

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

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

**Die Wirkung von Simvastatin auf die  
Leukozyten- und Thrombozyten-  
Endothelzell-Interaktion bei Antigen-induzierter  
Arthritis der Maus  
in vivo**

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

Mai Lan Dao Trong  
aus  
Karlsruhe  
2012

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

Berichterstatter: PD Dr. med. M. Schmitt-Sody

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andreas Dendorfer  
Prof. Dr. Hendrik Schulze-Koops  
Prof. Dr. Hans Hertlein

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. O. Gottschalk

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2012

**Meiner Familie**

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Die Rheumatoide Arthritis (RA) .....	1
1.1.1.	Pathogenese der RA .....	4
1.1.2.	Therapie der RA .....	6
1.1.3.	Bedeutung der Leukozyten und Thrombozyten bei der RA.....	8
1.2.	Statine .....	12
1.2.1.	Grundlagen.....	12
1.2.2.	Statine und die RA .....	14
2.	Ziel der Studie .....	17
3.	Material und Methoden .....	18
3.1.	Anmerkung.....	18
3.2.	Versuchsmodell .....	18
3.2.1.	Versuchstiere.....	18
3.2.2.	Versuchsgruppen.....	19
3.2.3.	Arthritisinduktion .....	19
3.2.4.	Statintherapie.....	20
3.3.	Operation .....	21
3.3.1.	Narkose .....	21
3.3.2.	Versuchsaufbau .....	22
3.3.3.	Mikrochirurgische Präparation.....	22
3.4.	Versuchsprotokoll .....	24
3.5.	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....	26
3.5.1.	Fluoreszenzmarkierung .....	27
3.5.1.1.	Thrombozyten: Kardiale Punktion und Markierung.....	28
3.5.1.2.	Leukozytenfärbung .....	29
3.5.1.3.	Plasmafärbung .....	30
3.6.	Auswertung .....	31
3.6.1.	Klinische Parameter .....	31
3.6.1.1.	Klinische Erscheinung .....	31
3.6.1.2.	Kniegelenksdurchmesser .....	31
3.6.2.	Mikrozirkulatorische Parameter .....	32
3.6.2.1.	Venolendurchmesser .....	32
3.6.2.2.	Erythrozytenfließgeschwindigkeit .....	32
3.6.2.3.	Thrombozyten-& Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	32
3.6.2.3.1.	Rollende Zellen .....	32
3.6.2.3.2.	Adhärente Zellen.....	33

3.6.2.4.	Funktionelle Kapillardichte .....	33
3.6.3.	Histologische Auswertung .....	34
3.6.4.	Statistische Auswertung .....	35
4.	Ergebnisse.....	37
4.1.	Klinische Parameter .....	37
4.1.1.	Klinische Erscheinung.....	37
4.1.2.	Körpergewicht .....	38
4.1.3.	Kniegelenksdurchmesser .....	39
4.2.	Intraoperative Parameter .....	40
4.3.	Mikrohämodynamische Parameter.....	40
4.4.	Mikrozirkulatorische Parameter .....	45
4.4.1.	Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion.....	45
4.4.2.	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	49
4.5.	Histologie .....	53
5.	Diskussion.....	56
5.1.	Diskussion der Methoden .....	56
5.1.1.	Die Antigen-induzierte Arthritis der Maus .....	56
5.1.2.	Die Intravitalmikroskopie .....	58
5.1.3.	Fluoreszenzmarkierung .....	59
5.1.4.	Thrombozytenseparation .....	60
5.1.5.	Die Simvastatintherapie.....	61
5.2.	Kritische Darstellung der Ergebnisse.....	62
6.	Zusammenfassung .....	67
7.	Literaturverzeichnis.....	69
8.	Abkürzungsverzeichnis .....	84
9.	Abbildungsverzeichnis .....	86
10.	Tabellenverzeichnis.....	87
11.	Danksagung.....	89

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Rheumatoide Arthritis (RA)

Die Rheumatoide Arthritis (chronische Polyarthritits) ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung, die typischerweise die von Synovialis ausgekleideten Regionen, d.h. Gelenke, Sehnenscheiden und Bursen, in symmetrischer Verteilung befällt. Alle Gelenke des menschlichen Organismus können dabei befallen werden.

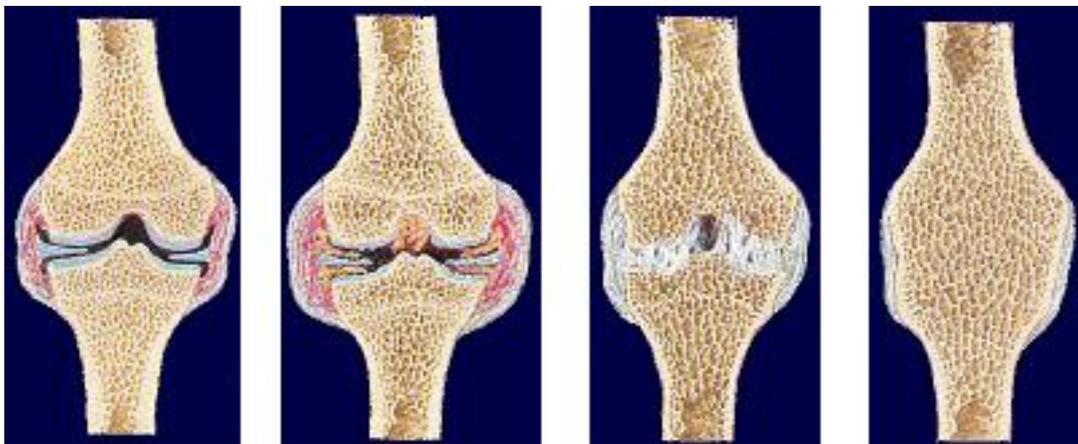


Abbildung 1: Stadien der Entwicklung der Arthritis. Von links nach rechts: entzündliche Veränderungen, Synovialhyperplasie, Knorpelverlust, Funktionsverlust. (<http://www.rheumanet.org>)

Die RA gilt als eine systemische Autoimmunerkrankung, bei der autoreaktive T- und B-Zellen, Makrophagen und Plasmazellen die Synovialis infiltrieren und diese hyperplastisch verändern. Dies führt zu einer granulierenden, proliferierenden Synovialitis (Pannus-Formation), wodurch es anschließend zur Knorpeldestruktion, Knochenerosion und Gelenkdeformation durch Zytokin-vermittelte Induktion von destruktiven Enzymen kommen kann <sup>1</sup>. Dies kann zu Form- und Achsabweichungen sowie Bewegungseinschränkungen führen.

Mit einer Prävalenz von ca. 1% in der erwachsenen Bevölkerung ist die RA die häufigste entzündliche Erkrankung der Gelenke mit einem Häufigkeitsgipfel in der 4. Lebensdekade. Frauen erkranken etwa 3-4-mal häufiger als Männer. Man geht von

einer Lebensverkürzung von ca. 15-20% nach Erkrankungsbeginn aus. Es besteht eine erhöhte Morbidität und Mortalität mit kardiovaskulären Erkrankungen<sup>2-5</sup>.

Der klinische Verlauf kann individuell sehr unterschiedlich sein, sowohl in Dauer wie auch im Ausmaß der Erkrankung. Klassischerweise beginnt sie jedoch in den Fingergrund- und proximalen Interphalangealgelenken mit einer symmetrischen Schwellung und einer schmerzhaften Bewegungseinschränkung. Morgensteifigkeit, Verstreichen der Knöchelkonturen und Gaenslen-Zeichen (schmerzhafter Händedruck) sind typisch. Auch Tendovaginitiden im Bereich des Handgelenks, die zum Karpaltunnelsyndrom führen können, kommen vor. Zu den Handdeformitäten gehören die Ulnardeviation der Finger, Knopfloch- und Schwanenhalsdeformitäten.

1987 entwickelte das American College of Rheumatology (ACR) folgende heute noch gültigen Kriterien zur Klassifikation der RA<sup>6</sup>. Für die Diagnose einer RA müssen vier von diesen sieben Kriterien vorhanden sein, davon 1 – 4 für mindestens 6 Wochen:

- Morgensteifigkeit der Gelenke von mindestens 1h
- Arthritis von 3 oder mehr Gelenkregionen: Weichteilschwellung oder Erguss an mindestens 3 Gelenkbereichen
- Arthritis der Hand- oder Fingergelenke: Handwurzelgelenke, proximale Interphalangealgelenke (PIP), Metakarpophalangealgelenke (MCP)
- Symmetrische Arthritis
- Rheumaknoten: subkutane Knoten über den Knochenvorsprüngen oder Extensorflächen oder im juxtaartikulären Bereich
- Nachweis von Rheumafaktor im Serum: IgM-Rheumafaktoren, CCP-Antikörper
- Für die Rheumatoide Arthritis typische radiologische Veränderungen der Hand

Die Sensitivität dieser Kriterien beträgt 91-94% und die Spezifität 89%.

Der sogenannte Rheumafaktor korreliert im Allgemeinen mit der Krankheitsaktivität, sollte aber dabei weniger als diagnostisches Kriterium, sondern eher als Verlaufsparemeter gelten, da er nur bei 80% der Patienten positiv ist, jedoch nicht alle seropositiven Menschen auch eine RA bekommen müssen.

1991 revidierte das ACR die Kriterien zur Klassifikation des globalen Funktionsstatus bei chronischer Polyarthrititis 7:

Klasse	Funktionskapazität
1	Vollständige Fähigkeit zur Verrichtung üblicher Aktivitäten des täglichen Lebens (Grundaktivitäten, berufliche bzw. Hausarbeiten, Freizeitaktivitäten)
2	Fähigkeit zur Verrichtung der üblichen Grundaktivitäten des täglichen Lebens und beruflicher bzw. Hausarbeiten, jedoch Einschränkung bei Freizeitaktivitäten
3	Fähigkeit zur Verrichtung üblicher Grundaktivitäten des täglichen Lebens, jedoch Einschränkung bei beruflicher bzw. Hausarbeit und Freizeitaktivitäten
4	Einschränkung der Fähigkeit zur Verrichtung üblicher Grundaktivitäten sowie bei beruflicher und Hausarbeit sowie Freizeitaktivitäten

Zu den Grundaktivitäten des täglichen Lebens zählen An- und Auskleiden, Essen, Körperpflege und Toilettenbenutzung. Berufliche (schulische) und Hausarbeiten sowie Freizeitaktivitäten sind alters- und geschlechtsspezifisch und abhängig von den Wünschen der Patienten.

Weitere international anerkannte Kriterien sind die DAS (Disease Activity Score)- und EULAR (European League against Rheumatism)-Responder-Kriterien zur Überprüfung der RA-Therapie.

### 1.1.1. Pathogenese der RA

Die Ätiologie der Rheumatoiden Arthritis ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Man geht von einer multifaktoriellen Genese aus <sup>8</sup>. Es ist jedoch seit längerem durch eine Vielzahl von Studien belegt, dass für die RA in 70-80% der Fälle eine genetische Disposition besteht. Dabei handelt es sich um eine genetische Assoziation mit bestimmten Humanen Leukozytenantigenen der Klasse II (HLA-DR4-Subtypen) auf dem Chromosom 6, welche bei mehr als 2/3 der Patienten mit RA, aber nur bei ca. 20% der Allgemeinbevölkerung, gefunden werden kann.

Die Autoimmunreaktion entsteht über die Aktivierung von CD4-positiven T-Lymphozyten durch bisher noch unbekannte Antigene in Anwesenheit bestimmter Klasse II MHC-Antigene. Es werden heute neben den gelenkspezifischen Antigenen wie Kollagen Typ II und Chondrozyt gp39 vor allem ubiquitäre Antigene wie die Glucose-6-Phosphatase Isomerase (GPI) als Auslöser diskutiert <sup>9</sup>. Nachfolgend werden weitere Zelltypen aktiviert, darunter Makrophagen, B-Lymphozyten, andere T-Zell-Subtypen, Thrombozyten <sup>10</sup> und vor allem auch synoviale Fibroblasten und Chondrozyten. Es kommt zu einer vermehrten Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen und pro-inflammatorischen Zytokinen, wie z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, Immunglobulinen, Autoantikörpern gegen das Fc-Fragment des IgG (der sogenannte Rheumafaktor) und Metalloproteinasen. Dabei geht man davon aus, dass TNF- $\alpha$  eine Hauptrolle in dieser Entzündungskaskade spielt, da es die Expression von den anderen Zytokinen reguliert <sup>11</sup>.

Die synoviale Gewebereaktion im Rahmen der RA führt durch Fibroblasten- und Endothelzellproliferation und Monozyten Chemotaxis zu einer Verdickung der Synovia, dem sogenannten Pannus. Er besteht hauptsächlich aus Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten und führt über Penetration des anliegenden Knorpels zu dessen Destruktion <sup>12</sup>. Dabei spielen lytische Enzyme eine entscheidende Rolle, zum Beispiel durch die Spaltung des Proteoglycan Aggrecans, einer wichtigen Knorpelkomponente, durch Enzyme der Gruppe "ADAMTS" (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif) <sup>11</sup>.

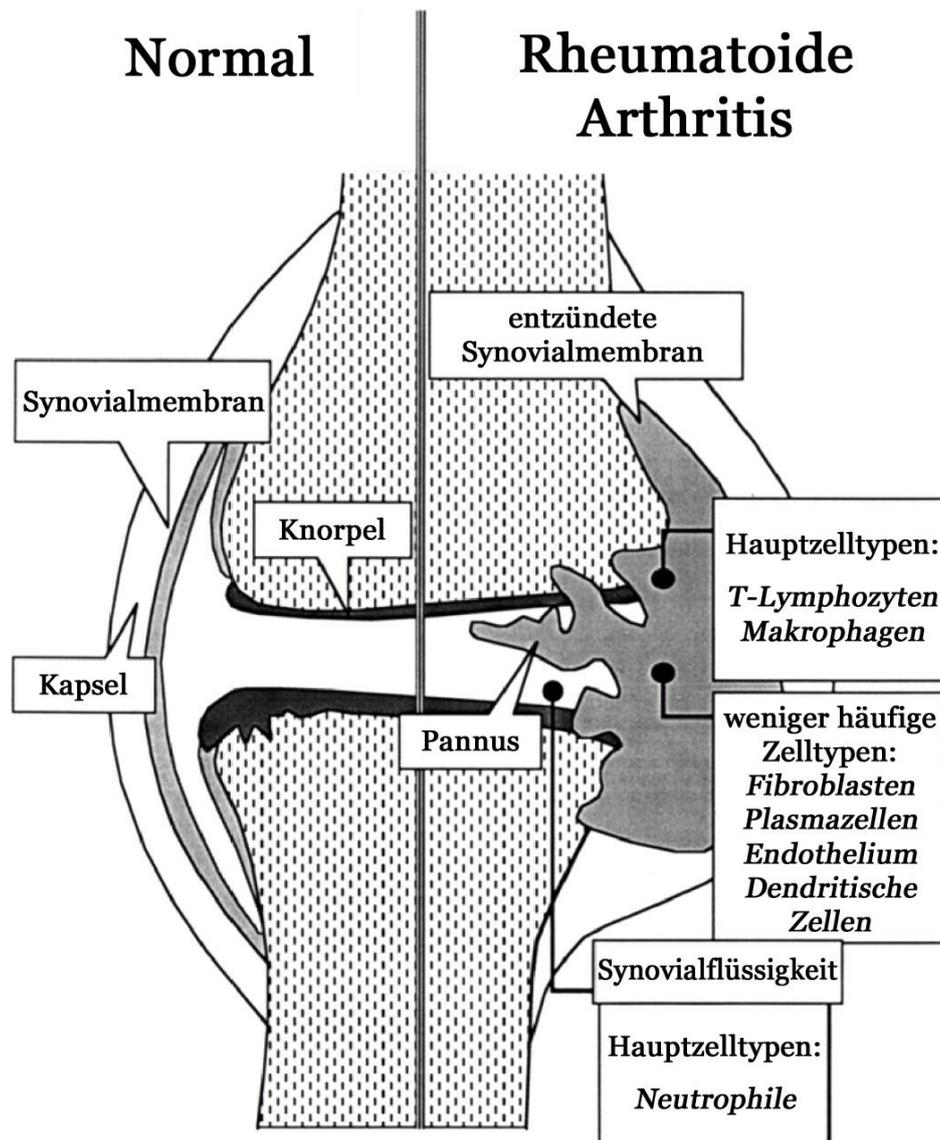


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines synovialen Gelenks nach Feldmann et al. <sup>13</sup>, links normal und rechts bei einer RA

Die systemische Beteiligung innerer Organe, welche selten ist, tritt infolge einer Immunkomplexvaskulitis auf.

### 1.1.2. Therapie der RA

Die Therapie der RA ist besonders in den ersten zwei Jahren nach Diagnosestellung entscheidend für den weiteren Krankheitsverlauf. Ziel ist es, den Entzündungsprozess effektiv zu unterdrücken, um der Zerstörung der Gelenke entgegenwirken zu können. Aktuell geht man in der Klinik nach einem Stufenplan vor, bestehend aus Krankengymnastik, physikalischen, medikamentösen und zuletzt operativen Maßnahmen.

Zur physikalischen Therapie zählen die Thermo-, Kryo-, Bewegungs- und Massagetherapie. Zusammen mit der Krankengymnastik sind diese Maßnahmen unerlässlich zur Vorbeugung von Schrumpfungen der Gelenkkapsel und von Muskelatrophien. Die symptomatische medikamentöse Therapie erfolgt bevorzugt mit Glukokortikoiden, DMARDs und nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR)<sup>14</sup>, die jedoch nur kurz wirksam sind. Dazu gehören die selektiven COX-2-Hemmer (z.B. Celebrex) und die weit verbreiteten unselektiven COX-1/2-Inhibitoren, die durch Hemmung der Cyclooxygenase die Prostaglandinsynthese hemmen. Beispiele sind Acetylsalicylsäure (ASS), Ibuprofen, Diclofenac oder Indometacin, wobei es im Gegensatz zu den selektiven COX-2-Hemmern <sup>15</sup> in bis zu 25% der Fälle zu gastrointestinalen Nebenwirkungen kommen kann <sup>16, 17</sup>.

Grundsätzlich gilt, dass eine möglichst frühzeitige, d.h. innerhalb der ersten 6 Monate nach Beschwerdebeginn, medikamentöse Therapie mit den sogenannten DMARDs entscheidend zum Erhalt der Funktion und zur Verminderung späterer Funktionseinschränkung ist. Unter DMARDs (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs, sog. Basistherapeutika) wird eine Gruppe von Medikamenten gefasst, die, über symptomatische Effekte hinaus, krankheitsmodifizierende Eigenschaften besitzen. Sie sollen einer Gelenkzerstörung vorbeugen bzw. diese verzögern und somit die Funktionsfähigkeit der Gelenke erhalten. Im Gegensatz zu einer symptomatischen Therapie soll eine Beeinflussung des Krankheitsverlaufes erzielt werden, jedoch tritt ihre Wirkung meist erst verzögert ein (4-16 Wochen). Zur Überbrückung bis zum Wirkungseintritt der DMARDs ist eine niedrigdosierte Cortison-Therapie aufgrund ihrer symptomlindernden und entzündungshemmenden Wirkung gut etabliert. Jedoch eignet sich diese nicht als Langzeittherapie <sup>18</sup>. Die

DMARD-Therapie sollte anschließend dauerhaft fortgesetzt, regelmäßig überprüft (z.B. anhand der DAS-EULER Responder-Kriterien) und ggf. modifiziert werden um die Krankheitsaktivität kontinuierlich zu unterdrücken <sup>18</sup>.

Aktuell unterscheidet man die traditionellen Wirkstoffe von den neueren Biologicals. Zu den traditionellen DMARDs zählen die Antimalariamittel Hydroxychloroquin und Chloroquin, die Immunsuppressiva Azathioprin, Cyclosporin, Leflunomid und Methotrexat, weiterhin Sulfasalazin, D-Penicillamin und orales/parenterales Gold. Die letzteren zwei finden momentan zwar noch Anwendung, werden jedoch nicht mehr in den aktuellen Leitlinien des ACR empfohlen <sup>19</sup>.

Es wird zunächst eine Monotherapie angestrebt. Methotrexat ist dabei die im Ersteintritt am häufigsten verwendete Substanz aufgrund seines raschen Wirkbeginns, bester Langzeit-Compliance, gesichertem Nachweis von Destruktionsbremsung und Mortalitätsverringern und Kostengünstigkeit bei aktiver RA <sup>18</sup>. Darüber hinaus ist es der meistverwendete Partner in DMARD-Kombinationen. Das Nebenwirkungsspektrum der Basistherapeutika umfasst neben unspezifischen gastrointestinalen Reizsymptomen (z.B. Übelkeit, Erbrechen, Diarrhöen) auch die Induktion von ulzerösen Schleimhautläsionen und das Auftreten einer Hepatopathie, welche bis zu einer fulminanten Hepatitis führen kann <sup>17</sup>.

Bei Patienten, die auf die traditionellen DMARDs nicht ausreichend ansprechen, kommen die Biologicals als Mono- oder Kombinationstherapie mit Methotrexat in Frage. Dazu zählen die TNF- $\alpha$ -Inhibitoren Adalimumab, Etanercept und Infliximab, der IL-1-Rezeptorantagonist Anakinra <sup>20, 21</sup> (in Deutschland nur als Kombinationstherapie mit Methotrexat zugelassen) und der chimäre monoklonale anti-CD20 Antikörper Rituximab <sup>22, 23</sup>. Es ist mittlerweile in mehreren Studien belegt worden, dass TNF- $\alpha$ -Inhibitoren wirksam die Krankheitsaktivität, die Lebensqualität und die radiologisch nachweisbare Progression verbessern können <sup>24-27</sup>. Im Gegensatz zu den Basistherapeutika weisen sie nach derzeitiger klinischer Erfahrung und Datenlage in der Literatur keine relevanten gastrointestinalen Nebenwirkungen auf <sup>17</sup>. Jedoch ist mit einem leicht erhöhten Infektionsrisiko und einem dosisabhängigen Risiko für Malignität zu rechnen. Schwere Infektionen sind sehr selten, können im Einzelfall aber ein lebensbedrohliches Ausmaß erreichen <sup>28, 29</sup>.

In den letzten Jahren werden weitere Therapieansätze vielversprechend diskutiert, wie zum Beispiel eine Blockade der NO-Synthese <sup>30</sup>, die Hemmung der

Neoangiogenese mittels VEGF-Rezeptorblockaden <sup>31</sup> wie auch die Therapie mit Statinen <sup>32</sup>.

### 1.1.3. Bedeutung der Leukozyten und Thrombozyten bei der RA

Thrombozyten sind bikonvexe, zellkernlose Zellen und mit etwa 3 µm die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutes. Es zirkulieren zwischen 150000-400000 Blutplättchen pro µl unter physiologischen Bedingungen im menschlichen Blut. Sie werden im Knochenmark und im monozytären Makrophagensystem durch Abschnürung aus den Megakaryozyten gebildet und in der Milz gespeichert.

