

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dipl. Ing. V. Jansson

**Etablierung eines Modells zur Untersuchung der  
Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion und zur  
Analyse von P-Selektin in der synovialen  
Mikrozirkulation bei der Antigen-induzierten-  
Arthritis der Maus mittels Fluoreszenzmikroskopie  
in vivo**

Dissertation

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

vorgelegt von Alexander Klose  
aus München

2007

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

Berichterstatter: PD Dr. med. A. Veihelmann

Mitberichterstatter: Prof. B. Walzog

Prof. H. Schulze-Koops

Prof. F. Krombach

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. M. Schmitt-Sody

Dekan: Herr Prof. Dr. D. Reinhardt

**Tag der mündlichen Prüfung: ..... 29.11.2007**

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
1.1	Rheumatoide Arthritis (RA) .....	5
1.1.1	Klinik und Prävalenz .....	5
1.1.2	Pathogenese der RA.....	6
1.1.3	Therapie der RA .....	8
1.1.4	Pharmakologische Therapie der RA.....	8
1.1.5	Bedeutung der Thrombozyten im Rahmen der RA .....	10
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG DER STUDIE</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>METHODIK</b> .....	<b>17</b>
3.1	Modelletablierung .....	17
3.1.1	Versuchstiere .....	17
3.1.2	Antigen-induzierte-Arthritis (AiA) .....	17
3.1.3	Thrombozytenpräparation .....	19
3.1.4	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....	20
3.1.5	Praktische Durchführung der Versuche .....	24
3.1.6	Versuchsprotokoll.....	27
3.2	.. Analyse der Bedeutung von P-Selektin in der synovialen Mikrozirkulation am Modell der AiA .....	27
3.2.1	Allgemeiner Teil.....	27
3.2.2	Praktische Durchführung der Versuche .....	29
3.2.3	Versuchsprotokoll.....	30
3.2.4	Immunhistologie.....	31
<b>4</b>	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG</b> .....	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>33</b>
5.1	Modelletablierung .....	33
5.1.1	Klinische und histologische Beurteilung .....	33
5.1.2	Durchflusszytometrie.....	35
5.1.3	Makro- und Mikrohämodynamische Parameter.....	37
5.1.4	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion .....	37
5.1.5	Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion .....	39

5.2	... Analyse der Bedeutung von P-Selektin in der synovialen Mikrozirkulation am Modell der AiA der Maus .....	42
5.2.1	Klinische und histologische Beurteilung .....	42
5.2.2	Makro- und Mikrohämodynamische Parameter .....	44
5.2.3	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion .....	45
5.2.4	Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion .....	46
5.2.5	Immunhistologie .....	48
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>51</b>
6.1	Grundlagen.....	51
6.2	Diskussion der Methoden .....	52
6.2.1	Die Antigen-induzierte-Arthritis der Maus.....	52
6.2.2	Einsatz der Intravitalmikroskopie zur Beurteilung der Leukozyten- und der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion .....	53
6.2.3	Thrombozytenseparation.....	54
6.2.4	Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen bei der AiA.....	55
6.2.5	Analyse der Bedeutung von P-Selektin in der synovialen Mikrozirkulation am Modell der AiA der Maus.....	57
<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>61</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>64</b>
<b>9.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>75</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Rheumatoide Arthritis (RA)

### 1.1.1 Klinik und Prävalenz

Bei der rheumatoiden Arthritis (RA) handelt es sich um eine chronische, inflammatorische Multisystemerkrankung mit dem charakteristischen Befund einer persistierenden Synovialitis, die üblicherweise die peripheren Gelenke in symmetrischer Verteilung betrifft (Lipsky, 1999).

Die synoviale Entzündung im Rahmen der RA führt über eine granulierende, proliferierende Synovialitis (Pannus) zur Knorpeldestruktion und Knochenerosion mit konsekutiven Gelenkdeformationen (Sewell und Feldmann, 1993). Auch wenn die Ätiologie der Erkrankung derzeit noch nicht endgültig geklärt ist, gilt die RA als Autoimmunerkrankung, bei der sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen.

Der Ausprägung der RA gestaltet sich sehr variabel und verläuft meist in Schüben, von der Beteiligung nur weniger Gelenke mit minimaler Destruktion, bis hin zu einer rasch progressiven Polyarthritis mit Zerstörung der betroffenen Gelenke. Nach 10-12 Jahren weisen mehr als 80% der Patienten eine Einschränkung der Gelenkfunktion, teilweise eine komplette Gelenkdestruktion, auf. Patienten mit einer aktiven, polyartikulären und rheumafaktor-positiven RA entwickeln in mehr als 70% Gelenkschäden innerhalb der ersten zwei Jahre nach Diagnosestellung (Scott, 2000; Brook und Corbett, 1977; Mottonen, 1988; van der Heijde et al., 1992; Plant et al.; 1994).

Die Prävalenz der RA innerhalb der Bevölkerung beträgt ca. 1%, wobei Frauen ca. dreimal häufiger als Männer betroffen sind (Lipsky, 1999). Während sich die Geschlechtsdifferenz mit zunehmendem Alter vermindert, nimmt die Prävalenz mit dem Alter zu. In 80% der Fälle beginnt die Erkrankung zwischen dem vierten und dem fünften Lebensjahrzehnt und man rechnet statistisch mit einer Verkürzung der Lebenserwartung um 15-20% nach Diagnosestellung.

1987 entwickelte das American College of Rheumatology folgende heute noch gültigen Kriterien zur Klassifikation der RA. Die Sensitivität dieser Kriterien beträgt 91-94% und die Spezifität 89% (Arnett et al., 1988).

#### Kriterien zur Klassifikation der RA:

##### 1. Richtlinien zur Klassifikation

- a. Vier von sieben Kriterien müssen für die Diagnose einer RA bei einem Patienten erfüllt sein
- b. Patienten mit zwei oder mehr Diagnosen werden nicht ausgeschlossen

##### 2. Kriterien

- a. Morgensteifigkeit
- b. Arthritis an drei oder mehr Gelenkregionen
- c. Arthritis der Gelenke der Hand
- d. Symmetrische Arthritis
- e. Rheumaknoten
- f. Nachweis von Rheumafaktor im Serum
- g. Radiologische Veränderungen

#### 1.1.2 Pathogenese der RA

Obwohl die Pathogenese der RA weitgehend noch ungeklärt ist, scheinen eine mikrovaskuläre Schädigung und eine Erhöhung der Anzahl der Synovialdeckzellen den Beginn des Entzündungsprozesses darzustellen. Bei Gesunden befindet sich innerhalb der Synovia nur eine geringe Anzahl an Zellen. Im Gegensatz dazu lassen sich bei Patienten mit RA massenhaft Zellen, insbesondere CD4<sup>+</sup>T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen nachweisen (Firestein, 2003).

Gegenwärtig geht man bei der Pathogenese der RA davon aus, daß die Entzündungsreaktion durch ein Antigen unbekannter Herkunft ausgelöst wird. Dieses Antigen wird in Anwesenheit von Klasse II-MHC-Antigenen spezifischen CD4<sup>+</sup>-positiven T-Zellen präsentiert und führt zu deren Aktivierung. Nachfolgend werden eine Vielzahl weiterer Zelltypen, wie Makrophagen, B-Zellen, andere T-Zell-

Subtypen, synoviale Fibroblasten und Chondrozyten aktiviert. Diese Entzündungskaskade geht mit einer vermehrten Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle und einer gesteigerter Produktion proinflammatorischer Zytokine, Interleukin1 (IL-1), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha), lytischer Enzyme und von Stickstoffmonoxid einher. Zusätzlich werden noch andere Zytokine gebildet, die entweder direkt die Entzündung oder die Bildung weiterer, an dem Entzündungsgeschehen, beteiligten Zellen fördern. Hier ist speziell noch der Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierende Faktor (GM-CSF) zu nennen, der unter anderem die Bildung von Makrophagen stimuliert. Daraus resultiert eine Störung der synovialen Mikrozirkulation mit nachfolgender Gelenksdestruktion (Feldmann et al., 1996).

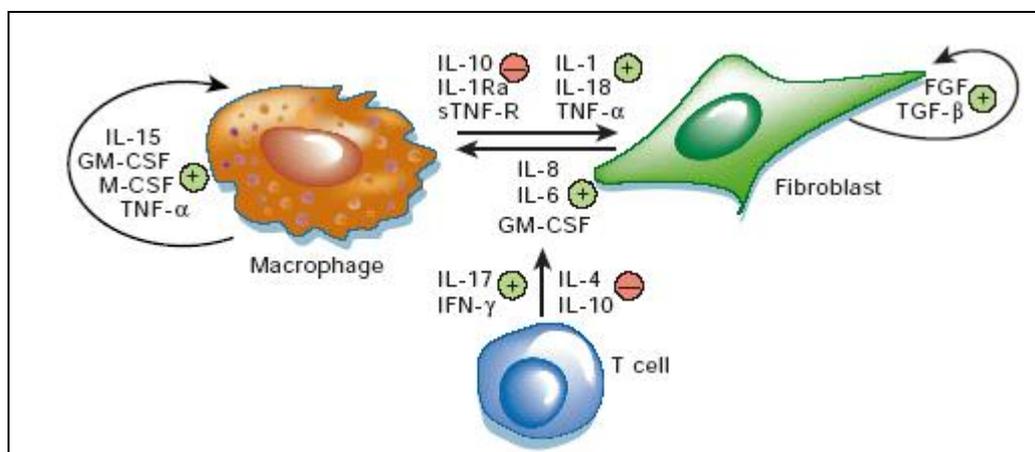


Abbildung 1 Interaktion von Makrophagen, Fibroblasten und T-Zellen.

Makrophagen und Fibroblasten adhären innerhalb der Synovialdeckzellschicht und produzieren Zytokine die sich selbst und andere Zellen aktivieren können. Dabei kommt es auch zur Interaktion zwischen mesenchymalen und antigen-präsentierenden Zellen. Dieser Vorgang ist nicht spezifisch für die RA, sondern findet sich auch bei anderen inflammatorischen Prozessen (⊕ Proinflammatorische Zytokine und ⊖ anti-inflammatorische Proteine) (Firestein, 2003).

### 1.1.3 Therapie der RA

Die Therapie der RA unterliegt einem Stufenplan. Bei diagnostischer Sicherheit sind zunächst körperliche Schonung sowie physikalische Therapie und Krankengymnastik indiziert. Eine intensive Schulung und Information des Patienten ist unerlässlich. Die pharmakologische Stufentherapie wird von den physikalischen Maßnahmen unterstützt, die den funktionellen Erhalt erkrankter Gelenke unterstützen sollen. Bei Therapieresistenz stehen verschiedene invasive Therapiemöglichkeiten zur Verfügung.

Folgende Ziele stehen bei der Behandlung der RA im Vordergrund:

- Schmerzlinderung
- Minderung der entzündlichen Aktivität
- Hemmung der Gelenkdestruktion
- Erhaltung der Gelenkfunktion
- Verhinderung von weiteren Organkomplikationen

Zum Erlangen dieser Ziele steht eine Vielzahl von Therapieoptionen zur Verfügung:

- Medikamentöse Therapie
- direkte Injektionen von Kortisonpräparaten in die Gelenke
- Krankengymnastik und Physikalische Therapie
- Ergotherapie und Rehabilitation
- Operative Verfahren wie z.B. Synovektomien und rekonstruktive Operationen

### 1.1.4 Pharmakologische Therapie der RA

In Abhängigkeit von dem Erkrankungsstadium, der aktuellen Beschwerdesymptomatik des Patienten und den individuellen Nebenwirkungen kommen verschiedenen Pharmaka zum Einsatz.

Die nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR), wie z. B. Acetylsalicylsäure, Ibuprofen, Indometacin, einschließlich den selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitoren sind, ebenso wie die Kortikosteroide, Phasen gesteigerter entzündlicher Aktivität vorbehalten (Willburger et al., 2006).

Diese Substanzen wirken antiphlogistisch, analgetisch und antipyretisch. Zu dieser Klasse gehören auch die selektiven Cyclooxygenase (Cox)-2-Hemmer, die weniger gastrointestinale Beschwerden hervorrufen, aber in letzter Zeit auf Grund kardiovaskulärer Risiken sehr zurückhaltend eingesetzt werden. Bei Bedarf können diese auch mit niedrig dosierten Glukokortikoiden kombiniert werden.

Ebenfalls im akuten Krankheitsschub eingesetzt werden orale Glukokortikoide, die die Entzündungsreaktion hemmen und auch die Gelenkdestruktion hinauszögern sollen.

Die Basis der pharmakologischen Behandlung der RA bilden die sog. disease modifying antirheumatic drugs=DMARDs, wie D-Penicillamin, Methotrexat, Ciclosporin usw. Sie unterdrücken die Produktion von Akutphaseproteinen und verlangsamen die Zerstörung der Gelenke.

Ebenfalls Verwendung finden die sog. Biologica, die rekombinaten Varianten natürlich vorkommender inhibitorischer Proteine. Hierunter zählen die Anti-TNF- $\alpha$ -Therapeutika, wie Etanercept, Infliximab, Adalimumab. Im Rahmen der rheumatoiden Arthritis wird TNF- $\alpha$  von aktivierten Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen vermehrt freigesetzt (Deuel et al., 1981). Die hohen Konzentrationen in Synovitisgewebe und der Synovia korrelieren dabei mit der lokalen, chondralen und ossären Erosion und sind Ansatzpunkt der Anti-TNF $\alpha$ -Therapeutika (Willburger et al., 2006).

Ebenfalls in die Gruppe der Biologica fallen die Anti-Interleukin-1 $\beta$ -Therapeutika. Als rekombinante Variante eines Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten blockiert Anakinra die Bindung des Cytokins IL-1 an dessen spezifischen Rezeptor (Ertenli et al., 2003). Auf diese Weise wird eine IL-1-abhängige Aktivierung der entsprechenden Zielzelle verhindert (Bresnihan et al., 1998).

Alle diese Medikamente weisen teilweise schwere Nebenwirkungen auf, wie zum Beispiel gastrointestinale Ulzera mit Blutungen, Ekzeme, Nieren- und Leberschädigungen. Immunsuppressiva können unter anderem zu Panzytopenien und aufgrund einer Minderung der Infektabwehr zu schweren Infektionen vor allem durch Viren, wie Cytomegalusvirus (CMV), führen. Auch wirken sie meist hepatotoxisch und kanzerogen. Deshalb ist eine strenge Indikationsstellung,

regelmäßige klinische Kontrolle und eine laborchemische Überwachung des Patienten unabdingbar.

Aufgrund der teilweise erheblichen Nebenwirkungen und dem oft therapierefraktärem Voranschreiten der Erkrankung wird ständig nach neuen Therapieansätzen geforscht. Klinische Anwendung hat inzwischen zum Beispiel die Therapie mit den rekombinanten löslichen TNF- $\alpha$ -Rezeptorantagonisten gefunden.

In den letzten Jahren hat sich in experimentellen Untersuchungen auch Stickstoffmonoxid als protektiv bei der RA gezeigt (Veihelmann et al., 1999). Auch die Hemmung der Neoangiogenese mittels VEGF-Rezeptorblockern wird in letzter Zeit zunehmend erforscht (Hirohito et al., 2001), aber keiner dieser Ansätze findet jedoch derzeit schon klinische Anwendung.

#### 1.1.5 Bedeutung der Thrombozyten im Rahmen der RA

Innerhalb der letzten Jahre wurde in zahlreichen Studien die Rolle der Leukozyten im Rahmen der RA erforscht. So ist heute offensichtlich, dass sie eine große Bedeutung bei der Pathogenese der RA einnehmen (Veihelmann et al., 1999).

Neu und bis jetzt wenig erforscht ist der Einfluss der Thrombozyten auf die Pathogenese und den Verlauf der RA.

Thrombozyten besitzen Fähigkeiten, die in vielen Teilen denen von Leukozyten ähneln, obwohl sie sich im Aufbau grundlegend unterscheiden. Im Gegensatz zu Leukozyten besitzen Thrombozyten, bei einem Durchmesser von ca. drei  $\mu\text{m}$ , keinen Zellkern. Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie zahlreiche Glykoproteine, die ihnen die Adhäsion an Endothelzellen ermöglichen. Im Zellinneren befinden sich neben Mitochondrien zahlreiche Speichergranula die bei Bedarf verschiedenste Stoffe freisetzen können (Bernhardt et al., 1991; Bubel et al., 1996; Deuel et al., 1981; Hervig et al., 1996). Diese Granula, die ATP-abhängig freigesetzt werden, werden in drei Gruppen eingeteilt:

- Dichte Granula
- Lysosomen
- $\alpha$ -Granula

Normalerweise verhindert ein intaktes, nichtaktiviertes Endothel die Thrombozytenadhäsion. Nach ihrer Aktivierung durch z.B. Thrombin oder ADP erfolgt eine Formveränderung der Thrombozyten und sie setzen proinflammatorische Mediatoren, wie zum Beispiel Thromboxane A, Leukotriene, Serotonin, Platelet Faktor 4 und Platelet-derived-growth-factor, frei. (Marcus, 1979; Weyrich et al., 1996; Barry et al., 1997; Piccardoni et al., 1996; Hervig et al., 1996). Zusätzlich besitzen sie das Potential Leukozyten zu aktivieren. (Ruf et al., 1992).

Innerhalb der Thrombozytenspeicher sind  $\alpha$ -Granula zahlenmäßig am häufigsten vorhanden und beinhalten eine Reihe von Proteinen, die verschiedenste biologische Funktionen wie Adhäsion, Aggregation, Chemotaxis, Proliferation, Inflammation und Koagulation beeinflussen. Neben adhäsiven Proteinen wie zum Beispiel Fibrinogen, vWF, GPIIb/IIIa, Vitronektin und Fibronectin sind Thrombozyten in der Lage, Zytokine wie Interleukin (IL)-1 $\beta$ , Chemokine und Wachstumsfaktoren, zu sezernieren (Holt und Niewiarowski, 1985).

Einen Überblick der Speichergranula und deren Inhalt sind in folgender Tabelle dargestellt (Holt und Niewiarowski, 1985):

Dichte Granula	$\alpha$ Granula	Lysosomen
ATP ADP $Ca^{2+}$ Serotonin Phosphat Guaninnukleotide	Enzyme: - <i><math>\alpha 1</math>-Antitrypsin</i> - <i><math>\alpha 2</math>-Makroglobulin</i> - <i><math>\alpha 2</math>-Antiplasmin</i> - <i>C1-Esterase-Inhibitor</i> Adhäsive Proteine: - <i>Fibrinogen</i> - <i>Fibronektin</i> - <i>vWF</i> - <i>Thrombospondin</i> - <i>Vitronektin</i> - <i>GPIIb/IIIa</i> Wachstumsfaktoren - <i>PDGF</i> - <i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i> - <i>Epidermal growth factor</i> - <i>Endothelial cell growth factor</i> Zytokinähnliche Proteine - <i>Interleukin-1</i> - <i>CD40-Ligand</i> - <i>Plättchenfaktor-4</i> - <i><math>\beta</math>-Thromboglobulin</i> Koagulationsfraktion - <i>HMWK</i> - <i>Plasminogen</i> - <i>PAI-1</i> - <i>Faktor V</i> - <i>Faktor XI</i> - <i>Fibrinogen</i> - <i>Protein S</i>	$\alpha$ -Arabinoside $\beta$ -Galactosidase $\beta$ -Glucuronidase N-Acetyl-glucosaminidase Elastase Kollagenase Kathepsin

Tabelle 1: Inhalt der Speichergranula der Thrombozyten

Evangelista et al. konnten zeigen, dass im Rahmen der akuten Entzündung in der Lunge von Kaninchen die Aktivierung und Interaktion der Thrombozyten mit den Endothelzellen zu einer gesteigerten Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten führt und dadurch der Endothelzellschaden aggraviert wird (Evangelista et al., 1999; Lou et al., 1997).

Thrombozyten können nicht nur im Rahmen der Hämostase an verletzte Gefäßareale adhären, sondern die Plättchenadhäsion kann auch an intaktes Endothel erfolgen (Johnson et al., 1995; Frenette et al.; 1998). Dieser Prozess erfolgt, ähnlich wie an verletzte Gefäßareale, in drei aufeinanderfolgenden Schritten, wobei das erste Anheften gefolgt wird vom Rollen und schließlich der festen Adhäsion.

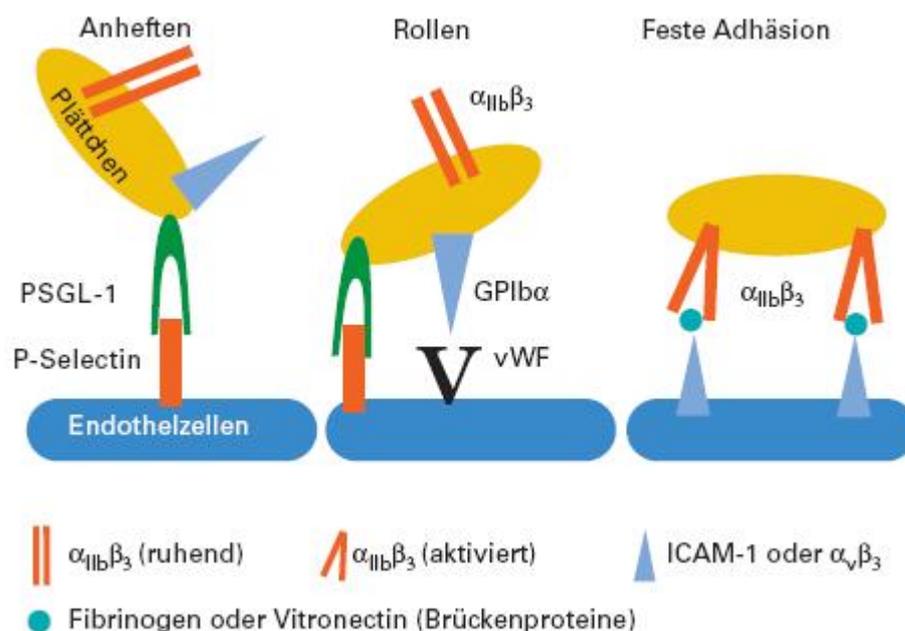


Abbildung 2 Plättchenadhäsion an Endothel.

