit einer Formveränderung einhergeht, die wiederum zur Konformitätsänderung und Affinitätssteigerung der GPIIb/IIIa Rezeptoren einhergeht (38;51).

Des Weiteren kann über diesen Rezeptor auch an das Endothel gebunden werden. Hierfür sind die endothelialen Oberflächenmoleküle intracellulär adhesion molecule-1

(ICAM-1), das Integrin $\alpha_v\beta_3$ und über den vWF der GPIIb Rezeptor verantwortlich (52;53).

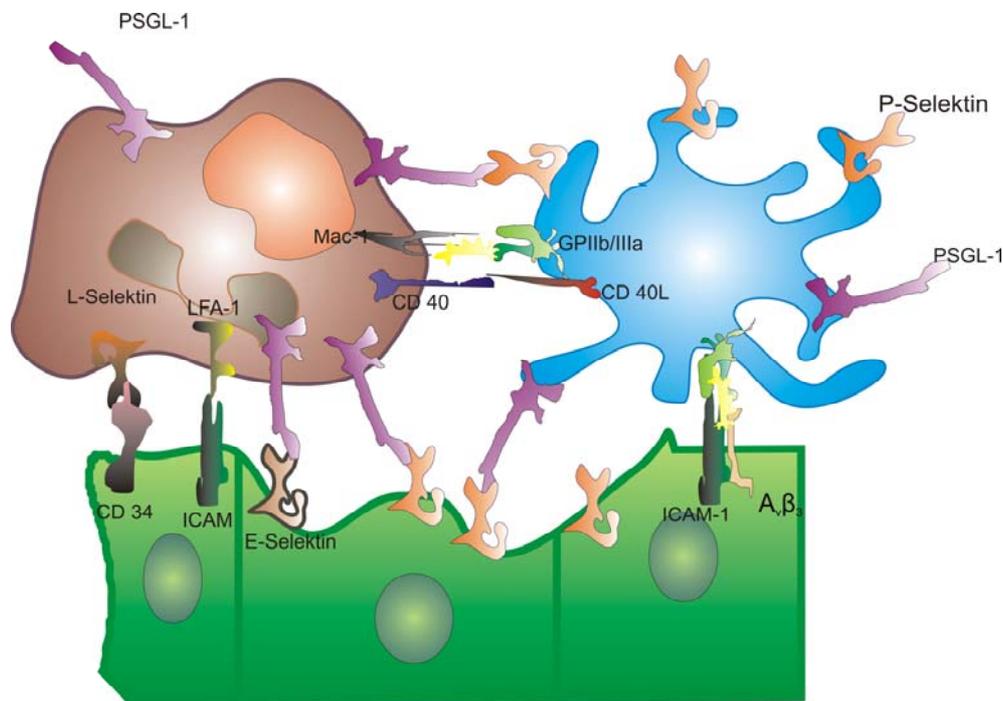


Abbildung 11: Darstellung eines kleinen Teils der Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren, die für die Interaktion der Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen verantwortlich gemacht werden.

In vitro konnte gezeigt werden, daß die Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel zu einer inflammatorischen proteolytischen Reaktion der Endothelzellen führt (54).

Das besondere Interesse an diesem Rezeptor begründet sich erstens in seinem selektiven Vorkommen auf Thrombozyten, zweitens an seiner Schlüsselposition in der Endstrecke der Thrombozytenaktivierung und drittens in seiner zentralen Rolle bei Adhäsion, Aggregation und Interaktion mit anderen Zellpopulationen.

Des Weiteren wird die antiinflammatorische Potenz von Thrombozytenhemmung über GPIIb/IIIa in der Kardiologie diskutiert. So konnte gezeigt werden, daß der protektive Effekt von GP IIb/IIIa Antagonisten bei optimaler Dosierung in der entzündungshemmenden Wirkung besteht und nicht nur in der antiaggregativen Wirkung, wofür auch die oben erwähnte Entzündungsinduktion durch Aktivierung des Rezeptors spricht (55;56).

2 Ziel der Studie

Das Ziel der Arbeit ist die Untersuchung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der synovialen Mikrozirkulation bei der Antigen-induzierten Arthritis in vivo. Hierbei soll der Einfluß des thrombozytären bzw. des endothelialen P-Selektins auf die Interaktion der Thrombozyten und Leukozyten auf das Rollen und die Adhäsion am Endothel unterschieden werden. Zum anderen soll durch selektive Hemmung des GPIIb/IIIa Rezeptors der Thrombozyten, deren Einflußnahme auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion evaluiert werden.

Dabei ist die Arbeitshypothese, daß die Thrombozyten durch ihre große Zahl und ihr schnelles Erscheinen im Bereich der Endothelläsion, die Grundlage für den Gewebeschaden der später folgenden Leukozyteninvasion bilden.

Hierzu wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie als Untersuchungsverfahren herangezogen. Diese Methode ermöglicht die zeitgleiche Visualisierung und Quantifizierung der Interaktion der Thrombozyten bzw. Leukozyten mit dem Endothel in vivo.

3 Material und Methoden

Dieses Kapitel befaßt sich mit der Darstellung der benutzten Gerätschaften und der zu Grunde liegenden Arbeitsweise. Hierbei wird dezidiert auf das Modell eingegangen.

3.1 Anmerkung

Alle im Folgenden vorgestellten tierexperimentellen Untersuchungen wurden bei der zuständigen Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-78/05 angezeigt und genehmigt.

3.2 Das Modell

Das zu Grunde liegende Modell ist das Modell der Antigen-induzierten Arthritis kombiniert mit der Intravitalmikroskopie, welches initial von Veihelmann et al. entwickelt wurde (57).

3.2.1 Grundlagen

Die den Operationen und der Intravitalmikroskopie vorangehenden Behandlungen der Versuchstiere sollen in diesem Abschnitt näher erläutert werden.

3.2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere werden C57/BL6 x 129SvEv Mäuse, sowie P-Selektins defiziente Mäuse (B6.129S7-Selptm1Bay/J, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere werden in Gruppen von 2 bis 5 Tieren pro Käfig gehalten und unterliegen einem 12 Stunden Hell/Dunkel Zyklus. Der Standardnahrung werden 18000 I.E./kg Vit A, 1280 I.E./kg Vit D3, 120 mg/kg Vit. E zugesetzt (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und das Trinkwasser ad libitum gegeben.

3.2.1.2 Arthritisinduktion und Untersuchungszeitpunkte

Die Induktion der Arthritis erfolgt mittels Antigenexposition, wie von Brackertz et al. beschrieben (58). Dieses Verfahren ist am Institut für Chirurgische Forschung bereits etabliert und wird seit einigen Jahren routinemäßig durchgeführt.

Zunächst wird eine Präimmunisierung mittels zweimaliger subkutaner Injektion von einem Protein-Antigen-Gemisch in die Flankenregion vorgenommen. Dies geschieht an Tag -21 (d-21) und an Tag -14 (d-14). Das Gemisch setzt sich aus 100µg methyliertem bovines Serum-Albumin (mBSA), gelöst in einer öligen Suspension angereichert mit Mycobacterium tuberculosis (50µg Complete Freund's Adjuvant, CFA), zusammen. An diesen Zeitpunkten erfolgt auch eine intraperitoneale Injektion von 2×10^9 durch Hitze abgetöteten Bordetella pertussis. An dem Tag der eigentlichen Arthritisinduktion, Tag 0 (d0), wird durch intraartikuläre Injektion des gleichen Antigens (100µg mBSA) in das linke Kniegelenk der Maus die Arthritis hervorgerufen. Hierauf entwickeln über 90% der Tiere innerhalb von 4 – 6 Tagen eine Gelenkdestruktion im Sinne einer Arthritis. Daher wurde als Untersuchungszeitpunkt der Tag 8 nach Arthritisinduktion gewählt.

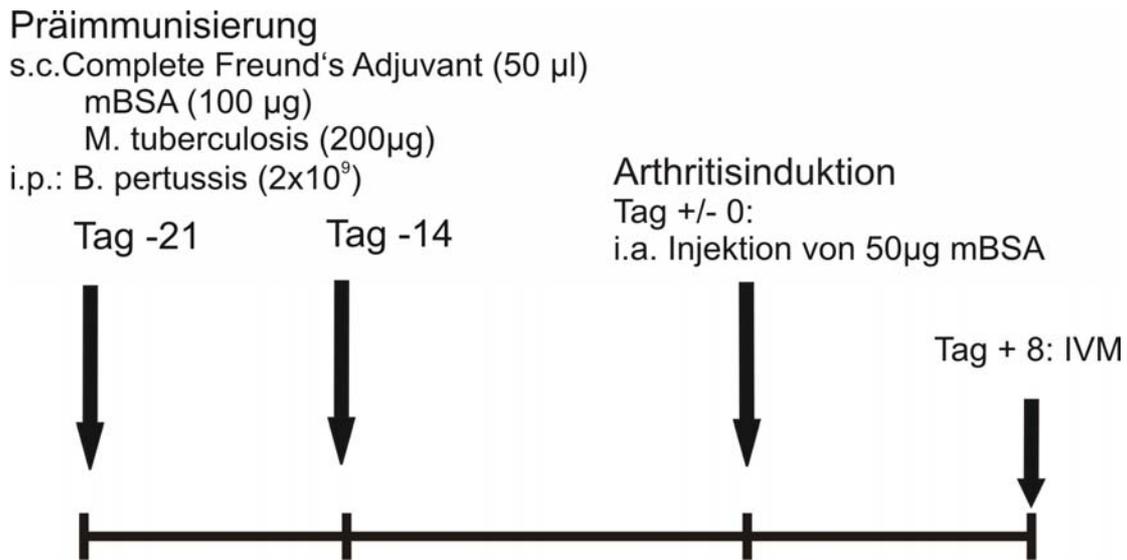


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Verlaufs der Arthritisinduktion. An Tag -21 und -14 subkutane und intraperitoneale Injektionen. An Tag 0 eigentliche Arthritisinduktion mit Injektion von mBSA in das linke Kniegelenk. Die IVM findet am Tag 8 statt.

3.2.1.3 Klinische Erscheinung

Die Tiere werden während der Arthritisinduktion täglich anhand des Erscheinungsbildes beurteilt.

- | | | |
|---|---|--|
| 0 | = | normales gesundes Tier |
| 1 | = | keine Körpergewichtszunahme oder ungewöhnliches Verhalten oder Vernachlässigung der Fellpflege |
| 2 | = | Körpergewichtsverlust oder auffällig gestörtes Verhalten oder struppiges Fell |
| 3 | = | Körpergewichtsverlust > 3 g oder somnolentes Verhalten oder schmutziges Fell |

Bei zwei aufeinander folgenden Punktwerten 2 oder einmaligem Punktwert 3 werden die Tiere aus dem Versuch entfernt.

3.2.1.4 Kniegelenksdurchmesser

Der Kniegelenksdurchmesser der Versuchstiere wird zu den Zeitpunkten der Präimmunisierungen, am Tag der Arthritisinduktion und an jedem der folgenden Tage bis zur Intravitalmikroskopie bestimmt.

Zur Bestimmung wird das Tier in eine Kurznarkose versetzt, auf den Rücken gelagert und mit einer Meßschiebe der Kniegelenkdurchmesser von ventral nach dorsal auf eine Dezimalstelle bestimmt.

3.2.1.5 Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung der arthritischen Veränderungen des synovialen, chondralen und ossären Gewebes erfolgt aus den nach Beendigung der IVM entnommenen Kniegelenken. Nach der Fixation in Formaldehyd bei einem pH von 7.2 über 12 Stunden, wurden die knöchernen Anteile der Kniegelenke entkalkt. Hierzu wurden die Präparate mit 20% EDTA bei einem pH von 7.2 über 3 Stunden inkubiert. Folgend wurden die Proben mit Phosphat-Puffer (PBS) gewaschen und automatisiert dehydriert (Shandon, Frankfurt). Nach Einbettung in Paraffin und Anfertigung von 3 µm dünnen Schnitten, erfolgte die Färbung mit Hematoxylin und Eosin.

Zur histologischen Einteilung wird der Score nach Brackertz herangezogen (59). Die gefärbten Paraffin Schnitte werden nach folgendem Schema ausgewertet:

0	=	Normales Kniegelenk
1	=	Normale Synovialis mit vereinzelt mononukleären Zellen
2	=	Zwei und mehr synoviale Zellschichten und perivaskuläre Infiltrate von Leukozyten
3	=	Hyperplasie des Synoviums und dichte Infiltration
4	=	Synovitis, Pannusbildung und Knorpel- bzw. Knochenerosion

3.2.2 Operationen

Die Operationen und die vorausgehende Behandlung der Tiere soll in diesem Kapitel beschrieben werden.

3.2.2.1 Narkosen

Alle Eingriffe bei den Versuchstieren, angefangen bei den Injektionen bis hin zu der Operation mit Intravitalmikroskopie, werden in Narkose durchgeführt. Diese Masken-Narkose wird durch ein Gemisch von Sauerstoff, Stickoxid und Isofluran, erreicht (FiO₂ 0,35; 5 Vol % Isofluran für die Induktion der Anästhesie und 1,5 Vol % Stickoxid). Die Narkose wird intraoperativ bei steigendem Blutdruck oder Herzfrequenzanstieg, vertieft. Dieses Vorgehen gewährleistet für das Tier eine schmerzfreie Behandlung und optimale Überwachung.

3.2.2.2 Versuchsaufbau

Nach Narkotisierung des Versuchstieres, wird dieses in Rückenlage auf eine Heizplatte gelagert (Effenberger, München, Deutschland) und eine rektale Temperatursonde eingebracht, um eine physiologische Körpertemperatur zwischen 36,5°C und 38,0°C zu gewährleisten.

Zur Überwachung des arteriellen Blutdrucks, wird ein Zugang in die Schwanzarterie gelegt. Zur Injektion der Fluoreszenzmarker für die Intravitalmikroskopie und zur eventuell notwendigen Volumensubstitution wird eine Verweilkanüle in eine Schwanzvene gelegt. Hierzu wird unter zu Hilfenahme eines Operationsmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland) der Schwanz des Tieres fixiert und unter sterilen Bedingungen im proximalen Drittel nach distal eröffnet. Nach Präparation des Gefäß-Nervenbündels wird die medial liegende Arterie mit einem Polypropylenkathetern (innerer Durchmesser: 0,28 mm; Portex, Lynthe, Kent, England) kanüliert. Ein identischer Katheter wird nun in die Vene eingebracht. Beide Zugänge werden mit einem Faden an dem Tier (5/0 Ethibond®, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) und mit Klebestreifen (BDF AG, Hamburg, Deutschland) an der Heizplatte fixiert.

Der arterielle Zugang wird nun mit einem Registriergerät verbunden (Viggo-Spectramed, DTX/Plus, Oxnard USA) und auf einem Monitor graphisch dargestellt (Videoskop, Hellige GmbH, Freiburg, Deutschland).

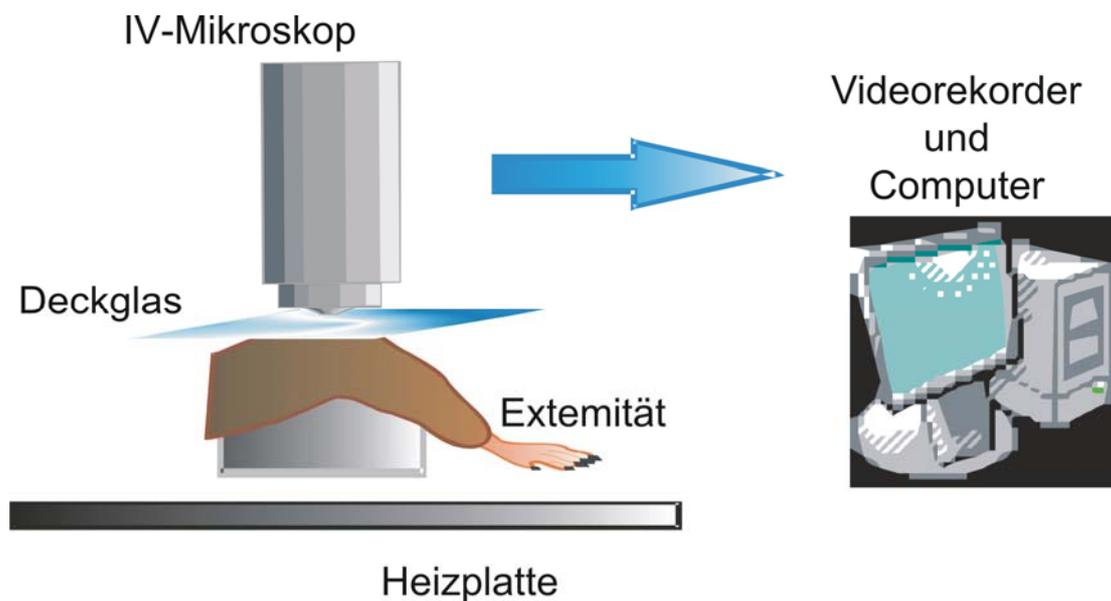


Abbildung 13: Schema des Versuchsaufbaus. Die linke untere Extremität des auf einer Heizplatte gelagerten Tieres wird über einem Plexiglasblock fixiert. Nach Präparation erfolgen die Positionierung eines Objektträgers über dem Situs und die Einstellung des IVM. Die Daten werden computerunterstützt visualisiert, aufgenommen und später offline ausgewertet.

3.2.2.3 Chirurgische Präparation

Damit die Präparation des Kniegelenks beginnen kann, wird das linke Kniegelenk in 45° Stellung über einem Plexiglasblock gelagert und durch ein Klebestreifen fixiert. Mit Unterstützung des Operationsmikroskops der Firma Leitz wird das vorher desinfizierte Fell des Tieres unterhalb des Kniegelenks auf Höhe der Pfote eröffnet. Die Präparation erfolgt nach proximal bis in den Inguinalbereich.

Nach der Fasciotomie erfolgt die Unterfahrung der Patellasehne mit einer Pinzette (FST, Vancouver, B.C., Kanada). Mit einer mikrochirurgischen Schere wird die Patel-

lasehne distal durchtrennt, womit nun der Hoffa'sche Fettkörper mit der Synovialis unverletzt freiliegt.

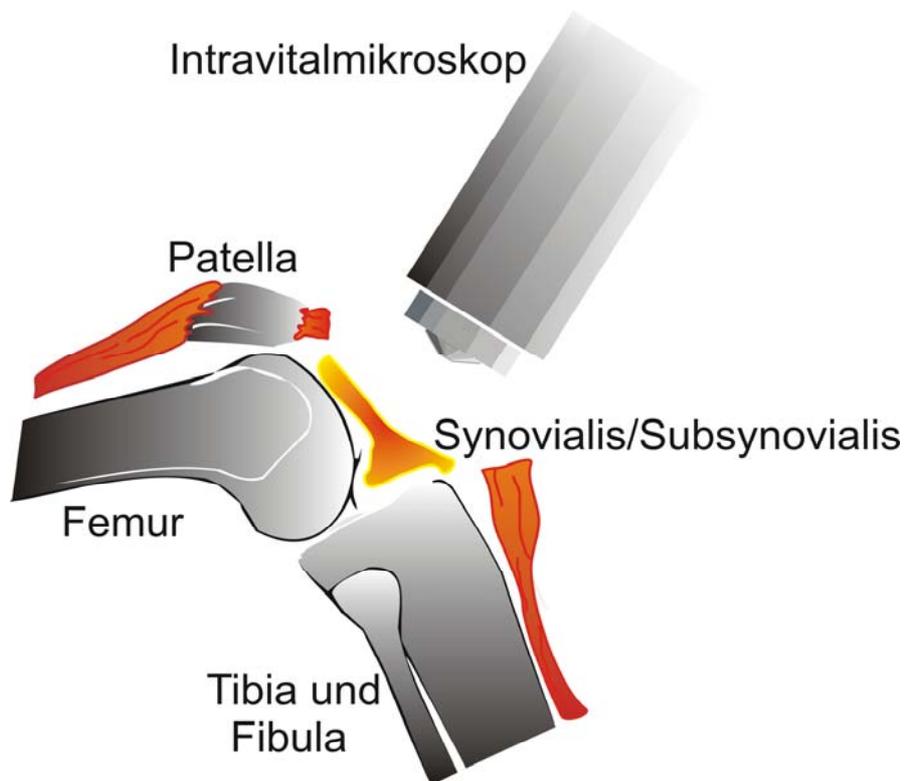


Abbildung 14: Vorgehen bei der Präparation: Fixierung des Kniegelenks in 45° Flexion und nach Freilegung der Patellasehne und deren Durchtrennung. Darüber das IVM.