Thrombozyten sind ein Schlüsselement bei der Verknüpfung von Hämostase, Inflammation und Gewebereparatur. Auch spielen sie eine wichtige Rolle bei der antimikrobiellen Abwehr <sup>33-35</sup>. Sie werden in einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen aktiviert, unter anderem bei der RA <sup>10, 36, 37</sup>. Innerhalb von Sekunden reagieren sie auf spezifische Signale durch Gewebsdefekte oder durch die Invasion von Pathogenen. Durch diese Stimulierung aggregieren sie mittels Expressierung neuer Rezeptoren für Adhäsionsproteine, ändern ihre Form (auch "shape change" genannt) und setzen eine Fülle an Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anderen Mediatoren frei. Zusätzlich treten sie in direkten Kontakt mit Endothelzellen, Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten, wodurch sie diese entweder stimulieren oder hemmen können. Die prinzipalen membranständigen Thrombozytenrezeptoren für diese Interaktion mit den anderen Zellen sind Glykoprotein IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) <sup>38</sup> und P-Selektin <sup>39-41</sup>.

Diese kontrollierte Interaktion von Leukozyten, Endothelzellen und Thrombozyten über Chemotaxis und Adhäsion ist ein maßgeblicher Mechanismus für fast alle entzündlichen Prozesse <sup>42</sup>. Thrombozyten tragen dazu bei, indem sie nach Adhäsion und shape change an geschädigtem Endothel eine adhäsive Oberfläche bereitstellen und damit das Rollen, Adhären und die Transmigration der Leukozyten unterstützen, diese stimulieren und die Chemokin-Synthese von Leukozyten und Endothelzellen regulieren (siehe Tabelle 1: Beitrag der Thrombozyten zur Entzündungsreaktion und die dabei involvierten Mediatoren <sup>42</sup>). Die Aktivierung und

Interaktion der Thrombozyten mit den Endothelzellen bei der Entzündung führt somit zu einer gesteigerten Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten und folglich zu einem gesteigerten Endothelzellschaden bei der Entzündung <sup>43, 44</sup>, was auch schon in vorangegangenen Studien am Modell der Antigen-induzierten Arthritis der Maus im Rahmen der Arbeitsgruppe am Walter-Brendel-Zentrum (WBZ) der Ludwig-Maximilians-Universität gezeigt werden konnte <sup>10</sup>.

<b>Entzündungsreaktion</b>	<b>Mediatoren</b>
<b>Gefäßreaktion</b>	Prostaglandin E, Serotonin, Histamin, PDGF, VEGF
<b>Chemotaxis für Leukozyten</b>	Plättchenfaktor-4, PDGF, $\beta$ -Thromboglobulin, RANTES, TGF- $\beta$
<b>Stimulation von Leukozyten</b>	ADP, ATP, Plättchenfaktor-4, $\beta$ -Thromboglobulin, PDGF, TGF- $\beta$ RANTES, IL-1, P-Selektin
<b>Beteiligung an der Wundheilung</b>	PDGF, TGF- $\beta$ , FGF, Angiopoietin, EGF

Tabelle 1: Beitrag der Thrombozyten zur Entzündungsreaktion und die dabei involvierten Mediatoren <sup>42</sup>

Als maßgebende Organellen für die inflammatorischen Eigenschaften der Thrombozyten gelten das Kanalikuläre System,  $\alpha$ -Granula und dichte Granula.

Das Kanalikuläre System ist eine spezielle Form des rauen Endoplasmatischen Retikulums, welches für die Endo- und Exozytose und zur Bildung von Pseudopodien verantwortlich ist. Der Thrombozyt besitzt ein dynamisches Zytoskelett, welches sich innerhalb von Sekunden durch einen aktivierenden Stimulus unter Ausbildung o.g. Pseudopodien verändern kann. Dieser shape change ermöglicht es dem Thrombozyten durch Oberflächenvergrößerung <sup>45</sup> mit anderen zellulären Blutbestandteilen und mit dem Endothel in Kontakt zu treten.

Es gibt ungefähr 80  $\alpha$ -Granula und etwa 5 dichte Granula pro Thrombozyt.  $\alpha$ -Granula sind die wichtigsten Speicherkompartimente und enthalten viele entscheidende Moleküle (siehe Tabelle 2: Übersicht der Thrombozytengranula und ihrer Inhaltsstoffe), welche verantwortlich sind für Adhäsion, Aggregation, Chemotaxis, Proliferation (Angiogenese, Wundheilung), Inflammation, Koagulation, Atherosklerose, antimikrobielle Abwehr und Malignität <sup>46, 47</sup>. Durch Aktivierung

fusionieren sie mit dem offenen Kanalikulären System und setzen damit ihren Inhalt frei <sup>48</sup>. Im Gegensatz zu den  $\alpha$ -Granula sind die Effekte durch die Inhaltsstoffe der dichten Granula eher auf die Initialphase der Entzündung beschränkt <sup>42</sup>.

Zusätzlich zur Degranulation dieser gespeicherten Mediatoren, sind aktivierte Thrombozyten auch fähig, Eicosanoide zur Regulation der Hämostase und der akuten Inflammation zu bilden. Dazu gehören Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) und Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ), welche vasokonstriktiv wirken, PGE<sub>2</sub> als Vasodilatator und Schmerzmodulator <sup>42</sup>, und 12-Hydroxyeicosatetraenoat (12-HETE), welches durch ein thrombozytenspezifisches Enzym synthetisiert wird und chemotaktisch auf Eosinophile wirkt <sup>49</sup>.

Weiterhin ist es den Thrombozyten durch Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle möglich, sich an andere subendotheliale Strukturen zu binden. Von großer Bedeutung sind hierbei besonders verschiedene Typen von Kollagen, Fibronectin, Laminin, Thrombospondin und der von-Willebrand-Faktor (vWF).

<b><math>\alpha</math>-Granula</b>	<b>Dichte Granula</b>
<p><b>Chemokine</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Plättchenfaktor 4</li> <li>- <math>\beta</math>-Thromboglobulin</li> <li>- Connective tissue activating protein 3</li> <li>- Neutrophil activating peptide2</li> <li>- RANTES (Regulated up on activation, normal T-cell and presumably secreted)</li> <li>- Macrophage inflammatory protein 1<math>\alpha</math></li> </ul> <p><b>Adhäsive Moleküle</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Thrombospondin</li> <li>- Fibrinogen</li> <li>- Fibronectin</li> <li>- Vitronectin</li> </ul> <p><b>Wachstumsfaktoren</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PDGF (platelet-derived growth factor)</li> <li>- TGF-<math>\beta</math> (Transforming growth factor <math>\beta</math>)</li> <li>- EGF (Epidermal growth factor)</li> <li>- Insulin-like growth factor</li> <li>- VEGF (Vascular endothelial growth factor A &amp; C)</li> <li>- FGF (Fibroblast growth factor)</li> <li>- Hepatocyte growth factor</li> </ul> <p><b>Interleukin 1<math>\beta</math></b></p> <p><b>Immunoglobuline</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- IgG, IgM, IgA, IgE</li> </ul> <p><b>Cationische Proteine</b></p> <p><b>P-Selektin</b></p> <p><b>von Willebrand Faktor</b></p> <p><b>Gerinnungsfaktoren</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Faktor V</li> <li>- Faktor VIII</li> </ul> <p><b>Glykoprotein IIb/IIIa</b></p> <p><b>Plasminogen activator inhibitor 1</b></p> <p><b>Enzyme</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\alpha</math>1-Antitrypsin</li> <li>- <math>\alpha</math>2-Makroglobulin</li> <li>- <math>\alpha</math>2-Antiplasmin</li> <li>- C1-Esterase-Inhibitor</li> </ul>	<p>Serotonin</p> <p>Adrenalin</p> <p>Noradrenalin</p> <p>Dopamin</p> <p>Histamin</p> <p>Bivalente Kationen (z.B. Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>)</p> <p>ADP und ATP</p> <p>GDP und GTP</p>

Tabelle 2: Übersicht der Thrombozytengranula und ihrer Inhaltsstoffe<sup>50</sup>

## 1.2. Statine

### 1.2.1. Grundlagen

Als Statine, auch bekannt als Cholesterinsyntheseenzym(CSE)-Hemmer, bezeichnet man eine Gruppe von Medikamenten zur Senkung der Serumkonzentration von LDL-Cholesterin. Statine hemmen kompetitiv die HMG(3-Hydroxy-3-Methylglutaryl)-CoA Reduktase, welche bei der Cholesterinbiosynthese als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym HMG-CoA zu Mevalonsäure katalysiert. Man unterscheidet 2 Generationen: die erste Generation besteht aus natürlich hergestellten Statinen (Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin), die zweite aus synthetischen (Fluvastatin, Atorvastatin und Rosuvastatin).

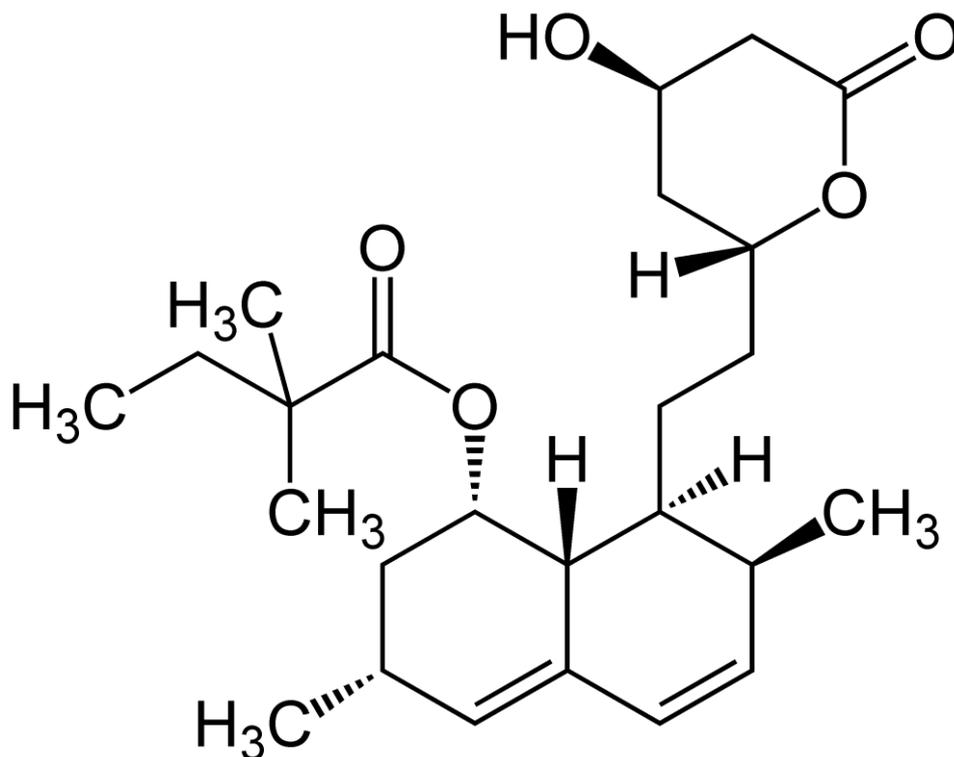


Abbildung 3: Strukturformel von Simvastatin

Der erste Vertreter dieser Gruppe, ML-236B, auch bekannt als Compactin oder Mevastatin, wurde 1976 erstmalig aus dem Pilz *Penicillium citrinum* von Akira Endo<sup>51, 52</sup> extrahiert. Michael S. Brown und Joseph L. Goldstein griffen diese Entdeckung auf und bestätigten erstmalig, dass Compactin die HMG-GoA-Reduktase-Aktivität in Fibroblasten von Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie hemmt<sup>53</sup>.

1980 gewannen Alberts et al.<sup>54</sup> bei Merck Research Laboratories aus einem Stamm von *Aspergillus terreus* den wirkungsstärkeren HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Mevinolin, heute bekannt als Lovastatin, dem Vorgänger von Simvastatin.

Jedoch konnte erst 1994 eine randomisierte Studie mit 4444 Patienten (Scandinavian Simvastatin Survival Group (4S)) die klinische Anwendung als Prophylaxe bei kardiovaskulären Erkrankungen etablieren<sup>55</sup>. Heute finden Statine als Lipidsenker eine breite klinische Anwendung bei Hypercholesterinämie und bei der primären und sekundären Prophylaxe nach Herzinfarkt durch eine signifikante Senkung der Morbidität und Mortalität bei kardiovaskulären Erkrankungen<sup>56-60</sup>.

Simvastatin, welches 1990 in den Handel kam, ist ein Prodrug und gehört wie Lovastatin und Atorvastatin zu den lipophilen CSE-Hemmern, welche hauptsächlich vom Cytochrom P-450 3A4 (CYP3A4) in der Leber metabolisiert werden. Die Halbwertszeit beträgt 2-3 Stunden und es wird zu 13% renal ausgeschieden. Bei den normal gebräuchlichen Dosierungen zwischen 5-80 mg kann Simvastatin das Serum-LDL-Cholesterin um 25-30% senken und wird generell sehr gut toleriert. Jedoch sollte man auf eine Dosisanpassung bei der gleichzeitigen Gabe von CYP3A4-Hemmern achten, da die Interaktion mit einem CYP3A4-Hemmer wie zum Beispiel Clarithromycin, Fluconazol, Cimetidin, Erythromycin, Amiodaron, Verapamil und Grapefruitsaft das Risiko von Nebenwirkungen erhöht<sup>61</sup>.

Das Nebenwirkungsspektrum der Statine umfasst neben den allgemeinen Symptomen wie zum Beispiel Kopfschmerzen und gastrointestinale Störungen<sup>62</sup> (Übelkeit, Dyspepsie, Konstipation, Diarrhö), bei 1-5% der Patienten Myalgien und seltener auch Myopathien<sup>63</sup>, Creatinkinasen(CK)-Anstieg, erhöhte Leberwerte und in ganz seltenen Fällen eine Rhabdomyolyse mit konsekutivem akutem Nierenversagen durch Myoglobulinurie, die schwerste und häufig letale Form der toxischen Myopathie<sup>64</sup>. Weiterhin werden in einzelnen Fällen noch Hepatotoxizität<sup>65</sup>, Sehenerkrankungen<sup>66</sup>, Laktatazidose durch Senkung des Coenzym Q10 (Ubichinon)

Plasmaspiegels, einem essentiellen Cofaktor der mitochondrialen Atmungskette <sup>67</sup>, ulzerative Colitis <sup>68</sup> und Pankreatitis <sup>69</sup> beschrieben.

### 1.2.2. Statine und die RA

Der Zusammenhang mit Inflammation wurde erstmalig 1995 von Kobashigawa et al. <sup>70</sup> im Rahmen von Herztransplantationen beschrieben. Kobashigawa beobachtete einen positiven Effekt von Pravastatin auf die Abstoßungsrate, 1-Jahres-Überlebensrate und die Inzidenz von koronarer Vaskulopathie nach Herztransplantation. Ein Jahr später zeigte Katznelson et al. in einer Pilotstudie, dass Pravastatin ebenfalls die akute Abstoßung bei Nierentransplantationen signifikant reduziert <sup>71</sup>.

Daraufhin untersuchten Brenda Kwak et al. die immunmodulatorische Wirkung von verschiedenen Statinen (Atorvastatin, Lovastatin und Pravastatin) *in vitro* auf die Expression von MHC-II (major histocompatibility class II) und die darauffolgende Lymphozytenaktivierung in verschiedenen Zelltypen, unter anderem auch an primären humanen Endothelzellen. Sie konnten zeigen, dass Statine dosisabhängig die Induktion der MHC-II-Expression durch Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) direkt und damit auch indirekt die MHC-II-vermittelte T-Zell-Aktivierung hemmen, wobei Pravastatin der stärkste Inhibitor war <sup>72</sup>.

Weitere *in vitro* Studien zeigten neben diesen immunmodulatorischen Effekten auch eine anti-inflammatorische Wirkung unabhängig vom Lipid-senkenden Effekt, zum Beispiel durch die reduzierte Produktion von Chemokinen, welche bei der Leukozytenmigration involviert sind <sup>73</sup>, die selektive Blockierung der LFA-1 (leucocyte function antigen-1) vermittelten Adhäsion und T-Zell Costimulation <sup>74</sup> und die Reduktion von Interleukin-6 (IL-6) und IL-8 durch TNF- $\alpha$  induziert oder durch IL-1 stimulierte FLS (fibroblast-like synoviocytes) <sup>75</sup>, <sup>76</sup>. Desweiteren wurde ein dosis-abhängiger biphasischer Effekt von Simvastatin auf FLS beobachtet: niedrig dosiert führte Simvastatin zu einer Hemmung der IL-6 und IL-8 Expression, hoch dosiert induzierte es eine Apoptose in FLS <sup>77</sup>.

Klinische Studien unterstützen diese anti-inflammatorische Hypothese: Albert et al. zeigten eine signifikante Senkung von C-reaktivem Protein (CRP) als Entzündungsmarker in der PRINCE-Studie (the pravastatin inflammation/CRP evaluation), einer randomisierten Kohortenstudie bei Patienten mit und ohne

kardiovaskulären Erkrankungen <sup>78</sup>. Im Rahmen von Herztransplantationen konnten Wenke et al. eine signifikant bessere 8-Jahres-Überlebensrate und niedrigere Inzidenz von Transplantations-Vaskulopathien durch Simvastatin-Therapie erheben<sup>79</sup>.

Heute wird zusätzlich die Wirkung von Statinen auf die rheumatoide Arthritis (RA) stark diskutiert. Die Arbeitsgruppe von Leung et al. <sup>80</sup> beschrieb am Modell der Kollagen-induzierten Arthritis der Maus eine Hemmung der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 und Interferon(IFN)- $\gamma$ ) der T-Zell-aktivierten Makrophagen durch Simvastatin. Klinische Studien bekräftigen diese Hypothese: Abud-Mendoza et al. zeigte an therapierefraktären RA-Patienten eine deutliche klinische Besserung durch Simvastatin-Therapie im Vergleich zu Chloroquin <sup>81</sup>. In der TARA-Studie (Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis) beobachteten McCarey et al. moderate, aber klinisch apparente anti-inflammatorische Effekte durch sechs Monate Therapie mit Atorvastatin. Sie beschrieben zusätzlich eine signifikante Senkung von CRP und der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) <sup>82</sup>. Eine signifikante Reduktion von CRP und TNF- $\alpha$  durch Simvastatin bei chronischen RA-Patienten wurde auch von Tikiz et al. beschrieben <sup>83</sup>. Ähnliche Ergebnisse zeigten Shirinsky et al., jedoch beschrieben sie eine Abhängigkeit der IL-6-Reduktion mit einer klinischen Besserung bei Patienten mit RA. Weiterhin postulierten sie, dass erhöhte Ausgangswerte von IL-10 ein möglicher Vorhersagewert für das Ansprechen auf eine Simvastatin-Therapie sein könnte <sup>84</sup>. Auch Hermann et al. zeigte einen Zusammenhang zwischen der Besserung der endothelialen Funktion, als Zeichen des Therapie-Ansprechens, mit erhöhten Entzündungsmarkern <sup>85</sup>. Weiterhin wurde von Kanda et al. eine Reduktion der Th1/Th2 und CD4/CD8 Ratio durch Simvastatin gemessen <sup>86</sup>.

Es wurde in den letzten Jahren eine Reihe weiterer pleiotroper Effekte von Statinen beobachtet. Dazu zählen

- die protektive Wirkung auf das Gefäßendothel durch erhöhte NO(nitric oxide)-Produktion <sup>87-89</sup>,
- ein antikoagulativer Effekt durch Senkung der Konzentration von Thrombin-Antithrombinkomplexen und P-Selektin <sup>90</sup>,
- eine reduzierte Thrombozytenaktivierung <sup>91</sup> und Thrombingeneration <sup>92, 93</sup>,

- ein fibrinolytischer Effekt durch Erhöhung der tPA (tissue plasminogen activator) in humanen Endothelzellen <sup>94</sup>, der fibrinolytischen Aktivität durch geranylgeranyliertes Rho-Protein und durch die Unterbrechung von Aktinfilamenten an der Aorta der Ratte <sup>95</sup>,
- ein antioxidativer Effekt <sup>96</sup>,
- und ein knochen-und knorpelprotektiver Effekt unter anderem durch Hemmung der Matrix-Metalloproteinase-3 in humanen Chondrozyten <sup>97</sup> und Supprimierung der periartikulären Knochendestruktion im Rahmen der RA der Ratte <sup>98</sup>.

## 2. Ziel der Studie

Trotz vielfacher neuer Erkenntnisse über die immunmodulatorische und entzündungshemmende Wirkung der Statine in den letzten Jahren ist bis heute wenig über die genauen Mechanismen bekannt. Ziel dieser experimentellen Studie ist es daher den entzündungshemmenden Effekt von Statinen auf die Leukozyten- und Thrombozyten-Endothelzellinteraktion anhand des Modells der Antigen-induzierten Arthritis der Maus *in vivo* zu untersuchen.

Ziele der intravitalen, fluoreszenzmikroskopischen, tierexperimentellen Studie waren:

- 1) Untersuchung der Leukozyten- und Thrombozyten-Endothelzellinteraktion und der Gefäßproliferation im Synovialgewebe des Knies der Maus mit und ohne Antigen-induzierter Arthritis, sowie Darstellung des klinischen Verlaufs und der Histologie
- 2) Untersuchung der Wirkung von Statinen auf die Leukozyten- und Thrombozyten-Endothelzellinteraktion und Gefäßproliferation im Rahmen der Entzündungsreaktion im Synovialgewebe der arthritischen Maus im Vergleich zur nicht-arthritischen.

Diese Studie verwendet das von Veihelmann et al. entwickelte Modell für die intravitale mikroskopische Analyse der synovialen Mikrozirkulation *in vivo*. Als Arthritis-Modell dient das 1977 initial von Brackertz et al. <sup>99-101</sup> beschriebene Modell der Antigen-induzierten Arthritis der Maus.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Anmerkung

Folgend vorgestellte tierexperimentelle Untersuchungen wurden am Walter-Brendel-Zentrum der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt.

### 3.2. Versuchsmodell

Es handelt sich um die von Veihelmann et al. <sup>103, 104</sup> etablierten, intravitalem fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen am Modell der Antigen-induzierten Arthritis der Maus nach Brackertz et al. <sup>99-101</sup>.

#### 3.2.1. Versuchstiere

Für sämtliche Versuche dieser Studie wurden ausschließlich weibliche C57Bl6 Mäuse (Charles-River-Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland) im Alter zwischen 8 bis 10 Wochen und mit dem Gewicht von 18 bis 24 Gramm verwendet. Während des Versuchszeitraumes wurden die Tiere einzeln in Polystyrenkäfige eingestreut mit Sägespänen untergebracht. Es herrschte ein 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus, eine Umgebungstemperatur von 22°C und eine Luftfeuchtigkeit von 40%. Die Tiere erhielten handelsübliches Trockenfutter für Nagetiere (ssniff®-Standard-Diät für Ratten/Mäuse: 120mg Vitamin E, 18 000 IU Vitamin A/kg; Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser ad libitum.

Es wurden nur Versuchstiere mit normalen, unauffälligem Fress-, Putz- und Spielverhalten verwendet.

### 3.2.2. Versuchsgruppen

In dieser Studie wurden vier Gruppen mit jeweils 7 validen Versuchstieren untersucht. Dabei wurden die Tiere randomisiert folgenden Gruppen zugewiesen: Zwei nicht-arthritische Kontrollgruppen und zwei arthritische Gruppen, davon jeweils eine mit Statinen und eine mit Vehicle therapiert. Die Versuche wurden doppelt verblindet und randomisiert.