Aktiviertes Endothel präsentiert P-Selektin auf seiner Zelloberfläche. Die Plättchenrezeptoren GPIb  $\alpha$  und PSGL-1 interagieren mit P-Selektin und vermitteln das Rollen von Plättchen. Nachfolgend wird die feste Plättchenadhäsion durch  $\beta_3$ -Integrine vermittelt (Siegel- Axel et al., 2006)

Das initiale Rollen der Thrombozyten wird über Selektine vermittelt. 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.

Aktivierte Thrombozyten exprimieren P-Selektin und ermöglichen dadurch die Adhäsion an PSGL-1 auf Neutrophilen und Monozyten. Diese Interaktion ist zum Beispiel für die Rekrutierung von Leukozyten in Thromben nötig. Dort helfen sie den Thrombus zu organisieren. Sowohl PSGL-1 als auch P-Selektin Knock-out Mäuse zeigen eine verzögerte Neutrophilen Rekrutierung, sowie eine mäßige Neutrophilie (Ley, 2003).

Eine entscheidende Rolle bei der Bindung von Thrombozyten an Endothelzellen spielt das Adhäsionsmolekül P-Selektin. Es wird in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten und in den Weibel-Palade-Körpern der Endothelzellen gespeichert und nach Aktivierung an die Zelloberfläche transportiert (Ley, 2003).

Der Aufbau der Selektine ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt:

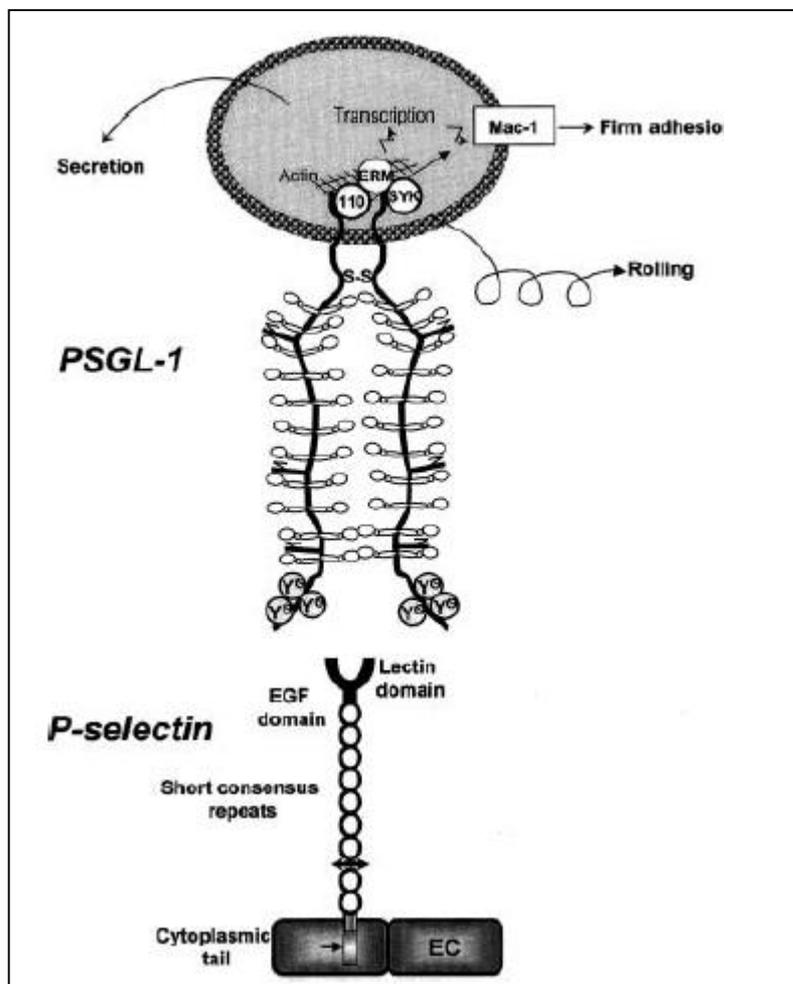


Abbildung 3 Struktur von P-Selektin und PSGL-1 (Patrick, 2004).

Das P-Selektin-Molekül (Molekulargewicht von 140 kDA) besteht aus einer Lectin-, einer Epidermal-Growth-Factor Domäne, und einer sich wiederholenden C3b-C4b Regulatory Protein Repeats, sowie einer transmembranösen Domäne und einem C-terminalen Ende (Patrick, 2004).

Innerhalb der vielen Liganden für P-Selektin ist nur der P-Selectin-glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) ausführlich untersucht worden. Dieser ist für 90% der P-Selektin Bindungen verantwortlich (Patrick, 2004).

Die temporäre Interaktion zwischen P-Selektin und PSGL-1 im Rahmen des Rollens der Thrombozyten auf dem Endothel ist schnell reversibel und zur festen Adhäsion bedarf es weiterer Mediatoren. Hier ist das Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) aus der Familie der Integrine von besonderer Bedeutung (Leclerc, 2002). Dieser Rezeptor kann an mehrere Moleküle binden, wie z.B. Fibrinogen und von-Willibrand-Faktor (vWF). Auch die Bindung des Integrins  $\alpha_5\beta_1$  an Fibronectin kann eine stabile Adhäsion vermitteln (Savage et al., 1998).

Thrombozyten, die im Blut zirkulieren oder an Endothelzellen adhären sind, können mit Leukozyten, insbesondere mit polymorphkernigen Neutrophilen (PMN), interagieren. Auch hier wird das Rollen über P-Selektin und PSGL-1 vermittelt. Die feste Bindung erfolgt dann über CD11b/CD18 und CD11a/CD18 auf Leukozyten mit Glykoprotein- Ib $\alpha$  (GPIb $\alpha$ ) und intercellular adhaesion molecule-2 (ICAM-2) auf Thrombozyten (Kuijper et al., 1998; Simon et al., 2000).

Während des Adhäsionsprozesses sezernieren Thrombozyten eine Vielzahl, den Entzündungsprozess beeinflussende, Substanzen wie z.B. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Platelet factor 4 (PF4) und regulated-upon-activation-normal-t-cell-expressed-and-secreted (RANTES). IL-1 $\beta$  wird über Mikrovesikel freigesetzt und führt über die Aktivierung von Endothelzellen zur gesteigerten Adhäsion von Leukozyten (Lindemann et al., 2001). Das Chemokin PF4 sorgt für die Rekrutierung von Monozyten und deren Differenzierung in Makrophagen (Scheuerer et al., 2000). RANTES fördert die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen (Dairaghi et al., 1998).

Verschiedene Hinweise für die Beteiligung von Thrombozyten im Rahmen der RA geben Studien, bei denen Patienten signifikant erhöhte P-Selektin Level im Vergleich zu Gesunden aufweisen (Veale, 1998; Joanne, 2001). Ebenso korreliert die

Thrombozytenzahl bei Patienten mit RA mit der Höhe des CRP-Wertes und der Krankheitsaktivität, gemessen mit dem Ritchie Artikular Score (Ertenli et al., 1998). Lin et al. zeigen in einer Studie, dass die sekretorische PhospholipaseA2 Aktivität, welche überwiegend aus Thrombozyten stammt, im Serum und Synovium von Patienten mit RA signifikant erhöht ist und mit der Krankheitsaktivität korreliert (Lin et al., 1996; Michaels et al., 1996). Die Aktivierung der PhospholipaseA2 führt zur Arachidonsäurefreisetzung. Daraus entsteht im weiteren Verlauf vermittelt durch Cyclooxygenase die Prostaglandine sowie ThromboxansA<sub>2</sub>, die für die Entwicklung der Inflammation unabdingbar sind (Simon, 1999). Des Weiteren steht die Aktivität der Cyclooxygenase 2 und der sekretorische Phospholipase A2 im Zusammenhang mit dem Platelet-Activating-Factor. Dieser wird in verschiedenen Zellen und auch in Thrombozyten synthetisiert (Braquet und Rola-Pleszcynski, 1987). Dieser Platelet-Activating-Factor konnte in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten nachgewiesen werden und die Blockade mittels eines Platelet-activating-factor-Antagonisten reduziert signifikant die Entzündungsreaktion (Hilliquin et al., 1995). Dennoch ist bis jetzt noch wenig über die Bedeutung der Thrombozyten und den genauen Mechanismen der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion im Rahmen der RA bekannt. Aufgrund der oben genannten Ergebnisse ist es naheliegend, dass Thrombozyten eine wichtige Rolle innerhalb der Pathogenese der RA spielen. Bis jetzt wurde die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in vivo in der synovialen Mikrozirkulation noch nicht untersucht.

## **2 ZIELSETZUNG DER STUDIE**

Ziel dieser experimentellen Studie ist es:

1. Etablierung eines Modells zur in vivo Visualisierung und Quantifizierung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der synovialen Mikrozirkulation am Modell der AiA der Maus mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie.
2. Analyse der Bedeutung von P-Selektin in der synovialen Mikrozirkulation am Modell der AiA der Maus mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie in vivo.

In dieser Untersuchung soll die Interaktion zwischen den Thrombozyten und dem Endothel unter physiologischen Bedingungen sichtbar gemacht und quantifiziert werden. Um dies zu erreichen wird das von Veihelmann et al. 1999 entwickelte in vivo Modell für die mikroskopische Analyse der synovialen Mikrozirkulation verwendet. Als Arthritis-Modell dient das initial von Brackertz et al. beschriebene Modell der Antigen-induzierten Arthritis der Maus (Brackertz et al., 1977).

## **3 METHODIK**

### **3.1 Modelletablierung**

Vorbemerkung:

Die Untersuchungen wurden in der Zeit von Oktober 2003 bis September 2005 mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (Tierantrag: 209.1/211-2531-56/02) am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt.

#### 3.1.1 Versuchstiere

Sowohl weibliche BALB/c als auch weibliche C57/BL6 Mäuse im Alter von acht bis zehn Wochen und einem Körpergewicht zwischen 18 und 22 Gramm wurden für die Studie verwendet (Charles-River-Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland). Während des Versuchszeitraums waren je fünf Tiere in einem mit Sägespänen eingestreuten Polystyrenkäfig untergebracht. Bei einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus betrug die Umgebungstemperatur 22°C, die relative Luftfeuchtigkeit 40%. Die Mäuse erhielten handelsübliches Trockenfutter für Nagetiere (ssniff®-Standarddiät für Ratten/Mäuse: 120 mg Vitamin E, 18 000 IU Vitamin A/kg; Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser ad libitum. Nur Versuchstiere, die ein normales Fress-, Putz- und Spielverhalten zeigten, wurden in die Versuche genommen.

#### 3.1.2 Antigen-induzierte-Arthritis (AiA)

Das für diese Untersuchung verwendete Modell ist die Antigen-induzierte Arthritis bei der Maus. Dieses Modell wurde erstmals von Dumonde und Glynn 1962 am Kaninchen beschrieben (Dumonde and Glynn, 1962). Brackertz hat es 1977 für die Maus etabliert (Brackertz et al., 1977).

In diesem Modell werden die Tiere vor der Induktion der Arthritis zweimalig präimmunisiert. Dies erfolgt durch zwei subkutane Injektionen eines Protein-Antigen-Gemisches in die Flanke der Tiere jeweils 21 und 14 Tage vor der eigentlichen Induktion der Arthritis. Appliziert werden 100 µg methyliertes bovines Serumalbumin (mBSA, Sigma, Deisenhofen, Deutschland), gelöst in einer öligen Suspension (50 µg Complete Freund's Adjuvant (CFA), Sigma). Diese wurde zuvor mit Mykobacterium tuberculosis (Stamm H37RA; Difco, Augsburg, Deutschland) versetzt. Zusätzlich erfolgt an den beiden Zeitpunkten je eine intraperitoneale Injektion von  $2 \times 10^9$  hitzegetöteter Bordetella pertussis (Institut für Mikrobiologie, Berlin, Deutschland). Der Immunisierung folgte an Tag 0 die eigentliche Arthritisinduktion durch eine intraartikuläre Injektion von 100 µg mBSA, gelöst in 50 µl NaCl, in das linke Kniegelenk der Maus.

Sämtliche Injektionen wurden in Äther-Kurzarkose durchgeführt. Für die intraartikuläre Injektion wurden Mikrokanülen der Größe Gauge 33 verwendet (Fine Science tools GmbH, Heidelberg). Mit diesen wurde das Kniegelenk nach Hautdesinfektion durch die Patellarsehne punktiert. Entsprechend der Studien befinden sich die Tiere eine Woche nach Arthritisinduktion in der Akutphase und nach neun Wochen in der chronischen Phase der Antigen-induzierten Arthritis (Brackertz et al., 1977 Veihelmann et al., 1999). Als Untersuchungszeitpunkt wurde der siebte Tag (d7) nach der eigentlichen Arthritisinduktion gewählt. Die Kontrolltiere durchlaufen das gleiche Procedere, wobei die Injektion intraartikulär mit dem äquivalenten Volumen steriler Kochsalzlösung vorgenommen wird.

Ab dem ersten Tag der Präimmunisierung bis zum Tag der chirurgischen Präparation am siebten Tag wurden die klinischen Parameter Pflegezustand, Spontanverhalten, Gelenkschwellung und Verlauf des Körpergewichts auf Überwachungsbogen für jedes Tier dokumentiert.

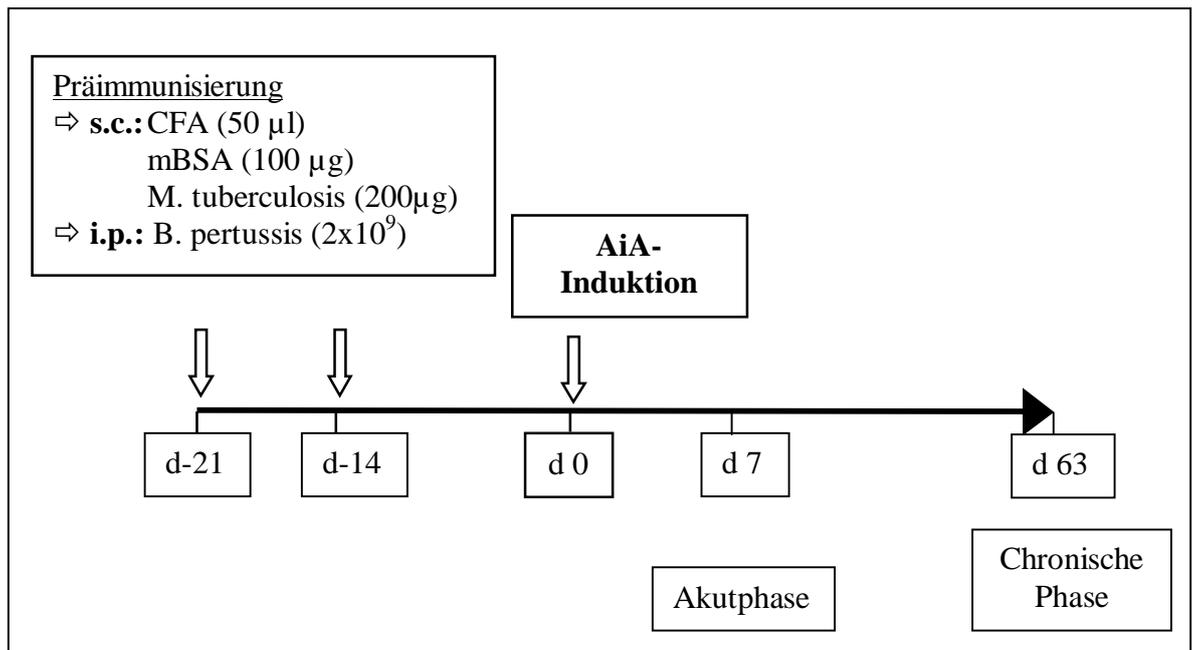


Abbildung 4 Ablauf der Antigen-induzierten Arthritis

Präimmunisierung, Induktion und Messzeitpunkte der Antigen-induzierten Arthritis (Brackertz et al., 1977). d = Tag; s.c. = subkutan; i.p. = intraperitoneal; i.a. = intraartikulär; CFA = complete Freund's adjuvant; mBSA = methyliertes bovines Serumalbumin.

### 3.1.3 Thrombozytenpräparation

Die Separation und die ex-vivo Färbung der Thrombozyten für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde nach dem Protokoll von Massberg et al. durchgeführt (Massberg et al., 1998).

Für jedes Experiment wurde dazu 1ml Blut von einem syngenem Spendertier in Narkose (N<sub>2</sub>O-Isfluran) durch kardiale Punktion entnommen und in einem 1 ml-Polypropylen Röhrcchen gesammelt. Je 1 ml Vollblut wurde in 0,2 ml Alsevers Puffer (38 mmol/L Zitronen-Säure, 75 mmol/L Trisodium citrat, 100 mmol/L Dextrose), 20µl Prostaglandin E<sub>1</sub>(PGE<sub>1</sub>)(650nmol/l) (Serva, Heidelberg, Germany) und 0,5 ml Dulbecco phosphate-buffered Saline (D-PBS) (PAN Systems, Aidenbach, Germany) aufgenommen. Das Blut wurde dann 10 Minuten bei 900 U/min zentrifugiert. Das thrombozytenreiche Plasma wurde mit 1,5 ml D-PBS, 0,3ml Lösung (38 mmol/L Zitronen-Säure, 75 mmol/L Trisodium citrat, 100 mmol/L Dextrose) und 50µl PGE<sub>1</sub>

aufgenommen. Anschließend wurde der Fluoreszenzmarker aminioreactive succinimidylester carboxyfluorescein-diacetat (CDFA-SE) (Molekulargewicht 535)(Molecular Probes, Eugene, OR) hinzugefügt und bei 3000 U/min 10 Minuten zentrifugiert. Das resultierende Thrombozyten-Pellet wurde in 0,4 ml DPBS (PAN Systems GmbH) resuspendiert. Die Anzahl gewonnener Thrombozyten wurde in jeder Probe mit Hilfe eines Coulter-Counters (Coulter-AC-T-Serie; Coulter Corporation, Miami, USA) bestimmt. Dann wurde ein entsprechendes Volumen einer Suspension, das ca.  $100 \times 10^6$  markierte Thrombozyten enthielt, in die laterale Schwanzvene der Maus appliziert. Bei Mäusen liegt die physiologische Thrombozytenzahl bei ca.  $600 \times 10^3$   $\mu$ l Vollblut. Das Blutvolumen beträgt ca. 5,85 ml/100g. Der Anteil markierter Thrombozyten an der Gesamtpopulation zirkulierender Thrombozyten lag damit bei ca. 10-20 %.

Die Funktion der markierten Thrombozyten wird durch Flowzytometrie (FACsort flow cytometer, Becton Dickinson, Heidelberg) und Aggregometrie (Aggregometer 2KAGGR 126, Labor, Hamburg) überprüft.

### 3.1.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

#### 3.1.4.1 Aufbau der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie:

Für diese Untersuchung wurde das Auflichtmikroskop AxioTech Vario (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) aus dem Institut für Chirurgische Forschung Großhadern verwendet. Dieses Intravitalemikroskop wurde im Detail von Harris et al. beschrieben und ist mit einem Projektionsokular mit 1,25-facher Vergrößerung ausgestattet (Harris et al., 1997).

Die intravitalem Aufnahmen für die Analysen der Mikrozirkulation wurden mit einem 20 x / 0,5 W Archoplan Immersionsobjektiv (Zeiss) durchgeführt und über eine schwarz-weiß Kamera (Camera FK 6990 IQ-S, Piper, Schwerte, Deutschland; Lichtempfindlichkeit 0,02 Luxm 699 x 581 Bildpunkte) aufgezeichnet. Es wurden 4-6 Gesichtsfelder pro Tier ausgewählt, die sowohl 1-3 postkapilläre Venolen (18-

40µm Durchmesser) als auch Kapillaren für die anschließende Messung der funktionellen Kapillardichte (FCD) beinhalteten. Die Feinfokussierung der jeweiligen Präparationsareale ermöglichte ein Mikro-/Makrotrieb, an dem das gesamte Mikroskop aufgehängt ist. Als Lichtquelle diente eine stufenlos regelbare Halogenlampe 12 V, 100 W (Zeiss) mit einem entsprechenden Bandpaßfilter (Filter Set 09: BP 450-490, Farbteiler (FT) 510, long pass (LP) 520, Anregungsbereich blau; Zeiss) für die Aufnahmen der mit dem Fluoreszenzmarker aminioreactive-succinimidylester-carboxyfluorescein-diacetat (CDFA-SE) gefärbten Thrombozyten.

Für die in-vivo Visualisierung der Leukozyten wurde der Fluoreszenzmarker Rhodamin 6G ( $M_r$  472,02 D, Sigma) intravenös als Bolus von 0,15 mg/kg unmittelbar vor den Aufnahmen injiziert. Dieser Marker reichert sich in den Mitochondrien der Leukozyten an und in der für die Untersuchung gewählten Dosis kann eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung durch Rhodamin 6G ausgeschlossen werden (Gear, 1974). Hierbei diente als Lichtquelle eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 100 W (AttoArc, Zeiss) mit entsprechendem Filter (Filter Set 15: BP 546/12, FT 580, LP 590 für Rhodamin 6G, Anregungsbereich grün; Zeiss). Der Einsatz der verschiedenen Filterblöcke und des Anregungslichts ermöglichte konsekutive Aufnahmen von Videosequenzen von den CDFA gefärbten Thrombozyten oder den Rhodamin gefärbten Leukozyten. Am Ende der Untersuchung konnte über eine FITC-Dextran Bolus Injektion ( $M_r$  150 kD, 15mg/kg Körpergewicht, Sigma Deisenhofen, Deutschland), ein hochmolekularer Plasmamarker, der Gefäßdurchmesser, die venöse Erythrozyten Fließgeschwindigkeit und die funktionelle Kapillardichte mit Hilfe des Zeiss Filter Sets 09 beurteilt werden. Wird FITC-Dextran mit einem Licht angeregt, das eine Wellenlänge unter 500 nm hat (Exzitationsmaximum 490 nm), emittiert es ein gelblich-weißes Licht mit einer mittleren Wellenlänge von 525nm. Durch diese Kontrastanhebung des Plasmas heben sich die perfundierten Gefäße deutlich vom wesentlich dunkleren umgebenden Gewebe ab.