Beidseitig des präparierten Kniegelenks wird nun Silicon gesetzt und ein Deckglas angebracht (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland). Oberhalb und unterhalb des Glases wird nun 0,9% Kochsalzlösung über einen Perfusor anfundiert (Perfusor V, B.Braun, München, Deutschland).

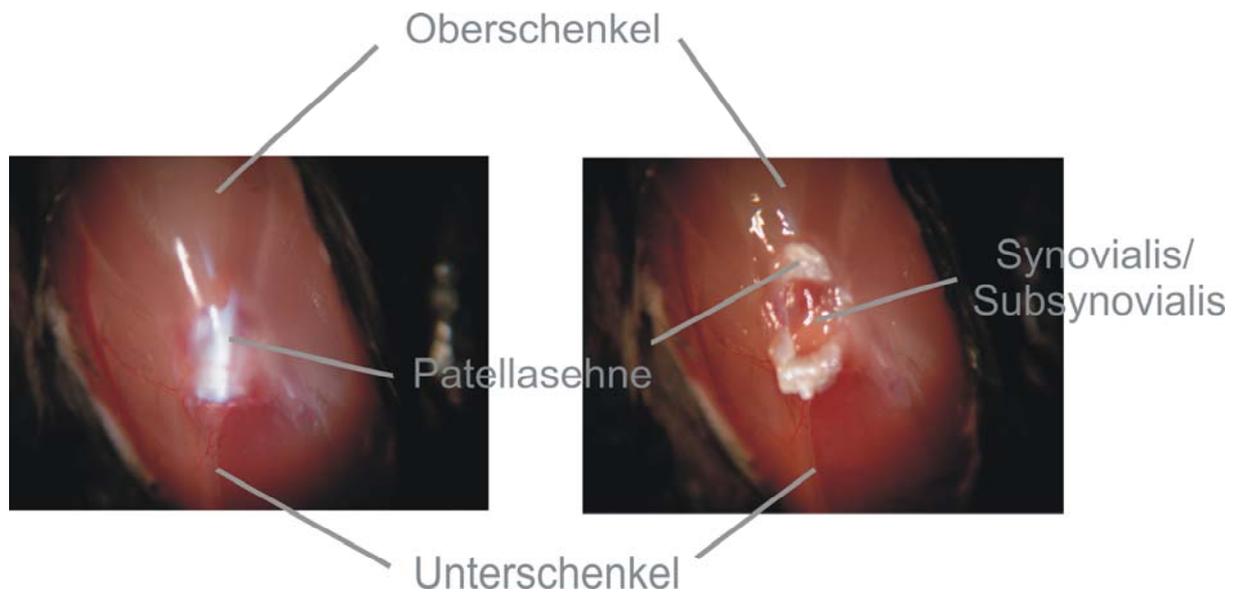


Abbildung 15: Links Operationssitus vor Durchtrennung der Patellasehne, nach Präparation der Haut und Fascien. Rechts Patellasehne durchtrennt und Blick frei auf den intraartikulären Raum mit Synovialis und distal liegendem Hoffa'schen Fettkörper.

3.2.3 Fluoreszenzmarkierung der Zellen

Die Markierung der Thrombozyten und Leukozyten erfolgt direkt durch Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen. Das Plasma wird durch an Proteine bindendes FITC dargestellt.

3.2.3.1 Kardiale Punktion und Thrombozytenmarkierung

Zur Visualisierung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion werden die Thrombozyten mit einem lang sichtbaren Fluoreszenzmarker, Carboxyfluorescein-Diacetatester (CFDA-SE, Molecular Probes, Eugene, OR) markiert (60). Hierzu wird in Narkose eine kardiale Punktion eines synergenen Spenders zur Gewinnung von ca. 1ml Vollblut, durchgeführt. Diese Probe wird mit 0,2ml Alsevers-Puffer (38mM Zitronen-Säure, 75 mM Trisodium Citrat/100mM Dextrose), 20µl Prostaglandin E₁ (PGE 1, Serva, Heidelberg) und 0,5ml Phosphat-Pufferlösung (PBS, PAN-Systems, Eidenbach) versetzt. Anschließend wird das Blut für 10min bei 900U/min zentrifugiert. Das dadurch thrombozytenreiche Plasma wird dann in 1,5ml PBS, 0,3ml Alse-

vers und 50µl PGE₁ resuspendiert. Der Fluoreszenzmarker CFDA-SE wird nun zugesetzt und der Ansatz für weitere 10min bei 3000U/min zentrifugiert.

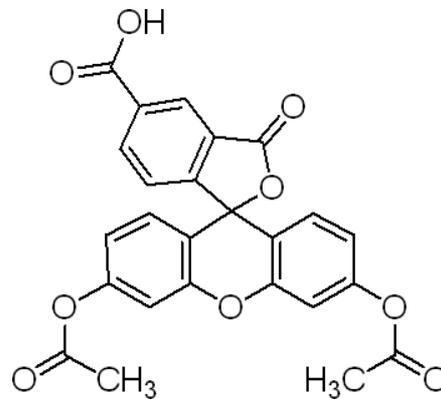


Abbildung 16: Strukturformel des Fluoreszenzmarkers Carboxyfluoreszein-Diacetatester (CFDA-SE)

Das resultierende Thrombozyten-Pallet wird in 0,4ml PBS resuspendiert. Die Anzahl gewonnener Thrombozyten wird in jeder Probe mit Hilfe eines Coulter-Counters (Coulter, Miami, FL) bestimmt. Dann wird ein entsprechendes Volumen, welches 100×10^6 fluoreszenzmarkierter Thrombozyten enthält, über den Schwanzkatheter injiziert. Der Anteil markierter Thrombozyten liegt damit bei ca. 10% - 20% (61). Die Funktion der markierten Thrombozyten wird durch Flowzytometrie (FACSort flow cytometer, Becton Dickinson, Heidelberg) und Aggregometrie (Aggregometer 2K-AGGR 126, Labor, Hamburg) überprüft.

3.2.3.2 Leukozytenfärbung

Zur zeitgleichen Visualisierung der Thrombozyten und Leukozyten werden die Leukozyten durch Injektion von Rhodamin 6G in vivo angefärbt (Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Dieser lipophile Farbstoff ist positiv geladen und reichert sich in Abhängigkeit zum Membranpotential in der Mitochondrienmembran an (62). Somit werden Zellen ohne Mitochondrien, wie z.B. Erythrozyten und Thrombozyten, nicht angefärbt.

In unseren Versuchen wird eine Dosis von 0,3 ml/kg/KG einer 0,2 mM (0,096 mg/ml) Rhodamin 6G Lösung intravenös appliziert (63).

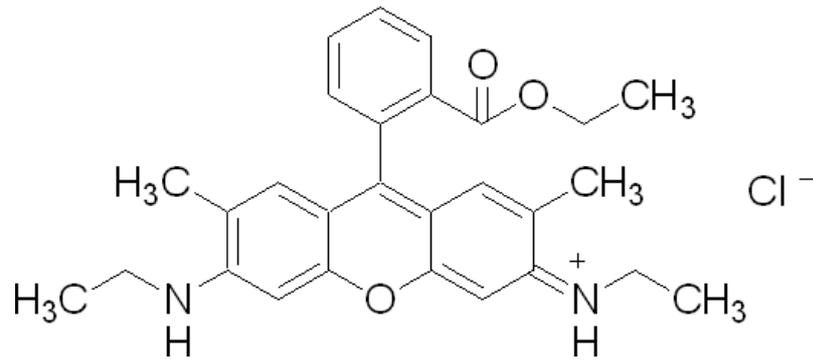


Abbildung 17: Strukturformel des Fluoreszenzmarkers Rhodamin 6G

3.2.3.3 Plasmafärbung

Auch das Blutplasma wird durch den lang zirkulierenden Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran angefärbt (Fluorescein isothiocyanate–dextran, 5g/dl, MW 150,000; Sigma, Deisenhofen, Deutschland). FITC ist ein kleines organisches Molekül und liegt typischer Weise an Proteine, über Primäre Amine gebunden, vor. Somit wird durch FITC der Proteinanteil des Blutplasmas gefärbt und die zirkulierenden Zellen ausgenommen (64).

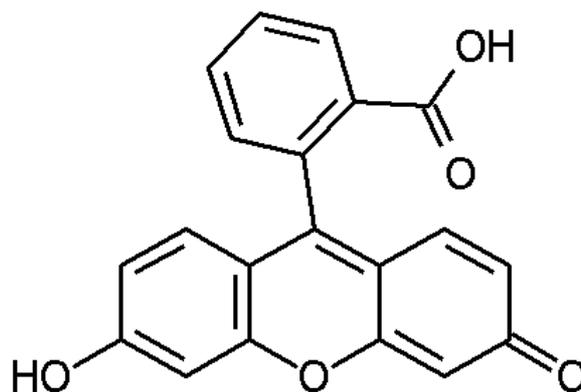


Abbildung 18: Strukturformel des Moleküls Fluorescein, die Grundlage des Farbstoffes FITC-Dextran.

3.2.4 Intravitalmikroskopie

Ein Auflichtmikroskop der Firma Zeiss (AxioTech Vario, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wird für die Versuche verwendet. Die Versuche werden mit einem Immersionssobjektiv (20x0,5 W, Archoplan, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Senkrecht im Lichtgang ist eine schwarz-weiß Kamera angeschlossen (Lichtempfindlichkeit 0,02 Lux 699 x 581 Bildpunkte, FK 6990 IQ-S, Piper, Schwerte, Deutschland). Als Lichtquelle dient eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 100 W (AttoArc, Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

Die Zeitkodierung wird mit einem Videozeitgenerator visualisiert (VT 633; Fora Company Ltd., Tokyo, Japan), der an einen VHS-Videorekorder angeschlossen ist (50 Halbbilder pro Sekunde; SVO-9500 MDP, Sony GmbH, Köln, Deutschland). Das Signal wurde online computerunterstützt über einen Bildschirm dargestellt (PVM-2043 MD, Sony GmbH, Berlin, Deutschland) und auf Videokassetten zur späteren Offline-Auswertung aufgenommen (PVM-2043 MD, Sony GmbH, Berlin, Deutschland).

Die Auswertung erfolgt durch eine Software, die es erlaubt in Echtzeit Flächen-, Gefäßdichte- und Flußgeschwindigkeitsmessungen durchzuführen (CAP IMAGE, Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland).

Für die Darstellung der mit CFDA gefärbten Thrombozyten bzw. der mit Rhodamin 6G markierten Leukozyten wird ein Bandpaßfilter (Filter Set 09 (Thrombozyten): BP 450-490, Farbteiler (FT) 510, long pass (LP) 520, Anregungsbereich blau bzw. Filter Set 15 (Leukozyten): BP 546/12, FT 580, LP 590 für Rhodamin 6G, Anregungsbereich grün; Zeiss) verwendet.

Pro Versuchstier werden 3 bis 4 Gesichtfelder, die sowohl 2 und mehr postkapilläre Venolen mit einem Durchmesser von 18-40µm als auch Kapillaren zur Messung der funktionellen Kapillardichte (FCD) beinhalten.

3.2.5 Mikrozirkulatorische Parameter

Im Folgenden werden die intravitalmikroskopisch erhobenen Parameter beschrieben.

3.2.5.1 Venolendurchmesser

In der Region of Interest (ROI) wird der Durchmesser der Venolen wiederum mit dem Programm CaplImage™ gemessen. Hierzu wird an 10 Stellen einer Venolen der Abstand zwischen den Gefäßwänden gemessen und der Mittelwert in μm notiert.

3.2.5.2 Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit (Red Blood Cell Velocity(RBC)) wird unter zu Hilfenahme der Software CaplImage™ in dem postkapillären Stromgebiet berechnet. Hierbei wird die Line-Shift-Diagramm Methode herangezogen und in Millimetern/Sekunde (mm/s) angegeben.

3.2.5.3 Funktionelle Kapillardichte

Die Funktionelle Kapillardichte (Functional Capillary Density (FCD)) ist definiert als die Länge der perfundierten Gefäße pro Beobachtungsfeld und wird in Zentimetern/Quadratcentimetern (cm/cm^2) angegeben. Auch hierbei wird nach interaktiver Kennzeichnung die Berechnung automatisiert durch CaplImage™ durchgeführt.

3.2.5.4 Rollen und Adhärenz der markierten Zellen

Zur Quantifizierung der mit CFDA gefärbten Thrombozyten und der mit Rhodamin 6G markierten Leukozyten wird ein $200\mu\text{m}$ langer Gefäßabschnitt in den intravitalmikroskopischen Aufnahmen markiert und über je 30 Sekunden das Rollen und die Adhärenz der Thrombozyten ausgezählt. Mit den Leukozyten wird identisch verfahren (65).

3.2.5.4.1 Rollende Zellen

Die Rollenden Zellen sind definiert als im Bezug auf den Blutstrom signifikant langsamer fließende Zellen, die kurze, transzendenten Kontakte mit dem Endothel zeigen. Sie werden als Fraktion aller Zellen, die einen gewissen Gefäßabschnitt passieren, angegeben und errechnen sich als Division der Anzahl rollender Zellen durch die Summe der rollenden Zellen und der den Gefäßabschnitt passierenden Zellen.

3.2.5.4.2 Adhärenente Zellen

Adhärenente Zellen sind definiert als über 30 Sekunden endothelständige Zellen in einem 200 µm langem Gefäßabschnitt. Sie werden als Zellen pro Quadratmillimeter (a/mm^2) angegeben. In die Berechnung geht der Gefäßdurchmesser mit ein und sie erfolgt nach der Formel:

$$aZ = (aZ \times 10^6) / (D \times \pi \times L)$$

Wobei aZ die adhärenenten Zellen in den 30 Sekunden wiedergibt, D den Gefäßdurchmesser in Mikrometern, π die Kreiskonstante und L die Länge des untersuchten Gefäßabschnittes.

3.3 Abschnitt 1: Einfluß von thrombozytären bzw. endothelialen P-Selektin auf die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Dieser Abschnitt beschreibt die erste Versuchsreihe in unserer Studie, die sich der Rolle des P-Selektins auf die Interaktion der Zellen in der Mikrozirkulation der Synovialis bei Antigen induzierter Arthritis widmet.

3.3.1 Ziele

Erstes Ziel dieses Versuchsabschnittes ist es, die Rolle von thrombozytären und endothelialen P-Selektin auf die Thrombozytenrekrutierung und deren Auswirkung auf das Rollen und die Adhärenz der Leukozyten zu differenzieren.

Hierdurch soll Aufschluß über die Möglichkeit der Entzündungsreduktion durch Hemmung der Thrombozyten erlangt werden.

3.3.2 Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung unterteilt sich in den Aufbau der Versuchsgruppen und des Versuchsprotokolls, sowie in die Darstellung der praktischen Umsetzung der Versuche.

3.3.2.1 Versuchsgruppen

Vier Versuchsgruppen mit jeweils 7 validen Versuchstieren werden für die Charakterisierung des P-Selektins durchgeführt. Hierbei werden die Tiere randomisiert den Gruppen zugeteilt und bei allen Tieren die Antigen-induzierte Arthritis ausgelöst.

In der Gruppe 1 rekrutieren sich Empfänger- und Spendertiere aus dem Stamm C57/Bl6., wohingegen in der Gruppe 2 alle Tiere dem P-Selektin defizienten Stamm B6.129P2-Nos2tm1Lau/J angehören.

In den Gruppen 3 und 4 bestehen nun die Empfänger- und Spendertiere aus unterschiedlichen Stämmen. In der Gruppe 3 sind die Empfängertiere C57/Bl6 Mäuse und die Spendertiere P-Selektin defizient, wohingegen in der Gruppe 4 die Empfänger P-Selektin defizient sind und die Spender C57/Bl6 Tiere.

Gruppe	1	2	3	4
Empfänger	C57/BL6	P-Sel defizient	C57/BL6	P-Sel defizient
Spender	C57/BL6	P-Sel defizient	P-Sel defizient	C57/BL6

Abbildung 19: Gruppenzusammensetzung des Abschnittes 1. In den Gruppen 1 und 2 rekrutieren sich Empfänger- und Spendertiere aus homologen Tierstämmen. In Gruppe 3 und 4 sind der Empfänger und der Spender aus dem jeweils anderen Tierstamm. In allen vier Gruppen wurde die Arthritis wie beschrieben induziert, n = 7.

3.3.2.2 Versuchsprotokoll

Für die Versuche des ersten Abschnitts wurde folgendes Versuchsprotokoll verwendet. Hier wurden von Beginn der Versuche an alle erhobenen Werte eingetragen.

Einzelversuchsprotokoll												
Modell zur Beobachtung der synovialen Mikrozirkulation der Maus in vivo												
P-Sel thrombozytär versus endothelial												
Gruppe: _____												
Markierung:												
Ohr												
Seite												
Versuchsnummer: _____												
Versuchstag: _____												
Versuchsbeginn/-ende: _____ bis _____												
Versuchstier												
Spendertier												
Narkose: (O ₂ 38 % + N ₂ O) + Isoflurane 2%												
Sonstige: _____												
Schwanzarterienkatheter: ja / nein Besonderheiten bei Durchführung: nein / ja: _____												
Blutdruckmessung: konstant / inkonstant keine, weil: _____												
Blutdruckverlauf:												
Beginn	10 min	20min	30 min	40 min	50 min	60 min	70 min	80 min	90 min	100 min	110 min	120 min
Körpergewicht: _____												
Kniegelenksdurchmesser: _____												
Kniepräparation: 1. Äußerer Aspekt: unauffällig Geschwollen												
2. Durchtrennung Patellarsehne: Zielgewebe unverletzt Zielgewebe verletzt, keine Blutung Starke Blutung												
Intravitalmikroskopie: Beginn der Aufnahmen: _____ Keine Aufnahme möglich, weil: _____												
CFDA: ja / nein Beginn: _____												
Rhodamin: ja / nein Beginn: _____												
FITC: ja / nein Beginn: _____												
Versuchende: Euthanasie: Pentobarbital i.p. 0,5 ml												
Organentnahme: Knie links Blutplasma Schwanzspitze Hoffa												

Abbildung 20: Versuchsprotokoll des ersten Abschnittes.

3.3.2.3 Versuchsaufbau

Die Versuche begannen mit der Narkotisierung des Spendertieres und der Herzpunktion. Folgend wurde das Spendertier getötet und die Thrombozyten wie vorhergehend beschrieben separiert und gefärbt. Während der beiden Pausen durch die Zentrifugation der Lösung wurde das Empfängertier klinisch beurteilt, gewogen und narkotisiert. Die Messung des Kniegelenksdurchmessers und die Lagerung auf dem Operationstisch erfolgten bereits in Narkose. Nun konnte die Präparation des Kniegelenks beginnen und folgend das Tier mit dem Operationstisch unter dem IVM in Position gebracht werden.

Nach Beendigung der Thrombozytenfärbung wurden diese dem Empfängertier injiziert und die Videoaufnahmen der IVM eingeleitet. Nach Durchführung der Leukozytenfärbung und deren Videoregistrierung wurde das Plasma angefärbt und die Mikrozirkulation auf Videokassette aufgenommen.

Der Versuch wurde mit Probenentnahme und Euthanasie des Tieres abgeschlossen.

Minute	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Narkose Spender												
Herzpunktion Spender												
Euthanasie Spender												
Thrombozytenfärbung												
Vorbereitung Empfänger												
Narkose Empfänger												
Kniegelenkspräparation												
Intravitalmikroskopie												
Thrombozyteninjektion												
in vivo Leukozytenfärbung												
in vivo Plasmamarkierung												
Probenentnahme												
Euthanasie Empfänger												

Abbildung 21: Schematische Darstellung des Zeitverlaufs der Versuche im ersten Abschnitt der Studie.