Therapie	Nicht-arthritische Kontrollgruppen	Versuchsgruppen mit Antigen-induzierter Arthritis
Vehicle (als Placebo)	„Kontrolle Vehicle“	„AiA Vehicle“
Simvastatin	„Kontrolle Statin“	„AiA Statin“

### 3.2.3. Arthritisinduktion

Die Versuchstiere werden vor der Arthritis-Induktion (d 0) zweimalig präimmunisiert, jeweils 21 (d -21) und 14 (d -14) Tage vorher. Dies erfolgt erstens mit der subkutanen Injektion eines Protein-Antigen-Gemisches aus 100 µg mBSA (methyliertes bovines Serumalbumin, Sigma, Deisenhofen, Deutschland), gelöst in 50µg CFA (Complete Freund's Adjuvant, Sigma) und versetzt mit Mycobacterium tuberculosis (Stamm H37RA; Difco, Augsburg, Deutschland) in die Flankenregion. Zweitens werden zu den beiden gleichen Zeitpunkten zusätzlich eine abgetötete Biomasse aus  $2 \times 10^9$  hitzegetöteten Bortadella pertussis (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) intraperitoneal appliziert. An Tag 0 erfolgt dann die Immunisierung und damit die Arthritis-Induktion durch eine intraartikuläre Gabe von 100µg mBSA als Antigen gelöst in 50µl NaCl in das linke Kniegelenk.

Sämtliche Injektionen wurden in einer Isofluran-Kurznaarkose durchgeführt. Für die intraartikulären Injektionen wurden Mikrokanülen, gauge 33, zum Punktieren des Gelenkes durch die Patellarsehne hindurch verwendet (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland). Es wurden die klinischen Parameter Gelenksdurchmesser,

Spontanverhalten, Pflegezustand und Gewicht auf einem Verlaufsbogen dokumentiert.

Die verschiedenen Phasen der Gelenksdestruktion im Sinne einer Arthritis werden anhand von der Literatur (Brackertz et al. <sup>99-101</sup>) und nach Vorversuchen (Veihelmann et al. <sup>103</sup>) wie folgt definiert: die Akutphase nach einer Woche (7 Tage), die Intermediärphase nach 4 Wochen (30 Tage) und die chronische Phase nach 9 Wochen (63 Tage).

#### 3.2.4. Statintherapie

Die Studie untersucht die Entzündungsreaktion im Rahmen der Antigen-induzierten Arthritis nach einer Therapie-Dauer von 14 Tagen. Dabei wurden die Tiere ab dem Tag der Arthritisinduktion für 14 konsekutive Tage entweder mit einem Placebo oder mit Simvastatin intraperitoneal behandelt, die Menge der Substanzen wurde auf das Gewicht des Tieres umgerechnet (40mg/kgKG). Dazu wurde das Tier unter inhalativer Kurznarkose (im folgenden Kapitel näher beschrieben) zunächst gewogen, um anschliessend die gewichtsadaptierte intraperitoneale Injektion (0,18-0,24 ml) durch Anheben der Bauchdecke mit einer ..... Kanüle zu applizieren. Im Rahmen der Therapie wurden täglich die klinische Erscheinung und das Gewicht anhand eines klinischen Scores und der Kniegelenksdurchmesser dokumentiert.

Für die Herstellung einer 10 mM Stocksolution wurde 41,8 mg Simvastatin in 1,5 ml 0,1N NaOH und 1 ml Äthanol gelöst. Diese Lösung wurde für 2 Stunden bei 50°C inkubiert, sodass die Lösung klar wurde. Bei diesem Vorgang wurde das Simvastatin von der inaktiven Laktonform in die aktive saure Form <sup>102</sup> gebracht. Das Volumen wurde mit PBS auf 10 ml gebracht und steril filtriert.

Gleicher Vorgang gilt für das Vehicle, nur ohne Zugabe von Simvastatin.

**Präimmunisierung:**

s.c. Complete Freund's Adjuvant (50 µl)  
 mBSA (100 µg)  
 M. tuberculosis (200 µg)  
 i.p. B. pertussis (2x10<sup>9</sup>)

**Arthritisinduktion:**

intraartikuläre Injektion  
 von 50 µg mBSA

**1. Therapietag**

IVM

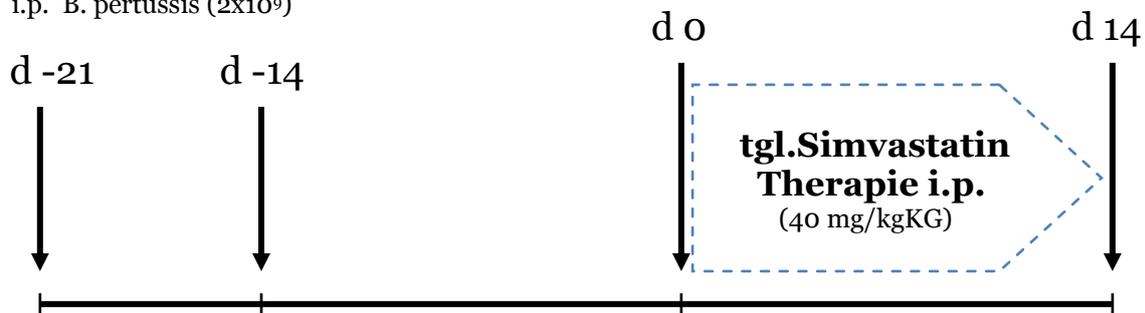


Abbildung 4: Versuchsablauf

### 3.3. Operation

#### 3.3.1. Narkose

Alle Eingriffe an den Versuchstieren, das heisst, die präoperativen Injektionen zur Arthritisinduktion und alle Statin- und Vehicle-Injektionen, Kniegelenksmessungen und die Operation mit Intravitalmikroskopie sowie die transthorakale Herzpunktion zur Thrombozytengewinnung wurden ausnahmslos in Inhalationsnarkose durchgeführt. Diese bestand aus einem Gemisch aus Sauerstoff (Fi O<sub>2</sub> 35%), Lachgas und Isofluran 1,2% (Forene, Abbott, Wiesbaden, Deutschland), welches über einen Vapor (Dräger, Lübeck, Deutschland) zugeführt wird.

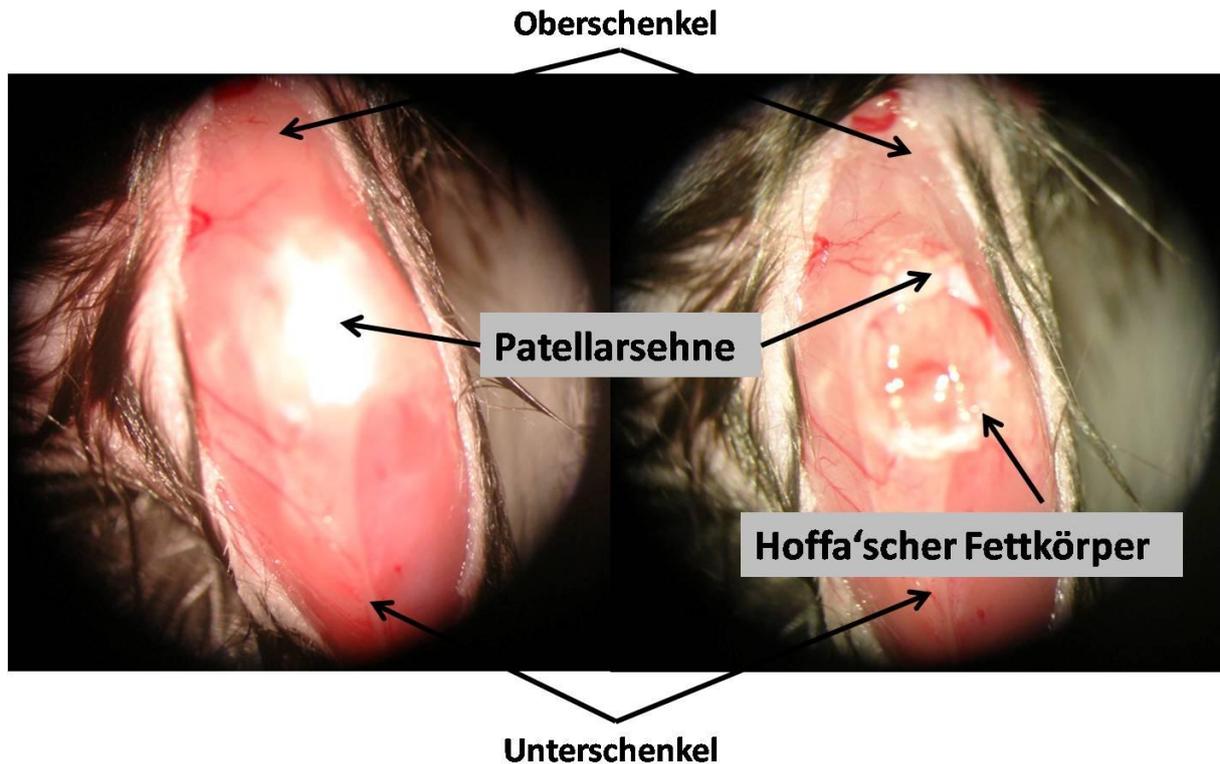
Die Narkose wurde intraoperativ dem Blutdruck und der Herzfrequenz angepasst, um dem Tier eine schmerzfreie Behandlung zu ermöglichen und eine optimale Überwachung zu gewährleisten.

### 3.3.2. Versuchsaufbau

Nach Narkotisierung wurde das Versuchstier in Rückenlage auf einer Heizplatte fixiert (Effenberger, München, Deutschland). Eine rektale Temperatursonde wurde eingebracht, um eine physiologische Körpertemperatur zwischen 36,5°C und 38°C zu gewährleisten. Anschließend wurde der Gefäßnervenbündel am proximalen Drittel des Schwanzes der Maus freipräpariert um einerseits über die Schwanzarterie den Blutdruck zu überwachen (Druck-Transducer, Sirecust 300D, Siemens, Deutschland) und um andererseits über die Schwanzvene eine Verweilkanüle für spätere Injektionen von Fluoreszenzmarkern und zur Volumensubstitution zu legen. Die Katheter (Fa. Portex, Lynthe, Kent, England) wurden beide mit zwei Fäden (5/0 Ethibond®, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) und durch Klebestreifen (BDF AG, Hamburg, Deutschland) an der Heizplatte fixiert.

### 3.3.3. Mikrochirurgische Präparation

Zur Präparation des Kniegelenkes wurde das linke Kniegelenk in einem Winkel von 45° Flexion auf einem speziell angefertigten Plexiglasblock gelagert und mit Klebeband fixiert. Nach Desinfektion wurde proximal der Pfote das Fell mit einer Schere eingeschnitten und bis zum Inguinalbereich eröffnet. Anschließend erfolgte die longitudinale Spaltung der oberflächlichen Faszien, um das Fell zur Seite lagern zu können. Die Patellarsehne wurde mit einer Pinzette (FST, Vancouver, B.C., Kanada) unterfahren, um sie dann an ihrem distalen Ansatz an der Tibia mit einer mikrochirurgischen Schere zu durchtrennen und nach proximal wegzuklappen. Nun war die Sicht frei auf den Hoffa'schen Fettkörper mit der Synovialis.



**Abbildung 5:** Präparation des Kniegelenks. Links: linkes Kniegelenk nach Eröffnung der Haut und Spaltung der Faszien, Sicht direkt auf die intakte Patellarsehne. Rechts: Nach Druchtrennung der Patellarsehne; Sicht auf den Hoffa'schen Fettkörper mit Synovialis.

Wie auf Abbildung 5: Präparation des Kniegelenks. Links: linkes Kniegelenk nach Eröffnung der Haut und Spaltung der Faszien, Sicht direkt auf die intakte Patellarsehne. Rechts: Nach Druchtrennung der Patellarsehne; Sicht auf den Hoffa'schen Fettkörper mit Synovialis. zu sehen, erfolgte die Präparation mithilfe eines Operationsmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland). Nun wurde auf dem Plexusglasblock beidseitig um das Knie ein Silikontropfen gesetzt, worauf nach Superfusion des Operationsstus mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung ein Deckglas gelegt wurde. Dies dient zum Schutz des Präparats vor Austrocknung und mechanischen Schäden sowie zur Ermöglichung der Intravitalmikroskopie.

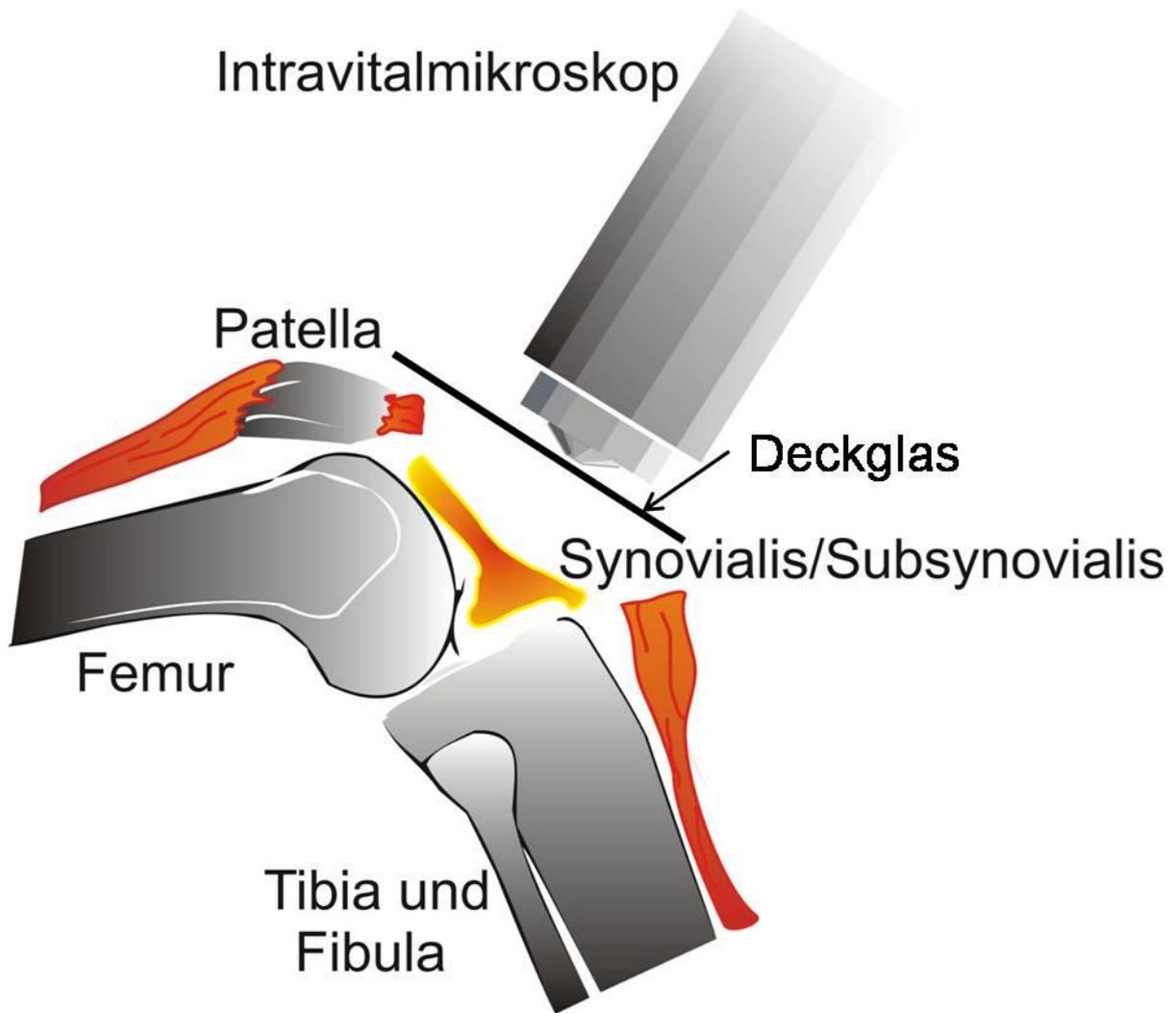


Abbildung 6: Vorgehen bei der Präparation: Fixierung des Kniegelenks in 45° Flexion und nach Freilegung der Patellarsehne und deren Durchtrennung. Darüber das Deckglas und das IVM.

### 3.4. Versuchsprotokoll

Für alle durchgeführten Versuche wurde folgendes Protokoll verwendet:

**Einzelversuchsprotokoll**

Modell zur Beobachtung der synovialen Mikrozirkulation der Maus in vivo

Gruppe: \_\_\_\_\_

Spritzennummer: \_\_\_\_\_

Markierung:

	rechts	links
Ohr		
Seite		

Versuchsnummer: \_\_\_\_\_

Versuchstag: \_\_\_\_\_

Versuchsbeginn/-ende: \_\_\_\_\_ bis \_\_\_\_\_

	C 57/BL6	Transgen
Versuchstier		
Spendertier		

Narkose: (O<sub>2</sub> 38 % + N<sub>2</sub>O) + Isoflurane 2%

Sonstige: \_\_\_\_\_

Schwanzarterienkatheter: ja / nein

Besonderheiten bei Durchführung:

nein / ja: \_\_\_\_\_

Blutdruckmessung: konstant / inkonstant

keine, weil: \_\_\_\_\_

Blutdruckverlauf:

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

Körpergewicht: \_\_\_\_\_

Kniegelenkdurchmesser: \_\_\_\_\_

Kniepräparation: 1. Äußerer Aspekt: unauffällig  
Geschwollen

2. Durchtrennung Patellarsehne:

Zielgewebe unverletzt

Zielgewebe verletzt, keine Blutung

Starke Blutung

Intravitalmikroskopie:

Beginn der Aufnahmen: \_\_\_\_\_

Keine Aufnahme möglich, weil: \_\_\_\_\_

CFDA: ja / nein Beginn: \_\_\_\_\_

Rhodamin: ja / nein Beginn: \_\_\_\_\_

FITC: ja / nein Beginn: \_\_\_\_\_

Versuchende: Euthanasie: Pentobarbital i.p. 0,5 ml

Organentnahme: Knie links  
Blutplasma  
Schwanzspitze  
Hoffa

Abbildung 7: Versuchsprotokoll.

## 3.5. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

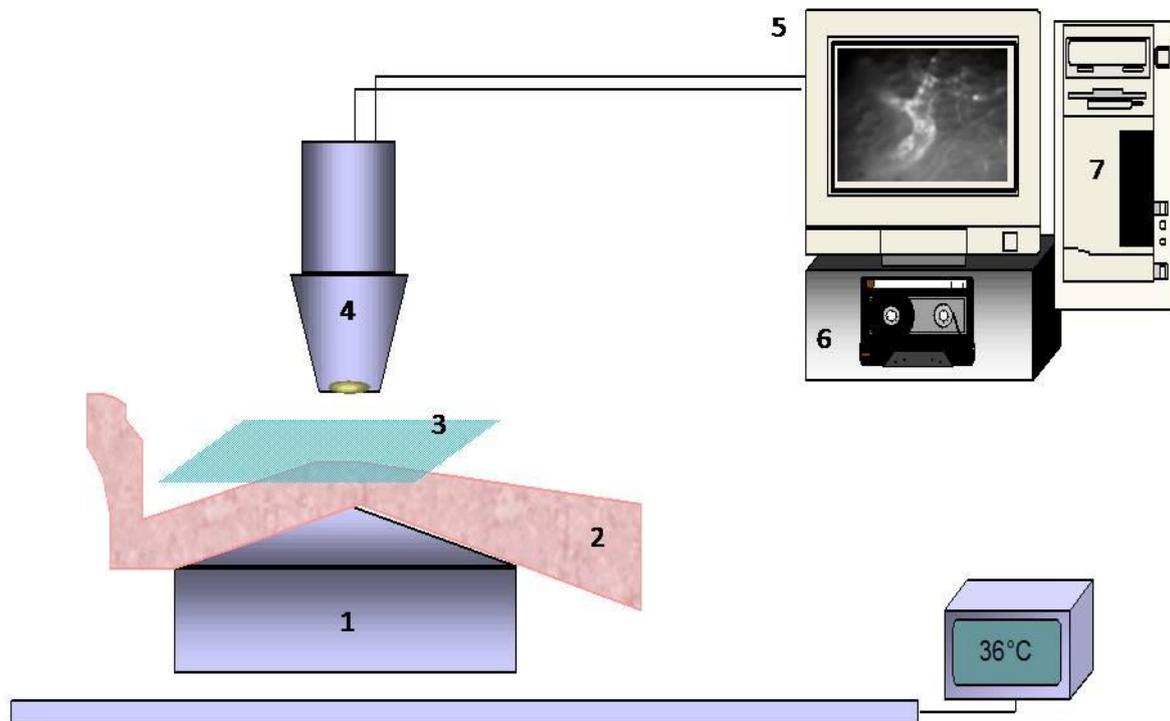


Abbildung 8: Technischer Aufbau zur Intravitalkamierung bestehend aus (1) computergesteuertem Mikroskopiertisch mit (2) Versuchstier und Situs, (3) Deckglas, (4) Intravitalkamierobjektiv mit Videokamera, (5) Bildschirm, (6) Videoaufnahmegerät und (7) Computer.

Das verwendete Intravitalkamierobjektiv wurde bereits zuvor von Harris et al. im Detail beschrieben<sup>105</sup>. Für die Versuche wurde ein Auflichtmikroskop der Firma Zeiss (Axiotech Vario, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet, welches mit einem Projektionsokular von 1,25-fachem Vergrößerungsfaktor ausgestattet ist. Zusätzlich wurden die intravitale Aufnahmen mit einem 20x/ 0,5W Archoplan Immersionsobjektiv von Zeiss durchgeführt. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 100 W (AtoArc, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Für die digitalen Aufnahmen wurde zunächst senkrecht im Lichtgang eine schwarz-weiß Kamera angeschlossen (Camera FK 6990 A-IQ, Pieper GmbH, Schwerte, Deutschland; Lichtempfindlichkeit 0,02 Luxm 699 x 581 Bildpunkte). Die Videosequenzen wurden anschließend auf einem Digital Videocassette Recorder (DSR-45P, Sony GmbH, Köln, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde, mit Einblendung eines Zeitcodes und des Datums mittels

Videozeitgenerator (VT 633; Fora Company Ltd., Tokyo, Japan), aufgezeichnet. Das Bild wurde letztendlich online computerunterstützt über einen Bildschirm (Trinitron PVM 20M2MDE, Sony GmbH, Berlin, Deutschland) dargestellt. Die Aufnahmen wurden zur späteren Offline-Auswertung auf Videokassetten (AY-DV124AMQ, Panasonic) aufgenommen. Die Auswertung erfolgt über eine Software, die es erlaubt in Echtzeit Flächen-, Gefäßdicke- und Flussgeschwindigkeitsmessungen durchzuführen (CAP-Image, Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland <sup>106</sup>).

Die Feinfokussierung der jeweiligen Präparationsareale wurde durch einen Mikro-/Makrotrieb, an dem das gesamte Mikroskop aufgehängt war, ermöglicht. Ein Fluoreszenzfilterschieber ermöglichte das Einsetzen der entsprechenden Bandpassfilter:

- zur Darstellung CFDA-markierter Thrombozyten und FITC-Dextran: Filter Set 09: BP 450-490, Farbteiler (FT) 510, long pass (LP) 520, Anregungsbereich blau;
- zur Darstellung von Rhodamin 6G-gefärbter Leukozyten: Filter Set 15: BP 546/12, FT 580, LP 590, Anregungsbereich grün.

Durch Umschalten der Filterblöcke und des Anregungslichts war es möglich, konsekutive Aufnahmen von Videosequenzen von allen untersuchten Gefäßen zu machen.