Nach Einblendung eines Zeitcodes und des Datums (Videozeitgenerator VT 633; Fora Company Ltd., Tokyo, Japan) wurden die Videosequenzen auf einem S-VHS Videorecorder (SVO-9500 MDP, Sony GmbH, Köln, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde aufgezeichnet. Dabei wurde

während der Versuche das Online-Bild auf einem Videobildschirm (PVM-2043 MD, Sony GmbH) dargestellt. Dies ermöglichte die gleichzeitige Kontrolle der Aufnahmen. Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurden auf Videokassetten (KCA-180 min, Sony GmbH) festgehalten.

Zur Offline-Auswertung der Videosequenzen wurde das computerunterstützte Videobildanalyse-System für die dynamische Kapillarmikroskopie „CAP-Image“ verwendet (Zeintl et al., 1989). Zur Verarbeitung der optischen Bilder stand eine vollständige Bildverarbeitungseinheit IP-8/AT (Matrox, Kanada) zu Verfügung, der ein PC (Intel Pentium 133 MHz), ein Videomonitor (PVM-1442QM, Sony GmbH), ein Digitalisierbrett mit zugehöriger Digitalisierlupe (MM II-1201, Summagraphics Corp., München, Deutschland) und ein Farbbildschirm zugeschaltet waren.

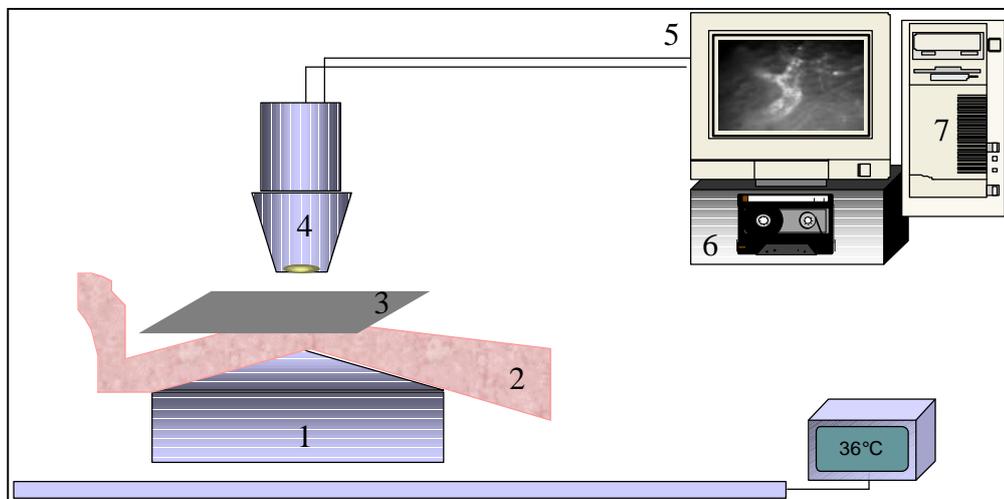


Abbildung 5 Intravitalmikroskopie

Technischer Aufbau zur Intravitalmikroskopie bestehend aus (1) computergesteuertem Mikroskopiertisch mit (2) Versuchstier und Situs unter (3) Deckglas, (4) Intravitalmikroskop mit Videokamera, (5) Bildschirm, (6) Videoaufnahmegerät und (7) Computer (Harris et al., 1997; Veihelmann et al., 1998).

#### 3.1.4.2 Mikrozirkulatorische Parameter:

Folgende Parameter wurden neben dem mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) sowie dem Durchmesser der Mikrogefäße mittels Intravitalmikroskopie bei jeder Untersuchung analysiert:

### *Erythrozytenfließgeschwindigkeit (Red Blood Cell Velocity (RBC))*

Die Messung erfolgte in den postkapillären Venolen nach der Line-Shift-Diagramm Methode mit Hilfe von Cap-Image®, die auf einer Kombination aus automatischem und interaktivem Verfahren beruht und in Millimeter/Sekunde angegeben wurde.

### *Funktionelle Kapillardichte (Functional Capillary Density (FCD))*

Diese ist definiert als Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Beobachtungsfläche ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ ) und damit ein Maß für die nutritive Perfusion des Gewebes (Nolte et al., 1995).

### *Thrombozyten-Endothel- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion*

Die mit CDFA-SE markierten Thrombozyten und die mit Rhodamin 6G in vivo markierten Leukozyten eines jeden Gefäßsegments wurden 30 Sekunden lang ausgezählt und entsprechend ihrer Interaktion mit dem mikrovaskulären Endothel folgendermaßen eingeteilt:

#### *Rollende Thrombozyten bzw. Leukozyten*

Dies sind Zellen, die sich im Vergleich zum Blutstrom, mit deutlich geringerer Geschwindigkeit bewegen und kurze, vorübergehende Endothelkontakte aufweisen. Sie werden als Fraktion aller Zellen angegeben, die ein definiertes Gefäßsegment passieren (errechnet als Anzahl rollende/(rollende + nicht adhärenente Leukozyten)).

#### *Adhärenente Thrombozyten bzw. Leukozyten*

Diese lösen sich während der Beobachtungszeit von 30 Sekunden nicht von einem 200  $\mu\text{m}$  langem Abschnitt des Gefäßwandendothels und werden als Zellen pro  $\text{mm}^2$  Endotheloberfläche ( $\text{Zellen}/\text{mm}^2$ ) angegeben. Aus dem Gefäßdurchmesser und der Länge des untersuchten Gefäßabschnitts kann die Anzahl adhärenenter Thrombozyten (AT) bzw. Leukozyten (AL) pro  $\text{mm}^2$  Endothelzelloberfläche wie folgt berechnet werden:

$$\text{AT bzw. AL} = (N \times 10^6) / (D \times \pi \times L)$$

(N bezeichnet dabei die Zahl adhärenenter Thrombozyten bzw. Leukozyten während der Beobachtungszeit, D den Gefäßdurchmesser in  $\mu\text{m}$ , L die Länge des untersuchten Gefäßabschnitts (200  $\mu\text{m}$ ) und  $\pi$  die Kreiskonstante)

### 3.1.5 Praktische Durchführung der Versuche

#### 3.1.5.1 Narkose

Die Narkose bei allen Versuchen erfolgte über eine Maske mittels Inhalation von Isofluran 1,2% (Forene, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) über einen Vapor (Dräger, Lübeck, Deutschland) und einer Mischung aus Lachgas und Sauerstoff (F<sub>1</sub>O<sub>2</sub> 35%). Dieses Verfahren zeigte sich in vorangegangenen Versuchen für Mäuse als gut verträgliche und die Mikrozirkulation allenfalls gering beeinflussende Narkoseform.

#### 3.1.5.2 Mikrochirurgische Präparation

Alle mikrochirurgischen Präparationen wurden unter semi-sterilen Konditionen durchgeführt. Zunächst wurde das Tier in Rückenlage auf einer Heizplatte fixiert um die Körpertemperatur konstant zu halten. Über einen Hautschnitt wurde die Gefäß-Nervenstrasse im proximalen Drittel des Schwanzes aufgesucht und die Arterie dargestellt. Nach Mobilisierung des Gefäßes wurde ein Verweilkatheter (Fa. Portex, England) eingelegt und mittels zweier Fäden fixiert (5/0 Ethibond®, Fa. Ethicon, Norderstedt). Dieser Zugang ermöglichte die Überwachung des arteriellen Blutdrucks über einen Druck-Transducer (Sirecust 300D, Siemens) und die kontinuierliche Volumensubstitution von 0,2 ml/Stunde zur Stabilisierung des Kreislaufes während der Narkose und chirurgischen Präparation. Anschließend wurde die laterale Schwanzvene ebenfalls freipräpariert, mittels eines Verweilkatheters (Fa. Portex, England) kanuliert und mit zwei Fäden fixiert (5/0 Ethibond®, Fa. Ethicon, Norderstedt). Über den venösen Zugang konnten sämtliche Fluoreszenzmarker und die markierten Thrombozyten sicher intravasal verabreicht werden.

Das linke Kniegelenk wird dann in ca. 45° Flexion auf einer speziellen Vorrichtung aus Plexiglas mit Silikon (Classic M., München) fixiert. Nach Hautdesinfektion wird durch einen U-förmigen Schnitt distal des Kniegelenks die Haut entfernt und somit die Präparation der Patellarsehne ermöglicht. Nach Resektion der Faszie wurde die

Patellarsehne vorsichtig mobilisiert und in der Mitte durchtrennt. Das proximale und distale Ende der Sehne wurden umgeschlagen und der darunter liegende „Hoffasche Fettkörper“ kann dadurch dargestellt werden. Nach Superfusion mit ca. 5 ml steriler Kochsalzlösung wird ein Deckglas auf dem Flüssigkeitsfilm schwebend über dem synovialen Gewebe fixiert, um die Messungen mit dem Intravitalmikroskop zu ermöglichen. Um Blutungen, die zu eventuellen Messartefakten führen könnten, zu vermeiden wurde die Präparation unter Vermeidung von Blutungen und möglichst gewebeschonend durchgeführt.

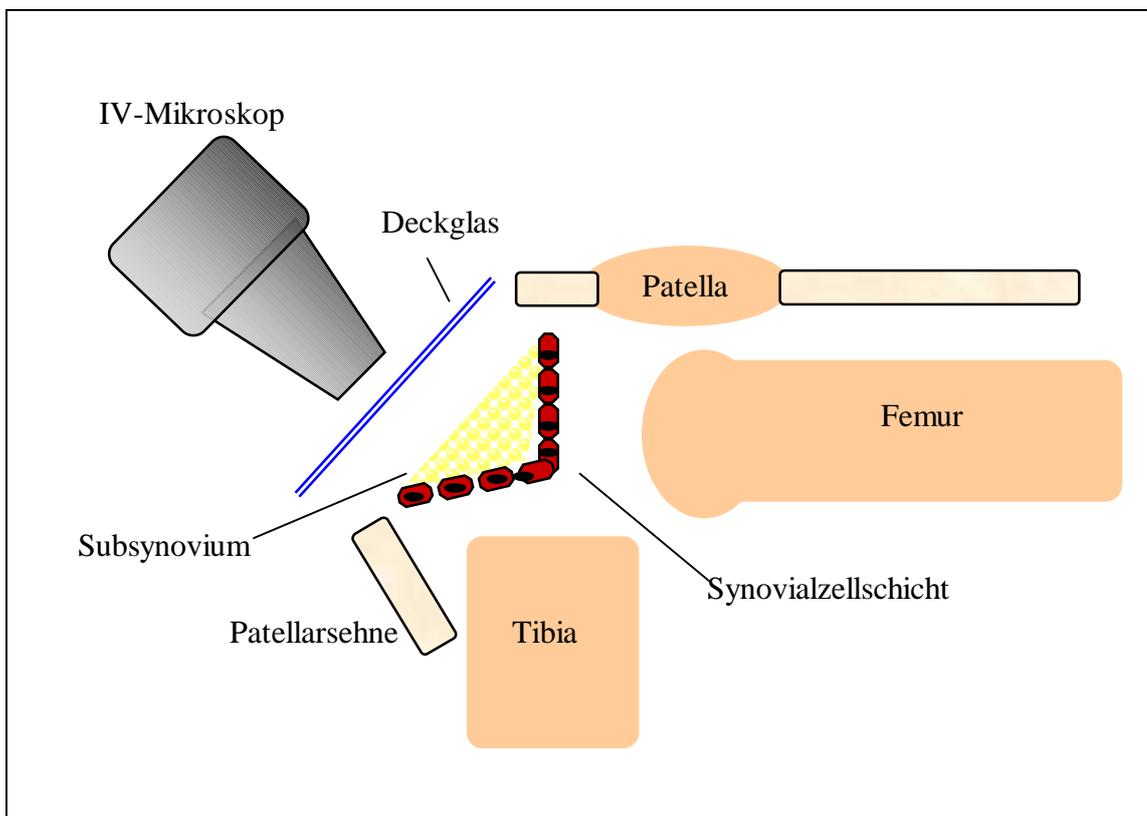


Abbildung 6 Schematische Seitenansicht der Präparation zur Intravitalmikroskopie am Kniegelenk der Maus

Nach Abschluss der Experimente wurden die Tiere mittels einer intravenösen Injektion von 1ml einer Lösung mit 0,16g/ml Pentobarbital ( Nembutal, Sanofi, Hannover, Deutschland) getötet. Die Kniegelenke wurden zur histologischen Untersuchung entnommen.

### 3.1.5.3 Klinische Beurteilung

Zur Überwachung der Aktivität wurde ein klinischer Score (Veihelmann et al., 1999) verwendet. Dazu wurden die Versuchstiere während des gesamten Beobachtungszeitraums ab dem Tag der ersten Präimmunisierung bis zum Versuchende am Tag der Intravitalmikroskopie anhand eines klinischen Scores beobachtet und eingestuft. Hierbei wurde das Körpergewicht, Schwellung des Kniegelenks und das Spontanverhalten auf einer Skala von 0-3 beurteilt.

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

Zur Bestimmung der Gelenkschwellung wurde der sagitale Kniegelenksdurchmesser mit einer Messlehre von ventral nach dorsal auf eine Dezimalstelle bestimmt und als Wert in mm zwischen dem Tag der Arthritisinduktion und dem Versuchende zum Zeitpunkt der intravitalmikroskopischen Messungen an Tag 7 dargestellt.

### 3.1.5.4 Histologische Beurteilung

Um das Ausmaß der Antigen-induzierten Arthritis zu analysieren wurden am Ende der Versuche die Kniegelenke entnommen und einer histologischen Untersuchung unterzogen. Nach Formalinfixation (Paraformaldehyd 8% bei pH 7,2 über 12 Stunden), Entkalkung durch 20% EDTA für 24 Stunden und Paraffineinbettung wurden die Präparate in 3µm dünne Präparate geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

Die Präparate wurden semiquantitativ nach einem von Brackertz und Mitarbeitern etablierten histologischen Score ausgewertet (Brackertz et al., 1977):

- 0 Normales Kniegelenk
- 1 Normales Synovium mit vereinzelt mononukleären Zellen
- 2 Zwei oder mehr synoviale Zellschichten und perivaskuläre Infiltrate von Leukozyten
- 3 Hyperplasie des Synoviums und dichte Infiltration
- 4 Synovitis, Pannusbildung, Knorpel-/subchondrale Knochenerosionen

### 3.1.6 Versuchsprotokoll

#### 3.1.6.1 Versuchsgruppen

Die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurde an Balb/c-Mäusen untersucht. Dabei wurden die Tiere randomisiert jeweils in eine arthritische Versuchsgruppe (n=7) und eine Kontrollgruppe (n=7) aufgeteilt.

#### 3.1.6.2 Versuchsablauf

Die Arthritis wurde nach oben beschriebenem Protokoll induziert und die Tiere am Tag 7 nach der intraartikulären Injektion den Versuchen zugeführt. Die chirurgische Präparation und die Intravitalmikroskopie geschahen ebenfalls nach oben erwähnten Methoden.

Nach Entnahme der Kniegelenke zur histologischen Beurteilung wurden die Mäuse mit Pentobarbital in Inhalationsnarkose euthanasiert.

## 3.2 Analyse der Bedeutung von P-Selektin in der synovialen Mikrozirkulation am Modell der AiA

### 3.1.1 Allgemeiner Teil

Im zweiten Abschnitt der Arbeit soll die Rolle von P-Selektin im Zusammenhang mit der RA untersucht werden. Bei der Pathogenese der RA standen in den letzten

Jahren vor allem die Leukozyten im Mittelpunkt des Interesses, doch lassen neuere Studien vermuten, dass auch die Thrombozyten wesentlich an der Manifestation der RA beteiligt sind.

Während im ersten Abschnitt der Arbeit ein Modell zur Visualisierung und Quantifizierung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der Mikrozirkulation des Synoviums erarbeitet wurde, ist es Ziel des zweiten Abschnittes, die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion, sowie die der Akkumulation von Thrombozyten zugrunde liegenden Mechanismen zu charakterisieren. Sowohl Thrombozyten als auch Endothelzellen exprimieren eine Vielzahl von Adhäsionsmolekülen, die prinzipiell für die Interaktion zwischen Thrombozyt und vaskulärer Oberfläche von Bedeutung sein könnten. Ein Adhäsionsrezeptor, der sowohl von Endothelzellen als auch von Thrombozyten exprimiert wird, ist das Selektin CD62P. P-Selektin wird in  $\alpha$ -Granula des Thrombozyten und Weibel-Palade Körperchen der Endothelzelle gespeichert und innerhalb von Sekunden nach Stimulation, an die Zelloberfläche mobilisiert.

Die Rolle von P-Selektin für die Rekrutierung von sowohl Leukozyten als auch von Thrombozyten in der Mikrostrombahn im Rahmen von Arthritismodellen ist bislang nur unzureichend untersucht.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wird daher die Rolle von P-Selektin für die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten in der Mikrostrombahn im Rahmen der RA analysiert. Dabei wurde mit dieser Zielsetzung das Eingang beschriebenen *in vivo* Modell verwendet. Außerdem erfolgte eine histologische Aufarbeitung der entnommenen Kniegelenke um das Ausmaß der Arthritis analysieren zu können. Ziel war es unter physiologischen Bedingungen *in vivo* den Einfluss von P-Selektin auf die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zu untersuchen. Auf die für diesen Versuchsablauf notwendigen Modifikationen wird im folgendem genauer eingegangen.

### 3.1.2 Praktische Durchführung der Versuche

#### 3.2.2.1 Narkose und Mikrochirurgische Präparation

Für diesen Teil der Studie wurde das schon oben ausführlich beschriebene Tiermodell verwendet. Im Folgenden sollen nur noch in Kürze die zentralen Schritte beschrieben werden und auf etwaige Abweichungen hingewiesen werden.

Die Tiere wurden jeweils in einer Narkose aus Isofluran 1,2% (Forene, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) und einer Mischung aus Lachgas und Sauerstoff ( $F_1$  O<sub>2</sub> 35%) durchgeführt. Anschließend wurden arterielle und venöse Katheter am Schwanz der Maus platziert, um den Blutdruck zu messen und um die markierten Thrombozyten und sonstige Fluoreszenzmarker injizieren zu können. Die Tiere wurden auf einer Heizplatte gelagert und das linke Knie in 45° Stellung fixiert. Nach Durchtrennung der Haut und der Faszie wurde die Patellarsehne vorsichtig mobilisiert, transversal durchtrennt und umgeklappt, um die Sicht auf das darunter liegende Synovialgewebe zu ermöglichen. Die Aufnahmen wurden wie oben beschrieben durchgeführt und die Tiere anschließend mittels einer Injektion von Pentobarbital getötet. Die Kniegelenke wurden zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung entnommen und bei -80 Grad Celsius tiefgefroren.

#### 3.2.2.2 Klinische Beurteilung

Die Tiere wurden nach dem oben schon beschriebenen Score am Tag d-21, d-14, d0 und d7 beurteilt. Hierbei wurde das Körpergewicht, Schwellung des Kniegelenks und das Spontanverhalten einer Skala von 0-3 beurteilt.

Der Kniegelenksdurchmesser in Millimeter diente zur Beurteilung der Aktivität der AiA.

#### 3.2.2.3 Histologische Beurteilung

Die entnommenen Kniegelenke wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll fixiert und gefärbt. Anschließend wurden die Präparate semiquantitativ nach dem von Brackertz und Mitarbeitern etablierten histologischen Score ausgewertet (Brackertz et al., 1977)(s. Seite 24).

### 3.1.3 Versuchsprotokoll

#### 3.2.3.1 Versuchsgruppen

Die folgenden Untersuchungen wurden an C57/Bl6 Mäusen und B6.129S7-Selptm1Bay/J (P-Selektin-defiziente) Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurde sowohl an einer AiA-Gruppe von P-Selectin-defizienten Tieren (Gruppe 4, n=7) als auch an einer Kontrollgruppe von P-Selectin-defizienten Tieren (Gruppe 2, n=7) untersucht, denen jeweils Thrombozyten von P-Selectin-defizienten Tieren infundiert wurden.

Als Vergleichsgruppe dienten AiA-C57/BL 6 Tiere (Gruppe 3, n=7, P-Selektin Positiv), denen Thrombozyten von C57/BL 6 Wildtyp Tiere (P-Selektin Positiv) infundiert wurden. Als Kontrollgruppe wurden C57/BL 6 Wildtyp Tiere (Gruppe 1, n=7, P-Selektin Positiv) ohne Arthritisinduktion verwendet, denen Thrombozyten von C57/BL 6 Wildtyp Tiere (P-Selektin Positiv) infundiert wurden.

#### 3.2.3.2 Versuchsablauf

Die Arthritis wurde nach oben beschriebenen Protokoll in den Gruppen 3 und 4 induziert und die Tiere am siebten Tag nach der intraartikulären Injektion den Versuchen zugeführt. Die Kontrollgruppe (1 und 2) erhielt äquivalente Injektionen mit steriler Kochsalzlösung. Die chirurgische Präparation und die Intravitalmikroskopie wurden in allen vier Gruppe nach oben erwähnten Methoden durchgeführt.

Als Thrombozytenspender dienten in der Gruppe der P-Selectin-defizienten Tiere ebenfalls P-Selektin-defiziente Tiere und in der Gruppe der Wildtyp Mäuse P-Selektin-positive Tiere.

Nach Entnahme der Kniegelenke zur histologischen Beurteilung wurden die Mäuse mit Pentobarbital in Inhalationsnarkose euthanasiert.

### 3.1.4 Immunhistologie

Die subpatellaren Fettkörper für die immunhistologische Aufarbeitung wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Sechs Mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) dicke, in Aceton fixierte Gefrierschnitte wurden immunhistologisch auf P-Selektin und vWF gefärbt.

Hierfür fanden Maus-spezifische monoklonale anti-vWF-Antikörper (Pharmingen) und Anti-P-Selektin Antikörper (Pharmingen), sowie kommerziell erhältliche immunhistochemische Kits (Vectastain; Camon, Wiesbaden, Deutschland) Verwendung. Die spezifische Färbung stellt sich mit den genannten Kits rötlich-braun dar.