3.4 Abschnitt 2: Die Rolle von GPIIb/IIIa für die Thrombozyten und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Der zweite Abschnitt bezieht sich auf den Einfluß des GPIIb/IIIa Rezeptors auf die Mikrozirkulation der Synovialis bei Antigen-induzierter Arthritis und beschreibt die praktische Umsetzung der Versuche.

3.4.1 Tirofiban

Das Nicht-Peptid Tirofiban (Aggrastat) ist ein potenter selektiver Inhibitor des Glykoproteins GPIIb/IIIa, der ausschließlich auf Thrombozyten vorkommt (66). Seine Effektivität bei der Behandlung des akuten Koronarsyndroms ist in den drei großen klinischen Studien RESTORE, PRISM und PRISM-PLUS bewiesen worden (67).

Aggrastat hemmt reversibel die Bindung von Fibrinogen an den vorher erwähnten GPIIb/IIIa Rezeptor. Die Hemmung der Plättchen Aggregation ist Dosis bzw. Konzentrationsabhängig. Die benutzte Dosierung ist an Vorversuche anderer Arbeitsgruppen des Instituts angelehnt (68).

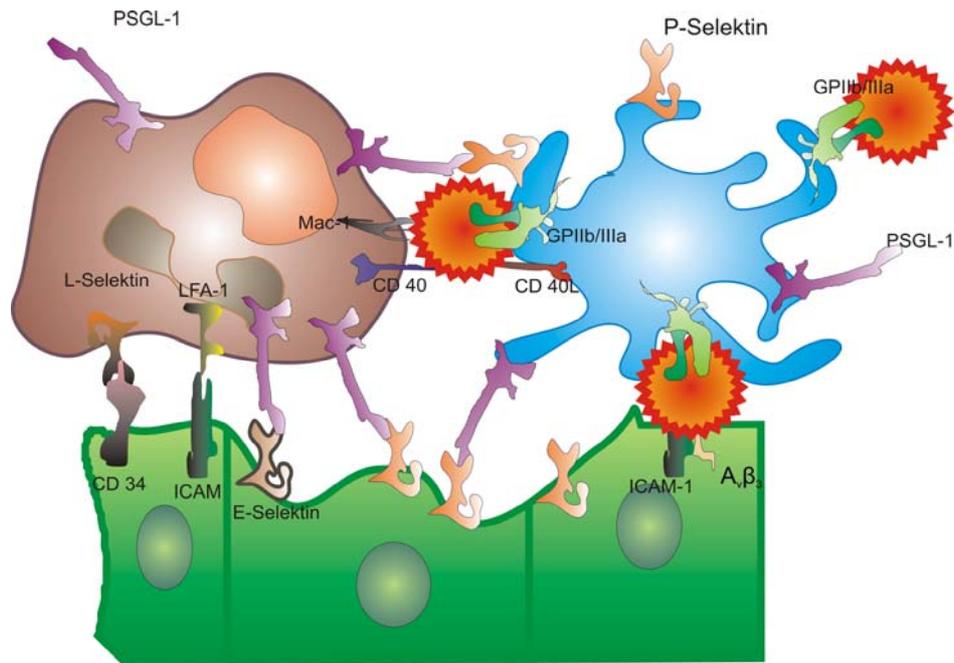


Abbildung 22: Selektive Hemmung des GPIIb/IIIa-Rezeptors durch den Antagonisten Tirofiban und daraus folgende Auswirkungen auf die Interaktion von Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen.

Tirofiban ist ein Non-Peptid Derivat von Tyrosin und wird durch die N-Sulfonylierung von (S)-Tyrosin und die folgende O-Alkylierung synthetisiert, woraus sich die folgende Struktur ergibt (69).

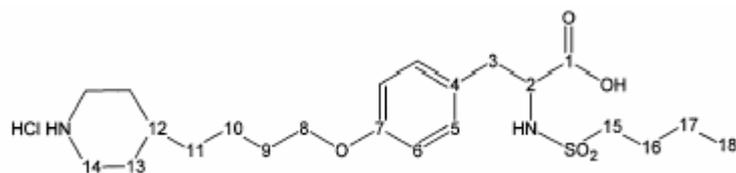


Abbildung 23: Strukturformel des Nicht-Peptides Tirofiban (Aggrastat™)

3.4.2 Ziele

Ziel dieses Abschnittes der Studie ist die Charakterisierung und Quantifizierung der Interaktion von Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen bei selektiver Hemmung der Thrombozyten über den GPIIb/IIIa Rezeptor.

Hieraus soll Aufschluß über die Möglichkeiten der antiinflammatorischen Therapie bei Rheumatoider Arthritis durch Hemmung der Thrombozyten gewonnen werden und somit eine mögliche neue Therapieoption aufgedeckt werden.

3.4.3 Versuchsdurchführung

In diesem Kapitel soll die praktische Durchführung der Versuche mit Darstellung der Versuchsgruppen, des Versuchsprotokolls und des Versuchsablaufs erläutert werden.

3.4.3.1 Versuchsgruppen

Der Versuchsaufbau ist wiederum identisch mit dem ersten Abschnitt der Studie. Vier Versuchsgruppen werden verblindet durchgeführt. Es werden ausschließlich Mäuse des Stammes C57/Bl6 als Spender- und Empfängertiere verwendet. In den Gruppen 1 und 2 wird im Gegensatz zu den Gruppen 3 und 4 keine Arthritis induziert. Die Gruppen 1 und 3 fungieren als positiv Kontrollen bei denen entsprechende Mengen NaCl verabreicht werden. Die Gruppen 2 und 4 sind die eigentlichen Versuchsgruppen in denen Tirofiban injiziert wird. Hierbei ist die Vorgehensweise verblindet, dazu wird von einer der Arbeitsgruppe fremden Person jeweils 14 Spritzen mit 1 ml NaCl 0,9% und 14 Spritzen mit 30 µg/ml Tirofiban aufgezogen und numeriert. Die Menge wird an das Körpergewicht des jeweiligen Tieres adaptiert und wobei sich eine Dosierung von 0.36 µg /g/KG ergibt. Diese Dosis ist vergleichbar mit der verabreichten Menge im klinischen Alltag und sie ist in anderen Modellen am Institut mehrfach verifiziert worden (68).

Die Injektion der Substanzen über den Schwanzvenenkatheter erfolgt bei Empfänger- und Spendertier 30 min vor Beginn der Herzpunktion bzw. den intravital-mikroskopischen Aufnahmen.

Die Tiere werden initial in eine gesunde Kontrollgruppe (Zusammenschluß aus den Gruppen 1 und 2) und eine Arthritisgruppe (Zusammenschluß aus den Gruppen 3 und 4) eingeteilt. Diese beiden Gruppen werden erst nach der IVM und der Erhebung der einzelnen Parameter zur statistischen Auswertung in die vier Gruppen aufgelöst.

Gruppe	1	2	3	4
Empfänger	C57/BI6	C57/BI6	C57/BI6	C57/BI6
Spender	C57/BI6	C57/BI6	C57/BI6	C57/BI6
AiA Induktion	Nein	Nein	Ja	Ja
NaCl Injektion	Ja	Nein	Ja	Nein
Tirofiban Injektion	Nein	Ja	Nein	Ja

Abbildung 24: Gruppenzusammenstellung des 2. Abschnittes der Studie. Sowohl Empfänger als Spender rekrutieren sich aus dem C57/BI6 Stamm. Arthritisinduktion nur in den Gruppen 3 und 4. In den Gruppen 2 und 4 Injektion von Tirofiban, n=7.

3.4.3.2 Versuchsprotokoll

Die folgende Graphik stellt das für diese Versuche benutzte Versuchsprotokoll da.

Einzelversuchsprotokoll

Modell zur Beobachtung der synovialen Mikrozirkulation der Maus in vivo

Tirofiban

Gruppe: _____
 Spritzennummer: _____

Markierung:

	rechts	links
Ohr		
Seite		

Versuchsnummer: _____
 Versuchstag: _____
 Versuchsbeginn/-ende: _____ bis _____

	C 57/BL6	Transgen
Versuchstier		
Spendertier		

Narkose: (O₂ 38 % + N₂O) + Isoflurane 2%
 Sonstige: _____

Schwanzarterienkatheter: ja / nein Besonderheiten bei Durchführung:
 nein / ja: _____

Blutdruckmessung: konstant / inkonstant keine, weil: _____

Blutdruckverlauf:

Beginn	10 min	20min	30 min	40 min	50 min	60 min	70 min	80 min	90 min	100 min	110 min	120 min

Körpergewicht: _____
Kniegelenksdurchmesser: _____

Kniepräparation:

1. Äußerer Aspekt:	unauffällig	
	Geschwollen	
2. Durchtrennung Patellarsehne:		Zielgewebe unverletzt
		Zielgewebe verletzt, keine Blutung
		Starke Blutung

Intravitalmikroskopie: Beginn der Aufnahmen: _____
 Keine Aufnahme möglich, weil: _____
 CFDA: ja / nein Beginn: _____
 Rhodamin: ja / nein Beginn: _____
 FITC: ja / nein Beginn: _____

Versuchende: Euthanasie: Pentobarbital i.p. 0,5 ml
 Organentnahme: Knie links
 Blutplasma
 Schwanzspitze
 Hoffa

Abbildung 25: Versuchsprotokoll des zweiten Abschnitts der Studie.

3.4.3.3 Versuchsaufbau

Wie im ersten Abschnitt beginnen diese Versuche mit der Narkose des Spendertieres. Nun wird jedoch die an das Körpergewicht adaptierte Menge Tirofiban, respektive NaCl, dem Spendertier injiziert und das Tier 30 min in Narkose belassen.

Nach dem Ablauf der 30 min wird die Herzpunktion zur Gewinnung des Vollblutes durchgeführt und das Tier anschließend euthanasiert. Folgend wird das Empfängertier in den Pausen durch die Zentrifugation klinisch beurteilt, gewogen und der Kniegelenksdurchmesser nach Einleitung der Narkose erhoben.

Hiernach wird das Tier wieder gelagert, das Kniegelenk präpariert und das Tier unter dem IVM in Stellung gebracht.

Minute	-30	-20	-10	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
Narkose Spender															
Tiro/NaCL Spender															
Herzpunktion Spender															
Euthanasie Spender															
Thrombozytenfärbung															
Vorbereitung Empf.															
Narkose Empfänger															
Tiro/NaCL Empfänger															
Kniepräparation															
Intravitalmikroskopie															
Thrombozyteninjektion															
Leukozytenfärbung															
Plasmamarkierung															
Probenentnahme															
Euthanasie Empfänger															

Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der Versuche des zweiten Abschnitts. Zeitdarstellung nicht absolut.

Die nun markierten Thrombozyten werden dem Empfänger infundiert und die Leukozyten sowie das Blutplasma in vivo gefärbt. Jeweils wird die intravitalmikroskopisch dargestellte Mikrozirkulation auf Videoband aufgenommen. Der Versuch ist nach Probenentnahme und Euthanasie des Versuchstieres beendet.

4 Statistik

Die in dieser Arbeit aufgeführten Werte sind als Mittelwert (MW) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Mittelwerte ergeben sich aus den Mittelwerten der einzelnen Versuchstiere.

Die Statistik wird unter zu Hilfenahme der Software Sigma Stat™ (Jandel Cooperation, St. Rafael, CA, USA) durchgeführt.

Zum Vergleich von zwei unverbundenen Stichproben wird der Mann-Whitney Ranksumtest herangezogen. Bei 3 und mehr unverbundenen Proben wird der ANOVA on Ranks Test angewendet.

Zur statistischen Analyse repetitiver Messungen wird der Friedman Test herangezogen.

Differenzen von $p < 0,05$ werden als signifikant angesehen.

5 Ergebnisse

Der Ergebnissteil gliedert sich in zwei Abschnitte. Der erste Teil beschreibt die Ergebnisse der Untersuchung der Rolle des thrombozytären versus des endothelialen P-Selektins bei der Antigen-induzierten Arthritis. Der zweite Teil beschreibt die Ergebnisse der selektiven Hemmung des GPIIb/IIIa Rezeptors der Thrombozyten in unserem Modell.

5.1 Abschnitt 1: Einfluß von thrombozytären bzw. endothelialen P-Selektin auf die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Dieses Kapitel gibt die erhobenen Daten zur näheren Beschreibung der Rolle des P-Selektins für die Zellinteraktionen in der synovialen Mikrozirkulation bei AiA wieder.

5.1.1 Arthritisinduktion

Die Arthritis wird an Hand des Spontanverhaltens und des Kniegelenksdurchmessers in der Induktionsphase überwacht. Post operationem wird das untersuchte Kniegelenk entnommen und histologisch nach dem Score von Brackertz eingeteilt (59).

5.1.1.1 Spontanverhalten

Das Verhalten der Tiere des P-Selektin defizienten Stammes war zu keinem Zeitpunkt auffällig (0 Punkte). Ein Tier der C57/Bl6 Gruppe, die ansonsten auch keine Auffälligkeiten zeigte, vernachlässigte ihre Körperpflege (1 Punkt).

5.1.1.2 Kniegelenksdurchmesser

Der Kniegelenksdurchmesser war in den C57/BL6-Gruppen nach der Induktion der Arthritis tendenziell höher als in den P-Selektin defizienten Tieren, wobei jedoch keine statistischen Signifikanzen vorlagen.

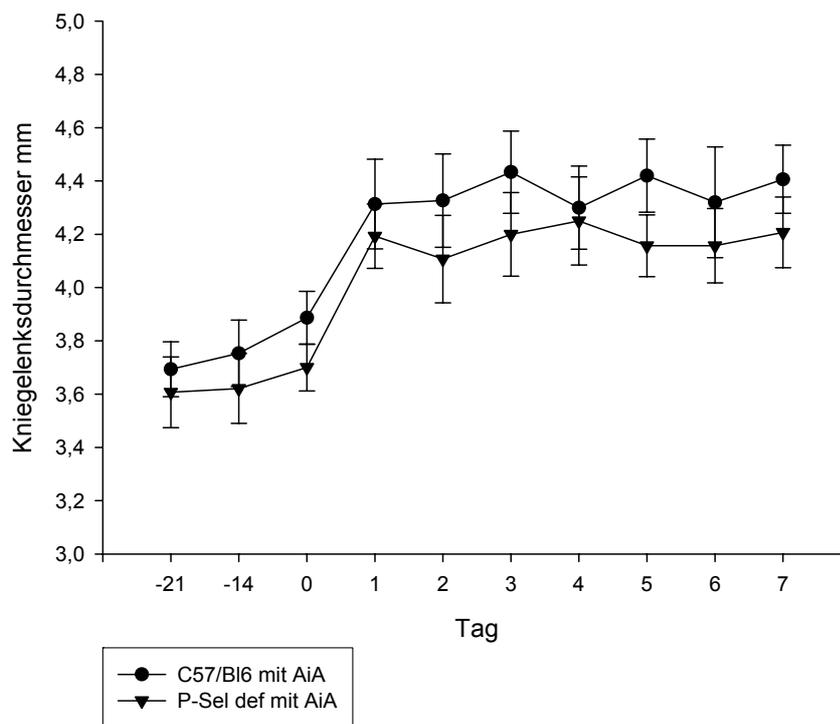


Abbildung 27: Veränderung des Kniegelenkdurchmessers von Beginn der Arthritisinduktion bis zum Tag der IVM. Kreissymbol: Tiere des C57/BL6 Stammes. Dreiecksymbol: Tiere des P-Selektin defizienten Stammes. $n = 14$, $MW \pm SEM$, $p < 0,05$

5.1.1.3 Körpergewicht

Das Körpergewicht der Wildtyp Tiere mit AiA lag bei IVM bei $22,5 \pm 0,7$ g und bei den P-Selektin defizienten Mäusen bei $21,9 \pm 0,9$ g. Damit bestanden keine statistischen Unterschiede zwischen den beiden Tierstämmen.

5.1.1.4 Histologie

In diesem Versuchsaufbau wurde bei allen Tieren Arthritis induziert. Die erfolgreiche Induktion der Arthritis wurde nach der IVM histologisch nach Brackertz überprüft (59).

Hierbei zeigten sich bei allen Mäusen des C57/Bl6-Stammes Veränderungen im Sinne einer Arthritis. Auch die Tiere des P-Selektin defizienten Stammes besaßen arthritische Veränderungen, jedoch waren diese geringer ausgeprägt. Da die Histologie nur qualitativen Aussagewert besitzt, sind diese Ergebnisse nur als Hinweis für den protektiven Charakter der P-Selektin Defizienz zu sehen.

Gruppe	0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	4 Punkte
C57 mit AiA	0	2	5	5	3
P-Sel mit AiA	0	7	6	1	0

Abbildung 28: Ergebnis der histologischen Auswertung nach Brackertz. 0 = Normales Kniegelenk, 1 = Normales Synovium mit vereinzelt mononukleären Zellen, 2 = Zwei und mehr synoviale Zellschichten und perivaskuläre Infiltrate von Leukozyten, 3 = Hyperplasie des Synoviums und dichte Infiltration, 4 = Synovitis, Pannusbildung und Knorpel- bzw. Knochenerosion.

5.1.2 Intraoperative Parameter

Intraoperativ wurden die Vitalparameter mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz und Körpertemperatur überwacht.

Der mittlere arterielle Blutdruck war über die gesamte Versuchsdauer konstant und betrug im Durchschnitt der WT-Mäuse vor der Kniegelenkspräparation 82 ± 5 mmHg, bzw. 85 ± 7 mmHg bei P-Sel defizienten und vor Euthanasie 79 ± 6 mmHg bzw. 78 ± 7 bei Mäusen ohne P-Selektin.

Die rektal gemessene Körpertemperatur lag im Mittel der C57/Bl6 Mäusen vor der Kniegelenkspräparation bei $37,5 \pm 0,8$ °C und vor Euthanasie $38,1 \pm 1$ °C. Bei den P-Selektin defizienten Tieren betrug die Temperatur zur Beginn der Präparation $37,1 \pm 1$ °C und bei Euthanasie $38,3 \pm 0,9$ °C.

Des Weiteren wurde die Herzfrequenz nur qualitativ überwacht, um gegebenenfalls die Narkose zu vertiefen.

	MAP		Temp	
Zeitpunkt	Kniepräparation	Versuchende	Kniepräparation	Versuchende
C57 mit AiA	82±5 mmHg	79±6 mmHg	37,5±0,8 °C	38,1±1 °C
P-Sel mit AiA	85±7 mmHg	78±7 mmHg	37,1±1 °C	38,3±0,9 °C

Abbildung 29: Tabellarische Darstellung des Mittleren Arteriellen Druckes (MAP) und der rektalen Temperatur (Temp.) bei Versuchsbeginn, bzw. Ende.

5.1.3 Hämodynamik und Mikromorphologie

Die Hämodynamik in der Region of Interest wurde durch Färbung des Plasmas mit FITC-Dextran untersucht. Dies ermöglichte die Erhebung der Parameter Venolendurchmesser, Flußgeschwindigkeit und Kapillardichte.

Der durchschnittliche Durchmesser der postkapillären Venolen war mit nur geringen Abweichungen bei den WT-Tieren durchschnittlich 107±39 µm und bei den P-Selektin defizienten Mäusen 276±46 µm.

Auch die Flußgeschwindigkeit der Erythrozyten, die sich nach Färbung des Plasmas mit FITC signallos darstellten, lag bei WT-Mäusen im Mittel um 0,72±0,3 mm/s und bei P-Sel defizienten Tieren um 0,64±0,2 mm/s.

Die Funktionelle Kapillardichte in der Mikrozirkulation der Synovialis war zwischen den P-Selektin defizienten Tieren und den Wildtyptieren zwar different, jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. So war die FCD in den P-Selektin Gruppen 2 und 4 276±46 cm/cm², wohingegen die C57/Bl6 Mäuse eine FCD von 311±52 cm/cm² zeigten.

Gruppe	Ø Venolen	RBC	FCD
C57 mit AiA	107±39 µm	0,72±0,3 mm/s	311±52 cm/cm ²
P-Sel mit AiA	99±71 µm	0,64±0,2 mm/s	276±46 cm/cm ²

Abbildung 30: Hämodynamische Parameter, die während der Intravitalmikroskopie erhoben wurden.