Pro Versuchstier wurden 3 Gesichtsfelder ausgewählt und aufgenommen, die jeweils 1-3 postkapilläre Venolen (18-40  $\mu\text{m}$  Durchmesser) oder Kapillaren zur Messung der funktionellen Kapillardichte (FCD) beinhalten.

#### 3.5.1. Fluoreszenzmarkierung

Zur Visualisierung der Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurden die Thrombozyten sowie die Leukozyten durch Fluoreszenzfarbstoffe direkt angefärbt. Das Plasma wurde durch an Proteine bindendes FITC-Dextran dargestellt, um den Gefäßdurchmesser, die Erythrozytenfließgeschwindigkeit und die funktionelle Kapillardichte zu erfassen.

## 3.5.1.1. Thrombozyten: Kardiale Punktion und Markierung

Die Thrombozyten wurden im Gegensatz zu den Leukozyten *ex vivo* angefärbt. Dazu wurde zunächst einem synergenem Spendertier (weiblich, C57Bl6) mittels Herzpunktion in Narkose ca. 1 ml Vollblut entnommen. Das Blut wurde anschließend mit 0,2 ml Alsevers-Puffer (38 mM Zitronensäure, 75 mM Trisodium Citrat/ 100 mM Dextrose), 20 µl Prostaglandin E1 (PGE 1, Serva, Heidelberg, Deutschland) und 0,5 ml Dulbecco phosphate-buffered Saline (D-PBS, PAN-Systems, Aidenbach, Deutschland) versetzt. Diese Probe wurde dann für 10 Minuten bei 900 U/min zentrifugiert, um das thrombozytenreiche Plasma von den restlichen Blutbestandteilen zu separieren. Dieses wurde mit 1,5 ml D-PBS, 0,3 ml Alsevers und 50 µl PGE 1 resuspendiert und der lang sichtbare Fluoreszenzmarker Carboxyfluoreszein-Diacetatester (CFDA-SE, Molecular Probes, Eugene, OR) zugesetzt um die Thrombozyten anzufärben, um somit die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion darstellen zu können <sup>107</sup>. Dieser Ansatz wurde nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten im Dunkeln für weitere 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Das resultierende Thrombozyten-Pallet wurde in 0,4 ml PBS resuspendiert. Die Anzahl gewonnener Thrombozyten wird in jeder Probe mit Hilfe eines Coulter-Counters (Coulter, Miami, FL) bestimmt. Dann wurde ein entsprechendes Volumen, welches  $100 \times 10^6$  fluoreszenzmarkierter Thrombozyten enthält, über den Schwanzvenenkatheter injiziert.

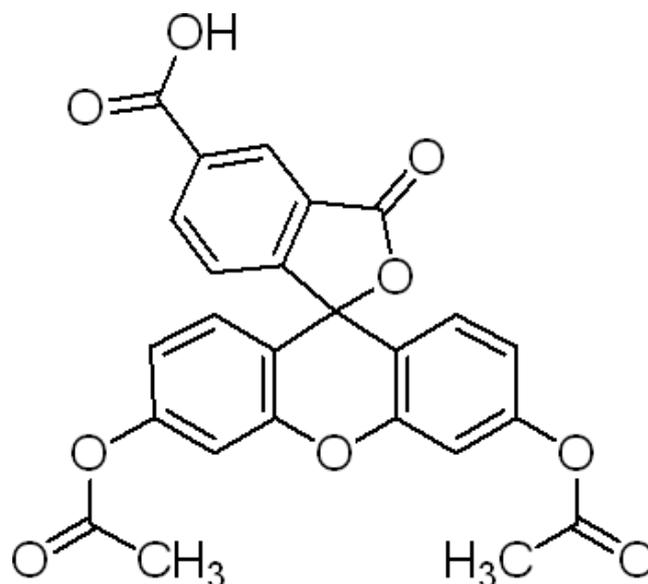


Abbildung 9: Strukturformel des Fluoreszenzmarkers Carboxyfluoreszein-Diacetatester (CFDA-SE)

Die physiologische Thrombozytenanzahl bei Mäusen beträgt ca.  $600 \times 10^3/\mu\text{l}$  Vollblut bei einem Blutvolumen von ca. 5,85 ml/100 g, somit liegt der Anteil markierter Thrombozyten an der Gesamtpopulation zirkulierender Thrombozyten damit bei ca. 10% - 20% <sup>108</sup>. Die Reinheit der Suspension und die Funktion der markierten Thrombozyten wurden nativ und nach Aktivierung mit Phorbol-Mystrate-Acetat durch eine durchflusszytometrische Untersuchung (FACsort flow cytometer, Becton Dickinson, Heidelberg) überprüft. Somit konnte eine Verunreinigung mit Leukozyten ausgeschlossen werden und die Funktionalität der markierten Thrombozyten getestet werden.

### 3.5.1.2. Leukozytenfärbung

Die Leukozyten wurden durch eine Injektion von Rhodamin 6G (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) direkt in vivo angefärbt. Dadurch konnten die Thrombozyten und Leukozyten zeitgleich während desselben Versuchs visualisiert werden. Rhodamin 6G ist ein lipophiler und positiv geladener Farbstoff, der sich durch diese Abhängigkeit zum Membranpotential an die Mitochondrienmembran anreichert <sup>109</sup>, was bedeutet, dass mitochondrienlose Zellen wie z.B. Erythrozyten und Thrombozyten, nicht mit angefärbt werden können.

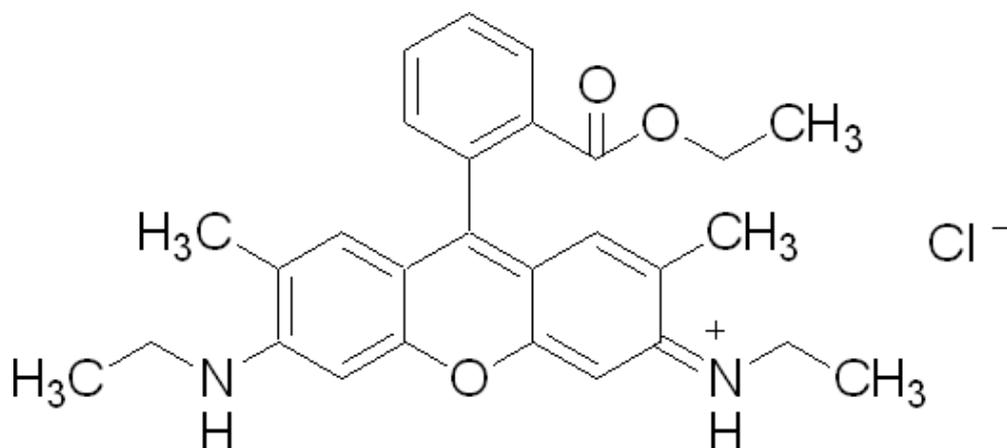


Abbildung 10: Strukturformel des Fluoreszenzmarkers Rhodamin 6G

In unseren Versuchen wurde eine Dosis von 0,3 ml/kgKG einer 0,2 mM (0,096 mg/ml) Rhodamin 6G Lösung intravenös appliziert <sup>110</sup>. Eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung kann in der für die Untersuchung gewählten Dosis ausgeschlossen werden <sup>111</sup>.

### 3.5.1.3. Plasmafärbung

Zur Anfärbung des Blutplasmas diente der Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran (Fluorescein isothiocyanate-dextran, 5 g/dl, MW 150.000, Sigma, Deisenhofen, Deutschland), ein hochmolekularer, lang zirkulierender Fluoreszenzfarbstoff, der über primäre Amine den Proteinanteil des Blutes bindet und anfärbt. Es wurde intravenös im Bolus in einer Dosis von 15 ml/kgKG appliziert. FITC-Dextran emittiert ein gelblich-weißes Licht mit einer mittleren Wellenlänge von 525 nm wenn es mit einem Licht von unter 500 nm Wellenlänge (Exzitationsmaximum 490 nm) angeregt wird. Diese Kontrastanhebung macht es möglich, dass sich die perfundierten Gefäße deutlich vom dunkleren Gewebe abheben und somit die Messung des Gefäßdurchmessers, der Blutflussgeschwindigkeit und der funktionellen Kapillardichte möglich war <sup>104, 112</sup>.

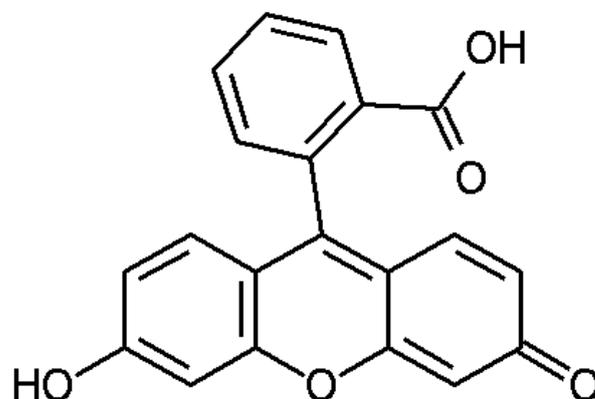


Abbildung 11: Strukturformel des Moleküls Fluorescein, die Grundlage des Farbstoffes FITC-Dextran.

## 3.6. Auswertung

### 3.6.1. Klinische Parameter

#### 3.6.1.1. Klinische Erscheinung

Zur klinischen Beurteilung der Ausprägung der Antigen-induzierten Arthritis wurden die Versuchstiere ab dem ersten Tag der Präimmunisierung bis zum Versuchsende anhand eines klinischen Scores beobachtet. Dazu wurden die Tiere hinsichtlich Körpergewicht, Spontanverhalten und Pflegezustand untersucht und nach folgenden Kriterien eingestuft:

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

Bei zwei aufeinander folgenden Punktwerten von 2 oder einmaligem Punktwert von 3 wurden die Tiere aus dem Versuch genommen.

#### 3.6.1.2. Kniegelenksdurchmesser

Der Kniegelenksdurchmesser wurde zu den Zeiten der Präimmunisierung (d-21 und d-14), am Tag der Arthritisinduktion (d 0) und an jedem der folgenden Therapie-Tage bis zur Intravitalmikroskopie gemessen.

Dazu wurden die Tiere in eine Kurznarkose versetzt, auf den Rücken gelagert und anhand eines Meßschiebers (Obi Baufachmarkt, München) der sagittale Durchmesser in 0,1 mm Einheiten bestimmt.

### 3.6.2. Mikrozirkulatorische Parameter

Neben dem mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) wurden folgende Parameter mittels Intravitalmikroskopie bei jedem Versuch anhand des Softwareprogramms CapImage™ bestimmt:

#### 3.6.2.1. Venolendurchmesser

Der Durchmesser einer Venole in der Region of Interest (ROI) wird durch Mittelung einer 10-maligen Messung des Abstandes zwischen den beiden Gefäßwänden in  $\mu\text{m}$  berechnet.

#### 3.6.2.2. Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Die Messung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit (Red Blood Cell Velocity (RBC)) wurde in den postkapillären Venolen unter Zuhilfenahme der Line-Shift-Diagramm-Methode von CapImage™ berechnet und wurde in Millimeter/Sekunde (mm/s) angegeben. Diese Methode beruht auf einer Kombination aus automatischen und interaktiven Verfahren und wurde für mindestens 3 Gefäße pro Tier ermittelt.

#### 3.6.2.3. Thrombozyten-& Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die CFDA-SE-markierten Thrombozyten und die Rhodamin 6G-markierten Leukozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Sekunden an mindestens 3 verschiedenen Gefäßen ausgezählt und je nach der Interaktion mit dem Endothel in die folgenden Gruppen eingeteilt:

##### 3.6.2.3.1. Rollende Zellen

Als rollende Zellen bezeichnet man solche, die im Randstrom fließen und sich am mikrovaskulären Endothel mit deutlich geringerer Geschwindigkeit entlang bewegen

als der zentrale oder der gefäßwandnahe Blutstrom. Außerdem zeigen rollende Zellen kurze Kontakte mit dem Endothel. Sie werden angegeben als eine Fraktion von allen Zellen, die ein definiertes Gefäßsegment passieren:

$$\text{"Fraktion rollender Zellen"} = \frac{\text{Anzahl rollender Zellen}}{\text{Summe (Rollende Zellen+alle passierende Zellen)}}$$

### 3.6.2.3.2. Adhärenente Zellen

Adhärenente Zellen sind solche, die während der gesamten Beobachtungszeit von 30 Sekunden an gleicher Stelle am Gefäßendothel haften geblieben sind und sich nicht gelöst haben. Sie werden als Zellen pro mm<sup>2</sup> Endotheloberfläche (Zellen/mm<sup>2</sup>) angegeben und anhand des Gefäßdurchmessers und der Länge des untersuchten Gefäßabschnitts mit folgender Formel berechnet:

$$\text{"Adhärenente Zellen"} = \frac{aZ \times 10^6}{D \times \pi \times L}$$

wobei: aZ = Anzahl adhärenenter Zellen (Thrombozyten, bzw. Leukozyten)

während der Beobachtungszeit (30s)

D = Gefäßdurchmesser [ $\mu\text{m}$ ]

L = Länge des untersuchten Gefäßabschnitts = 200  $\mu\text{m}$

$\pi$  = Kreiskonstante

### 3.6.2.4. Funktionelle Kapillardichte

Die Funktionelle Kapillardichte (Functional Capillary Density (FCD)) ist ein Maß für die nutritive Perfusion des Gewebes <sup>113</sup>. Sie ist definiert als Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Beobachtungsfeld und wird in Zentimetern pro Quadratzentimeter (cm/cm<sup>2</sup>) angegeben. Nach Markierung wurden die Werte mithilfe von CapImage<sup>TM</sup> ermittelt, von denen ebenfalls Mittelwerte aus mindestens 3 Beobachtungsfeldern errechnet wurden.

### 3.6.3. Histologische Auswertung

Am Ende der Versuche wurden den Versuchstieren die Kniegelenke entnommen, um das Ausmaß der Antigen-induzierten Arthritis histologisch beurteilen zu können. Dazu wurden die in toto resezierten Kniegelenke für 24-48 Stunden in 4%igem Paraformaldehyd fixiert, anschließend für 72 Stunden entkalkt (EDTA-4Na und 20% Citronensäure) und in Paraffin eingebettet. Für die Hämatoxylin und Eosin (HE) Färbung wurden diese Präparate dann in 3 µm dünne Präparate geschnitten. Die histologische Auswertung erfolgte über den von Brackertz et al. etablierten histologischen Score, nachdem die Präparate semiquantitativ ausgewertet wurden <sup>101</sup>:

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 und Knorpel- bzw. Knochenerosion

Es wurde von allen Tieren ein HE-gefärbter histologischer Schnitt blind ausgewertet.

### 3.6.4. Statistische Auswertung

In dieser Arbeit werden die quantitativen Werte als Mittelwert (MW) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Mittelwerte ergeben sich aus den Mittelwerten der einzelnen Versuchstiere pro Versuchsgruppe ( $n = 7$ ). Für die Auswertung wurde nur der Mittelwert aus sämtlichen Venolen bzw. mikrozirkulatorischen Parametern pro Versuchstier verwendet.

Die Statistik wurde unter Hilfenahme von Sigma Stat™ (Jandel Scientific, V5.1, USA), einer Statistiksoftware, durchgeführt. Der Vergleich mehrerer unabhängiger Versuchsgruppen miteinander erfolgte mit dem Kruskal-Wallis One Way ANOVA Rangsummentest. Bei Vorliegen einer Signifikanz ( $p < 0,05$ ), wurde als post hoc Test für den paarweisen Vergleich die Student-Newman-Keuls-Methode verwendet. Bei der Analyse repetitiver Messungen in mehreren Gruppen erfolgte ein Two Way ANOVA Test für verbundene Stichproben.

Für die histologischen Untersuchungen wurde aufgrund einer rein deskriptiven Einteilung von einer statistischen Auswertung abgesehen. Die Ergebnisse wurden als Median angegeben und qualitativ beurteilt.

## 4. Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen beschrieben und miteinander verglichen.

### 4.1. Klinische Parameter

#### 4.1.1. Klinische Erscheinung

Die erfolgreiche Arthritisinduktion wurde an Hand des Spontanverhaltens und des Kniegelenksdurchmessers beobachtet. Bei allen Tieren konnten keine Defizite hinsichtlich der Pflege, der Erscheinung und im Verhalten im Verlauf der Arthritisinduktion festgestellt werden.

Gruppen	Verhalten	Erscheinung	Gewicht	Schwellung
Kontrolle Vehicle	0	0	0	0
Kontrolle Statin	0	0	0	0
AiA Vehicle	0	0	0	7
AiA Statin	0	0	0	7*

**Tabelle 3: Klinischer Score: 0 = normales gesundes Tier im Sinne unserer Studie; 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, \* signifikant rückläufige Schwellung im Verlauf des Versuches.**

### 4.1.2. Körpergewicht

Bezüglich des Gewichts nahmen die Tiere initial während der Präimmunisierungsphase zu und zeigten anschließend eine Gewichtsverteilung, die nicht signifikant anstieg oder abnahm. Dabei lag das Gewicht bei der Mehrheit der Tiere zwischen 18g und 21g (Abb. 12).

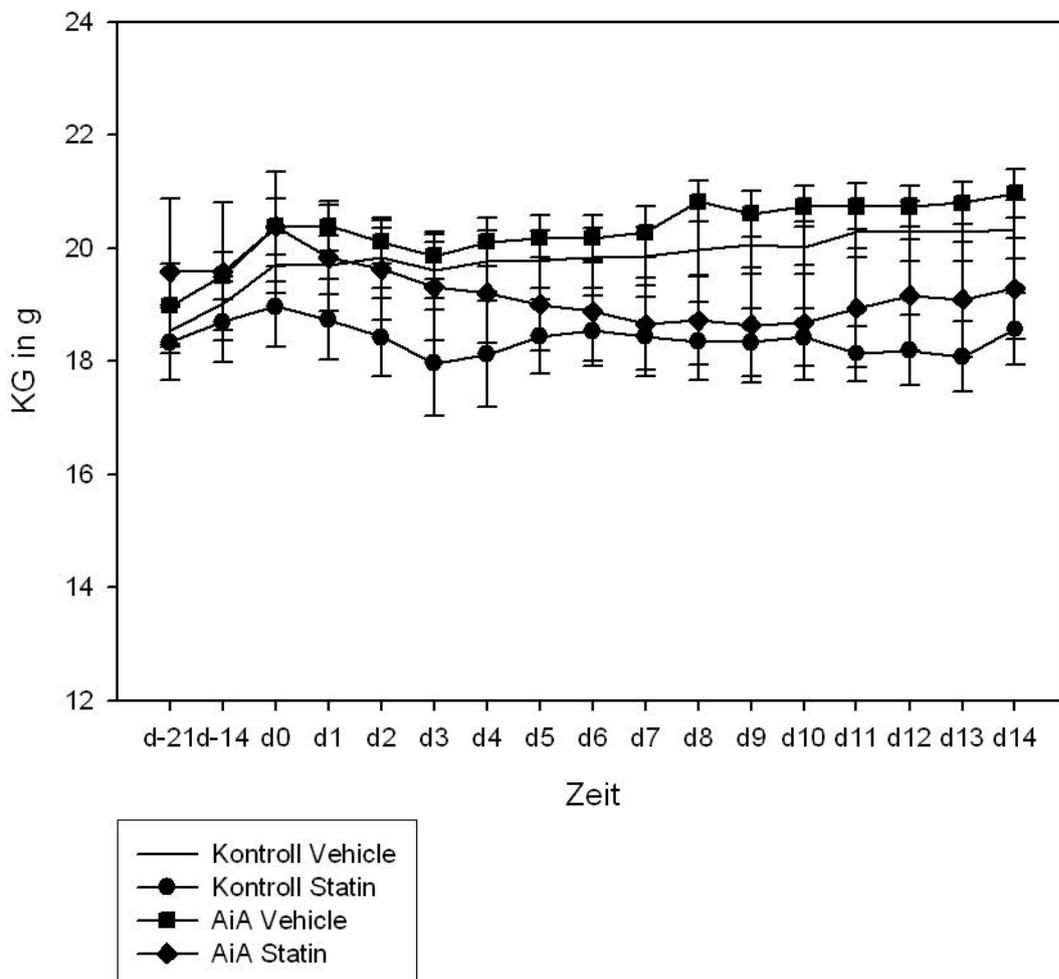


Abbildung 12: Körpergewicht: Verlauf des Körpergewichtes in den einzelnen Gruppen von Tag -21 bis zum Tag der IVM Aufnahmen. Die Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM. Es waren keine Signifikanzen ermittelbar.

### 4.1.3. Kniegelenksdurchmesser

Am Tag nach der Arthritisinduktion (Tag 1) durch intraartikuläre Injektion von steriler Kochsalzlösung bzw. mBSA zeigten alle Kontroll- wie auch AiA-Tiere eine Zunahme des Kniegelenksdurchmessers von durchschnittlich 3,5 mm auf 3,9 mm. Bei den Kontrollgruppen, denen sterile Kochsalzlösung in äquivalenter Dosis zum mBSA injiziert wurden, war die Schwellung ab dem 2. Tag wieder rückläufig und zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Bei den arthritischen Tieren hielt die Schwellung an (Abb. 13).

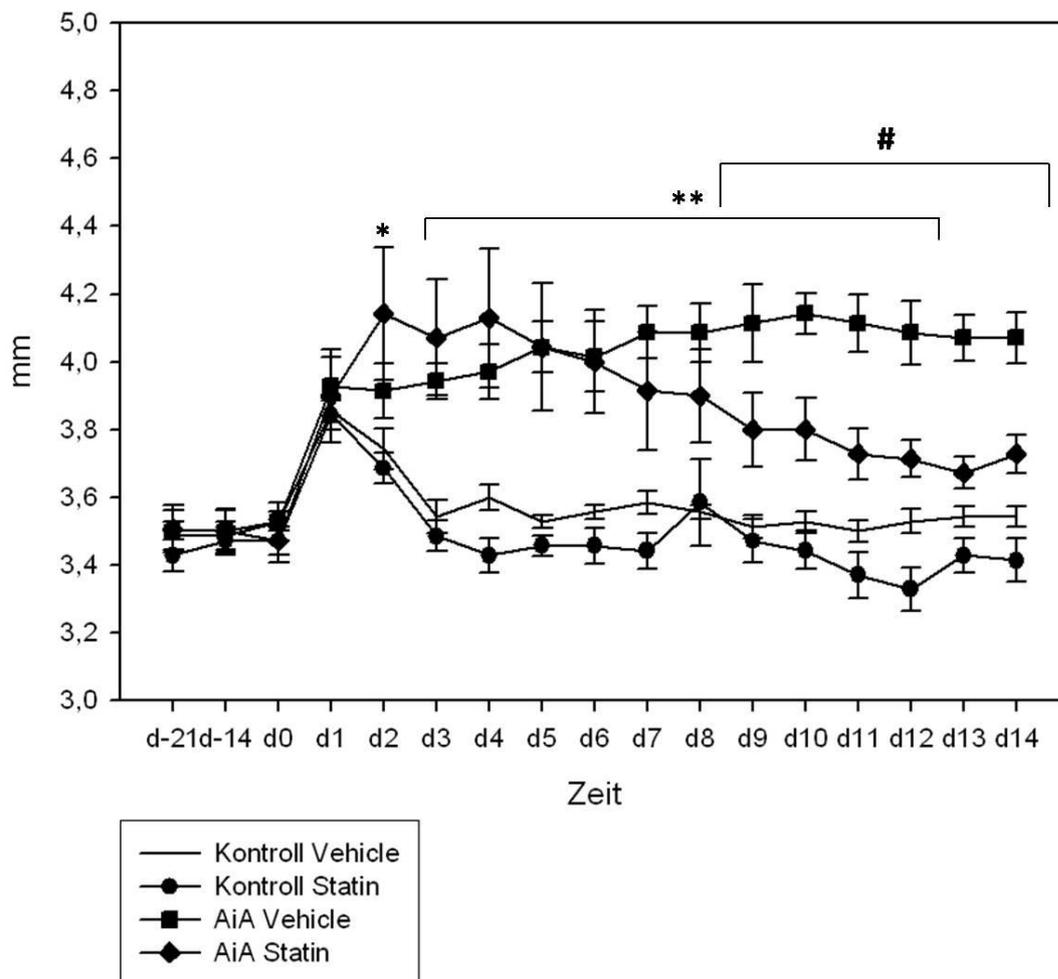


Abbildung 13: Kniegelenksdurchmesser: Veränderungen im Verlauf von Beginn der Arthritisinduktion bis zum Tag der IVM. Mittelwert  $\pm$ SEM. (\*)=  $p < 0,05$  bei AiA Statin vs. Kontrollgruppen; (\*\*)=  $p < 0,05$  bei AiA Vehicle vs. Kontrollgruppen und AiA Statin vs. Kontrollgruppen; (#)=  $p < 0,05$  bei AiA Vehicle vs. AiA Statin.