Die endogene Peroxidaseaktivität wurde durch 10-minütiger Applikation von Methanol und  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei Raumtemperatur blockiert. Abschließend wurden die Schnitte mit Mayers Hämalaun gegengefärbt. Als Kontrolle wurden Gefrierschnitte mit isotypspezifischem Kontroll-Antikörper inkubiert. Die Auswertung der Expression von P-Selektin und vW-Faktor erfolgte semiquantitativ nach der folgenden Einteilung:

- (-) keine Anfärbung
- (+) geringe Anfärbung
- + mäßige Anfärbung
- ++ starke Anfärbung

## 4 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die semiquantitativen Daten der histologischen Untersuchungen wurden aufgrund der geringen Fallzahlen als Median angegeben und semiquantitativ dargestellt. Eine statistische Auswertung erfolgte nicht.

Sämtliche quantitativen Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt. Die Mittelwerte der einzelnen Parameter berechnen sich aus der Anzahl der Versuchstiere pro Versuchsgruppe, d.h. das in der Regel bei  $n=7$  pro Gruppe, und meist vier beurteilter postkapillärer Venolen je Versuchsgruppe, 28 Einzelgefäße analysiert wurden. Für die statistische Auswertung wurde nur der Mittelwert aus sämtlichen Venolen pro Versuchstier verwendet. Bei den mikrozirkulatorischen Parametern wurde in gleicher Weise vorgegangen.

Die Werte wurden zunächst auf Normalverteilung (SigmaStat®, Jandel Scientific, V5.1, USA) getestet. Für die statistischen Auswertungen wurden beim Vergleich mehrerer Gruppen sämtliche Parameter mit einem Rangsummentest (ANOVA on ranks) vorgetestet. Falls zwischen Gruppen signifikante Unterschiede angezeigt wurden, wurden diese mit dem Dunn's Nachfolgetest überprüft. Entsprechend wurden Signifikanzen innerhalb einer Gruppe mit dem Wilcoxon-Test auf statistische Unterschiede geprüft.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Modelletablierung

#### 5.1.1 Klinische und histologische Beurteilung

Die Versuchstiere wurden nach oben beschriebenem klinischen Score beurteilt. Sowohl bei den Kontrolltieren ohne Arthritisinduktion als auch bei den AiA-Tieren konnte bei keinem Tier eine Auffälligkeit hinsichtlich des Verhaltens oder der Erscheinung festgestellt werden.

Anders verhielt es sich bezüglich der Kriterien Schwellung und histologische Untersuchung. Hier zeigten die AiA-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren eine deutliche Schwellung im Bereich der Kniegelenke und einen Histologiescore von 3 (Kontrolltiere 0).

Gruppen	Verhalten	Erscheinung	Schwellung	Histologie
Kontrolle	0	0	0	0
AiA d7	0	0	2	3

Tabelle 2 Ergebnisse klinischer und histologischer Score

#### Klinischer Score:

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 > 3g oder somnolentes Verhalten oder schmutziges Fell

#### Histologischer Score:

0=unauffälliges Kniegelenk

1=Normales Synovium mit vereinzelt mononukleären Zellen

2=Zwei oder mehr synoviale Zellschichten und perivaskuläre Infiltrate von Leukozyten

3=Hyperplasie des Synoviums und dichte Infiltration mit Leukozyten;

4=Synovitis, Pannusbildung, Knorpel-/subchondrale Knochenerosionen.

Nach Arthritisinduktion am Tag 0 war der linke Kniedurchmesser der arthritischen Gelenke im Vergleich zu den Gelenken der Kontrolltiere nach Injektion steriler physiologischer NaCl-Lösung signifikant erhöht.

In der Kontrollgruppe war ebenfalls eine Zunahme des Kniegelenksdurchmessers am Tag 1 nach Arthritisinduktion festzustellen, der aber am wahrscheinlichsten auf das

injizierte Volumen steriler Kochsalzlösung zurückzuführen ist. Anschließend ging der Wert in der Kontrollgruppe auf Ausgangsniveau zurück. Im Gegensatz dazu war die Schwellung der Kniegelenke der AiA-Tiere von Tag 2 bis Tag 7 signifikant größer im Vergleich zur Kontrollgruppe.

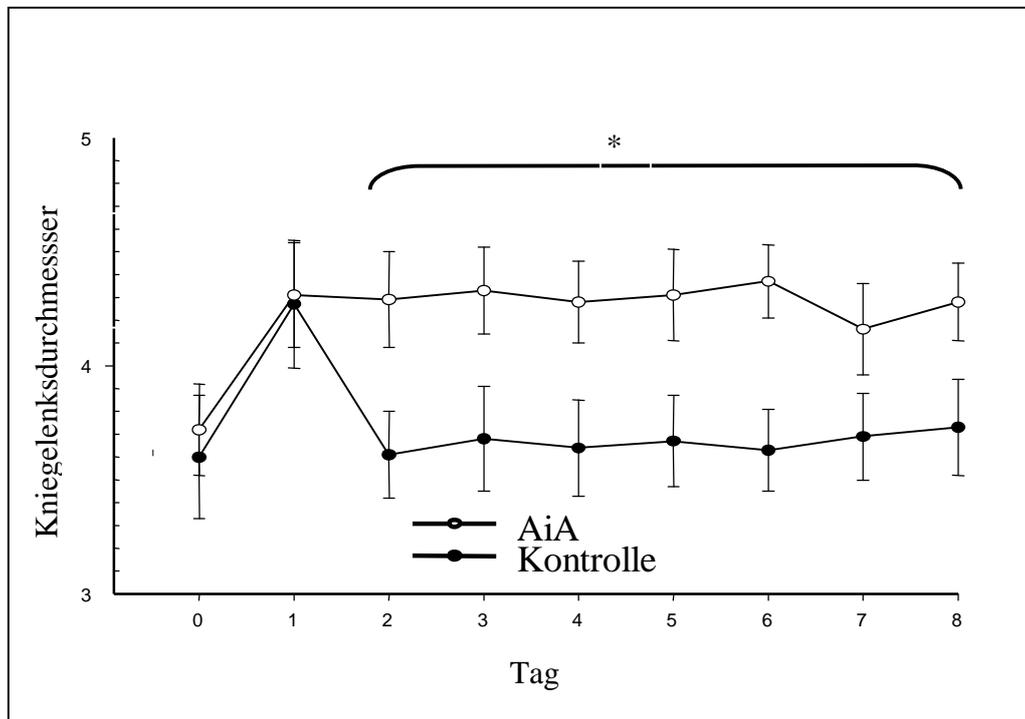


Abbildung 7 Kniegelenksdurchmesser

Verlauf des relativen Durchmessers des linken Kniegelenks in der AiA-Gruppe (n=7) von Tag -21 bis Tag 7 im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=7), die sterile Kochsalzlösung injiziert bekamen. d = 0 Tag der AiA-Induktion. Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \* =  $p < 0.05$

Allerdings konnten weder bei den arthritischen Tieren noch bei der Kontrollgruppe klinischen Zeichen einer manifesten systemischen Beteiligung nachgewiesen werden. Auch Defizite hinsichtlich der Pflege, atypisches Verhalten oder Veränderungen im Körpergewichtsverlauf im Vergleich zu den Kontrolltieren wurden nicht auffällig.

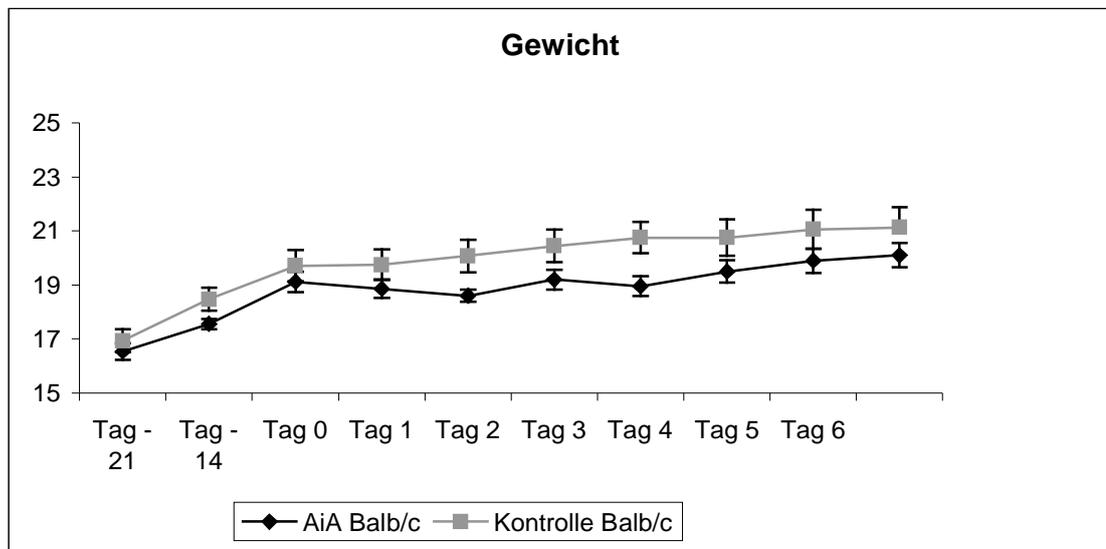


Abbildung 8 Körpergewicht

Verlauf des Körpergewichts in der AiA-Gruppe (n=7) von Tag -21 bis Tag 7 im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=7), die sterile Kochsalzlösung injiziert bekamen. d= 0 Tag der AiA-Induktion. Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 5.1.2 Durchflusszytometrie

Die Analyse der separierten Thrombozytensuspension (siehe oben beschriebenes Protokoll) ergab eine fast reine Thrombozytenlösung mit einer vernachlässigbaren Menge an anderen Blutzellen, wie Erythrozyten oder Leukozyten.

Die Fraktion der mit CFDA markierten Thrombozyten in der Suspension betrug > 99%. Um eine Aktivierung durch die Thrombozytenseparation ausschließen zu können, wurde die Oberflächenexpression des vor Aktivierung der Thrombozyten in a-Granula gespeicherten P-Selektins mit Hilfe monoklonaler Antikörper untersucht. Hierbei konnte keine Zunahme des Adhäsionsmoleküls und Aktivitätsmarkers P-Selektin auf der Oberfläche der separierten Thrombozyten im Vergleich zu Thrombozyten im Vollblut verzeichnet werden.

Anschließend sollte mit Hilfe der Durchflusszytometrie geklärt werden, ob die isolierten Thrombozyten noch adäquat auf von außen wirkende Stimuli reagieren und sich physiologisch verhalten. Hierfür wurden separierte, fluoreszenzmarkierte

Thrombozyten mit PMA ( $10^{-7}$  mol/ml) inkubiert. Die Aktivierung der Thrombozyten hatte einen ca. 10-fachen Anstieg der Expression des P-Selektins auf der Oberfläche der Thrombozyten zur Folge.

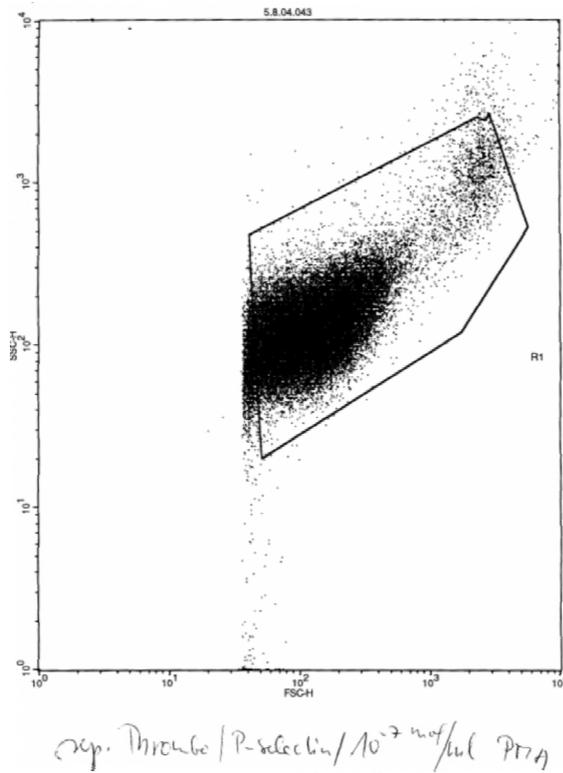


Abbildung 9 Durchflußzytometrie der separierten Thrombozyten: Repräsentativer Dot Plot der separierten Thrombozyten.

Die Thrombozyten werden durch ihr für sie charakteristisches Vorwärts-(x-Achse) und Seitwärtsstreulicht (y-Achse) identifiziert.

### 5.1.3 Makro- und Mikrohämodynamische Parameter

Die mikrochirurgische Präparation beeinträchtigte zu keinem Zeitpunkt der Versuche die Kreislaufsituation. Der mittlere arterielle Blutdruck gemessen während der Präparation an Tag 7 war zwischen AiA- und Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich (AiA  $79 \pm 2$  mmHg; Kontrolle  $77 \pm 3$  mmHg).

Es gab keinen signifikanten Unterschied im Durchmesser der postkapillären Venolen im Vergleich zwischen AiA- und Kontrolltieren (AiA  $16,56 \pm 3,88 \mu\text{m}$  Kontrolle  $16,82 \pm 4,98 \mu\text{m}$ ). Auch die Erythrozytenfließgeschwindigkeit in postkapillären Venolen unterschied sich am Tag 7 der AiA nicht signifikant von den Werten der Kontrolltiere (AiA  $0,595 \pm 0,103 \text{mm/s}$ , Kontrolle  $0,688 \pm 0,191 \text{mm/s}$ ). Die funktionelle Kapillardichte (FKD) war bei arthritischen Mäusen deutlich gegenüber gesunden Kontrolltieren erhöht (AiA  $431,60 \pm 30,31 \text{cm/cm}^2$ , Kontrolle  $237,30 \pm 28,60 \text{cm/cm}^2$ ).

### 5.1.4 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Das Verhalten der Leukozyten am Tag 7 nach Arthritisinduktion in der Versuchgruppe unterschied sich signifikant von den Kontrolltieren. Innerhalb der nicht arthritischen Gruppe wurden nur vereinzelte rollende oder adhärenente Leukozyten beobachtet. Im Gegensatz dazu war in der AiA-Gruppe am Tag 7 die Fraktion der rollenden Leukozyten signifikant erhöht ( $0,344 \pm 0,014$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM) im Vergleich zur Kontrolle ( $0,112 \pm 0,007$ ). Auch die Anzahl der adhärenenten Leukozyten unterschied sich am Tag 7 signifikant ( $1434,8 \pm 243,2 \text{mm}^{-2}$ ) von den Werten der Kontrolltiere ( $400,2 \pm 50,1 \text{mm}^{-2}$ ).

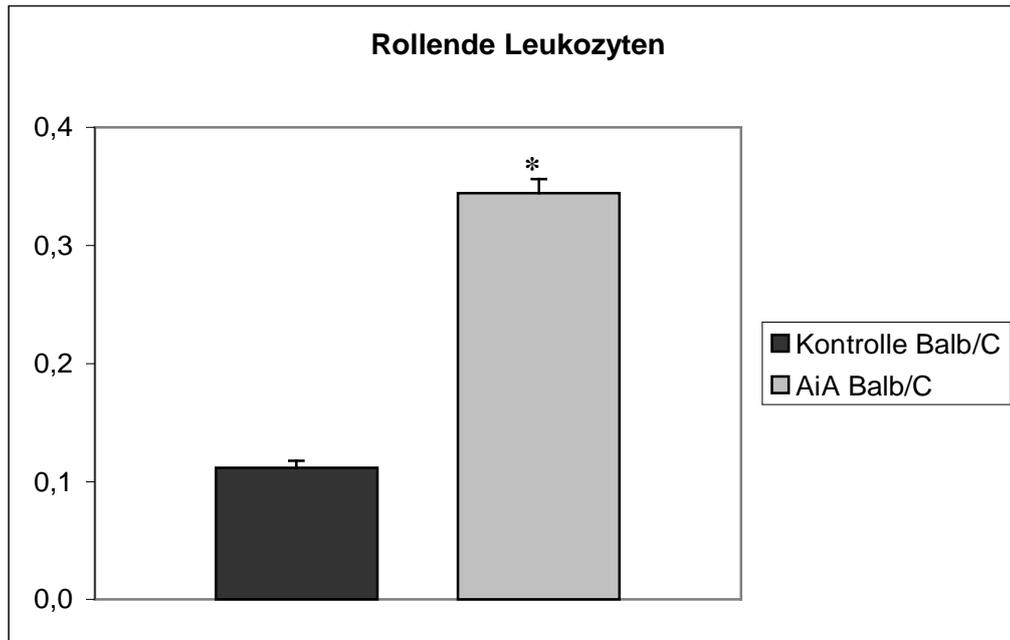


Abbildung 10: Rollende Leukozyten

Fraktion rollender Leukozyten am Tag 7 der AiA-Gruppe (n=7) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=7). Daten angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \* =  $p < 0.05$

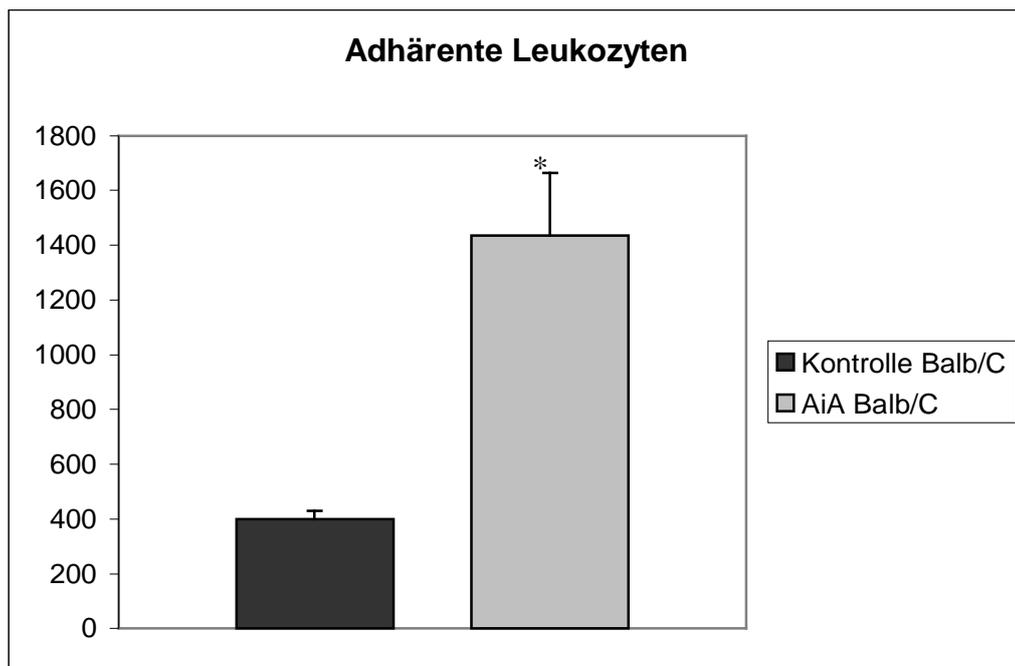


Abbildung 11 Adhärenente Leukozyten

Fraktion adhärenente Leukozyten am Tag 7 der AiA-Gruppe (n=7) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=7). Daten angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \* =  $p < 0.05$

### 5.1.5 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion

Die Thrombozyten zeigten in ihrer Interaktion mit dem Endothel Ähnlichkeiten zum Verhalten der Leukozyten. Sowohl rollende als auch adhärenente Thrombozyten konnten beobachtet werden. Repräsentative intravitalmikroskopische Bilder von CFDA Markierten Thrombozyten in AiA- und Kontrollmäusen zeigt folgende Abbildung:

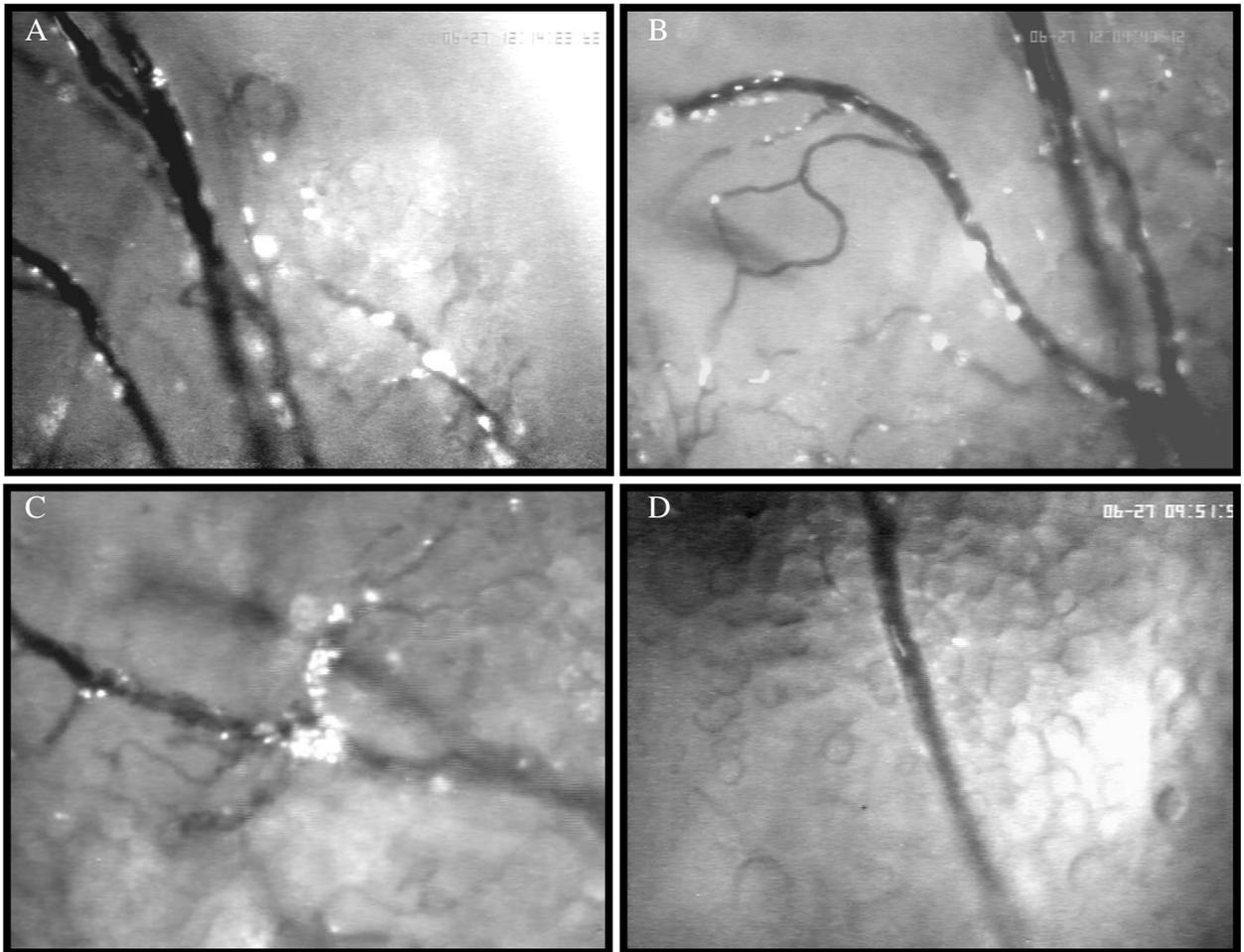


Abbildung 12 Intravital-Fluoreszenzbilder

Beispielhafte Visualisierung der CFDA-gefärbten Thrombozyten innerhalb der Mikrozirkulation in vivo mittels Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie.