5.1.4 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion

Die markierten Thrombozyten zeigten in den intravitalmikroskopischen Aufnahmen der C57/Bl6 Tiere mit Arthritis rege Interaktion mit dem Endothel (33). In der Gruppe 2 mit P-Selektin defizienten Empfängern und Spendern, beobachteten wir eine Reduktion dieser Interaktion, die sich als statistisch signifikant bei der Fraktion rollender ($0,05 \pm 0,01$) und adhärenenten Zellen ($153,5 \pm 38,8 \text{ mm}^{-2}$) im Vergleich zur Gruppe 1 (Roller: $0,254 \pm 0,04$; Sticker: $1705 \pm 242,3 \text{ mm}^{-2}$) herausstellte.

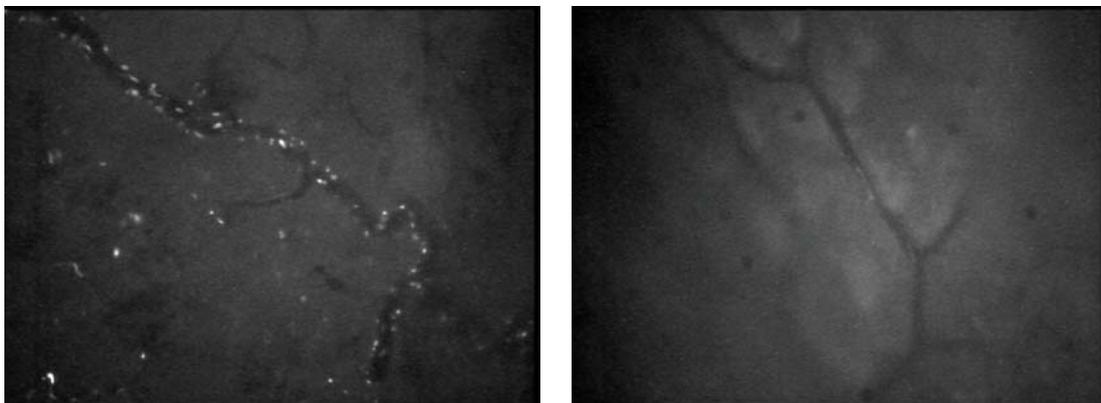


Abbildung 31: Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Mikrozirkulation der Synovialis mit angefärbten Thrombozyten. Links arthritisches Tier des C57/Bl6 Stammes. Viele adhärenente und rollende Blutplättchen. Rechts P-Selektin defizientes arthritisches Tier. Keine Interaktion der Thrombozyten mit dem Endothel.

In den Gruppen 3 und 4 wurden Empfänger- und Spendertiere aus unterschiedlichen Tierstämmen rekrutiert.

Hier war in Gruppe 3 mit den C57/Bl6 Empfängertieren und den von P-Selektin defizienten Spendern injizierten Thrombozyten, die Fraktion der rollenden Zellen $0,173 \pm 0,02$ gegenüber $0,254 \pm 0,04$ in C57/Bl6 Mäusen wiederum statistisch signifikant reduziert. Bei Beobachtung der rollenden Thrombozyten aus C57/Bl6 Spendertieren in der Mikrozirkulation der P-selektin defizienten Empfängern, war die Fraktion signifikant erniedrigt $0,122 \pm 0,02$.

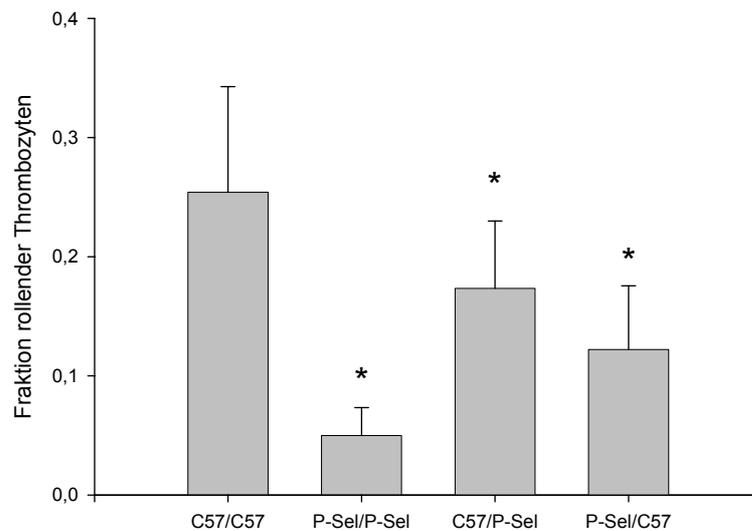


Abbildung 32: Graphische Darstellung der am Endothel rollenden Thrombozyten. In der Y-Achse die Empfänger/Spender, n=7 MW±SEM, *=p<0,05 Gruppe 4,3,2 vs 1

Ein eindeutigeres Bild zeigte sich bei den adhärenenten Zellen. Hier war die Reduktion in beiden Gruppen 3 ($807,4 \pm 198 \text{ mm}^{-2}$) und 4 ($497 \pm 58,4 \text{ mm}^{-2}$) signifikant gegenüber der Gruppe 1 ($1705,6 \pm 242,3 \text{ mm}^{-2}$). Somit kam es bei dem thrombozytären und bei dem endothelialen Versuchsaufbau zu einer signifikanten Reduktion der Interaktion der Thrombozyten mit den Endothelzellen.

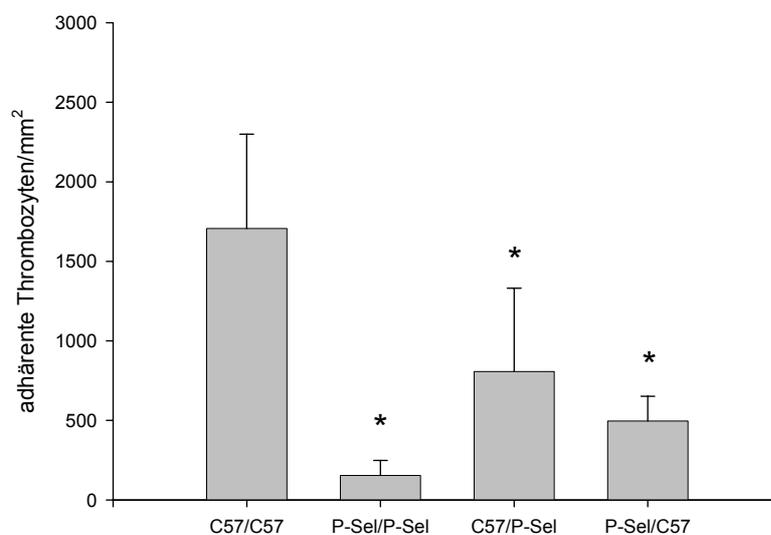


Abbildung 33: Anzahl der adhärenenten Thrombozyten pro Gefäßoberfläche. Y-Achse mit Darstellung des Empfänger/Spender, n=7 MW±SEM, *=p<0,05 Gruppe 4,3,2 vs 1

5.1.5 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die in vivo Fluoreszenzmarkierung der Leukozyten, die kein P-Selektin besitzen, erfolgte durch die intravenöse Applikation von Rhodamin 6G. Durch dieses Vorgehen ließen sich die Leukozyten in der synovialen Strombahn leicht visualisieren. In allen vier Gruppen wurde die Arthritis wie beschrieben induziert. In der ersten Versuchsgruppe war das Rollen ($0,229 \pm 0,02$) und die Adhärenz ($1667,6 \pm 222,7 \text{ mm}^{-2}$) der Leukozyten ein häufiges Phänomen, wohingegen in der Gruppe mit den P-Selektin defizienten Tieren und AiA Induktion beide Phänomene signifikant reduziert waren (Roller: $0,109 \pm 0,02$; Sticker: $266,8 \pm 42,8 \text{ mm}^{-2}$). Dieses Ergebnis deckt sich mit Vorversuchen (33).

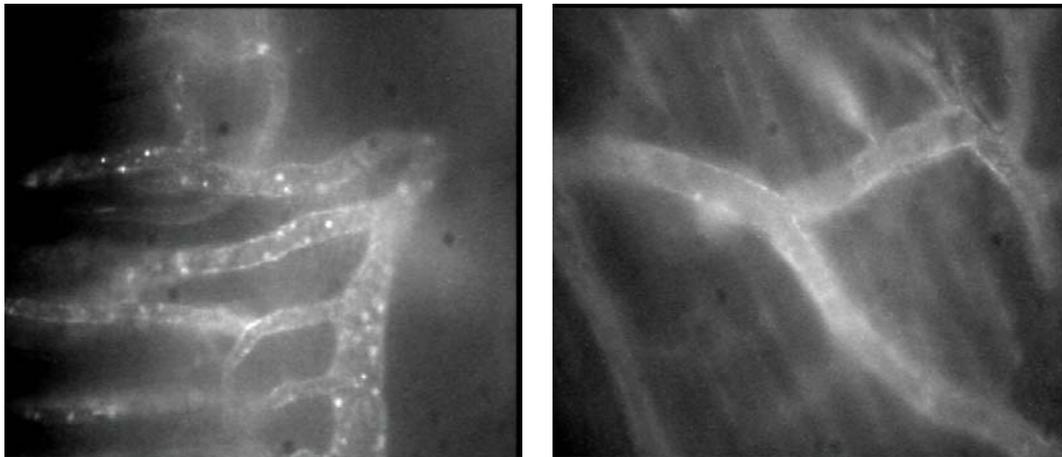


Abbildung 34: Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Mikrozirkulation der Synovialis mit angefärbten Leukozyten. Links arthritisches Tier des C57/Bl6 Stammes. Viele adhärenente und rollende weiße Blutzellen. Rechts P-Selektin defizientes arthritisches Tier. Kaum Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel.

In der Gruppe 3 ist das Empfängertier eine C57/Bl6 Maus und der Spender ein P-Selektin defizientes Tier. Die Gruppe 4 ist demgegenüber gegenteilig aufgebaut. Hier zeigte sich gegenüber den arthritischen C57/Bl6 Mäusen ($0,229 \pm 0,02$) eine Reduktion der Fraktion rollender Leukozyten bei Ausschaltung des thrombozytären ($0,190 \pm 0,02$) als auch des endothelialen P-Selektins ($0,124 \pm 0,02$), wobei die Reduktion nur beim endothelialen Versuchsaufbau signifikant war,

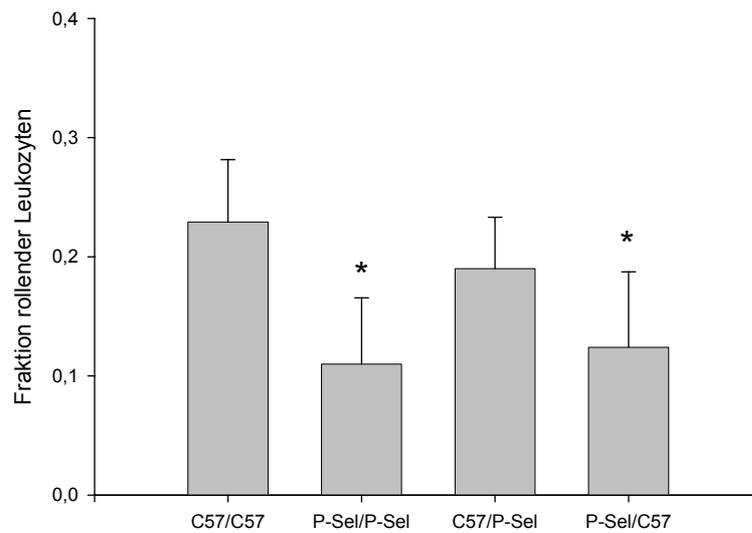


Abbildung 35: Rollende Leukozyten in den vier Versuchsgruppen. Y-Achse wiederum mit Kennzeichnung des Empfängerstammes/Spenderstammes, n=7 MW±SEM, *=p<0,05 Gruppe 4,2 vs 1

Bei den adhärenenten Leukozyten war sowohl die Reduktion bei Ausschaltung des endothelialen ($612,3 \pm 72 \text{ mm}^{-2}$), als auch des thrombozytären ($1105,1 \pm 107 \text{ mm}^{-2}$) P-Selektins signifikant im Bezug zu der Gruppe 1 ($1667,6 \pm 222,7 \text{ mm}^{-2}$).

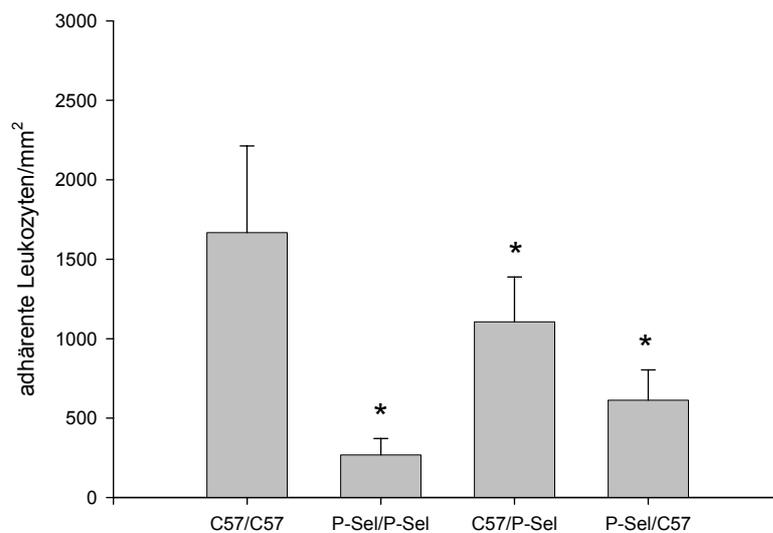


Abbildung 36: Graphische Darstellung der Adhärenz der Leukozyten in den einzelnen Versuchsgruppen. Y-Achse Empfänger/Spender, n=7 MW±SEM, *=p<0,05 Gruppe 4,3,2 vs 1

5.2 Abschnitt 2: Die Rolle von GPIIb/IIIa für die Thrombozyten und Leukozyten Endothelzell-Interaktion

Der zweite Abschnitt des Ergebnisteils stellt die für die Rolle des GPIIb/IIIa entscheidenden Daten bei der Antigen-induzierten Arthritis vor.

5.2.1 Arthritisinduktion

Während der Induktion der AiA werden die Tiere klinisch beurteilt, gewogen und der Kniegelenksdurchmesser überprüft.

Die erfolgreiche Arthritisinduktion wird an den am Ende der Versuche entnommenen Kniegelenken überprüft (59).

5.2.1.1 Spontanverhalten

Das Verhalten der Tiere in den Kontrollgruppen ohne Arthritis war zu keinem Zeitpunkt auffällig (0 Punkte). Zwei Tiere der arthritischen Gruppe, die ansonsten auch keine Auffälligkeiten zeigte, vernachlässigten ihre Körperpflege (1 Punkt).

5.2.1.2 Kniegelenksdurchmesser

Der Kniegelenksdurchmesser wurde zu den oben erwähnten Zeiten eruiert. Nach der Injektion des mBSA bzw. NaCl in das Kniegelenk ergab sich in beiden Gruppen eine Erhöhung des Durchmessers. Zu den darauf folgenden Meßzeitpunkten ergab sich ein signifikant höherer Kniegelenksdurchmesser bei den Tieren mit Arthritis im Gegensatz zu den gesunden Kontrolltieren.

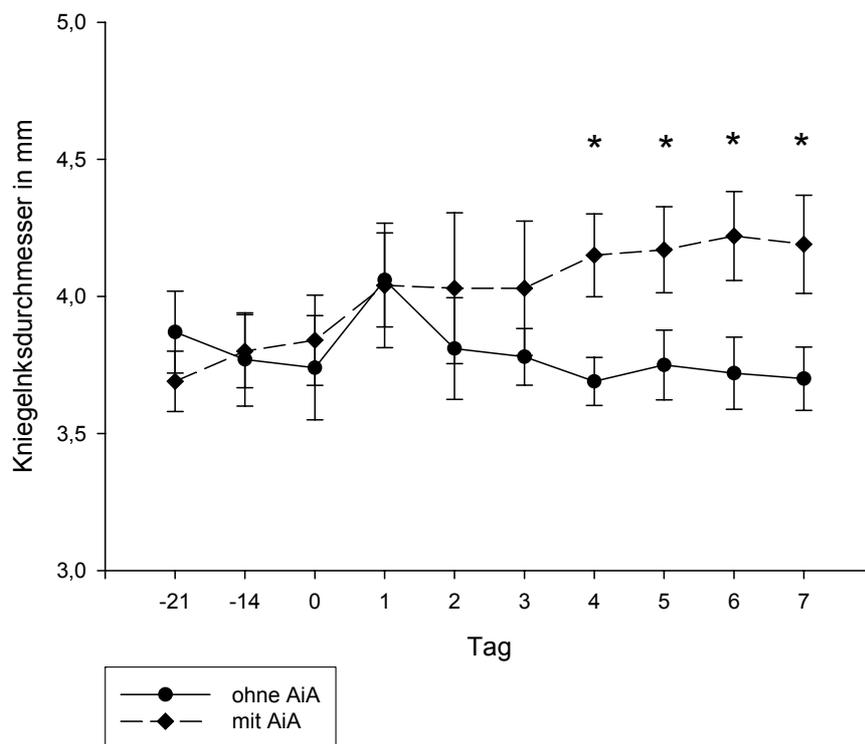


Abbildung 37: Entwicklung des Kniegelenksdurchmessers. Schwarze durchgehende Linie: Tiere ohne Induktion der Arthritis. Gestrichelte Linie: Tiere mit induzierter Arthritis. $n = 14$, $MW \pm SEM$, $p < 0,05$

5.2.1.3 Körpergewicht

Das Körpergewicht der Tiere betrug am Tag der IVM durchschnittlich $20 \pm 0,4$ g und unterschied sich zwischen den gesunden Kontrollgruppen und den arthritischen Tieren im Mittel nicht.

5.2.1.4 Histologie

Nach dem Abschluß der Versuche wurden die Kniegelenke wie bereits beschrieben, bei -80°C eingefroren und später fixiert.

Die Einteilung der Arthritisstadien erfolgte nach Brackertz und zeigte bei keinem Tier der Kontrollgruppen arthritische Veränderungen (59). Im Gegensatz dazu konnten bei der AiA-Gruppe mindestens Leukozyteninfiltration und im Durchschnitt eine Hyperplasie des Synoviums nachgewiesen werden.

Gruppe	0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	4 Punkte
ohne AiA	14	0	0	0	0
mit AiA	0	2	4	6	2

Abbildung 38: Histologischen Auswertung nach Brackertz. 0 = Normales Kniegelenk, 1 = Normales Synovium mit vereinzelt mononukleären Zellen, 2 = Zwei und mehr synovialen Zellschichten und perivaskuläre Infiltrate von Leukozyten, 3 = Hyperplasie des Synoviums und dichte Infiltration, 4 = Synovitis, Pannusbildung und Knorpel- bzw. Knochenerosion.

5.2.2 Intraoperative Parameter

Die Vitalparameter mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz und Körpertemperatur wurden intraoperativ überwacht.

Über die gesamte Versuchsdauer war der mittlere arterielle Druck der C57/Bl6 Mäuse ohne AiA konstant und betrug vor der Kniegelenkspräparation bei 84 ± 3 mmHg und vor Euthanasie 81 ± 5 mmHg. Der MAP der C57/Bl6 Tiere mit AiA lag zu Versuchbeginn bei 85 ± 7 mmHg und bei Versuchende bei 78 ± 7 mmHg.

Die Körpertemperatur wurde rektal gemessene und lag vor der Kniegelenkspräparation bei den Tieren ohne AiA bei $37,5 \pm 0,7$ °C und bei den Mäusen mit AiA bei $36,6 \pm 0,8$ °C. Bei Versuchende vor der Euthanasie, lag die rektale Temperatur der gesunden Tiere bei $38,4 \pm 0,7$ °C und die Temperatur der arthritischen Tiere bei $38,3 \pm 1$ °C.