Im weiteren Verlauf blieb der Kniegelenksdurchmesser bei der mit Vehicle therapierten arthritischen Gruppe auf dem gleichen Niveau, wohingegen er bei der mit Simvastatin behandelten arthritischen Gruppe wieder sinkt und ab dem 9. Tag signifikant niedriger als bei der arthritischen Vehicle Gruppe verläuft (Tag 9: Statin  $3,8 \pm 0,1$  mm vs. Vehicle  $4,1 \pm 0,1$  mm,  $p=0,01$ ; Tag 10: Statin  $3,8 \pm 0,1$  mm vs. Vehicle  $4,1 \pm 0,1$  mm,  $p=0,005$ ; Tag 11:  $3,7 \pm 0,1$  mm vs.  $4,1 \pm 0,1$  mm,  $p=0,002$ ; Tag 12:  $3,7 \pm 0,1$  mm vs.  $4,1 \pm 0,1$  mm,  $p=0,003$ ; Tag 13:  $3,7 \pm 0,1$  mm vs.  $4,1 \pm 0,1$  mm,  $p=0,001$ ; Tag 14:  $3,7 \pm 0,1$  mm vs.  $4,1 \pm 0,1$  mm,  $p=0,005$ ; Repeated Measures Two Way ANOVA Test).

## 4.2. Intraoperative Parameter

Die Kreislaufsituation der Versuchstiere wurde anhand von intraoperativ gemessenen Parametern kontrolliert und zeigte sich während der Aufnahmen stabil, sodass man davon ausgehen konnte, dass die chirurgische Präparation die Tiere nicht negativ beeinflusst hat. Dazu wurden der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) und die Herzfrequenz (HF) überwacht, wobei die Herzfrequenz nur qualitativ beobachtet wurde, um gegebenenfalls die Narkose zu vertiefen.

Der mittlere arterielle Blutdruck bei den Kontrolltieren lag bei der Vehicle Gruppe bei  $80 \pm 5$  mmHg und bei der Statin Gruppe etwas niedriger mit  $79 \pm 6$  mmHg. Bei den arthritischen Tieren lagen die Werte bei den mit Vehicle therapierten Tieren mit  $82 \pm 5$  mmHg etwas höher als bei den mit Statin therapierten Tieren mit  $79 \pm 4$  mmHg. Insgesamt konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen beobachtet werden.

## 4.3. Mikrohämodynamische Parameter

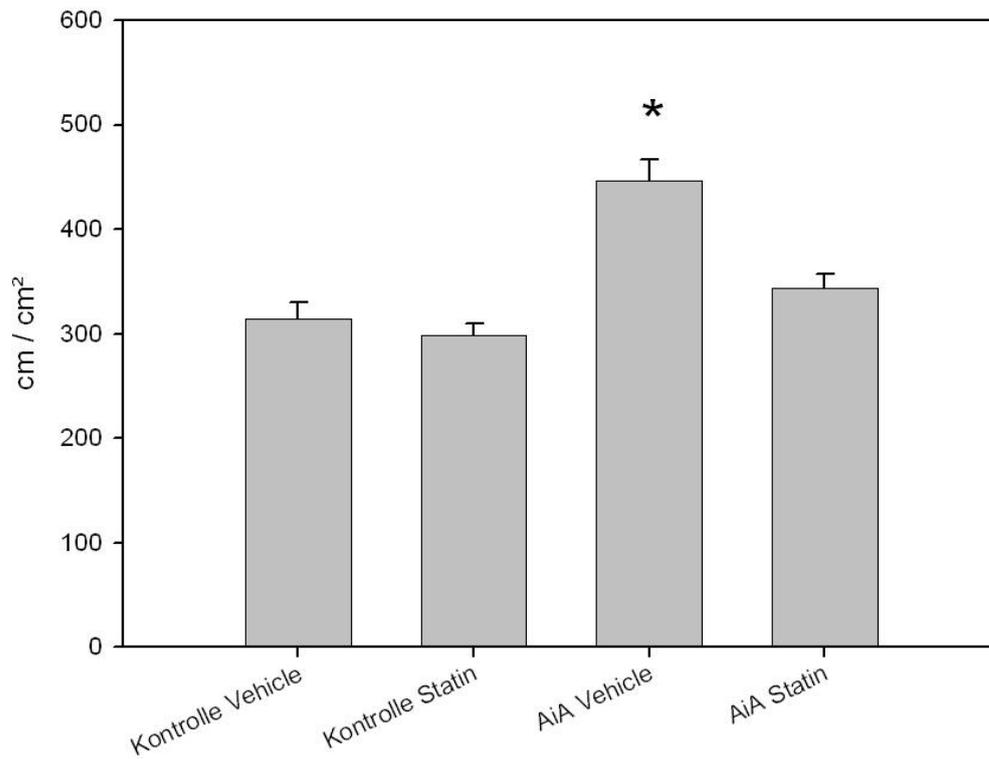
Der Durchmesser der postkapillären Venolen zeigte bei der Vehicle Kontrollgruppe mit  $11,3 \pm 0,039$   $\mu\text{m}$  keinen signifikanten Unterschied zu den beiden Arthritis Gruppen (Vehicle:  $12,04 \pm 0,60$   $\mu\text{m}$ , Statin:  $11,86 \pm 0,71$   $\mu\text{m}$ ). Der Gefäßdurchmesser bei der Statin Kontrollgruppe war hingegen mit  $9,6 \pm 0,33$   $\mu\text{m}$  leicht erniedrigt.

Kleinere Gefäße wurden nicht in die Wertung eingenommen, da ab einer Größe von  $<7-8 \mu\text{m}$  keine exakte Auswertung der IVM Aufnahmen mehr durchzuführen ist. Im Rahmen der Erythrozytenfließgeschwindigkeit in den postkapillären Venolen zeigten sich gewisse, jedoch nicht signifikante Schwankungen. Die Kontrolltiere präsentierten Werte von  $0,24 \pm 0,02 \text{ mm/s}$  bei den mit Vehicle therapierten und  $0,29 \pm 0,03 \text{ mm/s}$  bei den mit Statin therapierten Tieren. Bei den arthritischen Gruppen zeigten die mit Vehicle therapierten Tiere Werte von  $0,18 \pm 0,02 \text{ mm/s}$  und die mit Statin therapierten Werte von  $0,29 \pm 0,09 \text{ mm/s}$ .

<b>Gruppe</b>	<b>Gefäßdurchmesser</b>	<b>RBC velocity</b>	<b>FCD</b>
<b>Kontrolle Vehicle</b>	$11,3 \pm 0,39 \mu\text{m}$	$0,24 \pm 0,02 \text{ mm/s}$	$313,8 \pm 16,35 \text{ cm/cm}^2$
<b>Kontrolle Statin</b>	$9,6 \pm 0,33 \mu\text{m}$	$0,29 \pm 0,03 \text{ mm/s}$	$298,47 \pm 10,90 \text{ cm/cm}^2$
<b>AiA Vehicle</b>	$12,04 \pm 0,60 \mu\text{m}$	$0,18 \pm 0,02 \text{ mm/s}$	$446,20 \pm 20,85 \text{ cm/cm}^2$
<b>AiA Statin</b>	$11,86 \pm 0,71 \mu\text{m}$	$0,29 \pm 0,09 \text{ mm/s}$	$335 \pm 15,58 \text{ cm/cm}^2$

**Tabelle 4: Mikrohämodynamische Parameter bei der Intravitalmikroskopie.**

Die Messung der funktionellen Kapillardichte zeigte folgende Ergebnisse (Abb. 14-17): Es gab keinen Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen (Vehicle  $313,8 \pm 16,4 \text{ cm/cm}^2$ , Statin  $298,3 \pm 9,6 \text{ cm/cm}^2$ ). Jedoch war ein signifikanter Anstieg beim Vergleich der AiA Vehicle Gruppe ( $446,2 \pm 20,9 \text{ cm/cm}^2$ ) zu den beiden Kontrollgruppen (Vehicle:  $p < 0,001$ ; Statin:  $p = 0,001$ ) zu beobachten. Die mit Statin therapierte arthritische Gruppe ( $338 \pm 15,6 \text{ cm/cm}^2$ ) zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion der FCD im Vergleich zur AiA Vehicle Gruppe ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 14: Funktionelle Gefäßdichte der verschiedenen Versuchsgruppen. (\*) = Signifikanter Unterschied von AiA Vehicle im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen und zur AiA Statin Gruppe ( $p < 0,001$ )**

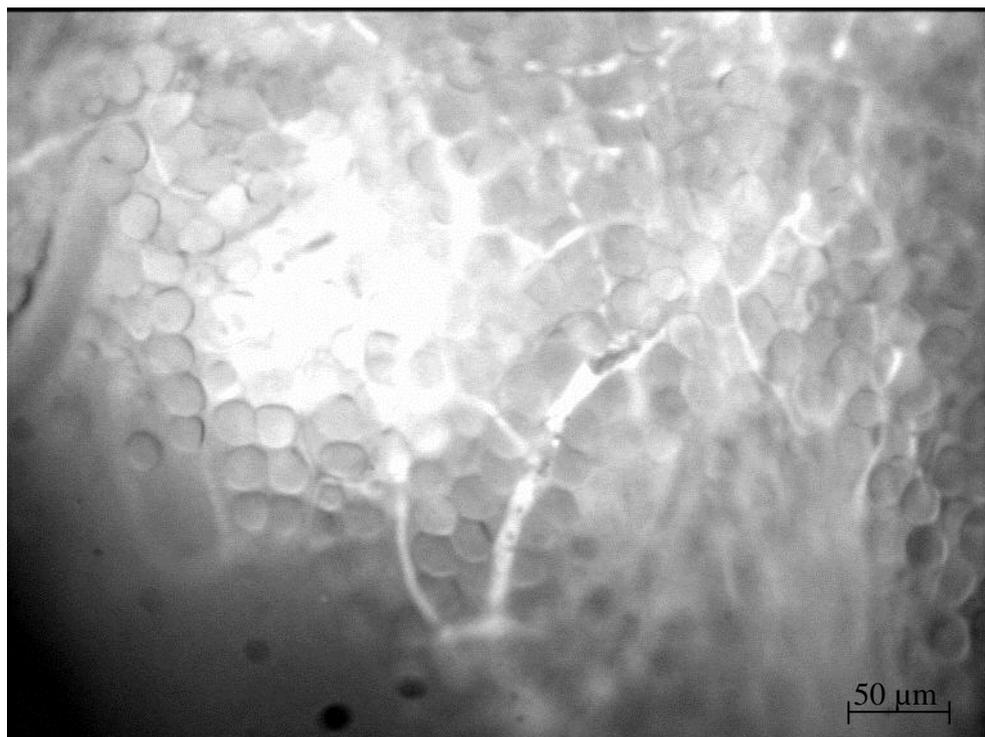


Abbildung 15: Kapillardichte eines nicht-arthritischen Kontrolltieres

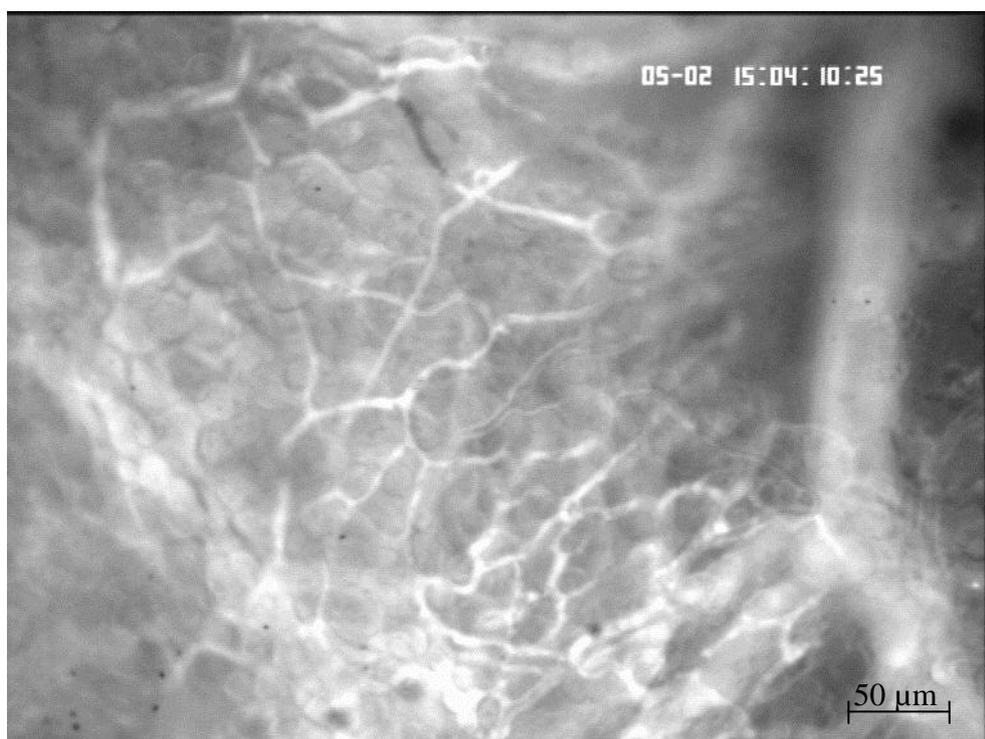


Abbildung 16: Kapillardichte eines arthritischen Versuchstieres



Abbildung 17: Kapillardichte eines Statin-behandelten AiA-Tieres

## 4.4. Mikrozirkulatorische Parameter

### 4.4.1. Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion

Beide arthritischen Gruppen zeigten in der Intravitalmikroskopie eine signifikant erhöhte Interaktion der markierten Thrombozyten mit dem Gefäßendothel (Abb. 19 und 20) im Vergleich zu den nicht-arthritischen Tieren (Abb. 18).



Abbildung 18: IVM Aufnahmen der CFDA-gefärbten Thrombozyten in vivo eines nicht-arthritischen Kontrolltieres.



Abbildung 19: IVM Aufnahmen der CFDA-gefärbten Thrombozyten in vivo eines arthritischen Kontrolltieres.



Abbildung 20: IVM Aufnahmen der CFDA-gefärbten Thrombozyten in vivo eines mit Statin behandelten AiA-Tieres.

Die Fraktion rollender Thrombozyten der mit Vehicle behandelten AiA-Gruppe ( $0,045 \pm 0,0045$ ) und die der mit Statin behandelten arthritischen Tiere ( $0,027 \pm 0,007$ ) zeigte einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den beiden nicht-arthritischen Kontrollgruppen (Kontrolle Vehicle:  $0,0091 \pm 0,0024$ ; Kontrolle Statin:  $0,005 \pm 0,0013$ ;  $p < 0,05$ ).

Sowohl bei den beiden Kontrollgruppen als auch bei den beiden AiA-Gruppen konnte jeweils eine Senkung bei den mit Statin therapierten Tieren im Vergleich zu den mit Vehicle therapierten Tieren beobachtet werden, welche jedoch nicht signifikant war (Abb. 21).

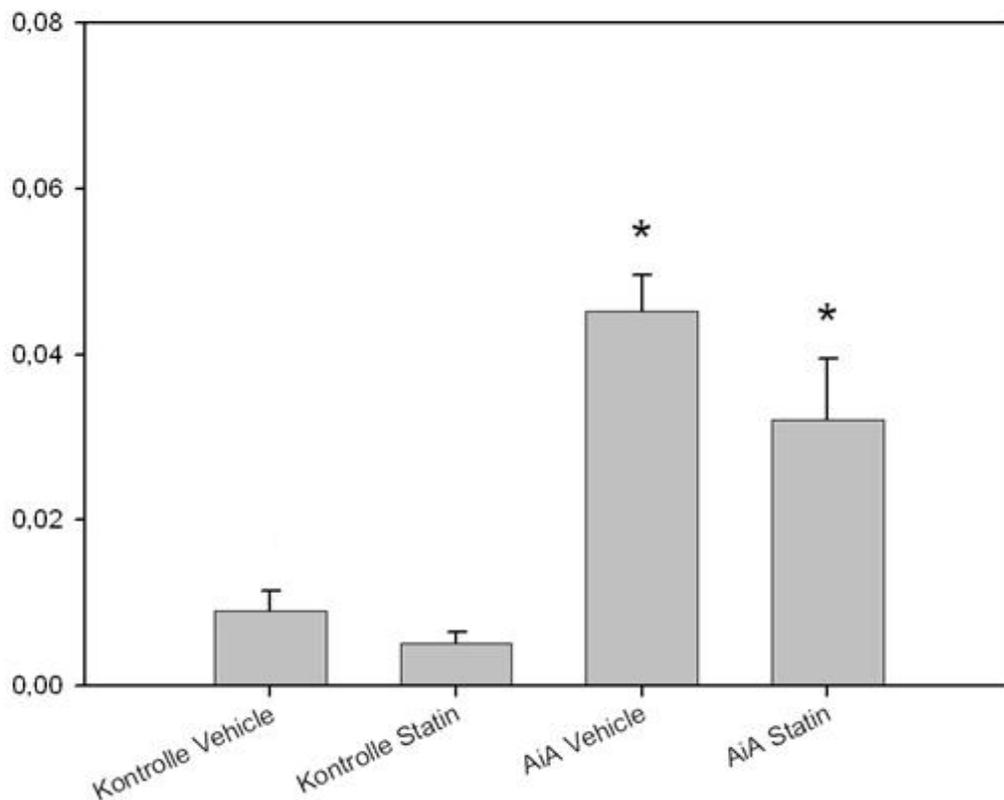


Abbildung 21: Fraktion rollender Thrombozyten bei  $n=7$   $MW \pm SEM$ . (\*) =  $p < 0,05$  bei AiA vs. Kontrolle.

Bei den adhärenenten Thrombozyten (Abb. 22) gab es ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Werte von der mit Vehicle therapierten arthritischen Gruppe ( $502 \pm 102,1$  Zellen/ $\text{mm}^{-2}$ ) im Vergleich zu den beiden nicht-arthritischen Gruppen (Kontrolle Vehicle:  $181 \pm 75,3$  Zellen/ $\text{mm}^{-2}$ ; Kontrolle Statin:  $105 \pm 34,6$  Zellen/ $\text{mm}^{-2}$ ;  $p < 0,05$ ). Die AiA Statin Gruppe befand sich mit  $170 \pm 71,6$  Zellen/ $\text{mm}^{-2}$  auf dem gleichen Niveau wie die beiden Kontrollgruppen und zeigte daher eine signifikante Reduktion im Vergleich mit der oben genannten AiA Vehicle Gruppe ( $p < 0,05$ ).

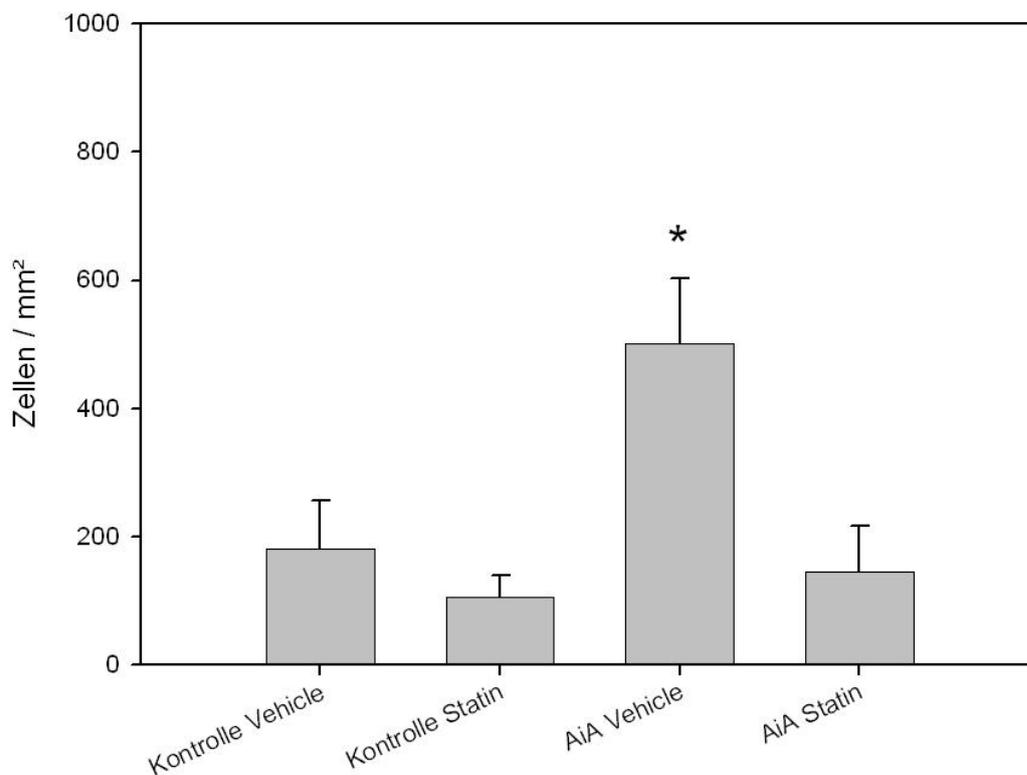


Abbildung 22: Anzahl der adhärenenten Thrombozyten/ $\text{mm}^2$  Gefäßendothel mit  $n=7$   $\text{MW} \pm \text{SEM}$ . (\*)= signifikante Reduktion bei den Kontrollgruppen und AiA Statin-Tieren im Vergleich zu AiA Vehicle ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4.2. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Analog den Ergebnissen der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion verhielt es sich auch bei den Untersuchungen mit Rhodamin 6G markierten Leukozyten (Abb. 23-25) mit einer Senkung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bei den mit Simvastatin behandelten Gruppen im Vergleich zu Nicht-Statin-Gruppen (Abb. 26, 27).