A-C Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion im kapilärem Gefäßnetz von Mäusen mit AiA

D Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion bei einem Kontrolltier

Ähnlich wie bei Leukozyten interagierten Thrombozyten nur selten mit der Endothelzellschicht in Kontrolltieren. Nur eine geringe Anzahl an Thrombozyten rollte an den Endothelzellen entlang oder haftete an ihnen fest. Ganz im Gegensatz zu den AiA-Tieren, bei denen die Fraktion rollender Thrombozyten signifikant anstieg ( $0,36 \pm 0,01$ ) im Vergleich zu gesunden Tieren ( $0,062 \pm 0,009$ ). Bei den adhärenenten Thrombozyten war der Unterschied mit einem mehr als 12-fachen Anstieg bei den AiA-Tieren ( $1813,2 \pm 431,7 \text{ mm}^{-2}$ ) zu den Kontrolltieren ( $143,6 \pm 28,7 \text{ mm}^{-2}$ ) noch deutlicher.

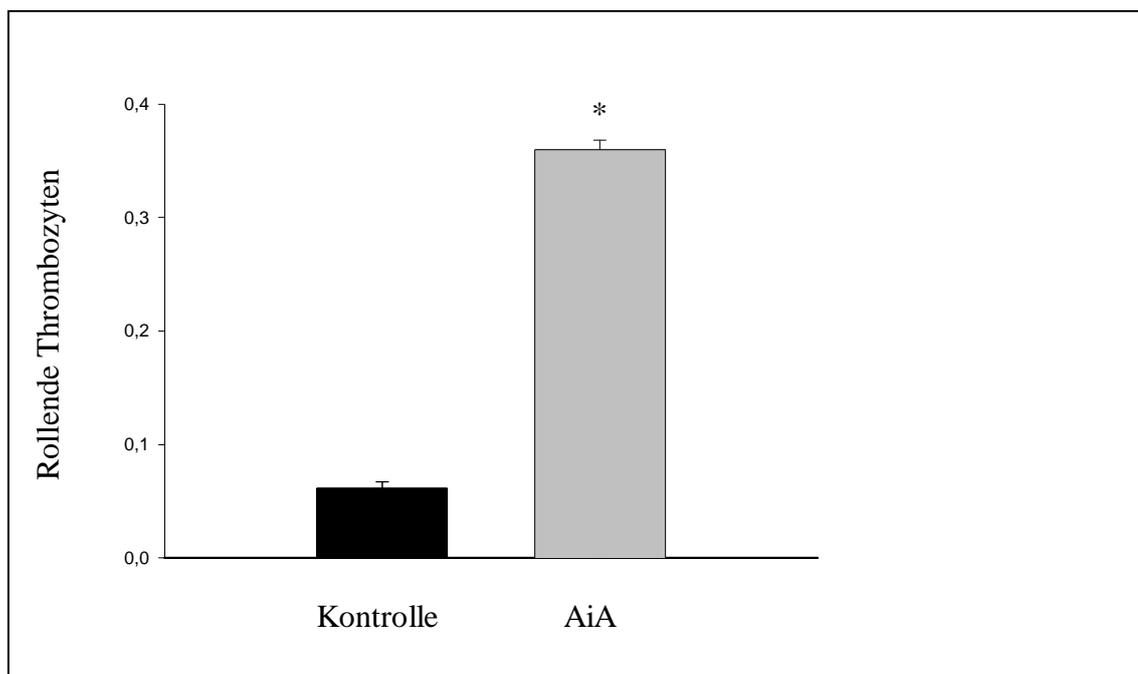


Abbildung 13 Rollende Thrombozyten am Tag 7 der AiA-Gruppe

Fraktion rollender Thrombozyten am Tag 7 der AiA-Gruppe (n=7) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=7). Daten angegeben als Mittelwert ± SEM. \* =  $p < 0,05$  AiA versus Kontrolle.

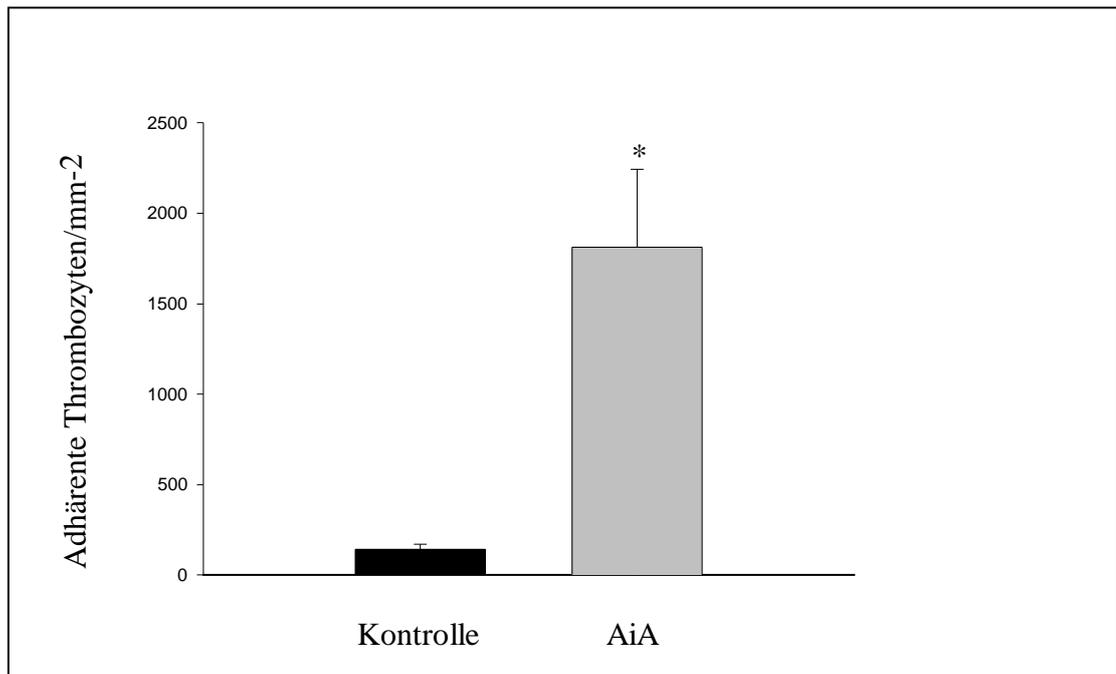


Abbildung 14 Adhärente Thrombozyten am Tag 7 der AiA-Gruppe

Fraktion adhärenter Thrombozyten am Tag 7 der AiA-Gruppe (n=7) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=7). \* =  $p < 0,05$  AiA-Tiere versus Kontrolle. Daten angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM

## 5.2 Analyse der Bedeutung von P-Selektin in der synovialen Mikrozirkulation am Modell der AiA der Maus

### 5.2.1 Klinische und histologische Beurteilung

Alle vier Gruppen wurden nach dem oben beschriebenen klinischen Score beurteilt. Bei den beiden Kontrollgruppen, die nur Injektionen mit steriler Kochsalzlösung erhielten, konnte bei keinem Tier eine lokale Entzündung oder systemische Auffälligkeit festgestellt werden ( Score = 0). Demgegenüber betrug der klinische Score der arthritischen Tiere der Gruppen 4 (P-Selektin (-/-)) im Median 1 und der Gruppe 3 (P-Selektin (+/+)) im Median jeweils 1-2.

Gruppen	Verhalten	Erscheinung	Schwellung	Histologie
Kontrolle (P-Selektin +/+)	0	0	0	0
Kontrolle (P-Selektin -/-)	0	0	0	0
AiA (P-Selektin +/+)	0	0	2	3
AiA (P-Selektin -/-)	0	0	1-2	1

Tabelle 3 Klinischer Score und histologischer Score

#### Klinischer Score:

- 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 > 3g oder somnolentes Verhalten oder schmutziges Fell.

#### Histologischer Score

- 0 = unauffälliges Kniegelenk
- 1 = Normales Synovium mit vereinzelt mononukleären Zellen
- 2 = Zwei oder mehr synoviale Zellschichten und perivaskuläre Infiltrate von Leukozyten
- 3 = Hyperplasie des Synoviums und dichte Infiltration mit Leukozyten
- 4 = Synovitis, Pannusbildung, Knorpel-/subchondrale Knochenerosionen

Nach Arthritisinduktion war der relative Kniegelenkdurchmesser am Tag 1 gegenüber dem Ausgangswert bei allen Tieren deutlich erhöht. Dies ist am wahrscheinlichsten auf das injizierte Volumen zurückzuführen. Am zweiten Tag kehrte der Kniedurchmesser bei den beiden nicht-arthritischen Tieren auf Ausgangsniveau zurück. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Schwellung des Kniegelenkes von Tag 2 bis Tag 7 bei den C57/Bl6 Mäusen mit AiA im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

In der Gruppe der P-Selektin defizienten Mäuse mit AiA war der Kniedurchmesser nach dem 2ten Tag geringer als bei den arthritischen C57/Bl6 Tieren, aber höher im Vergleich zu den nicht-arthritischen Kontrolltieren.

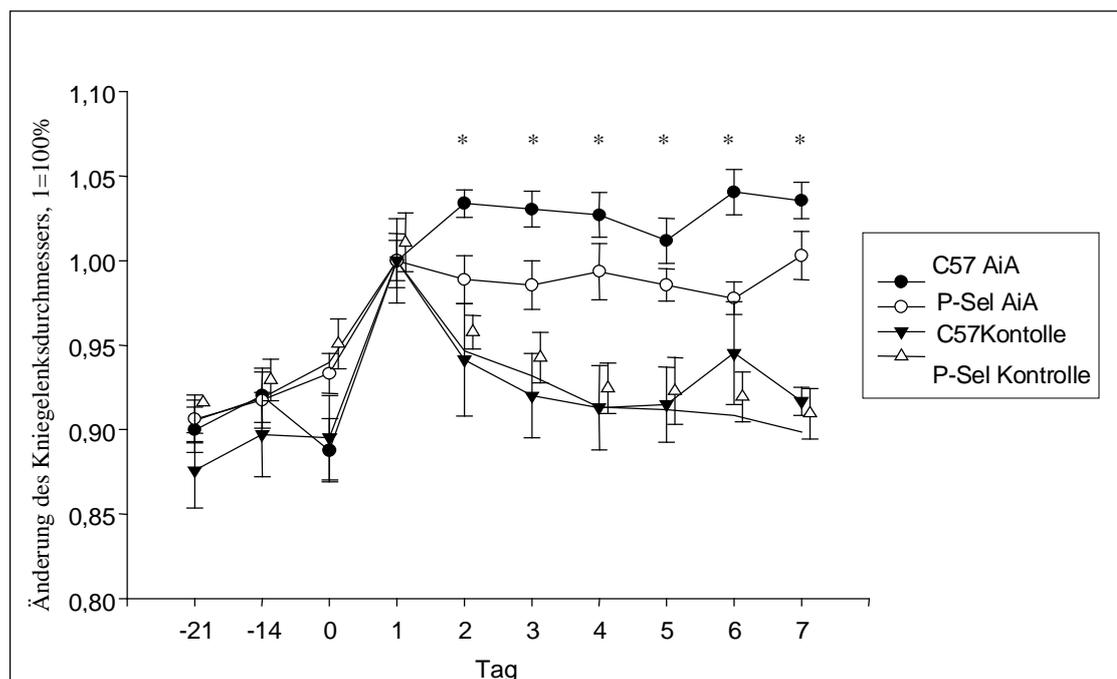


Abbildung 15 Kniegelenksdurchmesser

Verlauf des relativen Durchmessers des linken Kniegelenks in der AiA-P-Sel(+/-)-Gruppe (n=7) und der AiA-P-Sel(-/-)-Gruppe (n=7) von Tag -21 bis Tag 7 im Vergleich zu den Kontrollgruppen P-Sel(+/-) (n=7) und P-Sel(-/-)(n=7), die sterile Kochsalzlösung injiziert bekamen. d = 0 Tag der AiA-Induktion. Daten sind angegeben als relativer Mittelwert  $\pm$  SEM. \* =  $p < 0.05$

Weder bei den arthritischen Tieren noch bei der Kontrollgruppe konnten klinische Zeichen einer manifesten systemischen Beteiligung nachgewiesen werden. Auch

wurden weder Defizite hinsichtlich Pflege oder atypisches Verhalten, noch veränderter Körpergewichtsverlauf im Vergleich zu den Kontrolltieren auffällig.

### 5.2.2 Makro- und Mikrohämodynamische Parameter

Die mikrochirurgische Präparation beeinträchtigte zu keinem Zeitpunkt während der Versuche die Kreislaufsituation. Der mittlere arterielle Blutdruck gemessen während der Präparation an Tag 7 war zwischen allen vier Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

Kontrolle P-Sel(+ / +) (Gruppe1):	76 ± 5 mmHg
AiA P-Sel(+ / +)(Gruppe3):	74 ± 3 mmHg
Kontrolle P-Sel(- / -)(Gruppe 2):	80 ± 3 mmHg
AiA P-Sel(- / -)(Gruppe4):	77 ± 2 mmHg

Es gab keinen signifikanten Unterschied im Durchmesser der postkapillären Venolen im Vergleich aller vier Gruppen:

Kontrolle P-Sel(+ / +)(Gruppe1):	12,79 ± 3,19 µm
AiA P-Sel(+ / +)(Gruppe3):	10,91 ± 1,36 µm
Kontrolle P-Sel(- / -)(Gruppe2):	13,39 ± 4,03 µm
AiA P-Sel(- / -)(Gruppe4):	14,57 ± 2,57 µm

Auch die Erythrozytenfließgeschwindigkeit in postkapillären Venolen unterschieden sich am Tag 7 der AiA nicht signifikant von den Werten der Kontrolltiere.

Kontrolle P-Sel(+ / +)(Gruppe1):	0,52 ± 0,09 mm/s
AiA P-Sel(+ / +)(Gruppe3):	0,51 ± 0,28 mm/s
Kontrolle P-Sel(- / -)(Gruppe2):	0,56 ± 0,15 mm/s
AiA P-Sel(- / -)(Gruppe4):	0,67 ± 0,1 mm/s

Die funktionelle Kapillardichte (FKD) war in beiden arthritischen Gruppen in der Akutphase am Tag 7 gegenüber gesunden Kontrolltieren erhöht, der Unterschied war aber nicht signifikant.

Kontrolle P-Sel(+ / +)(Gruppe1):	249,43 ± 35,36 cm/cm <sup>2</sup>
AiA P-Sel(+ / +)(Gruppe3):	361,05 ± 30,43 cm/cm <sup>2</sup>
Kontrolle P-Sel(- / -)(Gruppe2):	252,47 ± 33,41 cm/cm <sup>2</sup>
AiA P-Sel(- / -)Gruppe4):	322,55 ± 14,33 cm/cm <sup>2</sup>

### 5.2.3 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Das Verhalten der Leukozyten am Tag 7 nach Arthritisinduktion in der P-Sel(+/-)-AiA-Gruppe unterschied sich signifikant von den P-Sel(+/-)-Kontrolltieren und verhielt sich daher ähnlich den Balb/C Gruppen im ersten Teil dieser Arbeit. Innerhalb der nicht arthritischen P-Sel(+/-)-Gruppe wurden nur vereinzelte rollende ( $0,08 \pm 0,02$ ) oder adhärenente ( $551,3 \pm 148 \text{ mm}^{-2}$ ) Leukozyten beobachtet. Im Gegensatz dazu war in der P-Sel(+/-)-AiA-Gruppe am Tag 7 die Fraktion der rollenden Leukozyten signifikant erhöht ( $0,21 \pm 0,03$ ). Auch die Anzahl der adhärenenten Leukozyten unterschied sich am Tag 7 signifikant ( $1491,8 \pm 283,5 \text{ mm}^{-2}$ ) von den P-Sel(+/-)-Kontrolltieren. Ein etwas anderes Ergebnis zeigte sich bei den beiden P-Sel(-/-) Gruppen. Hier lagen die Werte in der P-Sel(-/-)-AiA-Gruppe bzgl. der rollenden ( $0,12 \pm 0,02$ ) und adhärenenten ( $387,2 \pm 36,7 \text{ mm}^{-2}$ ) Leukozyten auf ähnlichem Niveau wie die Werte der rollenden ( $0,09 \pm 0,01$ ) und adhärenenten ( $355,4 \pm 47,6 \text{ mm}^{-2}$ ) Leukozyten in der P(-/-)-Kontrollgruppe und unterschieden sich damit auch kaum von der Werten der P-Sel(+/-) Kontrollgruppe ohne Arthritis

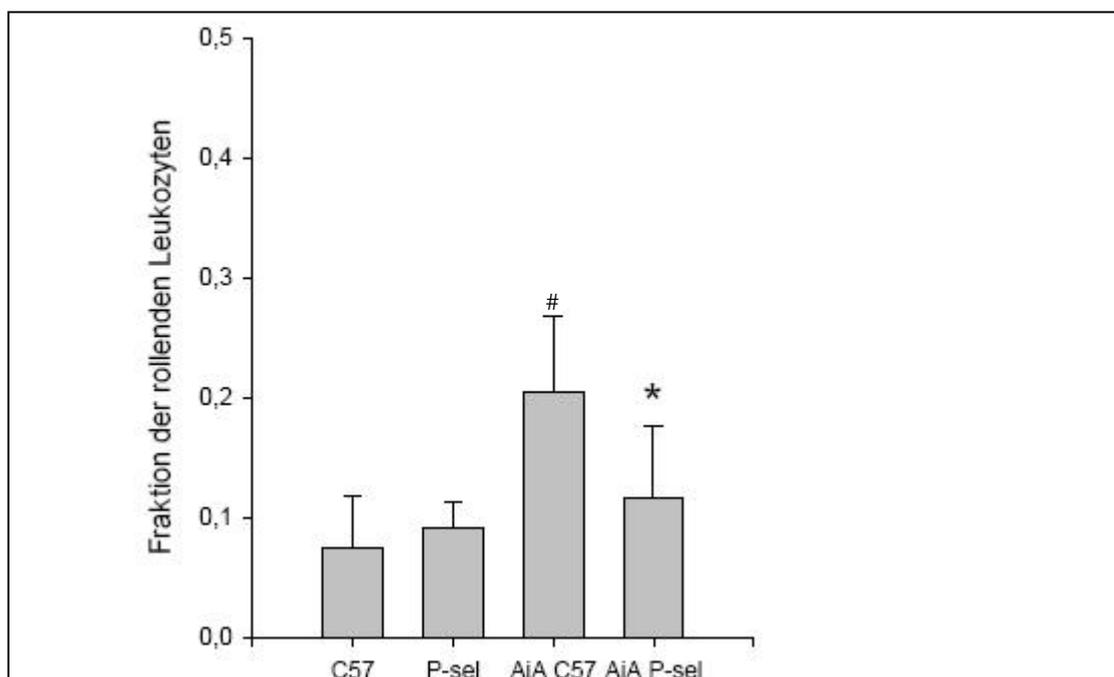


Abbildung 16 Rollende Leukozyten

Fraktion rollender Leukozyten in der AiA-P-Sel(+/-)-Gruppe (n=7) und der AiA-P-Sel(-/-)-Gruppe (n=7) am Tag 7 nach Arthritis-Induktion im Vergleich zu den Kontrollgruppen P-Sel(+/-) (n=7) und P-Sel(-/-) (n=7), die sterile Kochsalzlösung injiziert bekamen. d = 0 Tag der AiA-Induktion. # =  $p < 0,05$  C57/Bl6 Mäuse mit AiA versus Kontrollgruppe. \* =  $p < 0,05$

P-Selektin defiziente Tiere mit AiA versus C57/Bl6 mit AiA. Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=7).