Die Herzfrequenz wurde nur qualitativ überwacht, um gegebenenfalls die Narkose zu vertiefen.

	MAP		Temp	
Zeitpunkt	Kniepräparation	Versuchende	Kniepräparation	Versuchende
C57	84±3 mmHg	81±5 mmHg	37,5±0,7 °C	38,4±0,7 °C
C57 mit AiA	85±7 mmHg	78±7 mmHg	36,6±0,8 °C	38,3±1°C

Abbildung 39: Intraoperativ erhobene Parameter. Mittlerer arterieller Druck (MAP) und Körpertemperatur (Temp.)

5.2.3 Hämodynamik und Mikromorphologie

Die Hämodynamik der beurteilten Mikrozirkulation wurde durch die Anfärbung des Plasmas mit FITC-Dextran untersucht. Hieraus konnten die Parameter Venolendurchmesser, Flußgeschwindigkeit und Kapillardichte eruiert werden.

Der durchschnittliche Durchmesser der postkapillären Venolen war in gesunden Tieren $114\pm 41\mu\text{m}$ und in arthritischen Mäusen $124\pm 26\mu\text{m}$.

Auch die Flußgeschwindigkeit der Erythrozyten, die sich bei Anfärbung des Plasmas signallos darstellten, war unabhängig von der Arthritisinduktion. Sie betrug bei den Kontrolltieren $0,55\pm 0,3\text{ mm/s}$ und bei den AiA-Mäusen $0,52\pm 0,7$.

Die Funktionelle Kapillardichte der untersuchten ROIs war zwischen den Tieren ohne Arthritisinduktion und den arthritischen Versuchstieren different. So war in den gesunden Kontrollgruppen 1 und 2 die FCD $232\pm 41\text{ cm/cm}^2$, wohingegen die arthritischen Mäuse eine FCD von $342\pm 36\text{ cm/cm}^2$ zeigten.

Gruppe	Ø Venolen	RBC	FCD
Kontrolle	114±14	0,55±0,3	232±41
AiA	124±26	0,52±0,7	342±36*

Abbildung 40: Hämodynamische Parameter und morphologische Veränderungen in der Intravitalmikroskopie. n=14, MW±SEM, *=p<0,05

5.2.4 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion

Wie bereits in dem Abschnitt Versuchsaufbau beschrieben, wurde in diesen Versuchen dem Spendertier und dem Empfängertier 30 min vor Beginn der Intervention verblindet Tirofiban oder NaCl injiziert. Die Spenderthrombozyten wurden mit CFDA markiert, intravitalmikroskopisch visualisiert, quantifiziert und offline ausgewertet.

Die Thrombozyten zeigten in den Kontrollgruppen 1 und 2, die aus C57/Bl6 Tieren ohne Antigen-induzierte-Arthritis bestanden, nur minimale Interaktion mit dem Endothel. Rollende oder adhärenente Thrombozyten waren ein sehr seltenes Phänomen. Die Fraktion der rollenden Thrombozyten war bei den mit NaCl behandelten Mäusen $0,066 \pm 0,01$ und bei den Tieren mit Tirofiban-Injektion $0,048 \pm 0,01$. Die Tiere mit Injektion der Kochsalzlösung zeigten bei den an der Gefäßwand haftenden Zellen eine Anzahl von $189,7 \pm 40,1 \text{ mm}^{-2}$. Durch Behandlung mit Tirofiban ergab sich eine Anzahl adhärenenter Thrombozyten von $148,9 \pm 24,7 \text{ mm}^{-2}$.

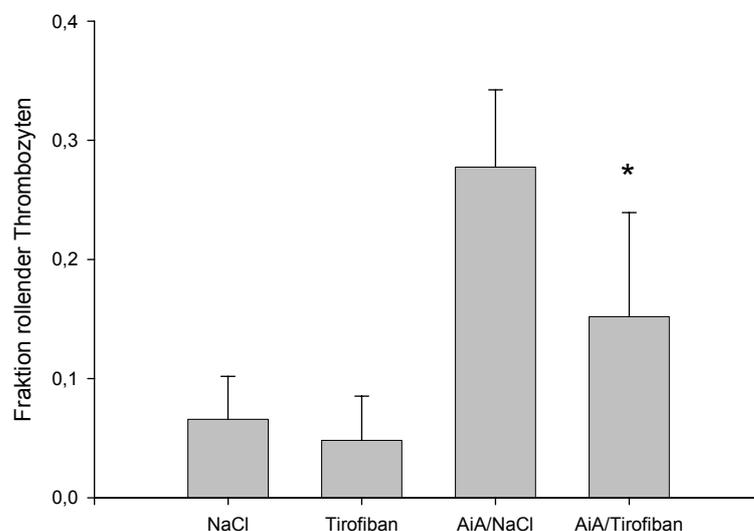


Abbildung 41: Fraktion der rollenden Thrombozyten. Gruppen 1 und 2 ohne AiA, arthritische Gruppen 3 und 4. n=7, MW±SEM, *=p<0,05 Gruppe 4 vs 3

In der arthritischen Gruppe 3, die aus C57/Bl6 Tieren mit Arthritis bestand und die nicht mit Tirofiban behandelt wurden, zeigte sich die stärkste Erhöhung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion (Roller: $0,277 \pm 0,02$; Sticker: $1809,1 \pm 239,3 \text{ mm}^{-2}$) gegenüber den Kontrollgruppen 1 und 2.

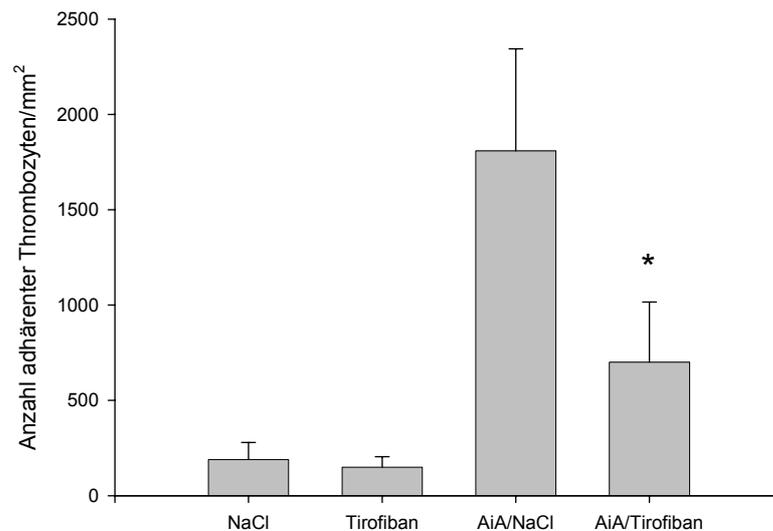


Abbildung 42: Graphische Darstellung der Ergebnisse bei den adhärennten Thrombozyten. Gesunde Kontrollgruppen 1 und 2. Arthritische Tiere Gruppen 3 und 4. n=7, MW±SEM, *=p<0,05 Gruppe 4 vs 3

In der arthritischen Gruppe, in der das GPIIb/IIIa selektiv antagonisiert wurde, war die Fraktion der rollenden Thrombozyten ($0,152 \pm 0,03$) signifikant gegenüber der arthritischen Gruppe mit NaCl-Behandlung erniedrigt ($0,277 \pm 0,02$).

Signifikant war auch der Vergleich zwischen der Adhärenz der Thrombozyten an dem Endothel in den beiden Gruppen. So waren die Sticker in der Gruppe 3 mit Injektion von NaCl ($1809 \pm 239,3 \text{ mm}^{-2}$) signifikant höher als in der mit Tirofiban behandelten Gruppe 4 ($700,6 \pm 140,9 \text{ mm}^{-2}$).

5.2.5 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Der GPIIb/IIIa Rezeptors wird, wie bereits erwähnt, nur von Thrombozyten exprimiert, jedoch war in den Gruppen 2 und 4, die mit Tirofiban behandelt wurden, auch die Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel reduziert.

In der NaCL-Kontrollgruppe zeigte sich wiederum eine geringe Interaktion zwischen den Leukozyten und Endothelzellen (Roller: $0,098 \pm 0,13$; Sticker: $551,3 \pm 148 \text{ mm}^{-2}$). Die Tiere in der mit Tirofiban behandelten Gruppe wiesen eine Fraktion rollender

Leukozyten von $0,088 \pm 0,02$ und eine Anzahl adhärenter weißer Blutzellen von $392,1 \pm 74,3 \text{ mm}^{-2}$ auf.

Die Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel war qualitativ vergleichbar mit der Interaktion der Thrombozyten und dem Endothel. Quantitativ waren jedoch in der arthritischen Gruppe die Reduktion des Rollens und der Adhärenz durch Tirofiban geringer als bei den Thrombozyten.

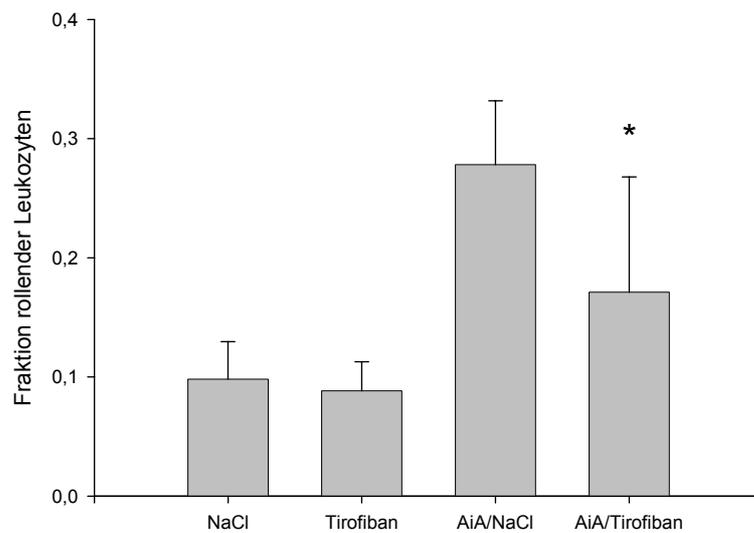


Abbildung 43: Fraktion der am Endothel entlang rollenden Leukozyten. Wiederum bestehen die Gruppe 1 und 2 aus gesunden Tieren, die Tiere in Gruppe 3 und 4 aus Arthritischen. $n=7$, $MW \pm SEM$, $*=p < 0,05$ Gruppe 4 vs 3

So waren in dieser Gruppe durch Hemmung der Thrombozyten die rollenden Leukozyten signifikant gegenüber den mit NaCl behandelten arthritischen Tieren ($0,278 \pm 0,02$) reduziert ($0,171 \pm 0,04$). Die Adhärenz der Leukozyten war in der mit Tirofiban therapierten Gruppe ($945,1 \pm 168 \text{ mm}^{-2}$) gegenüber den nur mit NaCl behandelten arthritischen Mäusen ($1491,8 \pm 283,5 \text{ mm}^{-2}$) signifikant erniedrigt.

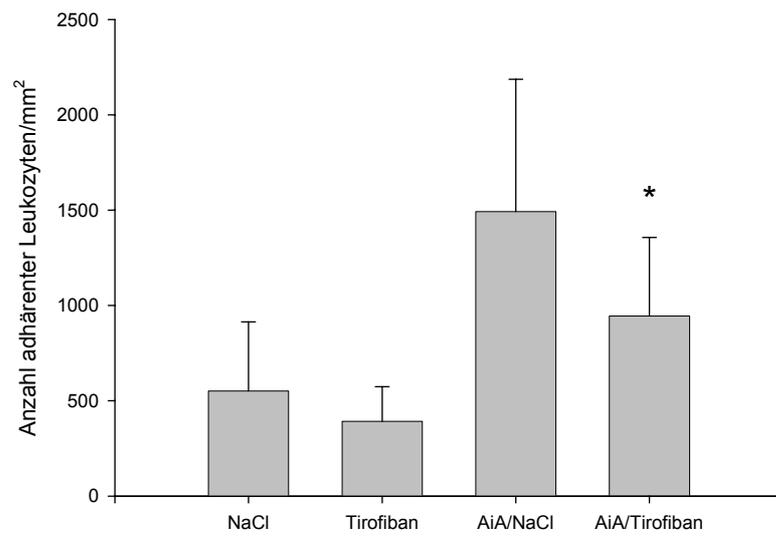


Abbildung 44: In den Gruppen 1 und 2 Darstellung der adhärenter Leukozyten bei gesunden Tieren. In den Gruppen 3 und 4 arthritische Tiere. n=7, MW±SEM, *=p<0,05 Gruppe 4 vs 3

6 Kritische Darstellung der Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext eingebettet und kritisch diskutiert.

6.1 Stand der Forschung

Die Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises umfassen eine Vielzahl verschiedener Krankheiten, deren Gemeinsamkeit die Manifestation am Stütz- und Bindegewebe des Bewegungsapparates ist. Die verschiedenen befallenen Gewebe entstehen allesamt dem Mesoderm.

Grundsätzlich kommt es zu einer Entzündung des entsprechenden Gewebes mit Freisetzung verschiedener lytischer Enzyme, die dann konsekutiv zu einer Destruktion angrenzender Gewebe führt.

Dieser inflammatorische Prozeß beginnt auf der Ebene der Mikrozirkulation. Hierbei kommt es zur Aktivierung verschiedener Adhäsionsmoleküle und Botenstoffe, die Leukozyten anlocken und weitere Endothelbereiche aktivieren (1;7;70). Insbesondere Granulozyten werden als zentral verantwortlich für den Gewebeschaden in der entzündlich veränderten Mikrozirkulation angesehen (34;71;72). Auch der Einfluß von Endothelzellen ist vielfach charakterisiert worden (73;74). Jedoch werden auch Thrombozyten in der entzündlich aktivierten Mikrozirkulation rekrutiert und aktiviert (17;21;27). In vielen Erkrankungen, denen eine Entzündung pathognomisch zu Grunde liegt, konnte ihre Beteiligung gezeigt werden (8;75-77).

Auch bei den rheumatischen Erkrankungen gibt es erste Hinweise auf die pathophysiologische Rolle von Thrombozyten bei deren Entstehung. So konnte bei Rheumatoider Arthritis gezeigt werden, daß es zu einem Anstieg der Thrombozyten-Leukozyten-Komplexe kommt und daß die Inhibition von PAF die klinischen Symptome reduziert (31;32). Weiterhin konnten ex vivo Anhaltspunkte für die schädigende Wirkung der Blutplättchen gefunden werden (78;79). Auch bei Patienten mit Arth-

ritis konnte erhöhte Thrombozytenaktivierung im entzündeten Gewebe verifiziert werden (80;81). In diesem Zusammenhang konnte bei arthritischen Mäusen eine starke Erhöhung der Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten mit dem Endothel im Vergleich zu gesunden Tieren nachgewiesen werden (33).

Thrombozyten sind die erste Zellpopulation, die die Gewebsaffektion erreicht. Phylogenetisch gehören sie zu den ältesten Blutbestandteilen und zeigen in anderen Organismen Potenz zur unspezifischen Abwehr. Des Weiteren besitzen sie Botenstoffe und Adhäsionsmoleküle zur Anlockung und Einbindung anderer Zellarten.

Über die zu Grunde liegenden Mechanismen und die Kinetik der Thrombozytenaktivierung sowie deren Einflußnahme auf die Inflammation ist jedoch bisher nur wenig bekannt.

6.2 Zielsetzung

Für die Interaktion der Thrombozyten und Leukozyten mit dem Endothel sind verschiedene Gruppen, wie Selektine für das Rollen, Integrine für die Adhärenz und die Ig-Superfamilie für die Transmigration verantwortlich. Aus diesem Grund haben wir uns für die nähere Charakterisierung der Thrombozyten, die ja nicht transmigrieren können, mit dem Selektin P-Selektin und dem Integrin GPIIb/IIIa, für die quantitativ und qualitativ herausragende Moleküle entschieden.

Das den Versuchen zu Grunde liegende Konzept der Entstehung und Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung bei Rheumatoider Arthritis, schlägt den Thrombozyten die initiale Rolle zu.

Bei diesem Prozeß treffen als erste Zellpopulation die Thrombozyten im Bereich der Gewebsaffektion ein und interagieren mit dem Endothel, wodurch zytotoxische Moleküle und chemotaktische Faktoren freigesetzt und weitere immunkompetente Zellen angelockt werden. Die adhärennten Thrombozyten bilden dann für diese folgenden immunpotenten Zellen die Matrix für deren Anlagerung.

Daher war die Zielsetzung des Versuchsvorhabens, in vivo diese Interaktion des Endothels mit den Leukozyten und Thrombozyten in der arthritischen synovialen Mikrozirkulation und die an der Regulation mitwirkenden Moleküle näher zu charakterisieren.

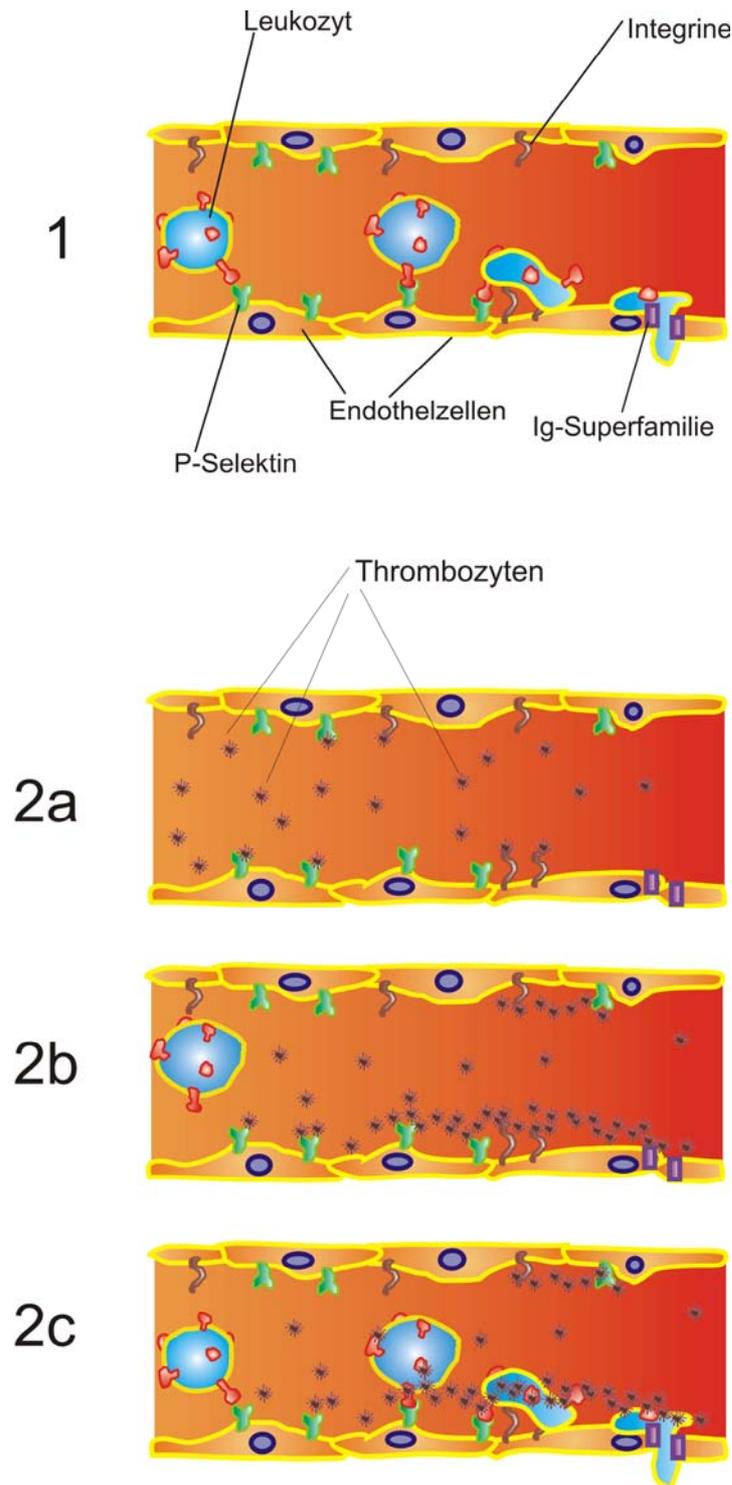


Abbildung 45: Schematische Illustration der Interaktion von Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen. In Bild 1 Transmigration der Leukozyten mit Ausblendung der Funktion von Thrombozyten. Die Thrombozyten sind die ersten Zellen, die die Irritation des Gefäßendothels erreichen (Bild 2a). Initial kommt es zur Adhäsion der Thrombozyten durch P-Selektin (Rollen). Dies wird durch die Interaktion mit dem GPIIb/IIIa Rezeptor stabilisiert (Bild 2b). Die Thrombozyten bilden die Matrix für die Anlagerung der Leukozyten im Bereich des Gefäßschadens (Bild 3c).