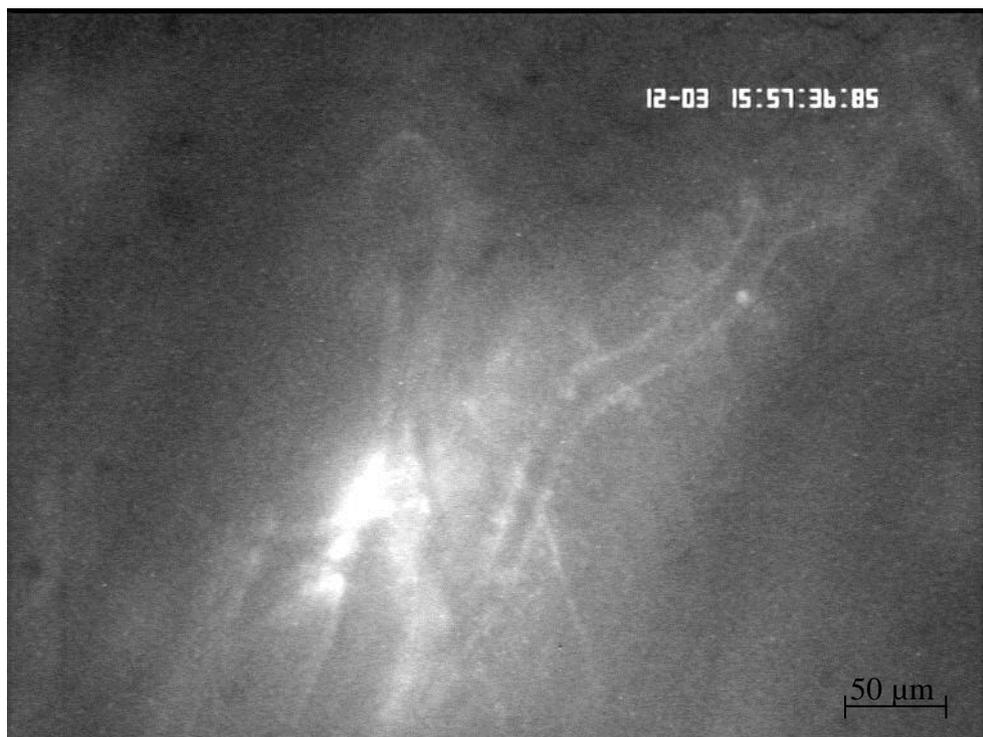


Abbildung 23: IVM Aufnahmen der mit Rhodamin 6G markierten Leukozyten in vivo eines nicht-arthritischen Kontrolltieres.

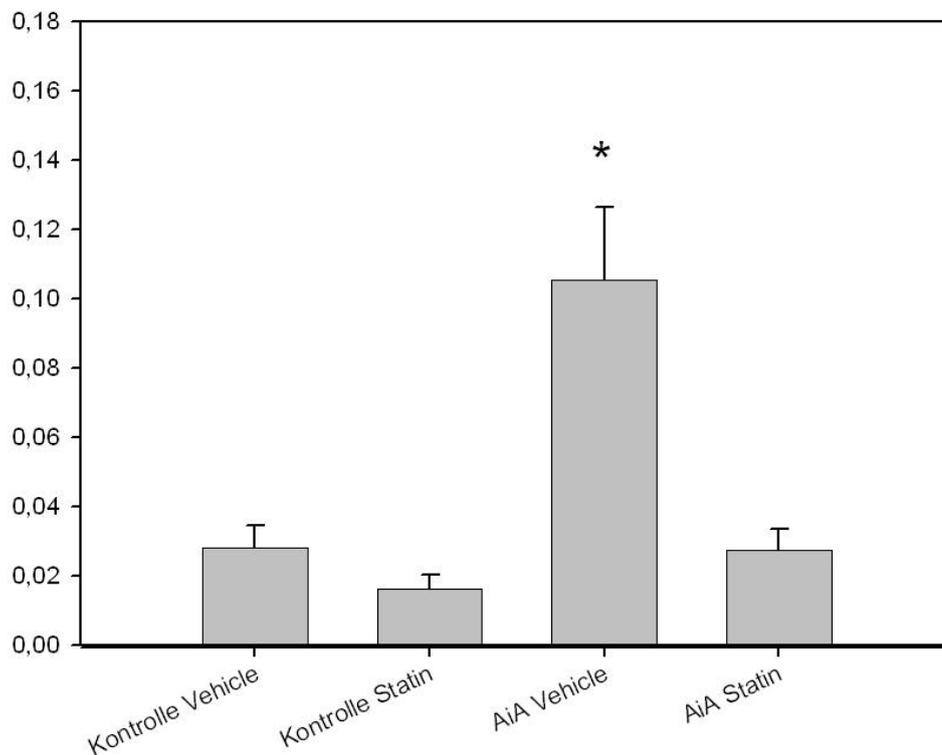


Abbildung 24: IVM Aufnahmen der mit Rhodamin 6G markierten Leukozyten in vivo eines arthritischen Kontrolltieres.



Abbildung 25: IVM Aufnahmen der mit Rhodamin 6G markierten Leukozyten in vivo eines mit Statin-behandelten AiA-Tieres.

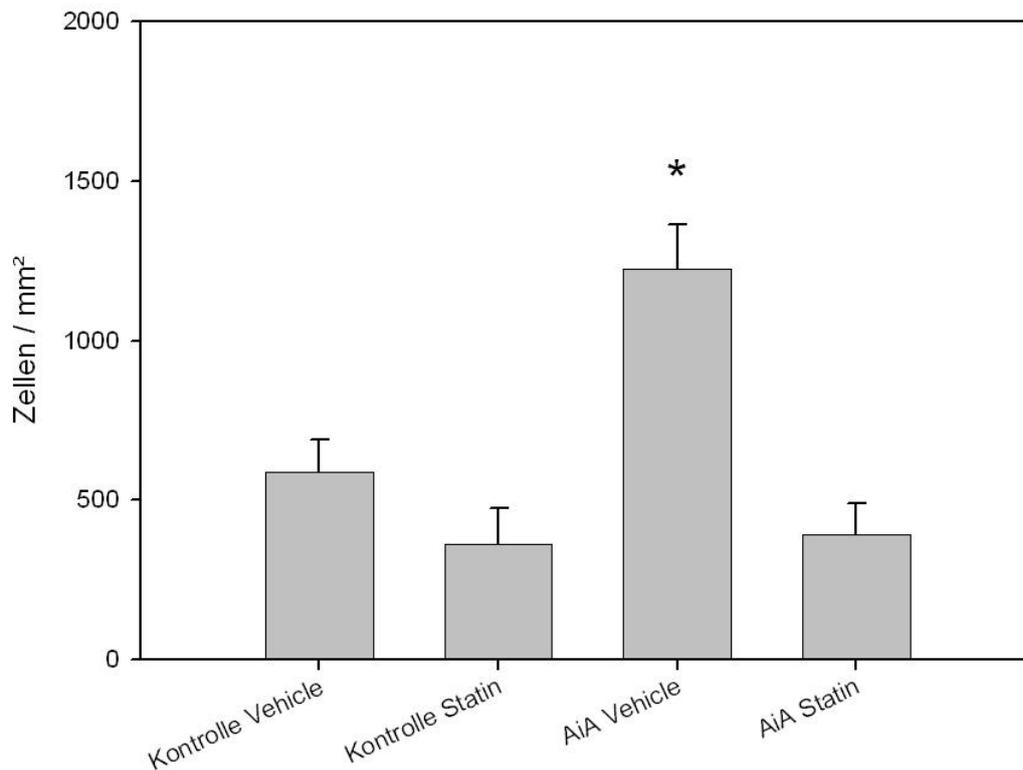
Bei der Beobachtung der Fraktion rollender Leukozyten (Abb. 26) zeigte sich im Gegensatz zu der Fraktion rollender Thrombozyten eine statistisch signifikante Senkung in der arthritischen Gruppe, die mit Statin behandelt wurde ( $0,025 \pm 0,006$ ) im Vergleich zu der, die mit Vehicle therapiert wurde ( $0,095 \pm 0,021$ ;  $p < 0,05$ ). Die beiden Kontrollgruppen zeigten untereinander keine Signifikanz (Kontrolle Vehicle:  $0,028 \pm 0,0065$ ; Kontrolle Statin:  $0,016 \pm 0,004$ ), jedoch war wie oben ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur AiA Vehicle Gruppe zu ermitteln ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 26: Fraktion rollender Leukozyten mit  $n=7$  MW $\pm$ SEM. (\*)=  $P < 0,05$  bei AiA Vehicle im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen und AiA Statin.**

Bei den adhärenenten Leukozyten (Abb. 27) erhielten wir äquivalente Ergebnisse: Man konnte eine signifikante Reduktion der Leukozyten pro  $\text{mm}^2$  Gefäßendothel bei den AiA-Statintieren ( $443 \pm 97,8$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ) im Vergleich zu den AiA-Vehicle-Tieren ( $1225 \pm 139,5$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ) beobachten ( $p < 0,001$ ). Die Werte der mit Statin

behandelten AiA-Gruppe lagen wieder auf dem gleichen Niveau mit den zwei Kontrollgruppen (Kontrolle Vehicle:  $589 \pm 99,8$  Zellen/ $\text{mm}^{-2}$ ; Kontrolle Statin:  $400 \pm 112,3$  Zellen/ $\text{mm}^{-2}$ ), welche ebenfalls einen signifikanten Unterschied zur AiA-Vehicle Gruppe zeigten ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 27:** Anzahl adhärenter Leukozyten/ $\text{mm}^2$  mit  $n=7$   $\text{MW} \pm \text{SEM}$ . (\*) =  $p < 0,001$  bei AiA Vehicle im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen und AiA Statin.

## 4.5. Histologie

Bei dieser Studie wurden bei allen Versuchstieren zur Überprüfung der erfolgreichen Arthritisinduktion histologische Untersuchungen durchgeführt und nach dem Score von Brackertz et al. ausgewertet. Dabei zeigten alle arthritischen Tiere entzündliche Veränderungen im Sinne einer Arthritis. Die Kontrollgruppen wiesen normale Histologien auf. Die Aussagekraft der Histologie ist rein qualitativ zu werten.

Gruppen	Histologischer Score				
	0	1	2	3	4
Kontrolle Vehicle	7	0	0	0	0
Kontrolle Statin	7	0	0	0	0
AiA Vehicle	0	0	0	4	3
AiA Statin	0	1	1	4	1

Tabelle 5: Histologische Auswertung der einzelnen Versuchsgruppen nach dem histologischen Score nach Brackertz et al.<sup>101</sup> (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 mit Leukozyten; 4 = Synovitis, Pannusbildung, Knorpel-/ subchondrale Knochenerosionen)

Abbildung 28 und Abbildung 29 zeigen jeweils exemplarisch einen histologischen Schnitt mit HE-Färbung durch das linke Kniegelenk eines Tieres aus jeder Versuchsgruppe. Dabei ist

- 1 = Meniskus,
- 2 = Gelenkspalt,
- 3 = Knorpel (a: gesund, b: arthritisch) und
- 4 = Synovialzellschicht (a: gesund, b: arthritisch).

Man kann die Abnahme der Knorpeldicke bei den arthritischen Tieren (Abb. 29: 3b) im Vergleich zu den gesunden (Abb. 28: 3a) und kleine superfizielle Erosionen deutlich erkennen. Auch das Synovium zeigt arthritische Veränderungen: Die Zellschicht ist hyperplastisch und mit zahlreichen Entzündungszellen infiltriert (Abb. 29: 4b).

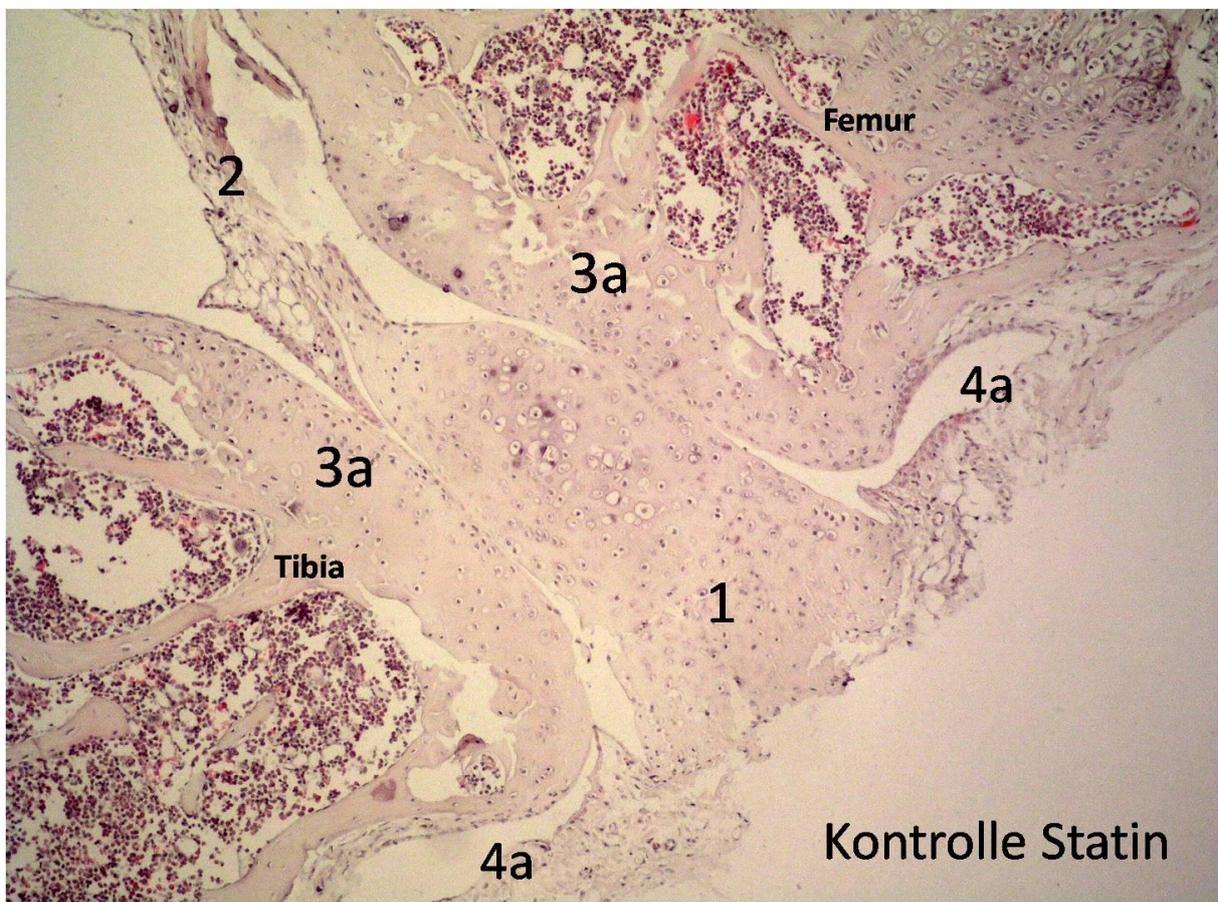
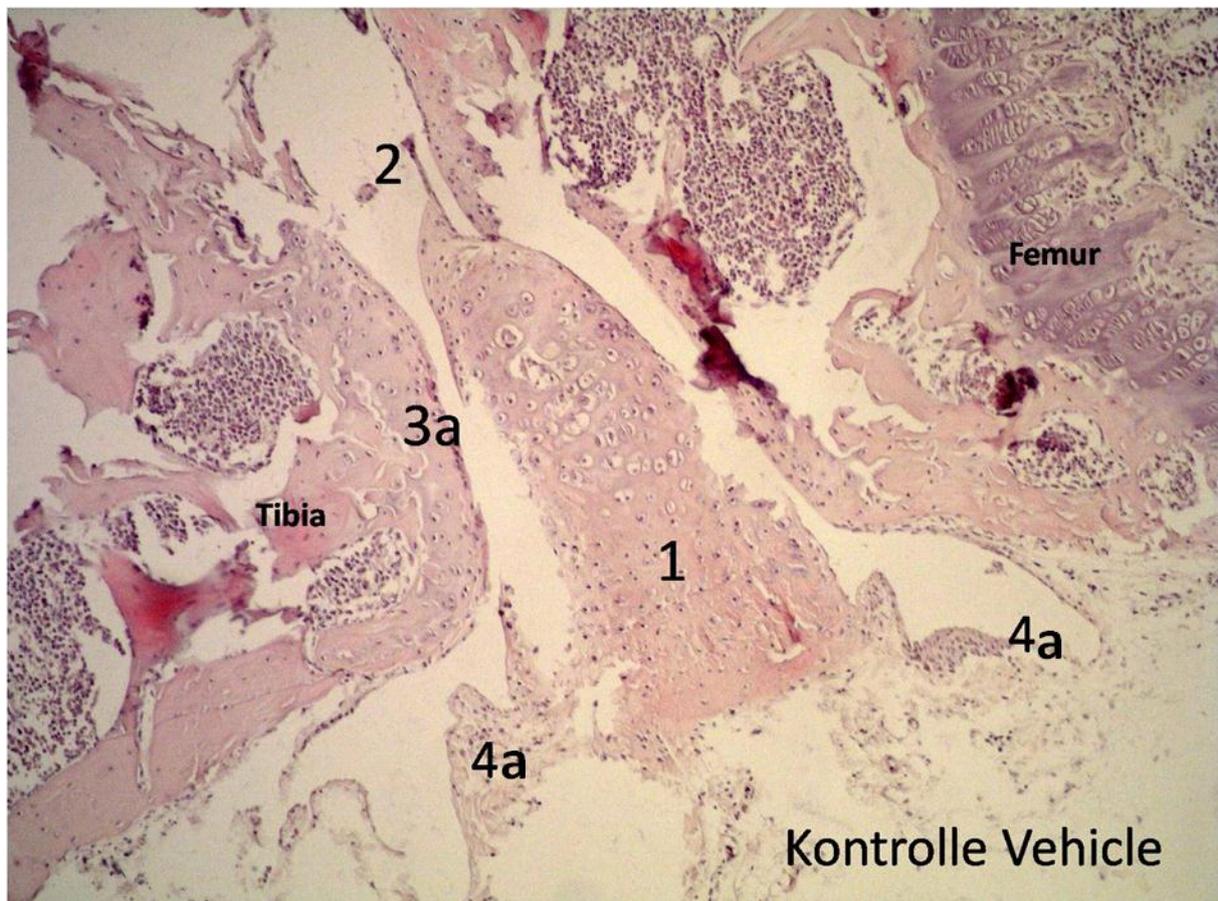


Abbildung 28: Histologische Schnitte von nichtarthritischen Kniegelenken.

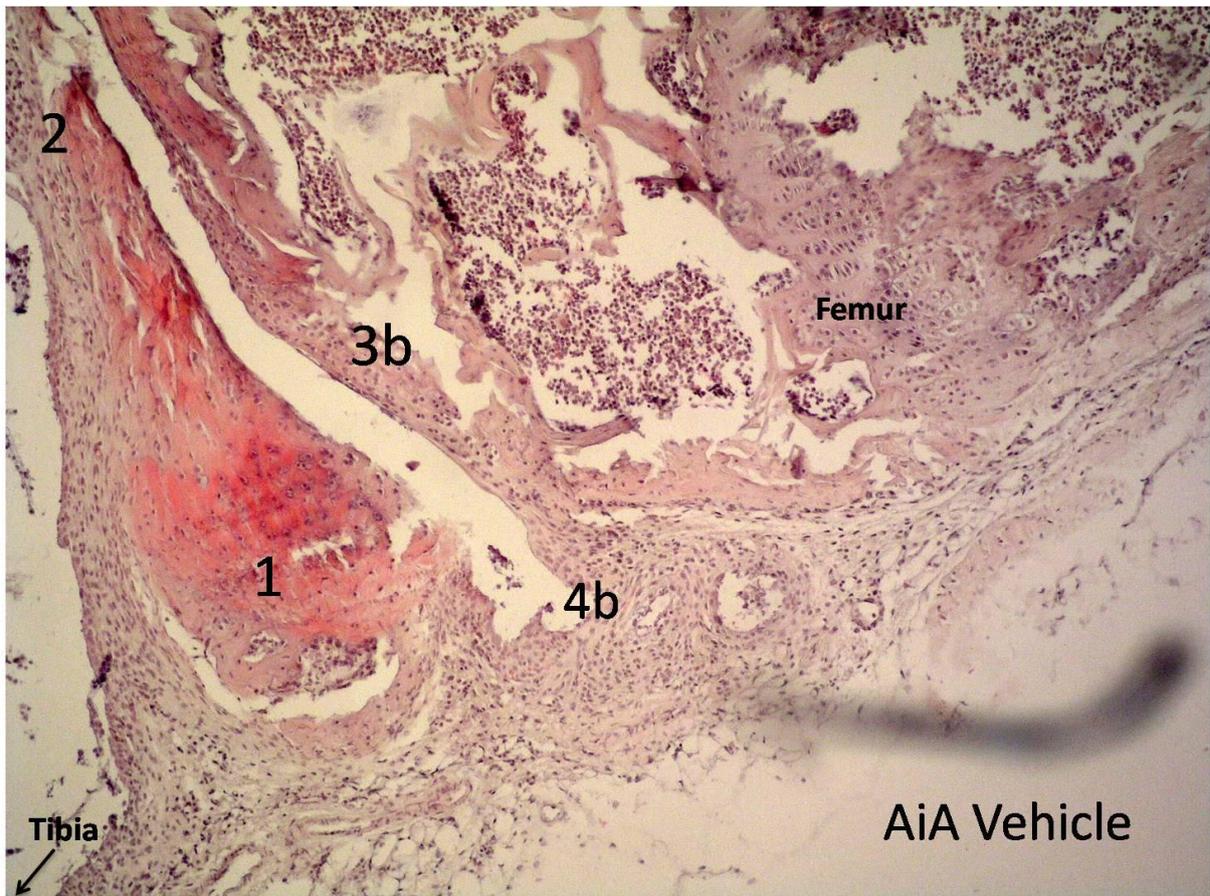


Abbildung 29: Histologische Schnitte von arthritischen Kniegelenken

## 5. Diskussion

### 5.1. Diskussion der Methoden

#### 5.1.1. Die Antigen-induzierte Arthritis der Maus

Es gibt momentan kein Tiermodell, welches die RA vollständig imitieren kann. Jedoch wurden mehrere Modelle entwickelt, die der RA in vielen wichtigen pathophysiologischen Aspekten ähneln <sup>114</sup>.

Das erste Modell war die Adjuvans-Arthritis (AA) der Ratte, eine zufällige Entdeckung von Carl Pearson 1956 <sup>115</sup>. Dabei wird die Arthritis durch Immunisierung mit in Öl emulsifizierten hitze-getöteten *Mycobacterium tuberculosis* (complete Freund's adjuvant) bei genetisch empfänglichen Ratten induziert. Die entzündliche Reaktion auf die M. tuberculosis-Antigene verläuft hier T-Zell-abhängig <sup>116, 117</sup>. Die AA entwickelt sich nach innerhalb von 11-20 Tagen und zeigt histologisch eine typische Pannus-Formation mit polymorphonukleären und mononukleären Infiltraten, später kommt es zu Knorpel- und subchondralen Knochenerosionen. Ausschlaggebend scheint dabei eine Kreuzantigenität zwischen Mykobakterium-Antigenen und Knorpel-Proteoglykan-Antigenen durch strukturelle Mimikry zu sein <sup>118</sup>. Dies wurde anhand der Isolierung aus Lymphknoten und Klonierung von stark arthritogenen Mykobakterium-spezifischen T-Zellen (A2 Stamm/line) aus AA-positiven Ratten nachgewiesen, welche die Arthritis bei Applikation auf gesunde Ratten transferieren können <sup>117</sup>.