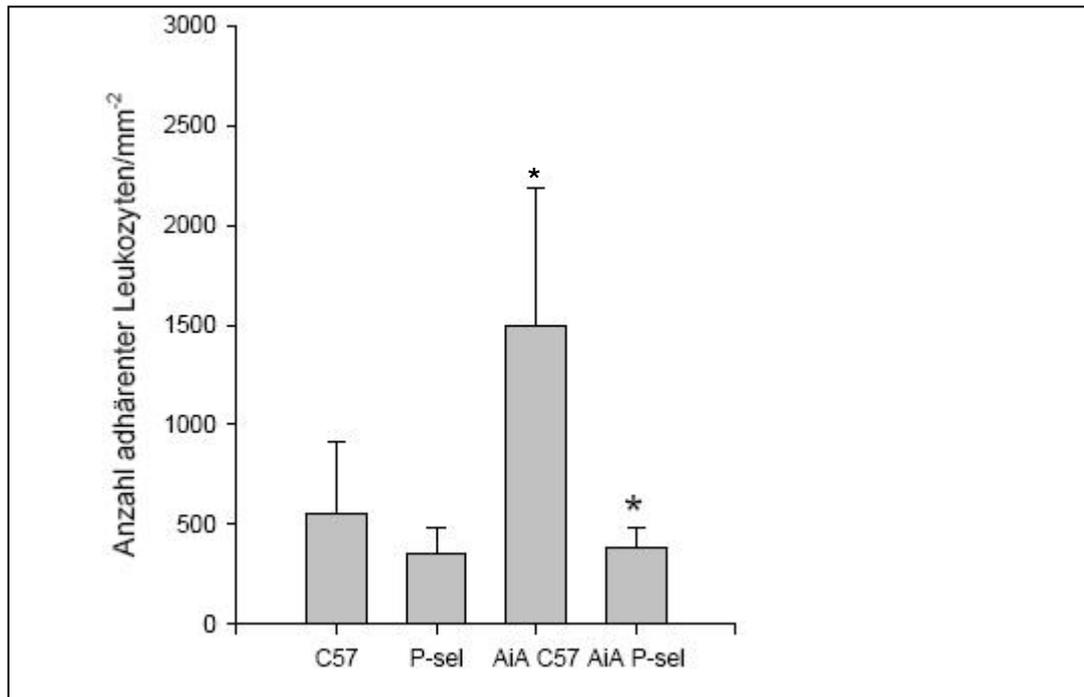


Abbildung 17 Adhärente Leukozyten

Fraktion adhärenter Leukozyten in der AiA-P-Sel(+/-)-Gruppe (n=7) und der AiA-P-Sel(-/-)-Gruppe (n=7) am Tag 7 nach Arthritis-Induktion im Vergleich zu den Kontrollgruppen P-Sel(+/-) (n=7) und P-Sel(-/-) (n=7), die sterile Kochsalzlösung injiziert bekamen. d = 0 Tag der AiA-Induktion. # =  $p < 0.05$  C57/Bl6 Mäuse mit AiA versus Kontrollgruppe. \* =  $p < 0.05$  P-Selektin defiziente Tiere mit AiA versus C57/Bl6 mit AiA Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=7).

#### 5.2.4 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion

Die Thrombozyten zeigten in ihrer Interaktion mit dem Endothel Ähnlichkeiten zum Verhalten der Leukozyten. Sowohl rollende als auch adhärente Thrombozyten konnten beobachtet werden.

Ähnlich wie bei Leukozyten interagierten Thrombozyten nur selten mit dem normalen Synovialgewebe in Kontrolltieren. Dies gilt sowohl für die P-Sel(+/-), als auch für die P-Sel(-/-) Kontrollgruppe. Nur eine geringe Anzahl an Thrombozyten in der P-Sel(+/-)-Kontrollgruppe rollten an den Endothelzellen entlang ( $0,041 \pm 0,024$ ) oder haftete an ihnen fest ( $174,21 \pm 89,12 \text{ mm}^{-2}$ ). Ganz im Gegensatz zu den P-Sel(+/-)-AiA-Tieren, bei denen die Fraktion rollender Thrombozyten signifikant höher war ( $0,203 \pm 0,110$ ). Bei den adhärenten Thrombozyten war der Unterschied

noch deutlicher mit einem mehr als 11-fachen Anstieg bei den P-Sel(+/-)-AiA-Tieren ( $1910,0 \pm 490,8 \text{ mm}^{-2}$ ).

Ein etwas anderes Ergebnis zeigte sich bei den beiden P-Sel(-/-)-Gruppen. Hier lagen die Werte in der P-Sel(-/-)-AiA-Gruppe bzgl. der rollenden ( $0,047 \pm 0,016$ ) und adhärennten ( $130,1 \pm 48,5 \text{ mm}^{-2}$ ) Thrombozyten auf ähnlichem Niveau wie die Werte der rollenden ( $0,035 \pm 0,029$ ) und adhärennten ( $119,0 \pm 54,5 \text{ mm}^{-2}$ ) Thrombozyten in der P(-/-)Kontrollgruppe und unterschieden sich damit auch kaum von der Werten der P-Sel(+/-) Kontrollgruppe.

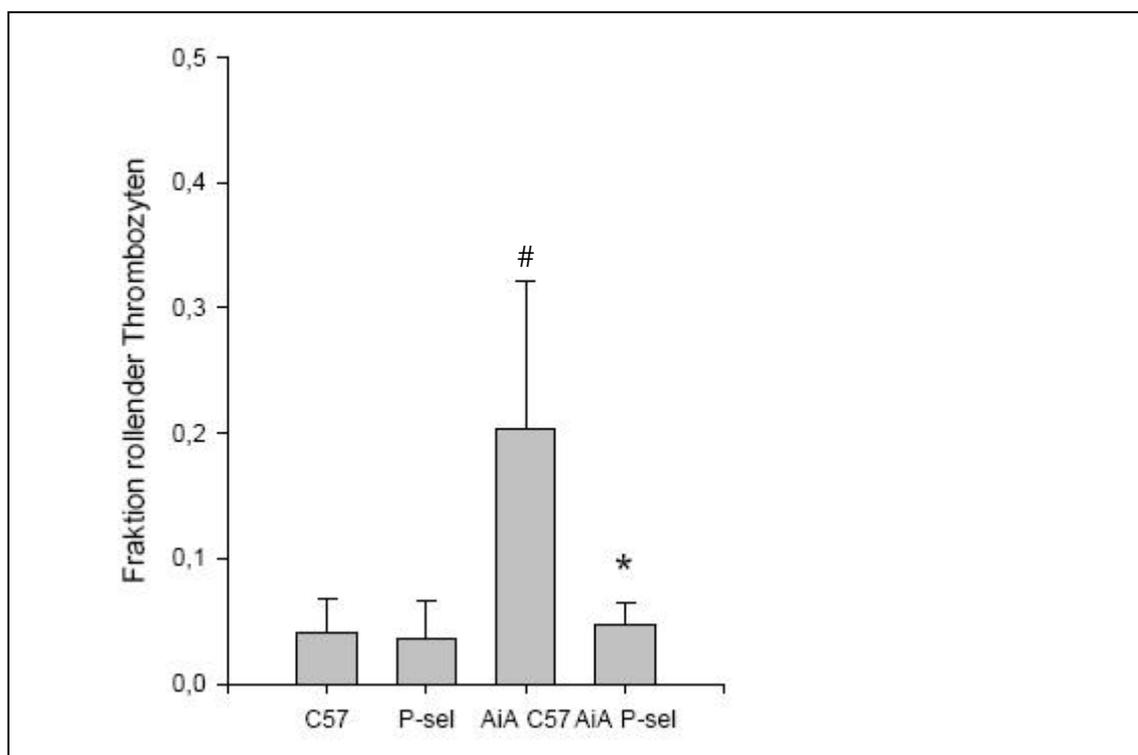


Abbildung 18 Rollende Thrombozyten

Fraktion rollender Thrombozyten in der AiA-P-Sel(+/-)-Gruppe (n=7) und der AiA-P-Sel(-/-)-Gruppe (n=7) am Tag 7 nach Arthritis-Induktion im Vergleich zu den Kontrollgruppen P-Sel(+/-) (n=7) und P-Sel(-/-)(n=7), die sterile Kochsalzlösung injiziert bekamen. d = 0 Tag der AiA-Induktion. # =  $p < 0,05$  C57/B16 Mäuse mit AiA versus Kontrollgruppe. \* =  $p < 0,05$  P-Selektin defiziente Tiere mit AiA versus C57/B16 mit AiA. Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM (n=7).

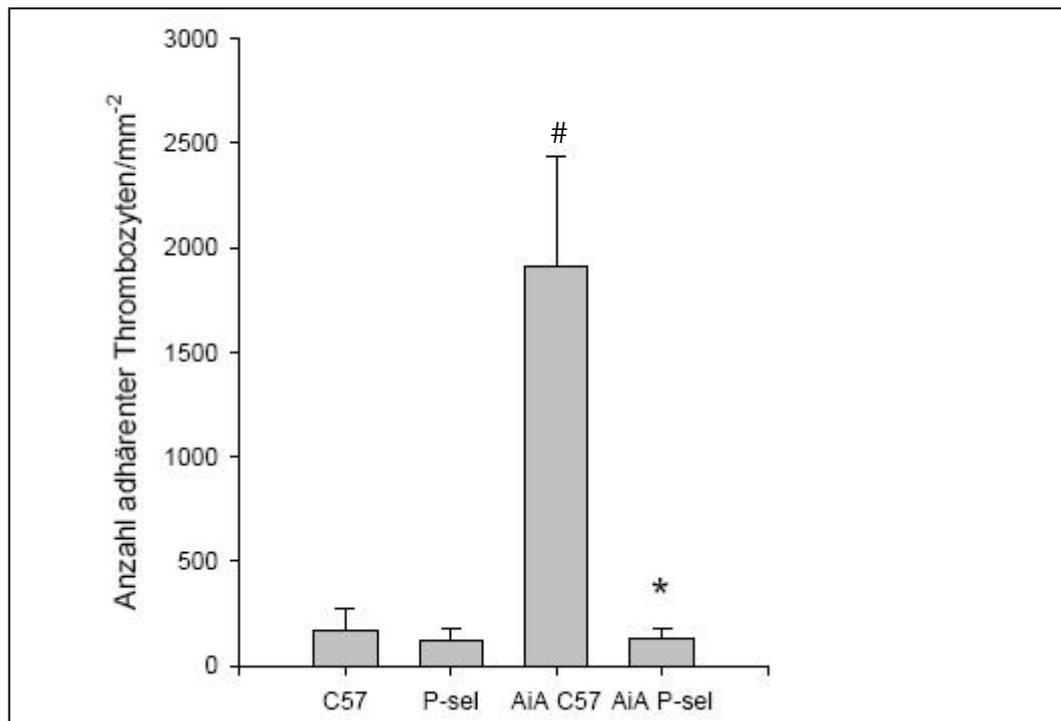


Abbildung 19 Adhärente Thrombozyten

Fraktion adhärenter Thrombozyten in der AiA-P-Sel(+/-)-Gruppe (n=7) und der AiA-P-Sel(-/-)-Gruppe (n=7) am Tag 7 nach Arthritis-Induktion im Vergleich zu den Kontrollgruppen P-Sel(+/-) (n=7) und P-Sel(-/-) (n=7), die sterile Kochsalzlösung injiziert bekamen. d = 0 Tag der AiA-Induktion. # = p < 0.05 C57/Bl6 Mäuse mit AiA versus Kontrollgruppe. \* = p < 0.05 P-Selektin defiziente Tiere mit AiA versus C57/Bl6 mit AiA. Daten sind angegeben als Mittelwert ± SEM (n=7).

### 5.2.5 Immunhistologie

Um die Expression von P-Selektin im Synovialgewebe des Kniegelenkes zu analysieren wurden nach Abschluss der intravitalmikroskopischen Untersuchung Proben für die Immunhistologie gewonnen. An Gefrierschnitten erfolgte anschließend die immunhistochemische Analyse der Expression von P-Selektin und von-Willebrand-Faktor mit Hilfe spezifischer monoklonalen Antikörper (Pharmingen). Der gleichzeitige immunhistologische Nachweis von von-Willebrand-Faktor diente zum Nachweis vaskulärer Strukturen im Gewebe. Die immunhistologische Analyse zeigte eine allenfalls geringe Expression von P-Selektin in Arteriolen und Venolen von nicht arthritischen Tieren. Nach Arthritisinduktion fand sich an Tag 7 dagegen eine deutliche Zunahme der P-Selektin-Expression, erkennbar an einer braun-rötlichen, spezifischen Färbung. P-Selektin fand sich dabei

sowohl in Arteriolen als auch in Venolen. Bei den P-Selektin defizienten Mäusen konnte weder in der Kontroll- noch in der Arthritisgruppe P-Selektin in den Immunhistologieschnitten nachgewiesen werden.

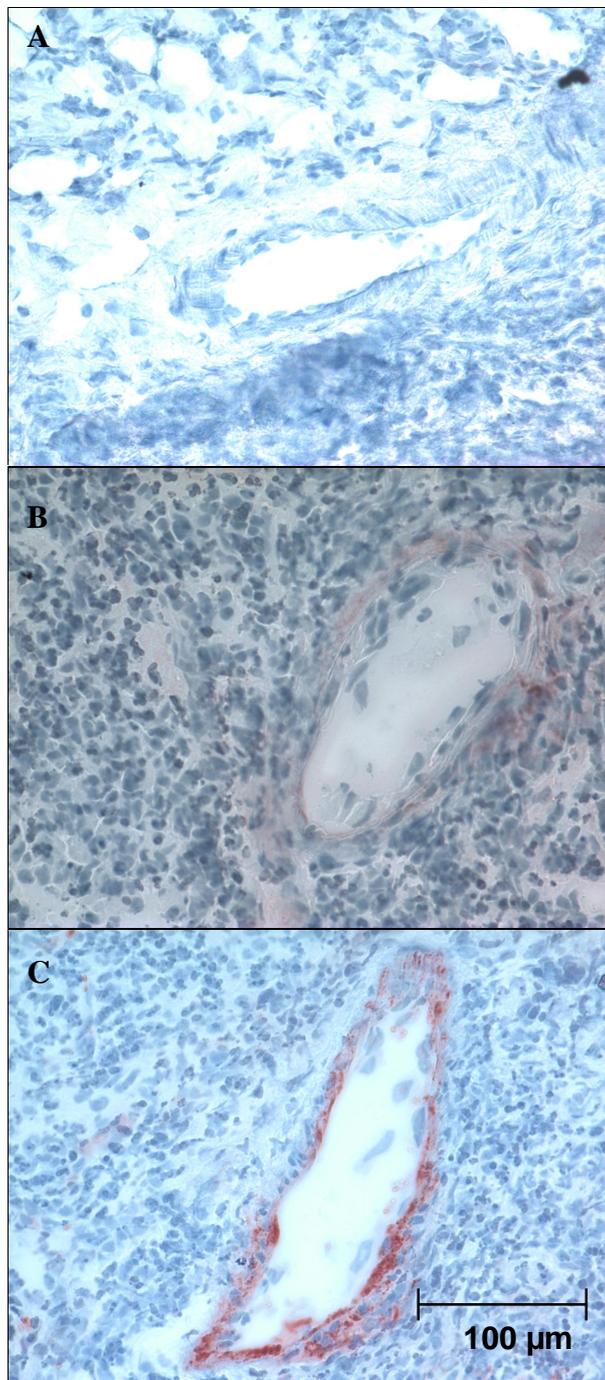


Abbildung 20 Immunhistologie

Immunhistologischer Nachweis von P-Selektin:

- A: keine Anfärbung: AiA-P-Sel(-/-)-Gruppe
- B: mäßige Anfärbung: Kontrollgruppe P-Sel(+/+)
- C: starke Anfärbung: AiA-P-Sel(+/+)-Gruppe

Auf zellulärer Ebene war CD62P auf Thrombozyten nachweisbar, die dem Endothel anhafteten (granuläres Färbungsmuster). Die Arteriolen und Venolen der arthritischen Tiere zeigten eine deutliche endotheliale Expression des Selektins (lineares Färbungsmuster), im Vergleich zur schwachen Anfärbung bei den P-Sel(+/+)-Kontrolltieren. Bei den P-Selectin-defizienten Tieren war weder unter physiologischen Bedingungen noch nach Arthritisinduktion eine Expression von P-Selektin nachweisbar.

Gruppen	P-Selektin: Tag 7
Kontrolle (P-Selektin +/+)	(+)/(+)
Kontrolle (P-Selektin -/-)	-/-
AiA (P-Selektin +/+)	++/++
AiA (P-Selektin -/-)	-/-

Tabelle 4 Expression von P-Selektin

- keine Anfärbung
- (+) geringe Anfärbung
- + mäßige Anfärbung
- ++ starke Anfärbung

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Grundlagen

Im Rahmen der Krankheiten des rheumatischen Formenkreises werden eine Reihe verschiedener entzündlicher Systemerkrankungen meist unbekannter Ätiologie zusammengefasst. Ihnen gemeinsam ist die Manifestation am Stütz- und Bindegewebe des Bewegungsapparats.

Die Einteilung der „rheumatischen Erkrankungen“ erfolgt nach ätiologischen (infektiös, metabolisch, autoimmun), pathologisch-anatomischen (entzündlich, degenerativ, funktionell) und topographischen Gesichtspunkten (Erkrankungen der Bänder, Sehnen, Knochen, Muskeln, Faszien).

Die häufigste entzündlich-rheumatische Erkrankung ist, noch vor den Spondylarthropathien, Kollagenosen und Vaskulitiden, die rheumatoide Arthritis (RA, auch chronische Polyarthritis, cP). Diese Erkrankung führt über eine Synovialitis zu Arthritis, Bursitis und Tendovaginitis. Fakultativ kann es aber auch zu extraartikulären Organmanifestationen, wie z.B. Perikarditis, Pleuritis und Vaskulitis kommen. Es ist außerdem bekannt, dass die häufigste Todesursache bei RA-Patienten die ischämische Herzerkrankung darstellt, und dass diese Patienten nach erlittenem Infarkt eine höhere Hospital-Mortalität aufweisen. (Bischoff, 2004).

Die Bedeutung der Thrombozyten und hierbei insbesondere von P-Selektin im Rahmen der Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis ist noch weitgehend ungeklärt, obwohl die Beteiligung von Thrombozyten im Rahmen von anderen entzündlichen Prozessen schon mehrfach nachgewiesen wurde. Thrombozyten sind die ersten und zahlenmäßig am häufigsten vertretenen Zellen, die bei jeglicher Verletzung des Endothels akkumulieren. Innerhalb von Sekunden reagieren sie auf eine Vielzahl von Stimulationsreizen, die durch Gewebeschädigung oder Pathogene freigesetzt werden. Nach ihrer Aktivierung exprimieren sie Rezeptoren für Proteine und setzen proinflammatorische Rezeptoren, Wachstumsfaktoren, Zytokine und zytotoxische Proteasen frei (Weyrich et al., 1996, Bubel et al., 1996; Deuel et al., 1981). Dadurch können Thrombozyten den Inflammationsprozess, die Abwehr und die Reparatur von Geweben initiieren und steuern. Sie sind Bestandteil eines

Netzwerkes zwischen Leukozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten im Rahmen von Entzündungen. (Kinger, 2002). Viele entzündliche Krankheiten sind charakterisiert durch Anzeichen von Thrombozyten-Aktivierung, aber es ist schwierig eine direkte Beziehung zwischen der Aktivierung der Thrombozyten und der sich anschließenden Entzündung herzustellen, obwohl einige Studien darauf hinweisen, dass der Schweregrad der Entzündung in Krankheiten wie z.B. Morbus Crohn, Asthma Bronchiale, Arteriosklerose und RA mit Anzahl der Thrombozyten korreliert (Danese et al., 2002; Pitchford et al., 2004; Huo und Ley, 2004). Pan et al. konnte zeigen, dass durch die Inhibition von E-und P-Selektin die Inflammationsreaktion bei hypersensitiven Pneumonitis der Maus signifikant reduziert werden konnte (Pan et al., 2000).

## **6.2 Diskussion der Methoden**

### **6.2.1 Die Antigen-induzierte-Arthritis der Maus**

Die Antigen-induzierte Arthritis (AiA) ist ein etabliertes Tiermodell für die experimentelle Untersuchung pathophysiologischer Vorgänge der humanen Rheumatoiden Arthritis. Sie wurde erstmals von Dumonde und Glynn 1962 am Kaninchen beschrieben (Dumonde and Glynn, 1962) und 1977 von Brackertz an der Maus etabliert (Brackertz et al., 1977).

Neben der AiA existieren weitere anerkannte experimentelle Arthritismodelle zur Erforschung der RA, die sich hinsichtlich der jeweils zu Grunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge unterscheiden, wie z. B. die Kollagen-II-induzierte Arthritis (Wooley et al., 1981; Trentham, 1982), die Adjuvans-Arthritis (Taurog et al., 1985; Kleinau et al., 1991; van Eden et al., 1985) und die Streptokokken-Zellwand-Arthritis (Koga et al., 1985), auf die hier aber nicht näher eingegangen werden soll.

Wir haben das Tiermodell der AiA zur Durchführung unserer Studie gewählt, da wir es im Bereich der Leukozyten bereits erfolgreich etablieren konnten und die Histologie der AiA der humanen RA mit einem Gelenksinfiltrat aus T-

Lymphozyten (hauptsächlich CD4+), B-Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen sehr ähnlich ist (Brackertz et al., 1977; Brauer et al., 1993).

Außerdem präsentiert sich das Kniegelenk als leicht zugänglich, bietet für die Experimente reproduzierbare arthritische Veränderungen, sowohl für akute als auch chronische Stadien der Erkrankung und zeigt bei stabiler Induktion kaum systemische Nebenwirkungen (Brackertz et al., 1977; Veihelmann et al., 1999).

#### 6.2.2 Einsatz der Intravitalmikroskopie zur Beurteilung der Leukozyten- und der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion

Das verwendete Mausmodell zur Visualisierung und quantitativen Untersuchung der synovialen Mikrozirkulation durch die Intravitalmikroskopie wurde erstmals von Veihelmann et al etabliert (Veihelmann et al., 1998). Grundvoraussetzung bei der Verwendung dieses Modells war unter anderem die Stabilität während der gesamten Präparation und den sich anschließenden Aufnahmen. Für den Beobachtungszeitraum von 60 Minuten konnte gezeigt werden, dass das Modell unter physiologischen Bedingungen stabil ist hinsichtlich des Durchmessers von synovialen Mikrogefäßen, der venulären Erythrozytenfließgeschwindigkeit, der funktionellen Kapillardichte und der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Somit sind stabile Voraussetzungen für Untersuchungen von möglichen pathophysiologischen Veränderungen bei Inflammation und nach Anwendung von Therapeutika gegeben.

Mehrere Studien zur Untersuchung der Mikrozirkulation unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen wurden von unserer Arbeitsgruppe bereits durchgeführt (Veihelmann et al., 1999; Veihelmann et al., 2001; Veihelmann et al., 2001).

Als Methode zur direkten Visualisierung von Leukozyten und Thrombozyten in der synovialen Mikrozirkulation verwendeten wir die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie. Durch diese Methode wurden in den letzten Jahren wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Pathomechanismen bei Entzündungen, Transplantatabstoßung und Autoimmunerkrankungen gewonnen.