6.3 Das Modell

Das beschriebene Tiermodell erlaubt uns durch die Intravitalmikroskopie die Visualisierung, Quantifizierung und Charakterisierung der synovialen Mikrozirkulation im Kniegelenk der Maus *in vivo*. Die hierzu notwendige mikrochirurgische Präparation des Kniegelenkes mit Durchtrennung der Patellasehne ist ohne großes chirurgisches Trauma durchzuführen. Die Antigen-induzierte Arthritis ist ein etabliertes Modell zur Induktion arthritischer Veränderungen im Kniegelenk der Maus. Die Datenerhebung und die statistische Auswertung sind in der Arbeitsgruppe langjährig bekannt.

6.3.1 Die Antigen-induzierte Arthritis der Maus

Zur Auslösung der arthritischen Veränderungen in unseren Versuchen, wird das Modell der Antigen-induzierten Arthritis der Maus verwendet. Dieses Modell, welches auf die Reaktion auf bovines Albumin beruht, wurde initial am Kaninchen etabliert und beschrieben (82). Brackertz transferierte dieses Modell auf die Maus und untersuchte die Arthritischen Veränderungen eingehend (59;83;84).

Neben diesem Modell der Antigen-induzierten Arthritis existieren noch einige andere Modelle zur Untersuchung der Pathogenese der Arthritis. Neben der spontanen Arthritis bei Genveränderungen (85), der Adjuvants-Arthritis (86) und der Bakeriten-Zellwand-Arthritis (87), ist die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) ein umfangreich durchgeführtes Forschungsprojekt (88). Die CIA wird durch chronische Antigenfreisetzung durch autoreaktive T-Zellen hervorgerufen und in ihrem Verlauf kommt es zu umfangreichen systemischen Veränderungen. Ein weiterer Nachteil ist der nicht wie bei der AiA stabil auftretende Kniegelenksbefall, und im weit überwiegenden Teil der Versuche mit CIA werden nur die Pfoten der Tiere arthritisch, die jedoch der IVM nicht zugänglich sind. Des Weiteren sind bei der Pathogenese der AiA, ebenso wie bei der Rheumatoiden Arthritis, T-B Lymphozyten beteiligt und die AiA ist im Gegensatz zur CIA bei allen Wildstämmen induzierbar (84).

Da systemische Symptome selten sind, der Kniegelenksdurchmesser einfach zu beurteilen ist und die histologische Untersuchung eine hohe Selektivität und Sensitivität besitzt, ist dieses Modell auch einfach zu überwachen.

6.3.2 Die chirurgische Präparation

Die Voraussetzungen für in vivo Experimente in Tiermodellen ist die fortbestehende Unversehrtheit physiologischer Bedingungen.

Zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Synovialis ist jedoch die Positionierung des IVM unterhalb von ca. 1000 μm über der Mikrozirkulation der Synovialis unabdingbar. Hierfür ist die Eröffnung des Fells, der Epidermis und der Durchtrennung der Patellasehne unumgänglich. Jedoch ist die Synovialis nicht mit der Patellasehne, die extraartikulär liegt, verwachsen und somit ist ein Trauma der Synovialis umgänglich.

Für dieses nur geringe Trauma der Synovialis und ohne Aktivierung des Endothels und damit der Mikrozirkulation spricht auch das nahezu ausbleibende Rollen und die fast fehlende Adhärenz der Leukozyten am Endothel, sowie die Stabilität der mikrozirkulatorischen Parameter in den untersuchten nicht-arthritischen Kontrolltieren.

6.3.3 Die Intravitalmikroskopie

Die IVM bietet die Möglichkeit der in vivo Analyse mikrozirkulatorischer Parameter, sie ist am Institut für Chirurgische Forschung essentiell mitentwickelt worden und wird von vielen Arbeitsgruppen verwendet. In den letzten Jahren konnten viele herausragende Erkenntnisse über die Pathogenese verschiedener Erkrankungen gewonnen werden. Unter diesen Organsystemen befinden sich unter anderem das Gehirn (89), die Leber (90), die Lunge (91), das Herz (68), der Darm (92) und Tumoren der Rückenhautkammer (93).

Hierbei kommen unterschiedliche Fluoreszenzmarker, die die Quantifizierung und Charakterisierung verschiedener Zellen ermöglichen, zum Einsatz und außerdem ermöglicht sie die Analyse verschiedener pathognomischer Gefäßcharakteristika in vivo. Auch im Mausmodell ist der Zugang einfach, ohne großes Trauma und somit ohne Einfluß auf die IVM durchführbar.

Somit läßt sich zusammenfassen, daß die IVM als etabliertes Werkzeug zur Untersuchung von Vorgängen in vivo ein verifiziertes und gut durchführbares Modell darstellt.

6.3.4 Verwendung der Maus

Im Folgenden möchte ich die Überlegungen, die der Entscheidung die Maus als Versuchstier zu wählen zu Grunde liegen, näher darstellen.

Zum einen ist das Kniegelenk der Maus mikrochirurgisch einfach zugänglich und zum anderen ähnelt die AiA der Maus der Rheumatoiden Arthritis des Menschen. Ein weiterer Grund ist das Volumen und die Zusammensetzung der Synovialis der Maus.

Des Weiteren ist die Maus in der Haltung ein anspruchsloses Tier, durch die kurze Generationszeit sehr flexibel und außerdem sind für kein anderes Tier ähnlich viele Antikörper verfügbar. Zusätzlich stehen im Gegensatz zu der Ratte viele Knockout Tiere, die die Beobachtung einzelner Botenstoffe oder Adhäsionsmoleküle ermöglichen, zur Verfügung.

6.3.5 Fluoreszenzmarkierung

Die Fluoreszenzmarkierung verschiedener Zellen und Stoffe wird in zahlreichen Untersuchungen verschiedener Gewebe und Organe in und ex vivo eingesetzt. Hierbei ist von grundlegender Bedeutung, daß diese Stoffe möglichst selektiv das gewünschte Ziel anfärben und daß diese Anfärbung ein spezifisches, gut meßbares Emis-

onsmaximum besitzt. Des Weiteren ist bei in vivo Versuchen zu berücksichtigen, daß die Toxizität möglichst gering ausfällt.

Durch die unterschiedlichen Emissionsmaxima und der Verwendung stark differierender Filter, ist eine Fehlinterpretation der Zugehörigkeit zwischen Thrombozyten und Leukozyten weitestgehend ausgeschlossen.

Jedoch muß zur Darstellung der FITC-Färbung des Plasmas wieder der Thrombozyten-Filter verwendet werden, wobei jedoch nur die RBC und die FCD bestimmt werden. Hierbei werden die Meßergebnisse durch das Mitzählen der Thrombozyten nicht verändert.

Für die Markierung der Leukozyten wird der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G verwendet. Die Intravitalmikroskopie dauert maximal 60 min, wobei initial nach der Injektion der einzelnen Farbstoffe die relevanten Parameter erhoben werden. Bei Injektion der von uns benutzten Dosis, sind noch nach 60 min 99,6% aller Granulozyten gefärbt (63). Rhodamin hemmt erst bei einer mehr als 100fach höheren Dosis die oxidative Phosphorylierung der Mitochondrien und auch die Phototoxische Wirkung ist auszuschließen (94;95).

Auch FITC hat keine Phototoxizität gezeigt, der Farbstoff FITC gilt als biologisch unbedenklich und am St. Patrick's Day wird das Fluorescein benutzt um den Chicago River grün zu färben (95).

Das zur Anfärbung der Thrombozyten herangezogene CFDA basiert wie das FITC auf dem Farbstoff Fluorescein und auch hier konnte in umfangreichen vorhergehenden Studien keine Toxizität bei der angewandten Dosierung bzw. Versuchszeit nachgewiesen werden (96).

Für diese Annahme sprechen auch die Ergebnisse der Versuche im Bezug auf die Stabilität der Parameter über den Zeitraum des Versuches. So kann keine signifikanten Änderungen in Hinsicht der Parameter Blutdruck, Herzfrequenz und Erythrozytenflußgeschwindigkeit bei Injektion der Farbstoffe gegenüber NaCl-Injektionen gemessen werden. Des Weiteren ist das Rollen und die Adhärenz in den gesunden Versuchstieren erniedrigt und hat sich auch über die Zeit nach Injektion der Fluoreszenzmarkierungen nicht vergrößert.

6.3.6 Thrombozytenseparation

Derzeit ist kein selektiver in vivo Fluoreszenzmarker für Thrombozyten bekannt. Daher werden die Thrombozyten ex-vivo markiert.

Wie bereits dargestellt werden die Blutplättchen im Vollblut einem Spendertier entnommen, separiert, markiert und refundiert. Bei diesem Vorgehen wären eine Aktivierung der Thrombozyten und damit eine Verfälschung unserer Ergebnisse denkbar.

Ein Marker für die Aktivierung der Thrombozyten ist die Expression von P-Selektin an der Oberfläche (97). Es konnte bei C57/Bl6 Tieren kein Unterschied in der Expression von P-Selektin auf Thrombozyten im Vollblut oder nach Separation festgestellt werden. Auch nach Inkubation mit Thrombin zeigte sich kein Unterschied zwischen den separierten Thrombozyten und denen im Vollblut. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen im Institut für Chirurgische Forschung (92;98-100).

Auch die Tatsache, daß sich in den gesunden Kontrolltieren nur sehr wenige Interaktionen zwischen dem Endothel und den separierten Thrombozyten finden, spricht gegen eine relevante Aktivierung.

6.4 Abschnitt 1: Einfluß von thrombozytären bzw. endothelialen P-Selektin auf die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Hier sollen die Ergebnisse des ersten Abschnittes der Studie im Bezug auf die Rolle des P-Selektins bewertet werden.

6.4.1 Einbettung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Hintergrund

Bei der Antigen-induzierten Arthritis kommt es zu einem inflammatorischen Prozeß auf der Ebene der synovialen Mikrozirkulation. Diese Änderungen gehen mit einer Neoangiogenese und der Einwanderung von Leukozyten einher, die wiederum für den entstehenden Gewebeschaden verantwortlich gemacht werden (57;101).

Der schädigende Effekt durch die Aktivierung und Einwanderung von Leukozyten, insbesondere der polymorphkernigen Neutrophilen (PMN), konnte bei Arthritis bereits gezeigt werden (102-104). Auf molekularer Basis wurden einige von Leukozyten freigesetzte Stoffe als besonders gewebeschädigend identifiziert (105-109). Ebenso konnte durch Hemmung von PMNs die Ausprägung der arthritischen Veränderungen reduziert werden (104;110;111). Dies legt nahe, daß zwischen der Einwanderung und Akkumulation von PMNs und dem entstehenden Gewebeschaden ein kausaler Zusammenhang besteht.

Die Adhäsion und die folgende Transmigration der Leukozyten erfolgt über drei Schritte. Im ersten Schritt kommt es zu einer lockeren Bindung und Aktivierung der Leukozyten (Rollens). Hieraus erfolgt die feste Bindung an das Endothel, die so genannte Leukozytenadhärenz, die wiederum Voraussetzung für die Durchwanderung der Leukozyten durch das Endothel ist. Das initiale Rollen der Leukozyten an der

Endothelzelle vermitteln die Selektine, die mit Glykoproteinen auf der Partnerzelle korrespondieren (112;113).

L-Selektin liegt auf der Oberfläche zirkulierender Leukozyten vor und vermittelt den initialen Kontakt mit dem Endothel, wodurch es zu einer weiteren Aktivierung der PMNs kommt in dessen Verlauf das L-Selektin von der Oberfläche wieder verschwindet (114;115).

Das vergleichbare Gegenstück ist das E-Selektin auf Endothelzellen. Dies wird jedoch nicht konsekutiv exprimiert, sondern wird erst nach der Aktivierung der Endothelzelle neu synthetisiert und spielt somit bei der von uns untersuchten Interaktion nur eine untergeordnete Rolle (116).

P-Selektin kommt sowohl auf den Endothelzellen, als auch auf den Thrombozyten vor und kann innerhalb von Sekunden nach Stimulation z.B. durch Thrombin aus den α -Granula mobilisiert werden (97).

Die Hemmung von P-Selektin bei Inflammation und Ischämie/Reperfusion zeigte einen protektiven Charakter in Bezug auf den Gewebeschaden (92;100;117). Somit ist anzunehmen, daß dieser erste Kontakt und die folgende Aktivierung zu der Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren führt, die wiederum die Adhärenz bedingt (118;119). Dieser kausale Zusammenhang zwischen Rolling und Adhärenz wird auch durch die Beobachtung untermauert, daß die Inhibition des Rollens auch zu einer Reduktion der Adhärenz führt (120;121).

Diese Ergebnisse und unsere Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung der Selektine für die Leukozytenrekrutierung bei Störung der Mikrozirkulation und der daraus entstehenden Gewebeschäden.

6.4.2 Einfluß von P-Selektin auf die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals dargestellt werden, daß die Interaktion von Thrombozyten und Endothelzellen vom thrombozytären und endothelialen P-Selektin vermittelt wird. In P-Selektin defizienten arthritischen Tieren ist das Rollen und die Adhärenz gegenüber Wildtyptieren mit AiA signifikant reduziert.

Diese Ergebnisse stimmen mit der Rolle von P-Selektin in anderen Erkrankungsmodellen, wie z.B., daß P-selektin-Defizienz gegen I/R-Schaden in Leber, Herz und Darm sowie Leukozyteninvasion schützt, überein (92;100;122;123).

Hingegen wurde in dem Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) berichtet, daß durch die Abwesenheit von P-Selektin der Krankheitsverlauf der Arthritis beschleunigt wird (124). Die P-Selektin defizienten Tiere, die in dieser Studie benutzt werden, gehören dem 129/Sv Stamm an, jedoch waren diese Tiere E/P-Selektin Knockouts, also keine reinen P-Selektin defiziente Tiere. Außerdem kommt es in dem CIA Modell zu einer generalisierten Entzündungsreaktion, da Kollagen II nicht komplett gelenkspezifische Antikörper induziert (125).

Als Ligand für P-Selektin bei der Interaktion von Thrombozyten und Endothelzellen, kommt der häufig beschriebene und auf Leukozyten und Thrombozyten zu findende P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) in Frage (126;127). Auch der Rezeptor Lewis^x ist ein Ligand des P-Selektins und seine Fähigkeit auch L- und E-Selektin zu binden macht ihn zu einem interessanten Kandidaten für die Bildung von Komplexen aus Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen (128). Somit könnte die von den Daten dieser Studie gestützte Vermutung, daß Thrombozyten initial an das Endothel binden und die Akkumulation von Leukozyten und den daraus folgenden Gewebeschaden initiieren, ein zusätzlich zu dem direkten Schaden durch thrombozytäre proinflammatorische Mediatoren und Sauerstoffradikalen auftretender Effekt sein (27;129;130).

Diese intravitalmikroskopisch gewonnenen Ergebnisse werden auch durch die durchgeführten histologischen Versuche getragen, da diese in den arthritischen P-Selektin defizienten Tieren nur milde morphologische Veränderungen zeigt.

Diese Annahme unterstützen auch die Versuche, in denen die Empfänger- und Spendertiere aus unterschiedlichen Stämmen bestehen. Hier ist sowohl, wenn das Endothel P-Selektin defizient und die Thrombozyten P-Selektin potent sind, als auch im umgekehrten Fall, jeweils die Leukozyten Interaktion mit dem Endothel gegenüber den Wildtyp-Emfängern und –Spendern (WT-E und WT-S) reduziert.

Hier zeigte sich, daß durch Injektion der Wildtyp-Thrombozyten in P-Selektin defiziente arthritische Empfängertiere, die Interaktion der Thrombozyten und der Leukozyten mit dem Endothel verglichen mit arthritischen P-Selektin defizienten Spender- und Empfängertieren (Abschnitt 1; Versuchsgruppe 2) ansteigt. Im Gegensatz dazu kann durch Injektion von P-Selektin defizienten Thrombozyten in Wildtyp-Tiere mit AiA die Interaktion der Thrombozyten und der Leukozyten mit dem Endothel gegenüber arthritischen WT-S und WT-E (Abschnitt 1; Versuchsgruppe 1) reduziert werden.

Hierbei ist zu berücksichtigen, daß nur höchstens 20% der Thrombozyten P-Selektin positiv sind, da im Empfängertier eigene P-Selektin defiziente Thrombozyten zirkulieren. Zieht man nun die Erhöhung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bei P-Sel defizienten arthritischen Tieren mit Injektion von WT-Thrombozyten heran, zeigt sich auch hier bei den adhärennten Leukozyten eine Verdoppelung durch die Injektion von WT-Thrombozyten zu den im Empfängertier zirkulierenden eigenen Thrombozyten.

Diese starken Effekte könnten von einer vorangegangenen Hochregulierung alternativer Signalwege durch das Fehlen von P-Selektin herrühren. Dafür kommen vor allen Dingen die schon erwähnten Selektine L und E, sowie die vom Endothel und den Thrombozyten ausgeschütteten Signalstoffe in Frage. Diese könnten eine hoch reagible Situation am entzündeten Endothel schaffen, die durch Zufügen von P-Selektin potenten Thrombozyten zu einer zusätzlichen Reaktivierung des P-Selektin-Signalweges führt. Bei Zugabe von P-Selektin defizienten Thrombozyten zu einem Wildtypier, kommt es im Gegensatz dazu zu einer Verdrängung der P-Selektin-potenten Thrombozyten aus der Thrombozyten-Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Da hieraus resultiert, daß die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion verringert wird, ist davon auszugehen, daß schon eine geringe Reduktion der Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion zu einer Verminderung des schädlichen Einflusses der Leukozyten führt. Die aus dem Versuchsaufbau resultierende Beobachtung eines kurz-

zeitigen Ereignisses ist besonders zu berücksichtigen, da die vorher erwähnten alternativen Signalwege zeitlich erst später aktiviert werden.

Somit scheint die Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel von der Aktivierung der Thrombozyten teilweise abhängig zu sein.

6.4.3 Schlußfolgerung

Damit ist für die Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel nicht nur allein das endotheliale verantwortlich, sondern auch das thrombozytäre P-Selektin.

Dies ist um so bedeutender, da wegen der starken Nebenwirkungen kein P-Selektin Antagonist beim Menschen zugelassen ist. Daher könnte durch selektive Hemmung der Thrombozyten deren Aktivierung reduziert werden, wodurch auch die Mobilisation des P-Selektins an die Thrombozytenoberfläche inhibiert würde und somit der schädigende Einfluß von P-Selektin reduziert werden könnte.

Da jedoch die Interaktion der Plättchen mit dem Endothel stärker gesunken ist als die Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel, sind an diesen Interaktionen wahrscheinlich noch mehrere andere Moleküle beteiligt, insbesondere da der CD62P Rezeptor als Selektin nur das initiale Rollen vermittelt.

6.5 Abschnitt 2: Die Rolle von GPIIb/IIIa für die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

In dieser Studie wurde die Rolle des GPIIb/IIIa Rezeptors näher erschlossen. Diese Ergebnisse sollen in diesem Kapitel in den Stand der Forschung eingebunden werden.

6.5.1 Einbettung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Hintergrund

Der Rheumatoiden Arthritis liegt ein chronisch-inflammatorischer Prozeß der Synovialis zu Grunde (1;35). Diese Entzündung geht mit einer Aktivierung und Einwanderung von Leukozyten einher (8;36).