Ein weiteres etabliertes Modell ist die Streptokokken-Zellwand-Arthritis (SCW), erstmalig berichtet 1977 von Cromartie et al. <sup>119</sup>. Die peritoneale Injektion einer wässrigen Lösung mit Zellwandfragmenten von Gruppe A Streptokokken führt bei bestimmten Rattenstämmen dabei zu einem biphasigem Verlauf: innerhalb von 24h kommt es zu einer akuten distalen Komplement-aktivierten und T-Zell-unabhängigen Gelenksentzündung durch Ablagerung dieser Peptidoglykan Fragmente im Synovium, welche nach etwa 3 bis 5 Tagen wieder fast vollständig abklingt. Nach 2-3 Wochen entwickelt sich eine chronische-erosive, diesmal T-Zell-abhängige Polyarthrititis mit Pannusformation, Knorpel- und Knochenerosionen. Am

Modell der Maus konnte im Gegensatz dazu nur die akute Gelenksentzündung mit Erythemen und starker Schwellung induziert werden. Diese Reaktion ließ sich jedoch später auch mit Zellwandfragmenten anderer Bakterien reproduzieren, wobei die Peptidoglykan-Einheit dafür essentiell erscheint <sup>120</sup>.

Die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) wurde 1977 von Trentham et al. an Ratten entdeckt <sup>121</sup>, welche später auch an Mäusen etabliert wurde. Dieses Modell beruht auf die Autoimmunität gegen natives Kollagen Typ II (CII), welches hauptsächlich in hyalinem Knorpel vorhanden ist. Ratten, die mit CII in *incomplete Freund's adjuvant* immunisiert wurden, entwickelten daraufhin Antikörper und eine Typ IV (Spättyp) Hypersensitivität gegenüber diesem Autoantigen <sup>122</sup>. Der fulminante Ausbruch der CIA tritt zwischen dem 10. und 16. Tag nach Immunisierung hauptsächlich ebenfalls bei den distalen Gliedmaßen mit Schwellung, Weichteilödem, Pannusbildung und anschließend Knorpel- und Knochenerosionen ein. Die CIA ist T-Zell-abhängig <sup>114</sup> und scheint auf eine bestimmte MHC-Prädisposition angewiesen zu sein, da nur Mäuse mit dem H2q Haplotyp empfänglich für eine Arthritis durch CII-Immunisierung sind <sup>123</sup>. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Pathomechanismen der CIA und AA sich komplementieren und dadurch eine besonders schwere Arthritis hervorrufen können <sup>124</sup>.

Als weitere bekannte Tiermodelle wären noch die Kollagen-Antikörper-induzierte Arthritis (CAIA) und das transgene humane-TNF- $\alpha$  Mäusemodell zu nennen. Die CAIA ist eine schwere und akut verlaufende Variante der Kollagen-induzierten Arthritis und basiert auf der Übertragung von CII-spezifischen monoklonalen Antikörpern auf gesunde Mäuse. Auch hier kommt es im Verlauf zu systemischen Veränderungen vor allem bei den distalen Gelenkregionen. Das genetische Modell beruht auf der Entwicklung einer chronischen Polyarthritits bei transgenen Mäusen, die 3'-modifizierte humane TNF (hTNF) Transgene exprimieren, welche durch anti-hTNF- $\alpha$ -Antikörper unterdrückt werden kann <sup>125</sup>. Dieses Modell hat wesentlich zum Verständnis der pathogenetischen Rolle von TNF- $\alpha$  im Rahmen der RA beigetragen <sup>13</sup>.

In dieser Studie wurde das Modell der Antigen-induzierten Arthritis (AiA) genutzt, einem etablierten Tiermodell zur Untersuchung pathophysiologischer Prozesse in der humanen Rheumatoiden Arthritis. Dumonde und Glynn entwickelten 1962 erstmalig dieses auf methyliertes bovines Serumalbumin (mBSA) basierende Modell am

Kaninchen <sup>126</sup>, welches anschließend von Brackertz et al. an der Maus etabliert und dort auf die arthritischen Veränderungen untersucht wurde <sup>99-101, 127</sup>. Die AiA ist eine chronische, antigen-spezifische und T-Zell-abhängige Synovitis und ihre Histologie ist der humanen RA mit einem Gelenkinfiltrat aus Lymphozyten (hauptsächlich CD4+), B-Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen sehr ähnlich. Sie ist im Gegensatz zu den oben genannten Modellen bei den meisten Wildstämmen induzierbar und führt stabil zu einem lokalisierten Befall des Kniegelenks. Dies war für unseren Versuchsaufbau besonders wesentlich, da zum Einen immer dasselbe Gelenk untersucht werden sollte, und zum Anderen das Kniegelenk, im Gegensatz zu den distalen Gelenken bei den anderen Modellen, mit der IVM leicht zugänglich ist. Da systemische Symptome selten sind, der Kniegelenksdurchmesser einfach zu beurteilen ist und die histologische Untersuchung eine hohe Selektivität und Sensitivität besitzt, ist dieses Modell einfach zu überwachen und wurde daher schon früher in unserer Arbeitsgruppe zur Untersuchung der Leukozyten- und Thrombozyten-Endothelzellinteraktion eingesetzt und etabliert <sup>104</sup>.

### 5.1.2. Die Intravitalmikroskopie

Anders als histologische Verfahren bietet die IVM die Möglichkeit der direkten *in vivo* Analyse mikrozirkulatorischer Parameter und wurde am Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Forschung essentiell mitentwickelt. In den letzten Jahren konnten viele herausragende Erkenntnisse durch die IVM über die Pathogenese verschiedener Erkrankungen zum Beispiel am Gehirn <sup>128, 129</sup>, an der Leber <sup>130, 131</sup>, der Lunge <sup>132</sup>, am Herzen <sup>133, 134</sup>, an der Haut und am Muskel <sup>135</sup>, am Darm <sup>136</sup> und an Tumoren der Rückenhautkammer <sup>137</sup> gewonnen werden. Die IVM ermöglicht es, zelluläre Pathomechanismen anhand der Fluoreszenzmikroskopie, aber auch mit normaler Lichtfeldmikroskopie oder Multiphotonenmikroskopie, *in vivo* zu präsentieren und zu untersuchen.

Für unsere Untersuchungen war es von immenser Bedeutung, Leukozyten und Thrombozyten *in vivo* zeitgleich mit unterschiedlichen Filtern darstellen zu können. Zusätzlich war es wichtig, über eine Zeitspanne von 90-120 Minuten stabile Voraussetzungen bei der Präparation und den anschließenden Aufnahmen zu erlangen, um möglichst wenige Störfaktoren bei den Messungen zu erhalten.

Aufgrund der stabilen mikro- und makrohämodynamischen Parameter in unserer Studie können wir von konstanten Bedingungen während der Versuche ausgehen.

Es wurden bereits mehrere Studien anhand der intravitalen Videofluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung der Mikrozirkulation am Modell der Antigen-induzierten Arthritis der Maus unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen durchgeführt<sup>10, 37, 103, 104, 138-140</sup>. Daher kann man zusammenfassend sagen, dass die IVM eine geeignete Untersuchungsmethode für unsere Studie darstellt.

### 5.1.3. Fluoreszenzmarkierung

Die Fluoreszenzmarkierung wird in zahlreichen Untersuchungen verschiedener Gewebe und Organe eingesetzt. Es existieren mittlerweile viele Fluoreszenzmarker, mit denen man unterschiedliche Zellen und Stoffe *in* und *ex vivo*, teilweise zeitgleich mit verschiedenen Filtern, darstellen kann. Wichtig dabei ist, dass diese Farbstoffe möglichst selektiv das gewünschte Zielgewebe bzw. Zellen anfärben und dass diese Anfärbung ein spezifisches und gut messbares Emissionsmaximum besitzt. Zusätzlich sollten sie bei *in vivo* Versuchen eine möglichst geringe Toxizität aufweisen.

Für unsere Studie wurden unterschiedliche Fluoreszenzmarker mit teilweise unterschiedlichen Emissionsmaxima und Filtern verwendet. Bei der Messung der CFDA-gefärbten Thrombozyten und der mit Rhodamin 6G gefärbten Leukozyten konnte eine Fehlinterpretation der Zugehörigkeit durch diese Unterschiede daher weitestgehend ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz dazu wurde für CFDA und FITC-Dextran, welche beide auf dem Farbstoff Fluorescein basieren, jeweils der gleiche Filter verwendet. Dies hat jedoch nicht die Thrombozyten-Endothelzellinteraktion beeinflusst, da die FITC-Messungen nur zur Bestimmung der RBC und der FCD dienten und erst anschließend stattgefunden haben.

Die Intravitalmikroskopie dauerte maximal 60 Minuten, wobei initial nach der Injektion der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe die relevanten Parameter erhoben wurden. Für die Versuchszeit von 60 Minuten und in den von uns benutzten

Dosierungen konnte in vorangegangenen Studien bereits die Phototoxizität, welche sich negativ auf die Ergebnisse hätte auswirken können, ausgeschlossen werden<sup>136, 141</sup>.

Auch die Stabilität der Parameter Blutdruck, Herzfrequenz und Erythrozytenfließgeschwindigkeit über den gesamten Zeitraum der IVM Messungen sprechen für die Annahme, dass die verwendeten Fluoreszenzmarker, auch im Vergleich zu den NaCl-Injektionen, keinen Einfluss auf die mikrozirkulatorischen Parameter und die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzellinteraktion haben.

#### 5.1.4. Thrombozytenseparation

Zurzeit ist noch kein Fluoreszenzfarbstoff bekannt, der die Thrombozyten *in vivo* markieren kann. Daher wurden für unsere Versuche die Thrombozyten einem Spendertier per kardialer Punktion entnommen, *ex vivo* mit dem Farbstoff CFDA markiert und dem Versuchstier intravenös appliziert.

Um eine durch den Separations- und Labellingprozess ausgelöste Aktivierung, welche unsere Ergebnisse verfälschen könnte, auszuschließen, wurde in unserer Arbeitsgruppe an diesem Modell die P-Selektin Expression im Vollblut und nach Separation gemessen. P-Selektin dient als Marker für die  $\alpha$ -Granula Sekretion und gilt als sensitiver Marker für eine Thrombozytenaktivierung<sup>142</sup>. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von P-Selektin zwischen den Thrombozyten im Vollblut und den separierten Thrombozyten festgestellt werden. In beiden Fällen konnte eine Steigerung der P-Selektin Expression nach Inkubation mit PMA bestimmt werden. Somit konnte eine Thrombozytenaktivierung durch den Separations- und Labellingprozess ausgeschlossen werden.

Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen am Institut Walter-Brendel-Zentrum im Rahmen unterschiedlicher Studien<sup>107, 143-145</sup>.

Zusätzlich spricht die Tatsache, dass es bei den gesunden Kontrolltieren unter physiologischen Bedingungen nur zu einer geringen Interaktion der CFDA-markierten Thrombozyten mit dem Endothel kommt, ebenfalls gegen eine relevante Aktivierung durch die *ex vivo* Markierung.

### 5.1.5. Die Simvastatintherapie

Die Simvastatintherapie erfolgte täglich intraperitoneal über einen Zeitraum von 14 Tagen. Dieses Therapieschema haben wir anhand der Daten aus den Studien von Leung et al. <sup>80</sup> übernommen, welche zur optimalen Dosisfindung Versuche mit jeweils 10, 20 und 40 mg/kgKG Simvastatin i.p. am CIA Mäusemodell durchgeführt haben. Erst bei einer Dosis von 40 mg/kgKG zeigte sich ein signifikanter Rückgang der CIA-Inzidenz und ihres Schweregrades <sup>80</sup>. Im Gegensatz zu den Studien von Palmer et al. <sup>146</sup> konnten wir keine erhöhte Mortalität durch die intraperitoneal applizierte Simvastatintherapie beobachten. Nur bei einigen Tieren ließ sich im Verlauf eine leichte Verdickung der Bauchwand klinisch erahnen, welche für eine leichte Irritation durch die Injektion sprechen könnte. Allerdings waren diese Tiere vom Gewicht, von ihrer Erscheinung und vom Verhalten her ansonsten unauffällig, was eine systemische Nebenwirkung unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Zur lipidsenkenden Behandlung am Menschen finden Dosierungen zwischen 5-80 mg Anwendung. Die Dosis von 40 mg/kgKG ist viel höher als beim Menschen, ist aber wegen der raschen kompensativen Hochregulation (3-8fach) der hepatischen HMG-CoA-Reduktase durch einen multivalenten, regulatorischen Feedback-Mechanismus bei Statintherapie an Mäusen und Ratten erforderlich <sup>147, 148</sup>.

## 5.2. Kritische Darstellung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand eines in vivo Modells gezeigt werden, dass die Therapie mit Simvastatin sich positiv auf die Antigen-induzierte Arthritis der Maus im Rahmen der Entzündungsreaktion auswirkt. Die Ergebnisse stimmen mit den ex vivo Untersuchungen an der Maus von Leung et al. <sup>80</sup> und mit anderen klinischen Studien überein.

Statine werden seit Jahren erfolgreich bei der primären und sekundären Prophylaxe bei kardiovaskulären Erkrankungen angewendet. Auch im Rahmen der Prophylaxe einer erhöhten Comorbidität mit kardiovaskulären Erkrankungen bei rheumatischen Erkrankungen finden sie mittlerweile als anerkannte Therapie Verwendung <sup>149</sup>. Ihre anti-inflammatorischen Effekte konnte bisher bei Nieren- und Herztransplantationen und bei der Atherosklerose als entzündliche Erkrankung, auch im Rahmen von Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel Multiple Sklerose <sup>150-152</sup>, Systemischer Lupus Erythematodes <sup>81, 153</sup> und Rheumatoide Arthritis, gut dokumentiert werden. Auch eine Vielzahl experimenteller Studien konnte diesen entzündungshemmenden Effekt belegen.

Die Entzündungshemmung beruht unabhängig von der Lipidsenkung auf der Modulation der Expression, Sekretion und Funktion von einer Reihe von Immunmediatoren, welche zu einer effektiven Immunsupprimierung durch Beeinträchtigung der Zellaktivierung, Adhäsion und Zellinteraktionen führen könnte <sup>154</sup>. Dazu gehören unter anderem die Senkung vom CRP <sup>82, 155</sup>, die Hemmung der INF- $\gamma$ -induzierten MHC-II-Expression <sup>72</sup>, die Supprimierung der Maturation von Dendritischen Zellen, die Hemmung der Antikoagulation <sup>91, 156, 157</sup>, sowie die der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 und die verminderte Monozyten-Endothel-Adhäsion <sup>158-162</sup>. Auch die Inhibierung von Matrix-Metalloproteinasen <sup>97, 163</sup> und Vasoprotektion durch erhöhte endotheliale NO Sekretion <sup>87, 88</sup> konnten bisher mehrfach beschrieben werden.

Die rheumatoide Arthritis ist eine MHC-II-assoziierte, chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung, bei der neben all den oben genannten Entzündungsmechanismen TNF- $\alpha$  pathogenetisch eine entscheidende und zentrale

Rolle spielt, da es die Expression der anderen proinflammatorischen Zytokine reguliert <sup>11</sup>. Dabei kommt es zu einer Aktivierung und kontrollierten Interaktion zwischen den Endothelzellen, Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, wobei man von einer Th1-gewichteten Immunabwehr spricht (paradigm of Th1/Th2 imbalance), und den Thrombozyten. Über Selektine kommt es zum sogenannten Rollen der Zellen. Die erhöhte Expressierung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf den Endothelzellen und den Leukozyten und seines leukozytären Liganden LFA-1 führt anschließend zu ihrer festen Bindung bzw. Adhäsion auf dem aktivierten Endothel <sup>164</sup>. Die Thrombozytenaktivierung führt zu ihrer Aggregation, zur Expressierung von weiteren Adhäsionsmolekülen und zur Freisetzung von P-Selektin aus ihren  $\alpha$ -Granulae, welches wiederum zur Rekrutierung von Leukozyten über den P-Selektin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) <sup>165</sup> führt. Die Bedeutung des P-Selektins auf die Leukozyten- und auch auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen konnte ebenfalls schon im Rahmen unserer Arbeitsgruppe anhand des AiA-Modells der Maus dargestellt werden <sup>37</sup>.

In unserer Studie konnten wir den positiven Effekt von Simvastatin auf die Entzündungsreaktion im Rahmen der Antigen-induzierten Arthritis der Maus bestätigen.

Die klinischen Parameter zur Verlaufskontrolle der AiA zeigten bis auf die Kniegelenkszunahme bei den arthritischen Tieren keine signifikanten Schwankungen. Dies sowie die stabilen intraoperativen Vitalparameter sprechen für einen möglichst niedrigen Einfluss von Störfaktoren auf die mikrozirkulatorischen Messergebnisse.

Die Kniegelenkszunahme der beiden arthritischen Gruppen bestätigte klinisch die erfolgreiche Arthritisinduktion. Die rückläufige Schwellung bei den mit Simvastatin therapierten arthritischen Tieren spricht für eine krankheitshemmende Wirkung.

Die histologische Auswertung konnte mit einer eindeutigen Zunahme von zellulären Infiltraten, Verdickung sowie Hyperplasie der Synovia und Abnahme der Knorpeldicke mit kleinen superfiziellen Erosionen eine Entzündungsreaktion im Rahmen der AiA bei beiden arthritischen Gruppen belegen. Qualitativ ließ sich jedoch kein Unterschied zwischen ihnen erkennen.

Die intravitalen Parameter hingegen zeigten eindeutige Ergebnisse zugunsten der Statintherapie. Sowohl die signifikante Reduktion der Kapillardichte bei den mit Statin behandelten arthritischen Tieren, als auch die der Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen sprechen für einen positiven Effekt durch diese Therapie. Auch bei den nicht-arthritischen Gruppen konnten wir eine leichte, wenn auch nicht signifikante, Reduktion all dieser Parameter bei der Simvastatin-Gruppe beobachten. Dies könnte auf einen protektiven Charakter wie auch in anderen Bereichen, in denen Simvastatin eingesetzt wird, hinweisen <sup>55-59</sup>.

Die Erhöhung der Kapillardichte im Rahmen der inflammatorischen Angiogenese bei der RA ist multifaktoriell unter anderem durch Wachstumsfaktoren (v.a. VEGF und HIFs), proinflammatorische Zytokine (v.a. TNF- $\alpha$ ), Chemokine, Matrix-Komponenten, Adhäsions-Moleküle und Proteasen bedingt <sup>166</sup>. Da die Statine wie oben beschrieben auf die meisten dieser Mechanismen einen anti-inflammatorischen Einfluss nehmen <sup>158-163</sup> ist es wahrscheinlich, dass der bei uns beobachtete Rückgang der Gefäßdichte bei den Statin-therapierten AiA-Tieren auf die Hemmung dieser Faktoren zurück zu führen ist <sup>167, 168</sup>.

Die Senkung der Fraktion rollender Thrombozyten- und Leukozyten könnte durch die von Eccles et al. und Oka et al. beschriebene Hemmung des thrombozytären und endothelialen P-Selektins erklärt werden <sup>169, 170</sup>.

Die Reduktion der adhärennten Zellen kann einmal durch den kausalen Zusammenhang zwischen Rollen und Adhärenz begründet werden, da die Inhibition des Rollens auch zu einer reduzierten Adhärenz führt <sup>171, 172</sup>. Zusätzlich könnte die Hemmung der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LFA-1 bei Monozyten, aktivierten T-Zellen und Endothelzellen <sup>173, 174</sup>, deren Bindung miteinander zur festen Adhäsion von Leukozyten mit dem Endothel führen, auch dazu beitragen. Weiterhin scheint die stimulierende Wirkung von Statinen auf die Produktion der endothelialen <sup>87, 88</sup> und thrombozytären <sup>156</sup> NO-Synthase dabei ebenfalls eine Rolle zu spielen, da NO ein potenter Inhibitor der Thrombozytenfunktion und -Aggregation ist. Dieser antiinflammatorische Effekt von Stickstoffmonoxid konnte auch schon anhand früherer Studien im Rahmen unserer Arbeitsgruppe evaluiert werden <sup>175</sup>.

Ebenfalls von großer Bedeutung scheint die Hemmung von TNF- $\alpha$  zu sein, da es ein Schlüsselzytokin in der Pathogenese der RA darstellt. Neben der Regulierung

weiterer proinflammatorischer Zytokine kann es die Expression von Adhäsionsmolekülen <sup>176</sup> und die Neoangiogenese <sup>166</sup> stimulieren.

Ein weiterer möglicher Faktor wäre die Reduzierung der endothelialen CD40-Expression. Die Hemmung des CD40 führt zu einer verminderten CD40-Ligand-induzierten proinflammatorischen Immunantwort <sup>177, 178</sup>. Auch die von Pignatelli et al. und Turk et al. beschriebene Hemmung der Expression des CD40-Liganden auf den Thrombozyten und T-Zellen könnte hierbei eine Rolle spielen <sup>179, 180</sup>, wobei die angefärbten und somit ausgewerteten Thrombozyten in unserem Modell aus unbehandelten Spendertieren kamen.

Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit in den postkapillären Venolen zeigte bei allen 4 Gruppen zwar keinen signifikanten Unterschied, jedoch konnten wir beobachten, dass sie bei der arthritischen Kontrollgruppe niedriger war als bei den nicht-arthritischen. Ähnliche Ergebnisse erhielten wir auch in vorangegangenen Studien <sup>10, 175</sup>, und wir konnten beobachten, dass es eine gewisse Korrelation zwischen der Erythrozytenfließgeschwindigkeit und der Gefäßdicke gab: Der Anstieg der Gefäßdicke bei den arthritischen Tieren ging meist mit einer Senkung der Fließgeschwindigkeit einher. Dies könnte man damit begründen, dass die inflammatorische Interaktion zwischen den Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen zu einer erhöhten zellulären Plasmakonzentration führt und der Fluss in den arthritischen Gefäßen dadurch verlangsamt ist. Analog dazu liegt der Rückschluss nahe, den schnelleren Fluss bei der AiA-Statine-Gruppe im Vergleich zur arthritischen Kontrollgruppe durch die entzündungshemmende Wirkung der Statine zu begründen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die meisten pleiotropen Effekte der Statine auf die Entzündungsmechanismen im Rahmen der RA applizierbar sind. Unsere *in vivo* Studie konnte diese Hypothese durch die positive Auswirkung sowohl auf den Kniegelenksdurchmesser als klinischer Verlaufparameter, als auch auf die Gefäßdicke und die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zusätzlich bestätigen. Dies konnten wir vor allem im Vergleich beider arthritischen Gruppen zeigen, zusätzlich auch im reduzierten Ausmaß bei den nicht-arthritischen Kontrollgruppen. Zusammen mit den Ergebnissen anderer experimenteller <sup>80</sup> und klinischer <sup>81-86</sup> Studien zugunsten einer supplementären Statintherapie unterstützen

unsere Resultate die Empfehlung zur Anwendung von Statinen bei der Rheumatoiden Arthritis.