Anders als histologische (Cywes et al., 1993) bzw. szintigraphische Verfahren mit Einsatz <sup>111</sup>Indium-markierter Thrombozyten (Chintala et al., 1994) erlaubt die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie den direkten Einblick in die Dynamik der Mikrozirkulation des untersuchten Gewebes mit quantitativer Beurteilung zellulärer Phänomene einerseits, und des mikrovaskulären Blutflusses andererseits. Zusätzlich ermöglicht die in-vivo Fluoreszenzmikroskopie dabei die getrennte Visualisierung und quantitative Analyse der einzelnen Segmente der Mikrozirkulation, wie Arteriolen, Kapillaren sowie Venolen und vermag die nutritive Perfusion, d.h. die tatsächlich perfundierten Gefäße, selektiv zu erfassen. Außerdem lassen sich zeitgleich sowohl Leukozyten als auch Thrombozyten in diesem Modell quantifizieren. Die intravitale Mikroskopie ist daher für unsere experimentellen Studien eine geeignete Untersuchungsmethode.

### 6.2.3 Thrombozytenseparation

Thrombozyten können nicht wie etwa Leukozyten durch intravenöse Applikation von Fluorchromen wie Rhodamin-6G, dargestellt werden, da sie sich mit dieser Methode auf Grund der fehlenden Mitochondrien nicht ausreichend anfärben lassen. Daher wurden zur quantitativen Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen die Thrombozyten aus dem Vollblut separater Spendertiere isoliert und *ex vivo* mit dem Fluoreszenzmarker Carboxyfluoreszein-Diacetatester (CFDA-SE, Molecular Probes, Eugene, OR) beladen. Um eine relevante Aktivierung der Zellen im Rahmen der Separation auszuschließen, bestimmten wir die P-Selektin Expression auf Thrombozyten im Vollblut, sowie nach differentieller Zentrifugation. Die Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche diente dabei als Marker für die  $\alpha$ -Granula Sekretion und ist als sensitiver Marker für eine Thrombozytenaktivierung allgemein akzeptiert (Stenberg et al. 1985). Die Expression von P-Selektin zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Thrombozyten im Vollblut im Vergleich zu separierten Thrombozyten. Gleichzeitig fand sich nach Inkubation mit PMA sowohl im Vollblut als auch nach Separation eine dramatische Hochregulation der P-Selektin-Oberflächenexpression. Eine

signifikante Thrombozytenaktivierung/-passivierung im Rahmen des Separationsprozesses konnte auf diese Weise ausgeschlossen werden.

Auch die Tatsache, dass sich unter physiologischen Bedingungen bei Kontrolltieren nur sehr wenige Interaktionen zwischen *ex vivo*-fluorchromierten Thrombozyten und Endothel nachweisen ließ, spricht gegen eine relevante Aktivierung der Zellen im Rahmen der Separation.

#### 6.2.4 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen bei der AiA

Um die differentielle Bedeutung von Thrombozyten im Vergleich zu Leukozyten bei der Ausbildung einer AiA untersuchen zu können, wurde ein Versuchsansatz gewählt, in dem sowohl die Thrombozyten- als auch die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen bei demselben Versuchstier untersucht werden konnte.

Dass Leukozyten eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der rheumatoiden Arthritis spielen ist schon aus Studien unserer eigenen Arbeitsgruppe und anderer Veröffentlichungen bekannt. (Veihelmann et al., 1999; Veihelmann et al., 2001; Veihelmann et al., 2001).

Einige Studien lieferten bereits Hinweise, dass auch den Thrombozyten eine entscheidende Bedeutung bei der Entwicklung der RA zukommt. So konnten Untersuchungen zeigen, dass die Anzahl der Thrombozyten bei der aktiven RA erhöht ist und dies auch mit dem Anstieg von Entzündungsparametern wie CRP und IL-6 korreliert (Milanovic et al., 2004; Ertenli et al., 2003).

Auch wurde bereits nachgewiesen, dass platelet-derived microparticles (PMPs), deren Bedeutung im Rahmen von Herzerkrankungen bereits erforscht wurde, bei der RA mit der Krankheitsaktivität positiv korrelieren (Knijff-Dutmer et al., 2002). Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass bei Patienten mit RA die Thrombozyten gesteigerte Sensitivität für Aggregationsstimuli zeigen (Colli et al., 1982). Hier wurde gezeigt, dass Thrombozyten deutlich sensitiver auf Reize von Kollagen und Epinephrin induzierter Aggregation reagieren.

Innerhalb der vorliegenden Studie konnte beobachtet werden, dass durch Arthritis sowohl die Anzahl an rollender, und als auch an adhärenter Thrombozyten stark zunimmt. In normalen synovialen Gefäßen zeigte die Intravitalmikroskopie nur eine sehr geringe Anzahl rollender oder anhaftender Leukozyten bzw. Thrombozyten. Diese Beobachtung stimmt mit Daten aus anderen Arbeiten in verschiedenen Organsystemen überein (Massberg et al., 1998, Frenette et al., 1998).

Die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen scheint dagegen eine wichtige Rolle bei der Antigen-Induzierten Arthritis zu spielen. Innerhalb der Mikrozirkulation der arthritischen Tiere konnten wir eine Zunahme der rollenden Thrombozyten um etwas mehr als den Faktor 5 und bei den adhärenten Thrombozyten sogar um das 12fache beobachten. Die Zahl der rollenden bzw. adhärenten Leukozyten nahm im Gegensatz dazu nur um den Faktor 3 zu. Der Nachweis dieser deutlich vermehrten Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion bei AiA legt nahe, dass die Oberfläche der arthritischen Gefäße Strukturen exprimieren, die die Adhäsion von aktivierten Thrombozyten ermöglichen. Das lose Anhaften von Leukozyten an das Endothel im Rahmen von Entzündungen ist essentieller Bestandteil einer Kaskade, die in einer festen Adhäsion und gegebenenfalls Emigration der Leukozyten durch die Gefäßwand resultiert. Die hierfür verantwortlichen Moleküle sowohl für das Rollen und die Adhärenz von Leukozyten als auch Thrombozyten, wie von-Willebrand-Faktor und P-Selektin, werden in den sogenannten alpha-Granula gespeichert (Weibel und Palade, 1982; Wagner et al., 1982; Mc Ever et al., 1989), was auf eine Beteiligung von Thrombozyten im Rahmen der Arthritis-induzierten Inflammation hindeutet.

Der schädigende Effekt durch die Aktivierung und Einwanderung von Leukozyten, insbesondere der polymorphkernigen Neutrophilen (PMN), konnte bei Arthritis bereits gezeigt werden (Taylor et al., 2000; Schulze et al., 1998). Ebenso konnte durch Hemmung von PMNs die Ausprägung der arthritischen Veränderungen reduziert werden (Kamel et al., 1991; Davis et al., 1986). Dies legt nahe, daß zwischen der Einwanderung und Akkumulation von PMNs und dem entstehenden Gewebeschaden ein kausaler Zusammenhang besteht.

### 6.2.5 Analyse der Bedeutung von P-Selektin in der synovialen Mikrozirkulation am Modell der AiA der Maus

Im zweiten Teil der Studie wurde die Bedeutung des Adhäsionsrezeptors P-Selektin für die Interaktion der Leukozyten und Thrombozyten mit den Endothelzellen untersucht. Schon andere Studien konnten zeigen, dass bei Patienten mit Arthritis die Level für zirkulierende Selektine, insbesondere P-Selektin, erhöht sind und auch mit Entzündungsmarkern wie z.B. tumor necrosis factor receptor 2 (sTNFR2) oder C-reaktives Protein (CRP) korrelieren (De Benedetti et al., 2000). Auch ist schon aus anderen Arbeiten bekannt, dass die Serumlevel von Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin oder ICAM-1 bei Patienten mit aktiver RA unter Therapie mit Sulphasalazine rückläufig sind. Hinsichtlich der Bedeutung von P-Selektin im Rahmen der unterschiedlichen Arthritismodelle im Tierversuch sind teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse veröffentlicht worden. Walter et al. konnten zeigen, dass die Leukozyten- und Monozytenmigration bei der adjuvant-induced Arthritis der Ratte durch Antikörper gegen P-Selektin signifikant verringert werden konnte (Walter et al., 1997). Auch bei Verdrengh et al. zeigte sich, dass bei P-Selektin defizienten Mäusen die Staphylokokken-Aureus-induzierter Arthritis im frühen Stadium klinisch und histologisch signifikant geringer ausgeprägt war (Verdrengh et al., 2000).

Im Gegensatz dazu zeigten Bullard et al. bei der Kollagen-Induzierten Arthritis P-Selektin defizienter Mäuse einen beschleunigten und fulminanteren Verlauf im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Bullard et al, 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte, nachdem der Nachweis einer deutlich vermehrten Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion erfolgte, gezeigt werden, dass in diesem Arthritismodell P-Selektin eine wesentliche Rolle in der Akutphase der Arthritis spielt. Bei den P-Selektin Knock-out-Mäusen war in der Akutphase der Arthritis sowohl bei den Leukozyten, als auch bei den Thrombozyten die Endothelzell-Interaktion deutlich vermindert und lag fast auf Niveau der gesunden Kontrolltiere. Dies zeigte deutlich die Bedeutung von P-Selektin als Vermittler des Rollens zwischen Thrombozyten und dem Endothel in diesem Modell. Das Rollen der

Leukozyten wird durch Selektine vermittelt. Hierbei wird auf der Oberfläche der Leukozyten L-Selektin exprimiert, welches den Kontakt zur Endothelzelle herstellt (von Andrain et al., 1991). P-Selektin wird von Leukozyten nicht exprimiert. Somit lassen die vorliegenden Ergebnisse vermuten, dass Thrombozyten primär an das Endothel binden und die Akkumulation von Leukozyten initiieren, wodurch im weiteren Verlauf der Gewebeschaden hervorgerufen wird (Hervig et al., 1999; Piccardoni et al., 2001).

Bei Leukozyten konnte schon bei P-Sel(-/-) Mäusen ohne Arthritis eine verminderte Leukozyten-Interaktion mit der Gefäßwand nachgewiesen werden (Wagner et al., 1995). Für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion im Rahmen der RA lagen hierfür bis jetzt noch wenige Daten vor.

Außerdem zeigt diese Studie, dass der Kniegelenksdurchmesser in der Akutphase bei der P-Sel(-/-)-Arthritisgruppe ansteigt, aber im gesamten Verlauf zwar nicht signifikant aber unter den Kniegelenksdurchmessern der P-Sel(+/-)-AiA-Gruppe bleibt. Auch dies zeigt die Bedeutung von P-Selektin innerhalb dieses Arthritis-Modells. Unsere Beobachtung steht im Gegensatz zu einer Untersuchung von Bullard et al., der in der Akutphase bei der Kollagen-induzierter Arthritis bei P-Selektin defizienten Mäusen einen beschleunigten und fulminanteren Verlauf zeigen konnte (Bullard et al., 1999).

Trotzdem scheint es erfolgversprechend, die durch P-Selektin vermittelte primäre Rollen von Blutplättchen im Rahmen der RA zu verhindern, um z. B. die nachgewiesene Hypersensitivität der Thrombozyten hinsichtlich Aggregationsstimuli bei Patienten mit RA zu verhindern (Colli et al., 1982) und die Anhäufung von Thrombozyten in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten zu vermindern (Endresen und Forre, 1992). Auch das Rollen von Neutrophilen auf aktivierten Thrombozyten wird durch P-Selektin vermittelt und führt im Verlauf zur festen Adhäsion von Neutrophilen an entzündliche Endothelzellen über weitere Adhäsionsmoleküle, wie CD11b/CD18, CD11a/CD18, GPIIb/IIIa und ICAM-2 (Mine et al., 2001). Durch die Blockierung von P-Selektin könnte man sowohl die Interaktion Thrombozyt-Endothelzelle, als auch Thrombozyt-Leukozyt vermindern und eventuell den Entzündungsprozess positiv beeinflussen.

Auffällig ist außerdem, dass die absolute Reduktion der Fraktion sowohl rollender als auch adhärenter Thrombozyten größer ist als bei den Leukozyten. Es scheint das dem P-Selektin bei den Thrombozyten im Vergleich zu den Leukozyten eine noch größere Bedeutung zukommt. Hierbei mag auch eine Rolle spielen, dass auch andere Selektine wie E- und L-Selektin eine Rolle bei der Adhäsion von Leukozyten zukommt (Walter und Issekutz, 1997) und dass das Zusammenspiel dieser Selektine ebenfalls wichtig ist (Birner et al., 1999). Im Widerspruch dazu steht eine Studie von Issekutz et al., in der E-Selektin-Antikörper zu einer signifikanten Verminderung der adjuvant-induzierten Arthritis hinsichtlich der Monozyten-Migration und der Knorpeldestruktion führten, P-Selektin-Antikörper aber keinen Effekt zeigten (Issekutz et al., 2001). Dies liegt eventuell an den unterschiedlichen Modellen der Arthritisinduktion innerhalb dieser Studien. Die Pathogenese der unterschiedlichen Arthritismodelle unterscheidet sich doch erheblich und dies allein könnte für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein. Bei der Adjuvans-Arthritis der Ratte kommt es zu einer Immunreaktion, die überwiegend auf zellulärer Ebene abläuft. Nach Immunisierung gegen Mykobakterium Tuberculosis werden durch die Injektionsemulsion primär Makrophagen stimuliert. Dieser Vorgang führt zu einer massiven Zytokinproduktion, Aktivierung von autoreaktiven B- und T-Zellen und Bildung autoreaktiver Antikörper gegen Knorpel und chronischer Gelenkentzündung. Da ein stark arthriogener T-Zell-Klon spezifisch für M. tuberculosis Antigene isoliert werden konnte, scheint eine Kreuzantigenität zwischen Mykobakterien-Antigenen und Knorpel-Proteoglykan-Autoantigenen als pathogenethischer Faktor ausschlaggebend zu sein (Taurog et al., 1985; Kleinau et al., 1991; van Eden et al., 1985). Im Gegensatz dazu nimmt man an, dass bei dem hier verwendeten Modell der AiA, Lymphozyten in der Pathogenese eine zentrale Rolle spielen, da die Histologie der AiA der humanen RA mit einem Gelenksinfiltrat aus T-Lymphozyten (hauptsächlich CD4+), B-Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen sehr ähnlich ist (Brackertz et al., 1977; Brauer et al., 1993).

Nach den Ergebnissen dieser Studie muss annehmen, dass den Thrombozyten eine bedeutende Rolle im Rahmen der RA zukommt. Sumariwalla et al. zeigte in einer Untersuchung, dass durch die Blockierung des P-Selektin glycoprotein ligand

(PSGL)-1 Rezeptors sowohl das klinische, als auch das histologische Fortschreiten bei der Kollagen-induzierten Arthritis im Mausmodell verhindert werden konnte (Sumariwalla et al., 2004). Bisher wurden verschiedene Selektin Inhibitoren entwickelt, die im Rahmen klinischer Studien mit Psoriasis- oder Asthma-Patienten oder experimenteller Studien untersucht wurden und ihre Effektivität dort gezeigt haben (Wang et al. 2002; Norman et al., 1998).

Im Mausmodell konnte die Arteriosklerose, bei der eine Inflammation sicherlich eine entscheidende Bedeutung spielt, durch die Blockade bzw. Elimination der P-Selektin Funktion reduziert werden (Huo et al., 2003; Ley, 2003). An einen therapeutischer Ansatz in dieser Richtung wäre auch bei der RA zu denken. Auch die Blockade des Rezeptors PSGL-1 durch eine rekombinantes Immunglobulin von PSGL-1 (rPSGL-Ig) konnte in Tiermodellen den postischemischen Schaden reduzieren und zeigte bei Ratten eine gute Verträglichkeit (Kumar et al., 1999; Hansen et al., 2004).

Außerdem ist es durchaus denkbar das Medikamente die anderer Stelle der Leukozyten-Thrombozyten- und Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion angreifen auch bei der RA zum Einsatz kommen, nachdem nun die Bedeutung der Thrombozyten fest steht. So könnte z.B. Tirofiban, das als Antagonisten des Glykoprotein Iib/IIIa fungiert, oder Clopidogrel durch Blockade des ADP-Rezeptors am Thrombozyt auch einen positiven Effekt auf die Leukozyten-Thrombozyten- und Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion im Rahmen der RA haben. Beide Medikamente haben ihre Effektivität bei der koronaren Gefäßerkrankung schon bewiesen. In letzter Zeit konnte die Rolle der Entzündung und der endotheliale Dysfunktion bei der Arteriosklerose gezeigt werden und die Gemeinsamkeiten in den Entzündungsmechanismen mit der RA aufgedeckt werden (Libby et al., 2002; Pasceri et al., 1999). Dies erklärt auch das die erhöhte kardiovaskuläre Mortalität bei Patienten mit RA in Abwesenheit klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren (Del Rincon et al., 2001). Durch die gezielte Inhibition von Thrombozyten könnte man somit sowohl die RA als auch die Arteriosklerose positiv beeinflussen und somit die Prognose dieser Patienten deutlich verbessern.

Ob diese Ergebnisse so auf die RA übertragbar sind, und ob sich dadurch neue Therapiestrategien entwickeln lassen muss Inhalt zukünftiger Forschung und Studien sein.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine Krankheit mit vergleichsweise hoher Prävalenz. Die Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung wird im Kreise der Autoimmunerkrankungen vermutet, ist aber trotz intensiver Forschung der letzten Jahre noch weitgehend unklar.

Es ist bekannt, dass es im Rahmen der synovialen Proliferation mit Bildung eines Gelenkpannus zu einer deutlichen Gefäßneubildung kommt. Dieser Gelenkpannus führt aufgrund seines verdrängenden Wachstums, sowie der Produktion proteolytischer Enzyme zur schmerzhaften Bewegungseinschränkung bis hin zur Versteifung der Gelenke.

Das Gefäßendothel spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Progression von entzündlichen Prozessen. In den vergangenen Jahren wurden wesentliche Erkenntnisse zu der Funktion des Endothels hinsichtlich der Produktion von Zytokinen, der Präsentation von Antigenen, der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion sowie der Neoangiogenese gewonnen.

Hierbei war bislang ungeklärt, inwieweit Thrombozyten an dem inflammatorischen Prozess der rheumatoiden Arthritis beteiligt sind.

Thrombozyten exprimieren auf der Zelloberfläche Glykoproteine, die die Adhäsion an die verletzte Gefäßwand vermitteln. Mitochondrien und Glykogramula befinden sich im Zellinneren der Thrombozyten und speichern u.a. Von-Willebrand-Faktor und P-Selektin. Außerdem exprimieren Thrombozyten eine Reihe von Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin, ICAM-1 sowie Integrine, wie das Glykoprotein Ib und IIb/IIIa. Nach ihrer Aktivierung produzieren die Thrombozyten Sauerstoffradikale und setzen proinflammatorische und vasoaktive Substanzen wie Thromboxan A<sub>2</sub>, Serotonin, Leukotrine und platelet-derived-growth-factor frei. Außerdem besitzen Thrombozyten die Fähigkeit die Funktion von Leukozyten zu modulieren.

Aufgrund der oben genannten Eigenschaften von Thrombozyten ist es zwar naheliegend, dass sie eine wichtige Rolle innerhalb der Pathogenese der RA spielen,

aber bis jetzt gibt es noch keine Untersuchung, die die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in vivo in der synovialen Mikrozirkulation charakterisiert.

Ziel der Studie war es die Rolle der Thrombozyten und insbesondere die von P-Selektin bei der Antigen-induzierten Arthritis der Maus hinsichtlich der synovialen Mikrozirkulation in vivo mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie, des klinischen Verlaufs und der Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen zu untersuchen.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde ein Modell etabliert, das mit Hilfe der intravitale Videofluoreszenzmikroskopie die Visualisierung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen ermöglicht. Hierfür wurde bei 14 Mäusen am achten Tag nach Induktion einer Antigen-induzierter rheumatoider Arthritis die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion mittels Intravitalmikroskopie untersucht. Zuvor wurden die Thrombozyten von Spendertieren ex-vivo mittels CDFA-SE gefärbt, den zu untersuchenden Tieren injiziert und anschließend die Anzahl der rollenden und adhärenen Thrombozyten, die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, der Durchmesser der Gefäße, die Erythrozytenflussgeschwindigkeit (RBV) und die funktionelle Kapillardichte (FCD) bestimmt. Das Ausmaß der Entzündung wurde durch Messung des Kniedurchmessers und einen histologischen Score quantifiziert.

Im Zweiten Abschnitt wurde die spezielle Rolle von P-Selektin in der synovialen Mikrozirkulation untersucht. Hierfür wurden in 4 Gruppen (P-Sel(+/+)-Kontrollgruppe, P-Sel(-/-)-Kontrollgruppe, P-Sel(+/+)-AiA-Gruppe, P-Sel(-/-)-AiA-Gruppe) die oben genannten Parameter untersucht und anschließend die entnommenen Gewebeproben immunhistochemisch auf P-Selektin und Von-Willebrand-Faktor analysiert.