Diese Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut, die dann folgend an dem Endothel adhären und transmigrieren, gilt als gesichert (112). Die Arbeitsgruppe konnte diese Leukozyteninvasion bei der AiA bereits zeigen und dieser Sachverhalt wird auch in dieser Studie beobachtet (57;131).

Die vielseitigen Fähigkeiten der Thrombozyten legen nahe, daß sie in der Pathogenese der Inflammation und somit der chronischen Gelenkentzündung eine wesentliche Rolle spielen.

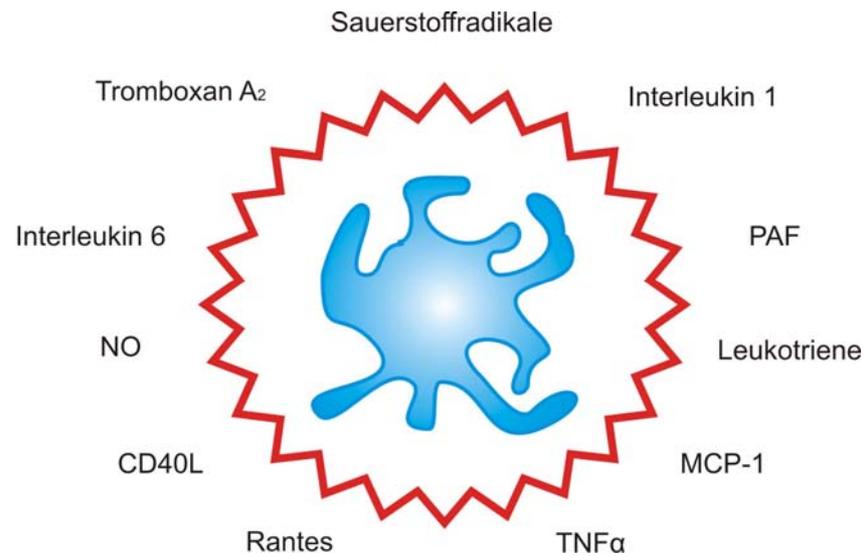


Abbildung 46: Unvollständige Darstellung der von Thrombozyten freigesetzten inflammatorisch wirkenden Mediatoren.

Die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten konnte bereits visualisiert werden (68). Dennoch sind die genauen molekularen Mechanismen bei Entstehung und Aufrechterhaltung der Entzündung ungeklärt. Bei AiA konnte gezeigt werden, daß es zu einer Erhöhung der T/E-I in der synovialen Mikrozirkulation der Synovialis kommt (33). Welchen Einfluß diese Vermehrung der Thrombozyten Adhärenz und Aktivierung bei AiA auf die Leukozyten hat, ist ungeklärt. Die Versuche im ersten Abschnitt zeigen eine Steigerung der L/E-I bei Injektion von WT-Thrombozyten in arthritische P-Sel-defiziente Tiere. Daher scheint ein kausaler Zusammenhang zwischen der T/E-I und der L/E-I zu bestehen. Um diesen Zusammenhang aufzulösen bietet sich der GPIIb/IIIa Rezeptor an, da dieser selektiv die Thrombozyten hemmt und somit diese aus der Interaktion von Leukozyten und Endothel eliminiert.

6.5.2 Einfluß von GPIIb/IIIa auf die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Aufgrund des ersten Abschnittes der Arbeit ist davon auszugehen, daß P-Selektin die initiale, transiente Interaktion der Thrombozyten mit dem Endothel vermittelt (92;100). Diese Verbindung ist wahrscheinlich durch die Scherkräfte nicht ausreichend und muß von anderen Verbindungen stabilisiert werden. Qualitativ und quantitativ kommt wahrscheinlich hierfür nur der GPIIb/IIIa Rezeptor in Frage (132;133).

Bei den arthritischen Tieren konnte eine signifikante Reduktion der Interaktion von Thrombozyten und Endothel im arthritischen Synovium bei Injektion von Tirofiban dargestellt werden. Die Verminderung schließt auch das transiente Rollen der Thrombozyten ein, was nach weitläufiger Annahme unter anderem durch P-Selektin vermittelt wird. Der Grund könnte eine Koppelung dieser beiden Arten der Interaktion im Sinne einer Vorwärtsaktivierung sein. So führt die Adhäsion von Thrombozyten über GPIIb/IIIa zur vermehrten Expression von P-Selektin (54).

Auch in den Versuchen dieser Studie, wurde durch Tirofiban diese Aktivierung des P-Selektin/PSGL-1/Lewis^x Systems durch den GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten gehemmt und damit das Rollen der Thrombozyten. Durch diese Hemmung wurde jedoch zusätzlich auch die Adhärenz der Thrombozyten am Endothel reduziert. Diese Adhärenz der Thrombozyten muß mit der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion gekoppelt sein, da die Ergebnisse der Studie zeigen, daß die Hemmung des GPIIb/IIIa Rezeptors die Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel reduziert.

Hierbei ist das Rollen der Leukozyten nicht signifikant reduziert, sondern nur die feste Adhärenz. Diese läßt darauf schließen, daß zusätzlich im geringeren Umfang noch andere Mechanismen beteiligt sind. Diese Vermutung spiegelt wahrscheinlich die direkt vom Endothel oder den Thrombozyten ausgeschütteten Signalstoffe und proinflammatorischen Proteine wieder (54;134;135). Dazu müssen neben dem GPIIb/IIIa-System noch zusätzliche Mechanismen bei der T/E-I aktiv sein, da es durch Tirofiban nicht zu einer vollständigen Hemmung dieser Interaktion kommt. Hierfür kommen vor allem P-Selektin und CD40 auf Thrombozyten und PSGL-1 sowie CD40L auf Leukozyten in Frage. Diese Rezeptoren werden jedoch konsekutiv exprimiert und sind dem GPIIb/IIIa Rezeptor auch quantitativ weit unterlegen.

Da die L/E-I durch Tirofiban weniger beeinflusst wird, als die T/E-I, müssen neben der von Thrombozyten vermittelten Interaktion, andere direkte Mechanismen parallel ablaufen. Von diesen direkten Verbindungen von Leukozyten und Endothel sind viele, wie E-Selektin, L-Selektin, LFA-1, CD34 und ICAM bekannt. In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, daß durch den Aufbau dieser Studie und der damit verbundenen kurzen Therapiezeit, nur der kurzzeitige Effekt von Tirofiban charakterisiert ist. Daher ist davon auszugehen, daß die alternativen Signalwege hier noch nicht aktiv sind.

In wie weit die langfristige Applikation von Tirofiban Einfluß auf die Entstehung und Aufrechterhaltung der Entzündung hat, ist zu untersuchen.

6.5.3 Schlußfolgerung

Diese Versuche stellen erstmals den Einfluß der selektiven Thrombozytenhemmung auf die Interaktion von Thrombozyten und Endothelzellen im Synovium arthritischer Tiere in vivo dar. Sie konnten erstmals darlegen, daß die Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel bei der AiA entscheidend abhängig von den Thrombozyten ist.

Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß der bei dieser Interaktion im Vordergrund stehende Rezeptor das Glykoprotein IIb/IIIa auf der Membran der Thrombozyten ist.

Des weiteren konnten erste Anhaltspunkte für eine Vorwärtsaktivierung bzw. Rückwärtshemmung zwischen dem P-Selektin und dem Integrin GPIIb/IIIa in der arthritischen synovialen Mikrozirkulation gewonnen werden.

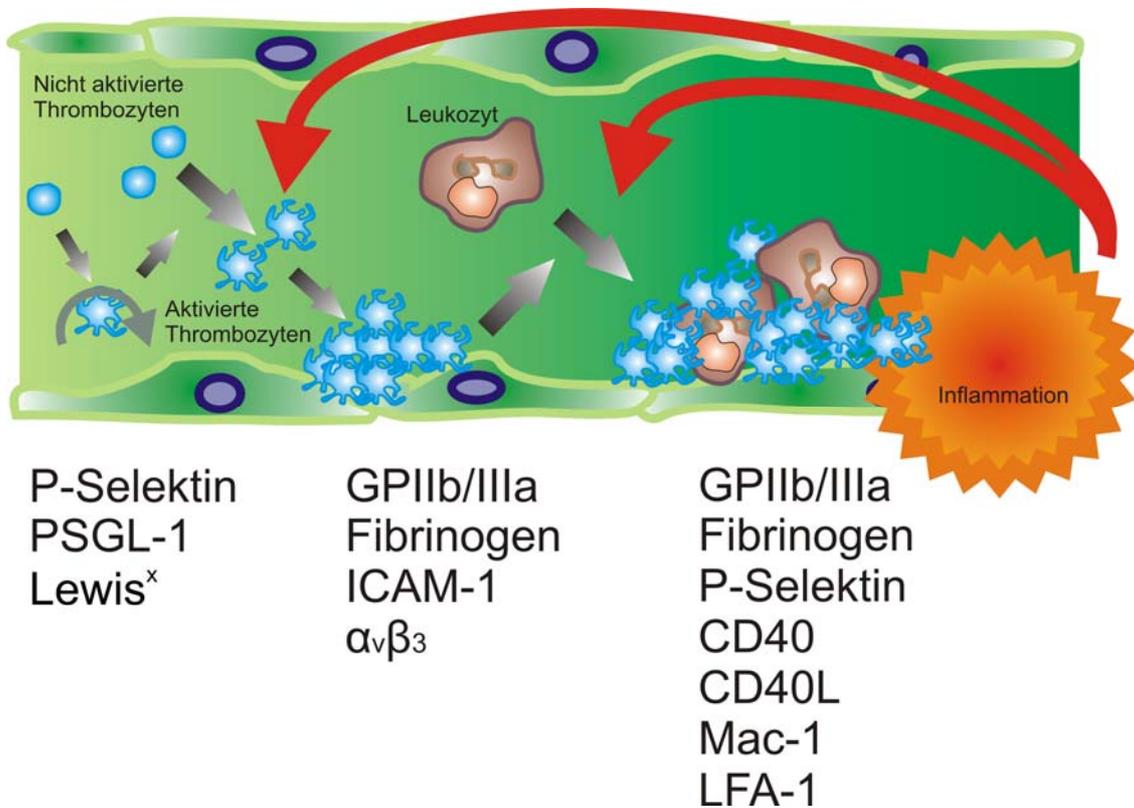


Abbildung 47: Circulus vitiosus der Thrombozyten-Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Durch das initial von P-Selektin vermittelte Rollen kommt es zur Aktivierung weiterer Thrombozyten und in Folge dessen zur Rekrutierung von Leukozyten. Die hieraus unterhaltene Entzündung führt wiederum zur Aktivierung von Thrombozyten und Einwanderung weiterer Leukozyten.

Somit könnte durch die Inhibition der Thrombozyten, die Leukozyteninfiltration gehemmt werden und dadurch der inflammatorische Schaden bei Rheumatoider Arthritis reduziert werden.

7 Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Die chronische Gelenkentzündung entsteht aus unterschiedlicher und teilweise noch ungeklärter Ursache. Durch den chronischen Charakter und fehlende kurative Behandlungsmöglichkeiten schreitet die Erkrankung unter einem großen Leidensdruck fort. In ihrem Verlauf kommt es zu erheblichen Funktionseinschränkungen und schließlich können Gelenkersatzprothesen multipler Gelenke und Invalidität die Folge sein.

Im Bereich der entzündeten Synovialis bildet sich ein Pannus, der durch seine schnelle Proliferation, Gefäßneubildungen und die Destruktion des angrenzenden Gewebes Tumor-ähnliche Eigenschaften zeigt.

Daher kommt dem Gefäßendothel und der synovialen Mikrozirkulation sowie der Leukozyteneinwanderung eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Progression des entzündlichen Prozesses zu. In anderen inflammatorischen Modellen konnte gezeigt werden, daß diese Progression aus einem Zusammenspiel von Sekretion proinflammatorischer Substanzen bzw. Botenstoffen, Antigenpräsentation, Einwanderung immunkompetenter Zellen und daraus weiter fortschreitender Gefäßneubildung herrührt. An diesem Modell ist bisher ungeklärt, welchen Einfluß die Thrombozyten bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Entzündung haben.

Daher war es das Ziel des Versuchsvorhabens die Interaktion der Thrombozyten mit dem Endothel und den Leukozyten näher zu charakterisieren und auf der Grundlage der Rezeptoren P-Selektin und GPIIb/IIIa, molekulare Mechanismen aufzudecken.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit konnte der Einfluß von thrombozytären und endothelialen P-Selektin auf die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion charakterisiert werden. In den Untersuchungen mit P-Selektin defizienten Thrombozyten bzw. P-Selektin defizientem Endothel, zeigte sich in beiden Fällen eine signifikante Reduktion sowohl der Thrombozyten-Endothelzell-, als auch der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.

Im zweiten Abschnitt wurden die Thrombozyten selektiv durch den GPIIb/IIIa Antagonisten Tirofiban inhibiert. Hierdurch wurden durch das Aggrastat in arthritischen Tieren das Rollen nahezu und die Adhärenz der Thrombozyten am Endothel halbiert. Zusätzlich hatte diese selektive Inhibition der Thrombozyten bei arthritischen Tieren auch Auswirkung auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. So waren auch hier das Rollen und die Adhärenz der Leukozyten am Endothel signifikant reduziert.

Die vorliegende Arbeit hat somit gezeigt, daß bei der Antigen-induzierten Arthritis die Inaktivierung von P-Selektin und GPIIb/IIIa zu einer Reduktion der Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen führt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß auch das auf der Thrombozytenoberfläche befindliche P-Selektin einen signifikanten Einfluß auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bei der AiA hat. Diese Interaktion muß wie auch andere Arbeiten zeigen, als schädlich für das synoviale Gewebe angesehen werden. Ferner haben die Versuche die Vermutung untermauert, daß initial die Thrombozyten an das Endothel anlagern und dies sekundär zur Invasion von Leukozyten führt. Diese Thrombozytenanlagerung geschieht zum einen transient durch P-Selektin und wird folgend durch GPIIb/IIIa stabilisiert, wodurch es zur Ausschüttung von Chemokinen durch die Thrombozyten und Endothelzellen kommt, die dann zur weiteren Rekrutierung von Leukozyten führt.

Die Inhibition der Rekrutierung, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten in der arthritischen synovialen Mikrozirkulation könnte daher für die Reduktion der Leukozytenrekrutierung und Chemokinfreisetzung und damit für die Reduktion des konsekutiven Gewebes Schadens von wichtiger, therapeutischer Bedeutung sein.

8 Abkürzungen

%	Prozent von Hundert
°C	Grad Celsius
aZ	adhärente Zellen
AiA	Antigen-induzierte Arthritis
ADP	Adenosin Diphosphat
ATP	Adenosin Triphosphat
C57	C57/Bl6-Stamm
CFA	Complete Freund's Adjuvant
CFDA	Carboxyfluoreszein-Diacetatester
COX	Cyclooxygenase
d	Tag
ENA-78	epithelial neutrophil-activating protein-78
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
FCD	funktionelle Kapillardichte
FGF	Fibroblast Growth Factor
FiO ₂	Sauerstoffgehalt Inspiration
FITC	Fluorescein isothiocyanate–dextran
FT	Farbteiler
g	Gramm
GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1
IVM	Intravitalmikroskopie
I.E.	Internationale Einheiten
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L/E-I	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion
LP	Long pass
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
mBSA	methyliertes bovines Serum-Albumin
min	Minuten
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein-1 α
mm	Milimeter
mmHg	Milimeter Wassersäule

µm	Mikrometer
mM	Milimolar
MW	Mittelwert
NaCl	0,9% Natriumchlorid
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PGE	Prostaglandin E
PGI ₂	Prostaglandin 2
PF 4	Platelet Faktor 4
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PRISM	Packaging Research, Intelligence Strategies & Marketing
PRISM-PLUS	Packaging Research, Intelligence Strategies & Marketing PLUS
P-Sel	P-Selektin
P-Sel-E	P-Selektin defizienter Empfänger
P-Sel-S	P-Selektin defizienter Spender
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
RA	Rheumatoide Arthritis
RANTES	upon activation normal T cell expressed and secreted
RBC	Erythrozytenfließgeschwindigkeit
RESTORE	Randomized Efficacy Study of Tirofiban for Outcomes and Restenosis
ROI	Region of Interest
s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
T/E-I	Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion
TGF	Transforming Growth Factor
TM	Geschütztes Warenzeichen
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VEGF	Vascular Endothel Growth Faktor
Vit	Vitamin
vWF	von-Willebrand-Faktor
W	Watt
WT	Wildtyp
WT-E	Wildtyp-Empfänger
WT-S	Wildtyp-Spender

9 Literaturverzeichnis

- (1) Sewell KL, Trentham DE. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Lancet* 1993; 341(8840):283-6.
- (2) Watson W, Tooms R, Carnesale P, Dutkowsky J. Subchondral bone and the erosive autoimmune origins of Rheumatoid arthritis. 1992.
- (3) O'Dell JR. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; 350(25):2591-2602.
- (4) Drosos AA. Newer immunosuppressive drugs: their potential role in rheumatoid arthritis therapy. *Drugs* 2002; 62(6):891-907.
- (5) Dolhain RJ, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC, Miltenburg AM. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996; 39(12):1961-9.
- (6) Afuwape AO, Kiriakidis S, Paleolog EM. The role of the angiogenic molecule VEGF in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Histol Histopathol* 2002; 17(3):961-972.
- (7) To SS, Newman PM, Hyland VJ, Robinson BG, Schrieber L. Regulation of adhesion molecule expression by human synovial microvascular endothelial cells in vitro. *Arthritis Rheum* 1996; 39(3):467-77.
- (8) Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* 2003; 9(6):263-268.
- (9) Gawaz M. Blood platelets - physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles, and therapy for atherothrombotic diseases. New York: Thieme, 2001: 1-56.
- (10) Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(16):7450-7454.
- (11) Bizzozero J. Über einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und Blutgerinnung. *Virchow's Arch Path Anat Physiol Klin Med* 1882; 90:261-332.
- (12) Lee RE, Young RH, Castleman B. James Homer Wright: a biography of the enigmatic creator of the Wright stain on the occasion of its centennial. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(1):88-96.
- (13) Nasse H. Das Blut in mehrfacher Beziehung physiologisch und pathologisch untersucht. *Haematologica* 1836.

- (14) de Gaetano G. Historical overview of the role of platelets in hemostasis and thrombosis. *Haematologica* 2001; 86(4):349-356.
- (15) Stormorcken H. The hemostatic mechanism: the role of platelets in physiology and bleeding states. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1987; 137:1-10.
- (16) Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22(9):913-22.
- (17) Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001; 12(5):261-73.
- (18) Born GV, CROSS MJ. THE AGGREGATION OF BLOOD PLATELETS. *J Physiol* 1963; 168:178-195.
- (19) Hirsch JG. Comparative bactericidal activities of blood serum and plasma serum. *J Exp Med* 1960; 112:15-22.
- (20) Ibele GM, Kay NE, Johnson GJ, Jacob HS. Human platelets exert cytotoxic effects on tumor cells. *Blood* 1985; 65(5):1252-1255.
- (21) Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost* 2003; 1(9):1897-905.
- (22) Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H et al. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998; 98(12):1164-71.
- (23) Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C et al. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* 1997; 95(10):2387-94.
- (24) Michelson AD, Benoit SE, Furman MI, Breckwoldt WL, Rohrer MJ, Barnard MR et al. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am J Physiol* 1996; 270(5 Pt 2):H1640-H1648.
- (25) Boehlen F, Clemetson KJ. Platelet chemokines and their receptors: what is their relevance to platelet storage and transfusion practice? *Transfus Med* 2001; 11(6):403-17.
- (26) Dairaghi DJ, Soo KS, Oldham ER, Premack BA, Kitamura T, Bacon KB et al. RANTES-induced T cell activation correlates with CD3 expression. *J Immunol* 1998; 160(1):426-33.
- (27) Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH et al. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest* 1996; 97(6):1525-34.
- (28) Imaizumi T, Albertine KH, Jicha DL, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Human endothelial cells synthesize ENA-78: relationship to IL-8 and to signaling of PMN adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17(2):181-92.

- (29) Michaels RM, Reading JC, Beezhold DH, Ward JR. Serum phospholipase A2 activity in patients with rheumatoid arthritis before and after treatment with methotrexate, auranofin, or combination of the two. *J Rheumatol* 1996; 23(2):226-229.
- (30) Lin MK, Farewell V, Vadas P, Bookman AA, Keystone EC, Pruzanski W. Secretory phospholipase A2 as an index of disease activity in rheumatoid arthritis. Prospective double blind study of 212 patients. *J Rheumatol* 1996; 23(7):1162-1166.
- (31) Hilliquin P, Guinot P, Chermat-Izard V, Puechal X, Menkes CJ. Treatment of rheumatoid arthritis with platelet activating factor antagonist BN 50730. *J Rheumatol* 1995; 22(9):1651-4.
- (32) Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br J Haematol* 2001; 115(2):451-9.
- (33) Schmitt-Sody M, Klose A, Gottschalk O, Metz P, Gebhard H, Zysk S et al. Platelet-endothelial cell interactions in murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44(7):885-889.
- (34) Bochner BS. Road signs guiding leukocytes along the inflammation super-highway. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(5):817-828.
- (35) Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423(6937):356-361.
- (36) Firestein GS. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 2005; 11(3 Suppl):S39-S44.
- (37) Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood* 1998; 91(4):1318-1324.
- (38) Miyamoto S, Katz BZ, Lafrenie RM, Yamada KM. Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 857:119-129.
- (39) Mansson P, Zhang XW, Jeppsson B, Johnell O, Thorlacius H. Critical role of P-selectin-dependent rolling in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte adhesion and extravascular recruitment in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362(2):190-196.
- (40) Liberek T, Chmielewski M, Lichodziejewska-Niemierko M, Lewandowski K, Rutkowski B. Transmigration of blood leukocytes into the peritoneal cavity is related to the upregulation of ICAM-1 (CD54) and Mac-1 (CD11b/CD18) adhesion molecules. *Perit Dial Int* 2004; 24(2):139-146.
- (41) Su WH, Chen HI, Huang JP, Jen CJ. Endothelial [Ca(2+)]_i signaling during transmigration of polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 2000; 96(12):3816-3822.

- (42) Yadav R, Larbi KY, Young RE, Nourshargh S. Migration of leukocytes through the vessel wall and beyond. *Thromb Haemost* 2003; 90(4):598-606.
- (43) Edens HA, Parkos CA. Modulation of epithelial and endothelial paracellular permeability by leukocytes. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 41(3):315-328.
- (44) Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999; 79(1):181-213.
- (45) Ertenli I, Kiraz S, Arici M, Haznedaroglu IC, Calguneri M, Celik I et al. P-selectin as a circulating molecular marker in rheumatoid arthritis with thrombocytosis. *J Rheumatol* 1998; 25(6):1054-1058.
- (46) Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM et al. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990; 343(6260):757-760.
- (47) Hattori R, Hamilton KK, Fugate RD, McEver RP, Sims PJ. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem* 1989; 264(14):7768-7771.
- (48) Calvete JJ. Platelet integrin GPIIb/IIIa: structure-function correlations. An update and lessons from other integrins. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222(1):29-38.
- (49) Marguerie GA, Ardaillou N, Cherel G, Plow EF. The binding of fibrinogen to its platelet receptor. *J Biol Chem* 1982; 257(20):11872-11875.
- (50) Plow EF, Marguerie GA, Ginsberg MH. Fibronectin binding to thrombin-stimulated platelets: evidence for fibrin(ogen) independent and dependent pathways. *Blood* 1985; 66(1):26-32.
- (51) Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 1998; 91(8):2645-2657.
- (52) Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha(v)beta3 integrin, and GPIbalpha. *J Exp Med* 1998; 187(3):329-339.
- (53) Shen Y, Romo GM, Dong JF, Schade A, McIntire LV, Kenny D et al. Requirement of leucine-rich repeats of glycoprotein (GP) Iba for shear-dependent and static binding of von Willebrand factor to the platelet membrane GP Ib-IX-V complex. *Blood* 2000; 95(3):903-910.
- (54) May AE, Kalsch T, Massberg S, Herouy Y, Schmidt R, Gawaz M. Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha(IIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation* 2002; 106(16):2111-2117.

- (55) Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol* 2001; 154(3):485-490.
- (56) Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Phillips DR. Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation. *Circulation* 2003; 107(8):1123-8.
- (57) Veihelmann A, Harris AG, Krombach F, Schutze E, Refior HJ, Messmer K. In vivo assessment of synovial microcirculation and leukocyte-endothelial cell interaction in mouse antigen-induced arthritis. *Microcirculation* 1999; 6(4):281-290.
- (58) Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 1977; 20(3):841-850.
- (59) Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR, Miller JF. Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *J Immunol* 1977; 118(5):1639-44.
- (60) Manegold PC, Hutter J, Pahernik SA, Messmer K, Dellian M. Platelet-endothelial interaction in tumor angiogenesis and microcirculation. *Blood* 2003; 101(5):1970-1976.
- (61) Tangelder GJ, Slaaf DW, Arts T, Reneman RS. Wall shear rate in arterioles in vivo: least estimates from platelet velocity profiles. *Am J Physiol* 1988; 254(6 Pt 2):H1059-H1064.
- (62) Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 1995; 15(2):85-91.
- (63) Kuebler WM, Kuhnle GE, Groh J, Goetz AE. Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J Appl Physiol* 1994; 76(1):65-71.
- (64) Bonney CH, Schmidt RE, Hunter DM, Conley GE. Fluorescein angiography and light microscopy studies of retinas irradiated by oxygen nuclei. *Aviat Space Environ Med* 1977; 48(5):418-423.
- (65) Zeintl H, Sack FU, Intaglietta M, Messmer K. Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 1989; 8(3):293-302.
- (66) Theroux P. Tirofiban. *Drugs Today (Barc)* 1999; 35(1):59-73.
- (67) Hantgan RR, Stahle MC, Jerome WG, Nagaswami C, Weisel JW. Tirofiban blocks platelet adhesion to fibrin with minimal perturbation of GpIIb/IIIa structure. *Thromb Haemost* 2002; 87(5):910-917.

- (68) Kupatt C, Wichels R, Horstkotte J, Krombach F, Habazettl H, Boekstegers P. Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion. *J Leukoc Biol* 2002; 72(3):455-461.
- (69) Ferrari E, Menabue L, Saladini M. Characterization and metal affinity of Tirofiban, a pharmaceutical compound used in acute coronary syndromes. *Bio-metals* 2004; 17(2):145-155.
- (70) Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1993; 14(10):506-12.
- (71) Geng JG. Directional migration of leukocytes: their pathological roles in inflammation and strategies for development of anti-inflammatory therapies. *Cell Res* 2001; 11(2):85-88.
- (72) Lingen MW. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125(1):67-71.
- (73) Geng JG. Interaction of vascular endothelial cells with leukocytes, platelets and cancer cells in inflammation, thrombosis and cancer growth and metastasis. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24(12):1297-1300.
- (74) Sunderkotter C, Mosser D, Ridley A, Sorg C, Roth J. Meeting report: molecular mechanisms of inflammation: how leukocytes come, see and seize. *Eur J Cell Biol* 2003; 82(7):379-383.
- (75) Pitchford SC, Riffo-Vasquez Y, Sousa A, Momi S, Gresele P, Spina D et al. Platelets are necessary for airway wall remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Blood* 2004; 103(2):639-647.
- (76) Huo Y, Ley KF. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14(1):18-22.
- (77) Danese S, Scaldaferrri F, Papa A, Pola R, Sans M, Gasbarrini G et al. Platelets: new players in the mucosal scenario of inflammatory bowel disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004; 8(5):193-198.
- (78) Bunescu A, Seideman P, Lenkei R, Levin K, Egberg N. Enhanced Fcγ receptor I, αMβ2 integrin receptor expression by monocytes and neutrophils in rheumatoid arthritis: interaction with platelets. *J Rheumatol* 2004; 31(12):2347-2355.
- (79) Endresen GK, Forre O. Human platelets in synovial fluid. A focus on the effects of growth factors on the inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10(2):181-187.
- (80) Milovanovic M, Nilsson E, Jaremo P. Relationships between platelets and inflammatory markers in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* 2004; 343(1-2):237-240.

- (81) Palmer DG, Hogg N, Revell PA. Lymphocytes, polymorphonuclear leukocytes, macrophages and platelets in synovium involved by rheumatoid arthritis. A study with monoclonal antibodies. *Pathology* 1986; 18(4):431-437.
- (82) Dumonde DC, Glynn LE. The reaction of guinea-pigs to autologous and heterologous fibrin implants. *J Pathol Bacteriol* 1965; 90(2):649-657.
- (83) Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 1977; 20(3):841-850.
- (84) Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR. Studies on antigen-induced arthritis in mice. III. Cell and serum transfer experiments. *J Immunol* 1977; 118(5):1645-1648.
- (85) Sakaguchi S, Sakaguchi N. Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system. *Curr Opin Immunol* 2005; 17(6):589-594.
- (86) Kleinau S, Erlandsson H, Holmdahl R, Klareskog L. Adjuvant oils induce arthritis in the DA rat. I. Characterization of the disease and evidence for an immunological involvement. *J Autoimmun* 1991; 4(6):871-880.
- (87) Koga T, Maeda K, Onoue K, Kato K, Kotani S. Chemical structure required for immunoadjuvant and arthritogenic activities of cell wall peptidoglycans. *Mol Immunol* 1979; 16(3):153-162.
- (88) Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977; 146(3):857-868.
- (89) Kataoka H, Kim SW, Plesnila N. Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24(6):668-676.
- (90) Khandoga A, Stampfl A, Takenaka S, Schulz H, Radykewicz R, Kreyling W et al. Ultrafine particles exert prothrombotic but not inflammatory effects on the hepatic microcirculation in healthy mice in vivo. *Circulation* 2004; 109(10):1320-1325.
- (91) Eichhorn ME, Ney L, Massberg S, Goetz AE. Platelet kinetics in the pulmonary microcirculation in vivo assessed by intravital microscopy. *J Vasc Res* 2002; 39(4):330-339.
- (92) Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998; 92(2):507-515.
- (93) Eichhorn ME, Strieth S, Krasnici S, Sauer B, Teifel M, Michaelis U et al. Protamine enhances uptake of cationic liposomes in angiogenic microvessels. *Angiogenesis* 2004; 7(2):133-141.
- (94) Gear AR. Rhodamine 6G. A potent inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 1974; 249(11):3628-3637.

- (95) Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385(4):290-298.
- (96) Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl)* 1998; 198(1):23-35.
- (97) Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 1985; 101(3):880-886.
- (98) Manegold PC, Hutter J, Pahernik SA, Messmer K, Dellian M. Platelet-endothelial interaction in tumor angiogenesis and microcirculation. *Blood* 2003; 101(5):1970-1976.
- (99) Massberg S, Schulz C, Gawaz M. Role of platelets in the pathophysiology of acute coronary syndrome. *Semin Vasc Med* 2003; 3(2):147-162.
- (100) Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Teupser D, Axmann S, Luchting B et al. P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo. *Shock* 2002; 18(6):529-535.
- (101) Schmitt-Sody M, Landes J, Zysk SP, Pellengahr C, Krombach F, Refior HJ et al. Quantitative assessment of angiogenesis in murine antigen-induced arthritis by intravital fluorescence microscopy. *J Vasc Res* 2003; 40(5):460-466.
- (102) Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R et al. Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1):38-47.
- (103) Schulze-Koops H, Davis LS, Haverty TP, Wacholtz MC, Lipsky PE. Reduction of Th1 cell activity in the peripheral circulation of patients with rheumatoid arthritis after treatment with a non-depleting humanized monoclonal antibody to CD4. *J Rheumatol* 1998; 25(11):2065-2076.
- (104) Hanly JG, Bresnihan B. Reduction of peripheral blood lymphocytes in patients receiving gold therapy for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1985; 44(5):299-301.
- (105) Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates N-epsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J Clin Invest* 1999; 104(1):103-113.
- (106) Yang YH, Hall P, Little CB, Fosang AJ, Milenkovski G, Santos L et al. Reduction of arthritis severity in protease-activated receptor-deficient mice. *Arthritis Rheum* 2005; 52(4):1325-1332.

- (107) Bush KA, Farmer KM, Walker JS, Kirkham BW. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum* 2002; 46(3):802-805.
- (108) Thomas R, Carroll GJ. Reduction of leukocyte and interleukin-1 beta concentrations in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Arthritis Rheum* 1993; 36(9):1244-1252.
- (109) Horneff G, Sack U, Kalden JR, Emmrich F, Burmester GR. Reduction of monocyte-macrophage activation markers upon anti-CD4 treatment. Decreased levels of IL-1, IL-6, neopterin and soluble CD14 in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 1993; 91(2):207-213.
- (110) Kamel M, Hanafi M, Bassiouni M. Inhibition of elastase enzyme release from human polymorphonuclear leukocytes by N-acetyl-galactosamine and N-acetyl-glucosamine. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9(1):17-21.
- (111) Davis P, Johnston C. Effects of gold compounds on function of phagocytic cells. Comparative inhibition of activated polymorphonuclear leukocytes and monocytes from rheumatoid arthritis and control subjects. *Inflammation* 1986; 10(3):311-320.
- (112) Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76(2):301-14.
- (113) Picker LJ, Warnock RA, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* 1991; 66(5):921-933.
- (114) von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(17):7538-7542.
- (115) von Andrian UH, Chambers JD, Berg EL, Michie SA, Brown DA, Karolak D et al. L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through sialyl LewisX-dependent and -independent recognition pathways. *Blood* 1993; 82(1):182-191.
- (116) Henseleit U, Steinbrink K, Goebeler M, Roth J, Vestweber D, Sorg C et al. E-selectin expression in experimental models of inflammation in mice. *J Pathol* 1996; 180(3):317-325.
- (117) Pan LH, Yamauchi K, Sawai T, Nakadate T, Kojima Y, Takahashi N et al. Inhibition of binding of E- and P-selectin to sialyl-Lewis X molecule suppresses the inflammatory response in hypersensitivity pneumonitis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(5):1689-1697.
- (118) McMillen MA, Huribal M, Sumpio B. Common pathway of endothelial-leukocyte interaction in shock, ischemia, and reperfusion. *Am J Surg* 1993; 166(5):557-562.

- (119) Kubes P, Payne D, Woodman RC. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in postischemic liver microcirculation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283(1):G139-G147.
- (120) Kubes P, Kerfoot SM. Leukocyte recruitment in the microcirculation: the rolling paradigm revisited. *News Physiol Sci* 2001; 16:76-80.
- (121) Vergnolle N, Derian CK, D'Andrea MR, Steinhoff M, Andrade-Gordon P. Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. *J Immunol* 2002; 169(3):1467-1473.
- (122) Weyrich AS, Ma XY, Lefer DJ, Albertine KH, Lefer AM. In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest* 1993; 91(6):2620-2629.
- (123) Arai M, Masui Y, Goldschmidt-Clermont P, DiPaula A, Siu C, Kondo T et al. P-selectin inhibition prevents early neutrophil activation but provides only modest protection against myocardial injury in dogs with ischemia and forty-eight hours reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34(1):280-288.
- (124) Ruth JH, Amin MA, Woods JM, He X, Samuel S, Yi N et al. Accelerated development of arthritis in mice lacking endothelial selectins. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(5):R959-R970.
- (125) Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology* 2005; 12(3):167-181.
- (126) Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B et al. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 2000; 191(8):1413-1422.
- (127) Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Li F, Johnson DA, Lichenstein HS et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol* 1995; 128(4):661-671.
- (128) Eguchi H, Ikeda Y, Ookawara T, Koyota S, Fujiwara N, Honke K et al. Modification of oligosaccharides by reactive oxygen species decreases sialyl lewis x-mediated cell adhesion. *Glycobiology* 2005; 15(11):1094-1101.
- (129) Piccardoni P, Sideri R, Manarini S, Piccoli A, Martelli N, de Gaetano G et al. Platelet/polymorphonuclear leukocyte adhesion: a new role for SRC kinases in Mac-1 adhesive function triggered by P-selectin. *Blood* 2001; 98(1):108-116.
- (130) Hervig T, Bakken AM, Farstad M. The swirling phenomenon in stored platelets is influenced by their endogenous serotonin. *Transfus Med* 1999; 9(2):139-145.
- (131) Veihelmann A, Brill T, Blobner M, Scheller I, Mayer B, Prolls M et al. Inhibition of nitric oxide synthesis improves detoxication in inflammatory liver dysfunction in vivo. *Am J Physiol* 1997; 273(2 Pt 1):530-6.

-
- (132) Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 1996; 94(6):1239-1246.
- (133) Reininger AJ, Korndorfer MA, Wurzinger LJ. Adhesion of ADP-activated platelets to intact endothelium under stagnation point flow in vitro is mediated by the integrin α IIb β 3. *Thromb Haemost* 1998; 79(5):998-1003.
- (134) Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* 1996; 135(6 Pt 1):1633-1642.
- (135) Shattil SJ, Ginsberg MH. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* 1997; 100(1):1-5.

10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. U. Pohl) in der Orthopädischen Arbeitsgruppe unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dipl. Ing. V. Jansson durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. med. Dipl. Ing. V. Jansson gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, für seine Anregungen und Ratschläge.

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Dr. med. M. Schmitt-Sody, meinem Betreuer. Unter seiner Anleitung und konstruktiven Kritik erlernte ich wissenschaftliches Denken und Arbeiten. Ihm verdanke ich die wesentlichen Grundlagen für die Durchführung und Auswertung der Experimente, bis hin zur kritischen Diskussion und Präsentation der Ergebnisse. Mit Geduld unterstützte er mich bei der Vorbereitung von Kongreßbeiträgen und bei der Umsetzung wissenschaftlicher Manuskripte. Herzlich will ich mich für die weit über die Belange dieser Arbeit hinausgehende Unterstützung und sein fortwährendes Vertrauen in mich bedanken.

Besonders danke ich auch Herrn Prof. Dr. med. A. Baethmann für die freundliche Aufnahme am Institut für Chirurgische Forschung und seine Ratschläge sowie stets konstruktive Kritik. Sein wissenschaftlicher Anspruch und sein persönlicher Einsatz für die Forschung werden mir in Zukunft Vorbild und Ansporn sein.

Mein Dank gilt weiter Herrn Dr. med. M. Eichhorn für seinen persönlichen Einsatz und aktiven Hilfe bei der praktischen Durchführung der Versuche sowie Dr. med. A. Khandoga für seine fachlichen Ratschläge und anregenden Diskussionen. Herrn H. Steinfeld, A. Steinfeld und I. Metz gilt mein ausdrücklicher Dank für die Hilfe bei der Vollendung der sprachlichen Form.

Meinen Arbeitsgruppenkollegen Herrn Oliver Gottschalk und Herrn Alexander Klose einen herzlichen Dank für die Einführung in das Modell und die Infrastruktur des Instituts für Chirurgische Forschung.

Außerdem möchte ich den medizinisch-technischen Assistentinnen Christine Csapó und Alke Schropp für die Mithilfe bei der Durchführung der Laborarbeiten danken.

Schließlich danke ich allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für ihre wohlwollende Unterstützung und die vielen gemeinsamen Gespräche.

11 Curriculum vitae

Name: Philip Manuel Metz

Anschrift: Adalbertstr. 19
80799 München

Telefon: Privat 089/28890774
Dienstlich: 089/7095-4355

E-Mail: Philip_Manuel.Metz@med.uni-muenchen.de

Geburtsdatum: 22.08.1975

Geburtsort: Essen-Werden

Familienstand: ledig

Religionszugehörigkeit: Römisch-katholisch

Staatsangehörigkeit: Deutsch

1986 – 1995 Schulabschluß: Abitur
Burggymnasium Essen

1996 – 2004 Studium der Humanmedizin
Ludwig-Maximilians-Universität München

06/04 – 10/04 Arzt im Praktikum
Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum Großhadern
Ludwig-Maximilians-Universität München
(Prof. Dr. med. A. J. Baethmann)

Seit 10/04 Wissenschaftlicher Assistent
Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum Großhadern
Ludwig-Maximilians-Universität München
(Prof. Dr. med. U. Pohl)