Im ersten Abschnitt zeigte sich, dass sowohl die Kniegelenksdurchmesser als auch der histologische Score und die funktionelle Kapillardichte signifikant bei den AiA-Tieren erhöht war. Im Bereich Gefäßdurchmesser und Erythrozytenflussgeschwindigkeit gab es keinen signifikanten Unterschied. Bei den AiA-Tieren zeigte sich eine signifikante Erhöhung sowohl bei den rollenden Leukozyten (3fach) und Thrombozyten (6fach) als auch bei den adhärenen Leukozyten (3fach) und Thrombozyten (12fach) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im zweiten Abschnitt zeigte sich, dass sowohl die Kniegelenksdurchmesser als auch der histologische Score und die FCD signifikant bei den P-Sel(+/-)-AiA-Gruppe, P-Sel(-/-)-AiA-Gruppe gegenüber der P-Sel(+/-)-Kontrollgruppe und der P-Sel(-/-)-Kontrollgruppe erhöht war. Auffällig hierbei ist die Tatsache, dass der Kniegelenksdurchmesser in der P-Sel(-/-)-AiA-Gruppe zwar gegenüber den Kontrollgruppen erhöht war, aber auf deutlich niedrigerem Niveau im Vergleich zur P-Sel(+/-)-AiA-Gruppe lag. Im Bereich Gefäßdurchmesser und Erythrozytenflussgeschwindigkeit gab es auch hier keinen signifikanten Unterschied. Sowohl die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion als auch die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion zeigte sich in diesem Abschnitt hinsichtlich rollender und adhärenter Leukozyten bzw. Thrombozyten ähnlich. Bei beiden Zellarten unterschieden sich die Gruppe der P-Sel(+/-)-AiA-Tieren signifikant von der P-Sel(-/-) Kontrollgruppe, der P-Sel(+/-) Kontrollgruppe und der P-Sel(-/-)-AiA-Tieren, die auf etwa gleichem Niveau lagen. Bei der immunhistochemischen Untersuchung zeigte sich eine deutlich stärkere Expression von P-Selektin in der akuten Phase im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei den P-Selektin-knock-out-Mäusen konnte P-Selektin in keiner Gruppe nachgewiesen werden. Insgesamt zeigt sich, dass den Thrombozyten in der akuten Phase der AiA eine bedeutende Rolle zukommt und hierbei P-Selektin einen entscheidenden Anteil hat. Es ist durchaus denkbar, dass durch Blockade von P-Selektin sich der Krankheitsverlauf bei der RA positiv beeinflussen lässt. Inwieweit sich diese Ergebnisse auch auf die RA beim Menschen übertragen lassen und dies für zukünftige Therapiestrategien von Bedeutung ist müssen weitere Studien zeigen.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis 2002 Update. *Arthritis Rheumatism* 2002; 46(2):328-346.
2. Arnett F.C., Edworthy S. M., Bloch D.A., McShane D.J., Fries J.F., Cooper N.S., Healey L.A., Kaplan S.R., Liang M.H., Luthra H. S., Medsger T.A., Mitchell D.M., Neustadt D.H., Pinals R.S., Schaller J.G., Sharp J.T., Wilder R.L., Hunder G.G.: The American Rheumatism Association 1987 revised Criteria. *Arthritis Rheumatism*. 1988; 31(3):315-324.
3. Barry OP, Practio D, Lawson JA, Fitzgerald JA: Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 1997; 99:2118-2122.
4. De Benedetti F, Vivarelli M, Pignatti P, Oliveri M, Massa M, Pistorio A, Martini A. Circulating levels of soluble E-selectin, P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2000; 27(9):2246-50.
5. Bernhardt, J., M.R. Tschudi, Y. Dohi, I. Gut, B. Urwyler, F.R. Buhler, and T.F. Luscher. Release of nitric oxide from human vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 180:907-912.
6. Birner U, Issekutz TB, Issekutz AC. The role of selectins in VLA-4 and CD18-independent neutrophil migration to joints of rats with adjuvant arthritis. *Eur J Immunol.* 1999; 29(4):1094-100.
7. Bischoff A. Mit funktionsfähigen Gelenken alt werde. *Deutsches Ärzteblatt* 2004; 34-35:1854-1855.
8. Brackertz, D., Mitchell, G.F., and Mackay, I.R. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 1977; 20:841-850.
9. Braquet P, Rola-Pleszcynski M. Platelet-activating factor and cellular immune responses. *Immunol Today* 1987; 8:354-52.

10. Brauer, R., Thoss, K., and Henzgen, S. Humoral and cell-mediated sensitivity to cartilage constituents in mice with antigen-induced arthritis. *Agents Actions Suppl* 1993; 39:69-73.
11. Bresnihan B, Alvaro-Garcia JM, Cobby M et al.: Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 1998; 41:2196-04.
12. Brook A, Corbett M. Radiographic changes in early rheumatoid diseases. *Ann Rheum Dis* 1977; 36:71-3.
13. Bubel,S., D.Wilhelm, M.Entelmann, H.Kirchner, and H.Kluter. Chemokines in stored platelet concentrates. *Transfusion* 1996; 36:445-449.
14. Bullard DC, Mobley JM, Justen JM, Sly LM, Chosay JG, Dunn CJ, Lindsey JR, Beaudet AL, Staite ND. Acceleration and increased severity of collagen-induced arthritis in P-selectin mutant mice. *J Immunol.* 1999; 163(5):2844-9.
15. Chintala,M.S., V.Bernardino, and P.J.Chiu. Cyclic GMP but not cyclic AMP prevents renal platelet accumulation after ischemia-reperfusion in anesthetized rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1994; 271:1203-1208.
16. Colli S, Maderna P, Tremoli E, Colombo F, Canesi B. Platelet function in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 1982; 11(3):139-43.
17. Cywes,R., M.A.Packham, L.Tietze, J.R.Sanabria, P.R.Harvey, M.J.Phillips, and S.M.Strasberg. Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology* 1993; 18:635-647.
18. 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..
19. Danese S, Katz JA, Saibeni S, Papa A, Gasbarrini A, Vecchi m, Fiocchi C. Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients 2003; 52:1435-1441.
20. 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.
21. Del Rincon ID, Williams K, Stern MP et al. High Incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum* 2001; 44:2737-45.
  22. Deuel, T.F., R.M. Senior, D. Chang, G.L. Griffin, R.L. Henrikson, and E.T. Kaiser. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981; 78:4584-4587
  23. Dumonde D. and Glynn, L. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol* 1962; 43, 373-383.
  24. Eden van, W., Holoshitz, J., Nevo, Z., Frenkel, A., Klajman, A., and Cohen, I.R. Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to *Mycobacterium tuberculosis* and to cartilage proteoglycans. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82:5117-5120.
  25. 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):181-7.
  26. Ertenli I, Kiraz S, Arici M, Haznedaroglu IC, Calguneri M, Celik I, Kirazli S. P-selectin as a circulating molecular marker in rheumatoid arthritis with thrombocytosis. *J Rheumatol.* 1998; 25(6):1054-8.
  27. Ertenli I, Kiraz S, Ozturk MA, Haznedaroglu I, Celik I, Calguneri M. Pathologic thrombopoiesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2003; 23(2):49-60.
  28. Evangelista V, Celardo A, Dell'Elba G. Platelet contribution to leukotriene production in inflammation: in vivo evidence on the rabbit. *Thromb Haemost* 1999; 81:442-448.
  29. Feldmann, M., Brennan, F.M., and Maini, R.N. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996; 85:307-310.
  30. Firestein G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423:356-361.

31. Frenette P.S., Moyna C., Hartwell D.W., Lowe J.B., Hynes R.O., Wagner D.D. Platelet-endothelial interaction in inflamed mesenteric venules. *Blood* 1998; 91:1318-24.
32. Fuchs HA, Kaye JJ, Callahan LF, Nance EP, Pincus T. Evidence of significant radiographic damage in rheumatoid arthritis within the first 2 years of disease. *J Rheumatol* 1989; 16:585-91.
33. Gear, A.R. Rhodamine 6G. A potent inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 1974; 249:3628-3637.
34. Groot P.G., and Sixma J.J. Platelet adhesion. *Br.J.Haematol.* 1990; 75:308-312.
35. Hantgan,R.R., G.Hindriks, R.G.Taylor, J.J.Sixma, and P.G.de Groot.. Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb:IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood. *Blood* 1990; 76:345-353.
36. Harris, A.G., Hecht, R., Peer, F., Nolte, D., and Messmer, K.. An improved intravital microscopy system. *Int J Microcirc Clin Exp* 1997; 17:322-327.
37. 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.
38. Heijde Van der DMFM, van Leeuwen MA, van Riel PLCM, Koster AM, van't Hof MA, van Rijswijk MH, et al. Biannual radiographic assessments of hands and feet in a three-year prospective followup of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992; 35:26-34.
39. Hansen A. et al. Evaluation of cardioprotective effects of recombinant soluble P-selectine glycoprotein ligand-immunoglobulin in myocardial ischemia-reperfusion injury by real-time myocardial contrast echocardiography. *J Am Coll. Cardiol* 2004; 44:887-91.
40. Hervig TA, Farstad M. Human blood platelet serotonin may stimulate serotonin studied in vitro: Endogenous serotonin may stimulate thrombin induced serotonin release in stored platelets. *Platelets* 1996; 7:53-57.

41. Hiliquin P, Guinot P, Chermat.Izard, Puechal X, Menkes CJ. Treatment of rheumatoid arthritis with platelet activating factor antagonist BN 50730. *J Rheumatol* 1995, 22:1151-54.
42. Hirohito Sone, Yasushi Kawakami, Michihiro Sakauchi, Yasushi Nakamura, Akimitsu Takahashi, Hitoshi Shimano, Yukichi Okuda, Toshiaki Segawa, Hideo Suzuki, and Nobuhiro Yamada. Neutralization of Vascular Endothelial Growth Factor Prevents Collagen-Induced Arthritis and Ameliorates Established Disease in Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 281:562–568.
43. Holt,J.C. and S.Niewiarowski. Biochemistry of alpha granule proteins.. *Semin. Hematol.* 1985; 22:151-163.
44. Huo Y, Ley KF. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14:18-22.
45. Issekutz AC, Mu JY, Liu G, Melrose J, Berg EL. E-selectin, but not P-selectin, is required for development of adjuvant-induced arthritis in the rat. *Arthritis Rheum.* 2001; 44(6):1428-37.
46. Joanne E. Joseph. Increased circulating platelet±leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *British Journal of Haematology*, 2001; 115:451-459.
47. Johnson RC, Mayadas TN, Frenette PS, et al. Blood cell dynamics in P-selectin-deficient mice. *Blood* 1995; 86:1106-1114
48. Kamel M, Hanafi M, Bassiouni M. Inhibition of elastase enzyme release from human polymorphonuclear leukocytes by N-acetyl-galactosamine and Nacetyl-glucosamine. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9(1):17-21.
49. Kleinau, S., Erlandsson H., Holmdahl, R., and Klareskog, L. Adjuvant oils induce arthritis in the DA rat. I. Characterization of the disease and evidence for an immunological involvement.. *J Autoimmun* 1991; 871-880.
50. Kingler MH, Jelkmann W. Role of boold platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22:913-922.

51. Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar MA. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; Jun; 46(6):1498-503.
52. Koga T., Kakimoto K., Hirofuji T., Kotani S., Ohkuni H., Watanabe K., Okada N., Okada H., Sumiyoshi A., and Saisho K. Acute joint inflammation in mice after systemic injection of the cell wall, its peptidoglycan, and chemically defined peptidoglycan subunits from various bacteria. *Infect Immun* 1985; 50:27-34.
53. Kuijper PH, Gallardo Toers HI, Lammers JW, Sixma JJ, Koendermann L, Zwaginga JJ. Platelet associated fibrinogen and ICAM-2 induced firm adhesion of neutrophils under flow conditions. *Thromb Haemost* 1998; 80:443-48.
54. Kumar a, et al. recombinant soluble form of PSGL-1 accelerates thrombolysis and prevents reocclusion in a porcine model. *Circulation* 1999; 99:1363-69
55. Leclerc JR. Plateletglycoprotein IIb/IIIa antagonists: lessons learned from clinical trials and future directions. *Crit Care Med.* 2002; 30:332-40.
56. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends mol Med.*2003; 9:263-268.
57. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105:1135-43.
58. Lin MKS, Farewell V, Vadas P, Bookmann AM, 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; 23:1162-66.
59. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA et al..Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated Interleukin 1 beta synthesis. *J Cell Biol* 2001; 154:485-90.
60. Lipsky PE. Rheumatoide Arthritis. *Harrison – Innere Medizin* 1999; 2211-2221.

61. Lou J, Donati YR, Juillard P. Platelets play an important role in TNF-induced microvascular endothelial cell pathology. *Am J Patol* 1997; 151:1397-1405.
62. Marcus AJ: Pathways of oxygen utilization by stimulated platelets and leukocytes. *Semin Hematol* 1979; 16:188.
63. Manegold PC, Hutter J, Pahernik SA, messmer K, Dellian M. Platelet-endothelial interaction in tumor angiogenesis and microcirculation. *Blood* 2003; 101:1976-1979.
64. Massberg,S., G.Enders, R.Leiderer, S.Eisenmenger, D.Vestweber, F.Krombach, and K.Messmer.. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998; 92:507-515.
65. Mc Ever R.P., Beckstead J.H., Moore K.L., Marshall-Carlson l., Bainton D.F. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 1989; 84:92-99.
66. 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; 23:226-229.
67. Milovanovic M, Nilsson E, Jaremo P. Relationships between platelets and inflammatory markers in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta.* 2004; 343(1-2): 237-40.
68. Mottonen TT. Prediction of erosiveness and rate of development of new erosions in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*1988; 47:648–53.
69. Nolte, D., Zeintl, H., Steinbauer, M., Pickelmann, S., and Messmer, K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp* 1995; 15:244-249.
70. Norman, K.E. et al. Sialyl Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) and an sLe<sup>x</sup> mimetic, CGP69669A, disrupt E-selectin-dependent leukocyte rolling in vivo. 1998; *Blood* 91:475–483.

71. Nurden, A.T. Platelet membrane glycoproteins and their role in platelet adhesion and aggregation. *Agents Actions Suppl* 1986; 20:29-44.
72. 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.
73. Pasceri V, Yeh ET. A tale of two diseases: atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Circulation* 1999; 100:2124-6.
74. Patrick A. 2004. P-Selectin in haemostasis. *BJ Haematology* 2004; 126:298-306.
75. Piccardoni P, Evangelista V, Piccoli A, de Gaetano G, Walz A, Cerletti C. Thrombin-activated human platelets release two NAP-2 variants that stimulate polymorphonuclear leukocytes. *Thromb Haemost* 1996; 76:780-785.
76. 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.
77. Plant MJ, Saklatvala J, Borg AA, Jones PW, Dawes PT. Measurement and prediction of radiological progression in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1994; 21:1808-13.
78. Pitchford SC, Riffó Vasquez Y, Sousa A, Momi S, Gresele P, Spina D, Page CP. Platelets are necessary for airway remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Immunobiology* 2004; 103:639-647.
79. Ruf A, Schlenk RF, Maras A, Morgenstern E, Patscheke H. Contact induced neutrophil activation by platelets in human cell suspensions and whole blood. *Blood* 1992; 80:1238-1246.
80. Ruggeri, Z.M. New insights into the mechanisms of platelets adhesion and aggregation. *Semin. Hematol* 1994; 31:229-239.
81. Schmitt-Sody M, A. Klose, O. Gottschalk, P. Metz, H. Gebhard, S. Zysk, M. E. Eichhorn, T. M. Hernandez-Richter, V. Jansson, A. Veihelmann.

- Platelet–endothelial cell interactions in murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology* 2005; 44:885–889.
82. Savage B, Almus-Jakobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998;94:657-66.
83. Scheuer B, Ernst M, Durrbaum-Landmann I, et al. The CXC-Chomokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood* 2000; 95:1158-66.
84. 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):2065-76.
85. Scott DL. Prognostic factors in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39(1):24–9.
86. Sewell KI, Trendham De: Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Lancet* 1993; 341:283-286.
87. Simon LS. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med* 1999, 106:37-42.
88. Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQDong J, McIntire LD et al. Platelet glycoprotein Ib $\alpha$  is a counterreceptor for the leucocyte integrin MAC-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med* 2000; 192:193-204.
89. Stenberg,P.E., R.P.McEver, M.A.Shuman, Y.V.Jacques, and D.F.Bainton. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J.Cell Biol.* 1985; 101:880-886.
90. Sumariwalla PF, Malfait AM, Feldmann M.. P-selectin glycoprotein ligand 1 therapy ameliorates established collagen-induced arthritis in DBA/1 mice partly through the suppression of tumour necrosis factor. *Clin Exp Immunol.* 2004; 136(1):67-75
91. Taurog, J.D., Kerwar, S.S., McReynolds, R.A., Sandberg, G.P., Leary, S.L., and Mahowald, M.L. Synergy between adjuvant arthritis and collagen-induced arthritis in rats. *J Exp Med* 1985; 162:962-978.

92. 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.
93. Trentham, D.E. Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1982; 25:911-916.
94. Veale DJ. Soluble cell adhesion molecules P-selectin and ICAM-1, and disease activity in patients receiving sulphasalazine for active rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1998; 27(4):296-299.
95. Veihelmann, A., Harris, A.G., Krombach, F., Schutze, E., Refior, H.J., and Messmer, K. In vivo assessment of synovial microcirculation and leukocyte-endothelial cell interaction in mouse antigen-induced arthritis. *Microcirculation* 1999; 6, 281-290.
96. Veihelmann, A., Hofbauer, A., Refior, H.J., and Messmer, K. Oxaceprol, an atypical inhibitor of inflammation, reduces leukocyte adherence in mouse antigen-induced arthritis. *Acta Orthop Scand* 1999; 72:293-298.
97. Veihelmann, A., Krombach, F., Refior, H.J., and Messmer, K. Effects of NO synthase inhibitors on the synovial microcirculation in the mouse knee joint [In Process Citation]. *J Vasc Res* 1995; 36:379-384.
98. Veihelmann, A., Landes, J., Hofbauer, A., Doerger, M., Refior, H.J., Messmer, K., and Krombach, F. Exacerbation of Antigen-Induced Arthritis in Inducible Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice. *Arthritis Rheum* 2001.
99. Veihelmann A, Szczechny G, D. Nolte, H.J. Refior, K. Messmer. A novel model for the study of the microcirculation in synovial tissue of mouse knee joint in vivo. *Res Exp Med* 1998; 198:43-54.
100. Verdrengh M, Erlandsson-Harris H, Tarkowski A. Role of selectins in experimental *Staphylococcus aureus*-induced arthritis. *Eur J Immunol*. 2000; 30(6):1606-13.
101. 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 USA* 1991; 88(17):7538-7542.
102. Wagner D.D., Olmsted J.B., Marder V.J. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol* 1982; 95:355-60.
103. Wagner DD. P-selectin knockout: a mouse model for various human diseases. *Ciba Found Symp.* 1995;189:2-10; discussion 10-16, 77-8.
104. Wang, K. et al. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-Ig (rPSGL-Ig) attenuates infarct size and myeloperoxidase activity in a canine model of ischemia-reperfusion. *Thromb. Haemost.* 2002; 88:149-154.
105. Walter UM, Issekutz AC. The role of E- and P-selectin in neutrophil and monocyte migration in adjuvant-induced arthritis in the rat. *Eur J Immunol.* 1997; 27(6):1498-505.
106. Weibel E.R., Palade G.E..New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J Cell Biol* 1982; 23:101-12.
107. Willbuger R.E., Müller K., Knorth H.. Pharmakologische Therapie der rheumatoiden Arthritis. *Deutsches Ärzteblatt.* 2006;103:48-57.
108. Wooley P.H., Luthra H.S., Stuart J.M., and David, C.S. Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. *J Exp Med* 1981; 154:688-700.
109. Zeintl, H., Sack, F.U., Intaglietta, M., and Messmer, K. Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 1989; 293-302.
110. Zimmermann GA: Activated platelet signal chemokin synthesis by human monocytes. *J Clin Invest* 1996; 97:1525-1534.

## 9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Interaktion von Makrophagen, Fibroblasten und T-Zellen.....	7
Abbildung 2	Plättchenadhäsion an Endothel.....	13
Abbildung 3	Struktur von P-Selektin und PSGL-1 (Patrick, 2004).....	14
Abbildung 4	Ablauf der Antigen-induzierten Arthritis.....	19
Abbildung 5	Intravitalmikroskopie.....	22
Abbildung 6	Schematische Seitenansicht der Präparation zur Intravitalmikroskopie am Kniegelenk der Maus .....	25
Abbildung 7	Kniegelenksdurchmesser .....	34
Abbildung 8	Körpergewicht .....	35
Abbildung 9	Durchflußzytometrie der separierten Thrombozyten: Repräsentativer Dot Plot der separierten Thrombozyten. ....	36
Abbildung 10:	Rollende Leukozyten .....	38
Abbildung 11	Adhärente Leukozyten .....	38
Abbildung 12	Intravital-Fluoreszenzbilder .....	39
Abbildung 13	Rollende Thrombozyten am Tag 7 der AiA-Gruppe .....	40
Abbildung 14	Adhärente Thrombozyten am Tag 7 der AiA-Gruppe.....	41
Abbildung 15	Kniegelenksdurchmesser .....	43
Abbildung 16	Rollende Leukozyten .....	45
Abbildung 17	Adhärente Leukozyten .....	46
Abbildung 18	Rollende Thrombozyten.....	47
Abbildung 19	Adhärente Thrombozyten.....	48
Abbildung 20	Immunhistologie.....	49

**ZUR PERSON**

Name: Alexander Klose  
Anschrift: Safferlingstr.27  
93053 Regensburg  
Telefon 0173-9218982  
geboren am: 20. März 1974  
Geburtsort: München  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

**AUSBILDUNG**

1981-1984 Grundschule Torquato Tasso, München  
1988-1995 Gymnasium Lion Feuchtwanger, Abschluss Abitur  
1995-1997 Grundstudium der Sportwissenschaft an der Technischen Universität  
München  
1997-2003 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian - Universität  
München

**BERUFSERFAHRUNG**

1997-2004 Krankenpflegerhelfer in der chirurgischen Klinik Dr. Schreiber,  
München  
Seit 2004 Assistenzarzt in der Abteilung für Herz- Thorax und herznahe  
Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Regensburg, Professor Dr.  
Schmid

**FAMULATUREN**

September 2000 Unfallchirurgie, Klinikum Großhadern, München; Prof. Lob  
September 2001 Kinderchirurgie, Kinderklinik in der Lachnerstraße, München;  
Prof. Kellnar

Oktober 2001 Unfallchirurgie, Universitätsklinik Freiburg; Prof. Südkamp  
März 2002 Emergency Department, Mineral Springs Hospital; Banff,  
Kanada;  
August 2002 Orthopädie, Praxis Dr. Kornasoff; München  
September 2002 Anästhesie, Gemeinschaftspraxis DR. Schaechter; München

### **PRAKTISCHES JAHR**

Juni 03-Aug.03 1. Tertial: Chirurgie, Klinikum Großhadern, München; Prof.  
Jauch  
Sep. 03-Nov.03 2. Tertial: Pädiatrie, Haunersche Kinderklinik, München; Prof.  
Reinhard  
Dez. 03-März 04 3. Tertial Innere Medizin/Kardiologie, Baylor College of  
Medicine; Houston, USA

### **AUSLANDSAUFENTHALTE**

März 02 - April 02 Mineral Springs Hospital Banff, Kanada  
Dez. 03 – Feb. 04 Baylor College of Medicine; Houston, USA