## 6. Zusammenfassung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine progrediente chronisch-entzündliche systemische Autoimmunerkrankung, welche im Endstadium zu erheblichen Bewegungseinschränkungen der Patienten und zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität durch kardiovaskuläre Erkrankungen führen kann. Die Ätiologie ist bis heute noch nicht vollständig geklärt, man geht jedoch von einer multifaktoriellen Genese aus. In 70-80% der Fälle besteht eine genetische Assoziation mit bestimmten Humanen Leukozytenantigenen der Klasse II. Dabei führt die synoviale Entzündung mehrerer Gelenke zu einer schmerzhaften Zerstörung von Knorpel und Knochen mit konsekutiver Deformierung, was nicht selten zu einer Arthrodeuse oder einem künstlichen Gelenkersatz führen kann.

Bisher besteht die Therapie aus einem Stufenplan mit Krankengymnastik, physikalischen, medikamentösen und zuletzt operativen Maßnahmen. Die medikamentöse Therapie besteht einerseits aus der symptomatischen Behandlung mit Glukokortikoiden und NSAR, andererseits aus den krankheitsmodifizierenden Basistherapeutika, den sogenannten DMARDs.

Statine werden seit Jahren erfolgreich bei der primären und sekundären Prophylaxe von kardiovaskulären Erkrankungen und bei Hypercholesterinämie eingesetzt. Die Relevanz ihrer pleiotropen Effekte im Rahmen der Antiinflammation, auch im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wie die RA, gewinnt heute immer mehr an Gewicht.

In unserer *in vivo* Studie konnten wir erstmals anhand intravitraler Fluoreszenzmikroskopie einen positiven Effekt auf die Inflammation bei der Antigen-induzierten Arthritis der Maus *in vivo* zugunsten der Statintherapie belegen. Dazu wurden weibliche C57/Bl6 Mäuse nach Arthritisinduktion im linken Knie 14 Tage lang intraperitoneal mit Simvastatin therapiert. Im Intravitalmikroskop wurde anschließend anhand Fluoreszenzmarkierung von Thrombozyten, Leukozyten und Plasma die Anzahl rollender und adhärenter Thrombozyten und Leukozyten, die funktionelle Kapillardichte und die Erythrozytenfließgeschwindigkeit *in vivo* im betroffenen Kniegelenk gemessen. Der Kniegelenksdurchmesser und die histologische Auswertung wurden zur Quantifizierung hinzugezogen.

Die Therapie mit Simvastatin zeigte bei den arthritischen Tieren einen signifikanten Rückgang der Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen und der Gefäßdicke als Entzündungsparameter im Vergleich zur arthritischen Kontrollgruppe. Auch die rückläufige Kniegelenksschwellung unterlegt diese krankheitshemmende Wirkung. Im Rahmen der nicht-arthritischen Kontrollgruppen ließ sich ebenfalls ein leichter Rückgang der oben genannten intravitalen Parameter bei der mit Statin-therapierten Gruppe feststellen, welche für einen zusätzlichen protektiven Effekt sprechen könnte.

Somit könnte die Statintherapie bei der Rheumatoiden Arthritis nicht nur im Rahmen der kardiovaskulären Prophylaxe bei erhöhter Comorbidität, sondern auch als entzündungshemmendes Pharmazeutikum von wichtiger therapeutischer Bedeutung sein.

## 7. Literaturverzeichnis

- (1) Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996 May 3;85(3):307-10.
- (2) Alkaabi JK, Ho M, Levison R, Pullar T, Belch JJ. Rheumatoid arthritis and macrovascular disease. *Rheumatology (Oxford)* 2003 February;42(2):292-7.
- (3) Pasceri V, Yeh ET. A tale of two diseases: atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Circulation* 1999 November 23;100(21):2124-6.
- (4) Van DS, McColl G, Wicks IP. Accelerated atherosclerosis: an extraarticular feature of rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 2002 April;46(4):862-73.
- (5) Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, Spitz PW, Haga M, Kleinheksel SM, Cathey MA. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994 April;37(4):481-94.
- (6) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, . The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988 March;31(3):315-24.
- (7) Hochberg MC, Chang RW, Dwosh I, Lindsey S, Pincus T, Wolfe F. The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992 May;35(5):498-502.
- (8) Sewell KL, Trentham DE. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Lancet* 1993 January 30;341(8840):283-6.
- (9) Matsumoto I, Staub A, Benoist C, Mathis D. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* 1999 November 26;286(5445):1732-5.
- (10) Schmitt-Sody M, Klose A, Gottschalk O, Metz P, Gebhard H, Zysk S, Eichhorn ME, Hernandez-Richter TM, Jansson V, Veihelmann A. Platelet-endothelial cell interactions in murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005 July;44(7):885-9.
- (11) Feldmann M. Pathogenesis of arthritis: recent research progress. *Nat Immunol* 2001 September;2(9):771-3.
- (12) Ishikawa H. Rheumatoid pannus formation: synovial cell attachment to the surface of cartilage. *Japanese Journal of Rheumatology* 1998;8(3):213-23.
- (13) Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996;14:397-440.

- (14) Rho YH, Oeser A, Chung CP, Milne GL, Stein CM. Drugs Used in the Treatment of Rheumatoid Arthritis: Relationship between Current Use and Cardiovascular Risk Factors. *Arch Drug Inf* 2009 June;2(2):34-40.
- (15) Mateos JL. [Selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2), celecoxib and parecoxib: a systematic review.]. *Drugs Today (Barc )* 2010 February;46 Suppl A:1-25.
- (16) Hoer A, Gothe H, Schiffhorst G, Sterzel A, Grass U, Haussler B. Comparison of the effects of diclofenac or other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and diclofenac or other NSAIDs in combination with proton pump inhibitors (PPI) on hospitalisation due to peptic ulcer disease. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2007 February 26.
- (17) Schiemann U, Kellner H. [Gastrointestinal side effects in the therapy of rheumatologic diseases]. *Z Gastroenterol* 2002 November;40(11):937-43.
- (18) Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie e.V. DGRh-Leitlinie: Management der frühen rheumatoiden Arthritis. 2007.
- (19) Saag KG, Teng GG, Patkar NM, Anuntiyo J, Finney C, Curtis JR, Paulus HE, Mudano A, Pisu M, Elkins-Melton M, Outman R, Allison JJ, Suarez AM, Bridges SL, Jr., Chatham WW, Hochberg M, MacLean C, Mikuls T, Moreland LW, O'Dell J, Turkiewicz AM, Furst DE. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008 June 15;59(6):762-84.
- (20) Burger D, Dayer JM, Palmer G, Gabay C. Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006 October;20(5):879-96.
- (21) Jacques C, Gosset M, Berenbaum F, Gabay C. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam Horm* 2006;74:371-403.
- (22) Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004 June 17;350(25):2572-81.
- (23) Emery P, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A, Schechtman J, Szczepanski L, Kavanaugh A, Racewicz AJ, van Vollenhoven RF, Li NF, Agarwal S, Hesse EW, Shaw TM. The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum* 2006 May;54(5):1390-400.
- (24) Klareskog L, van der Heijde D, de Jager JP, Gough A, Kalden J, Malaise M, Martin ME, Pavelka K, Sany J, Settas L, Wajdula J, Pedersen R, Fatenejad S, Sanda M. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with

rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2004 February 28;363(9410):675-81.

- (25) Klareskog L, Gaubitz M, Rodriguez-Valverde V, Malaise M, Dougados M, Wajdula J. A long-term, open-label trial of the safety and efficacy of etanercept (Enbrel) in patients with rheumatoid arthritis not treated with other disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis* 2006 December;65(12):1578-84.
- (26) Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Furst D, Weisman MH, St Clair EW, Keenan GF, van der Heijde D, Marsters PA, Lipsky PE. Sustained improvement over two years in physical function, structural damage, and signs and symptoms among patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab and methotrexate. *Arthritis Rheum* 2004 April;50(4):1051-65.
- (27) van de Putte LB, Atkins C, Malaise M, Sany J, Russell AS, van Riel PL, Settas L, Bijlsma JW, Todesco S, Dougados M, Nash P, Emery P, Walter N, Kaul M, Fischkoff S, Kupper H. Efficacy and safety of adalimumab as monotherapy in patients with rheumatoid arthritis for whom previous disease modifying antirheumatic drug treatment has failed. *Ann Rheum Dis* 2004 May;63(5):508-16.
- (28) Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA* 2006 May 17;295(19):2275-85.
- (29) Listing J, Strangfeld A, Kary S, Rau R, von HU, Stoyanova-Scholz M, Gromnica-Ihle E, Antoni C, Herzer P, Kekow J, Schneider M, Zink A. Infections in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic agents. *Arthritis Rheum* 2005 November;52(11):3403-12.
- (30) Bhat AS, Tandan SK, Kumar D, Krishna V, Prakash VR. Interaction between inhibitors of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase in adjuvant-induced arthritis in female albino rats: an isobolographic study. *Eur J Pharmacol* 2007 February 5;556(1-3):190-9.
- (31) Veale DJ, Fearon U. Inhibition of angiogenic pathways in rheumatoid arthritis: potential for therapeutic targeting. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006 October;20(5):941-7.
- (32) Bansback N, Ara R, Ward S, Anis A, Choi HK. Statin therapy in rheumatoid arthritis: a cost-effectiveness and value-of-information analysis. *Pharmacoeconomics* 2009;27(1):25-37.
- (33) Clawson CC, White JG. Platelet interaction with bacteria. I. Reaction phases and effects of inhibitors. *Am J Pathol* 1971 November;65(2):367-80.
- (34) Saluk-Juszczak J, Wachowicz B, Kaca W. Endotoxins stimulate generation of superoxide radicals and lipid peroxidation in blood platelets. *Microbios* 2000;103(404):17-25.

- (35) Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 2002 December;70(12):6524-33.
- (36) Milovanovic M, Nilsson E, Jaremo P. Relationships between platelets and inflammatory markers in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* 2004 May;343(1-2):237-40.
- (37) Schmitt-Sody M, Metz P, Gottschalk O, Birkenmaier C, Zysk S, Veihelmann A, Jansson V. Platelet P-selectin is significantly involved in leukocyte-endothelial cell interaction in murine antigen-induced arthritis. *Platelets* 2007 August;18(5):365-72.
- (38) Spangenberg P, Redlich H, Bergmann I, Losche W, Gotzrath M, Kehrel B. The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes. *Thromb Haemost* 1993 September 1;70(3):514-21.
- (39) Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 1990 February 1;75(3):550-4.
- (40) Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 1989 October 20;59(2):305-12.
- (41) McEver RP. GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *J Cell Biochem* 1991 February;45(2):156-61.
- (42) Klinger MH. Platelets and inflammation. *Anat Embryol (Berl)* 1997 July;196(1):1-11.
- (43) Evangelista V, Celardo A, Dell'Elba G, Manarini S, Mironov A, de Gaetano G, Cerletti C. Platelet contribution to leukotriene production in inflammation: in vivo evidence in the rabbit. *Thromb Haemost* 1999 March;81(3):442-8.
- (44) Lou J, Donati YR, Juillard P, Giroud C, Vesin C, Mili N, Grau GE. Platelets play an important role in TNF-induced microvascular endothelial cell pathology. *Am J Pathol* 1997 November;151(5):1397-405.
- (45) Wurzinger LJ. Histophysiology of the circulating platelet. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1990;120:1-96.
- (46) Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009 July;23(4):177-89.
- (47) Holt JC, Niewiarowski S. Biochemistry of alpha granule proteins. *Semin Hematol* 1985 April;22(2):151-63.
- (48) White JG. Platelet secretion during clot retraction. *Platelets* 2000 September;11(6):331-43.

- (49) Goetzl EJ, Woods JM, Gorman RR. Stimulation of human eosinophil and neutrophil polymorphonuclear leukocyte chemotaxis and random migration by 12-L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid. *J Clin Invest* 1977 January;59(1):179-83.
- (50) Troxler M, Dickinson K, Homer-Vanniasinkam S. Platelet function and antiplatelet therapy. *Br J Surg* 2007 June;94(6):674-82.
- (51) Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot (Tokyo)* 1976 December;29(12):1346-8.
- (52) Endo A, Kuroda M, Tanzawa K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett* 1976 December 31;72(2):323-6.
- (53) Brown MS, Faust JR, Goldstein JL, Kaneko I, Endo A. Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase. *J Biol Chem* 1978 February 25;253(4):1121-8.
- (54) Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Albers-Schonberg G, Hensens O, Hirshfield J, Hoogsteen K, Liesch J, Springer J. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980 July;77(7):3957-61.
- (55) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994 November 19;344(8934):1383-9.
- (56) Hebert PR, Gaziano JM, Chan KS, Hennekens CH. Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality. An overview of randomized trials. *JAMA* 1997 July 23;278(4):313-21.
- (57) Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000 January 18;101(2):207-13.
- (58) Vaughan CJ, Gotto AM, Jr., Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2000 January;35(1):1-10.
- (59) Pedersen TR. Statin trials and goals of cholesterol-lowering therapy after AMI. *Am Heart J* 1999 August;138(2 Pt 2):S177-S182.
- (60) MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002 July 6;360(9326):7-22.
- (61) Robinson JG. Simvastatin: present and future perspectives. *Expert Opin Pharmacother* 2007 September;8(13):2159-27.

- (62) Scott RS, Lintott CJ, Wilson MJ. Simvastatin and side effects. *N Z Med J* 1991 November 27;104(924):493-5.
- (63) Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. *JAMA* 2003 April 2;289(13):1681-90.
- (64) Silva MA, Swanson AC, Gandhi PJ, Tataronis GR. Statin-related adverse events: a meta-analysis. *Clin Ther* 2006 January;28(1):26-35.
- (65) Russo MW, Scobey M, Bonkovsky HL. Drug-induced liver injury associated with statins. *Semin Liver Dis* 2009 November;29(4):412-22.
- (66) Marie I, Delafenetre H, Massy N, Thuillez C, Noblet C. Tendinous disorders attributed to statins: a study on ninety-six spontaneous reports in the period 1990-2005 and review of the literature. *Arthritis Rheum* 2008 March 15;59(3):367-72.
- (67) Goli AK, Goli SA, Byrd RP, Jr., Roy TM. Simvastatin-induced lactic acidosis: a rare adverse reaction? *Clin Pharmacol Ther* 2002 October;72(4):461-4.
- (68) Rea WE, Durrant DC, Boldy DA. Ulcerative colitis after statin treatment. *Postgrad Med J* 2002 May;78(919):286-7.
- (69) Singh S, Loke YK. Statins and pancreatitis: a systematic review of observational studies and spontaneous case reports. *Drug Saf* 2006;29(12):1123-32.
- (70) Kobashigawa JA, Katznelson S, Laks H, Johnson JA, Yeatman L, Wang XM, Chia D, Terasaki PI, Sabad A, Cogert GA, . Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 1995 September 7;333(10):621-7.
- (71) Katznelson S, Wilkinson AH, Kobashigawa JA, Wang XM, Chia D, Ozawa M, Zhong HP, Hirata M, Cohen AH, Teraski PI, . The effect of pravastatin on acute rejection after kidney transplantation--a pilot study. *Transplantation* 1996 May 27;61(10):1469-74.
- (72) Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 2000 December;6(12):1399-402.
- (73) Romano M, Diomede L, Sironi M, Massimiliano L, Sottocorno M, Polentarutti N, Guglielmotti A, Albani D, Bruno A, Fruscella P, Salmona M, Vecchi A, Pinza M, Mantovani A. Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. *Lab Invest* 2000 July;80(7):1095-100.
- (74) Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, Cottens S, Takada Y, Hommel U. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med* 2001 June;7(6):687-92.
- (75) Lazzerini PE, Lorenzini S, Selvi E, Capecchi PL, Chindamo D, Bisogno S, Ghittoni R, Natale MR, Caporali F, Giuntini S, Marcolongo R, Galeazzi M, Laghi-Pasini F. Simvastatin inhibits cytokine production and nuclear factor-

kB activation in interleukin 1beta-stimulated synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 2007 September;25(5):696-700.

- (76) Yokota K, Miyazaki T, Hirano M, Akiyama Y, Mimura T. Simvastatin inhibits production of interleukin 6 (IL-6) and IL-8 and cell proliferation induced by tumor necrosis factor-alpha in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006 March;33(3):463-71.
- (77) Yokota K, Miyoshi F, Miyazaki T, Sato K, Yoshida Y, Asanuma Y, Akiyama Y, Mimura T. High concentration simvastatin induces apoptosis in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2008 February;35(2):193-200.
- (78) Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA* 2001 July 4;286(1):64-70.
- (79) Wenke K, Meiser B, Thiery J, Nagel D, von SW, Krobot K, Steinbeck G, Seidel D, Reichart B. Simvastatin initiated early after heart transplantation: 8-year prospective experience. *Circulation* 2003 January 7;107(1):93-7.
- (80) Leung BP, Sattar N, Crilly A, Prach M, McCarey DW, Payne H, Madhok R, Campbell C, Gracie JA, Liew FY, McInnes IB. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. *J Immunol* 2003 February 1;170(3):1524-30.
- (81) Abud-Mendoza C, de la Fuente H, Cuevas-Orta E, Baranda L, Cruz-Rizo J, Gonzalez-Amaro R. Therapy with statins in patients with refractory rheumatic diseases: a preliminary study. *Lupus* 2003;12(8):607-11.
- (82) McCarey DW, McInnes IB, Madhok R, Hampson R, Scherbakov O, Ford I, Capell HA, Sattar N. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004 June 19;363(9426):2015-21.
- (83) Tikiz C, Utuk O, Pirildar T, Bayturan O, Bayindir P, Taneli F, Tikiz H, Tuzun C. Effects of Angiotensin-converting enzyme inhibition and statin treatment on inflammatory markers and endothelial functions in patients with longterm rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005 November;32(11):2095-101.
- (84) Shirinsky IV, Zheltova OI, Solovyova NY, Kozlov VA, Shirinsky VS. Changes in disease activity, cytokine production, and proliferation of peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis after simvastatin treatment. *Scand J Rheumatol* 2009 January;38(1):23-7.
- (85) Hermann F, Forster A, Chenevard R, Enseleit F, Hurlimann D, Corti R, Spieker LE, Frey D, Hermann M, Riesen W, Neidhart M, Michel BA, Hellermann JP, Gay RE, Luscher TF, Gay S, Noll G, Ruschitzka F. Simvastatin improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *J Am Coll Cardiol* 2005 February 1;45(3):461-4.

- (86) Kanda H, Yokota K, Kohno C, Sawada T, Sato K, Yamaguchi M, Komagata Y, Shimada K, Yamamoto K, Mimura T. Effects of low-dosage simvastatin on rheumatoid arthritis through reduction of Th1/Th2 and CD4/CD8 ratios. *Mod Rheumatol* 2007;17(5):364-8.
- (87) Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Huang J, Caldwell RW. Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. *J Am Coll Cardiol* 1999 January;33(1):234-41.
- (88) Laufs U, La F, V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998 March 31;97(12):1129-35.
- (89) Laufs U. Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol* 2003 March;58(11):719-31.
- (90) Undas A, Celinska-Lowenhoff M, Domagala TB, Iwaniec T, Dropinski J, Lowenhoff T, Szczeklik A. Early antithrombotic and anti-inflammatory effects of simvastatin versus fenofibrate in patients with hypercholesterolemia. *Thromb Haemost* 2005 July;94(1):193-9.
- (91) Puccetti L, Pasqui AL, Pastorelli M, Bova G, Cercignani M, Palazzuoli A, Angori P, Auteri A, Bruni F. Time-dependent effect of statins on platelet function in hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 2002 December;32(12):901-8.
- (92) Musial J, Undas A, Undas R, Brozek J, Szczeklik A. Treatment with simvastatin and low-dose aspirin depresses thrombin generation in patients with coronary heart disease and borderline-high cholesterol levels. *Thromb Haemost* 2001 February;85(2):221-5.
- (93) Szczeklik A, Musial J, Undas A, Gajewski P, Gora P, Swadzba J, Jankowski M. Inhibition of thrombin generation by simvastatin and lack of additive effects of aspirin in patients with marked hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 1999 April;33(5):1286-93.
- (94) Wiesbauer F, Kaun C, Zorn G, Maurer G, Huber K, Wojta J. HMG CoA reductase inhibitors affect the fibrinolytic system of human vascular cells in vitro: a comparative study using different statins. *Br J Pharmacol* 2002 January;135(1):284-92.
- (95) Essig M, Nguyen G, Prie D, Escoubet B, Sraer JD, Friedlander G. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. Role of geranylgeranylation and Rho proteins. *Circ Res* 1998 October 5;83(7):683-90.
- (96) Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 November 1;23(11):2083-9.
- (97) Lazzarini PE, Capecchi PL, Nerucci F, Fioravanti A, Chellini F, Piccini M, Bisogno S, Marcolongo R, Laghi PF. Simvastatin reduces MMP-3 level in

- interleukin 1beta stimulated human chondrocyte culture. *Ann Rheum Dis* 2004 July;63(7):867-9.
- (98) Funk JL, Chen J, Downey KJ, Clark RA. Bone protective effect of simvastatin in experimental arthritis. *J Rheumatol* 2008 June;35(6):1083-91.
- (99) Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR. Studies on antigen-induced arthritis in mice. III. Cell and serum transfer experiments. *J Immunol* 1977 May;118(5):1645-8.
- (100) Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR, Miller JF. Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *J Immunol* 1977 May;118(5):1639-44.
- (101) Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 1977 April;20(3):841-50.
- (102) Vickers S, Duncan CA, Chen IW, Rosegay A, Duggan DE. Metabolic disposition studies on simvastatin, a cholesterol-lowering prodrug. *Drug Metab Dispos* 1990 March;18(2):138-45.
- (103) Veihelmann A, Szczesny G, Nolte D, Krombach F, Refior HJ, Messmer K. A novel model for the study of synovial microcirculation in the mouse knee joint in vivo. *Res Exp Med (Berl)* 1998 July;198(1):43-54.
- (104) Veihelmann A, Harris AG, Krombach F, Schutze E, Refior HJ, Messmer K. In vivo assessment of synovial microcirculation and leukocyte-endothelial cell interaction in mouse antigen-induced arthritis. *Microcirculation* 1999 December;6(4):281-90.
- (105) Harris AG, Hecht R, Peer F, Nolte D, Messmer K. An improved intravital microscopy system. *Int J Microcirc Clin Exp* 1997 November;17(6):322-7.
- (106) Zeintl H, Sack FU, Intaglietta M, Messmer K. Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 1989 July;8(3):293-302.
- (107) Manegold PC, Hutter J, Pahernik SA, Messmer K, Dellian M. Platelet-endothelial interaction in tumor angiogenesis and microcirculation. *Blood* 2003 March 1;101(5):1970-6.
- (108) Tangelder GJ, Slaaf DW, Arts T, Reneman RS. Wall shear rate in arterioles in vivo: least estimates from platelet velocity profiles. *Am J Physiol* 1988 June;254(6 Pt 2):H1059-H1064.
- (109) Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 1995 March;15(2):85-91.
- (110) Kuebler WM, Kuhnle GE, Groh J, Goetz AE. Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J Appl Physiol* 1994 January;76(1):65-71.

- (111) Gear AR. Rhodamine 6G. A potent inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 1974 June 10;249(11):3628-37.
- (112) Bonney CH, Schmidt RE, Hunter DM, Conley GE. Fluorescein angiography and light microscopy studies of retinas irradiated by oxygen nuclei. *Aviat Space Environ Med* 1977 May;48(5):418-23.
- (113) Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp* 1995 September;15(5):244-9.
- (114) Brahn E. Animal models of rheumatoid arthritis. Clues to etiology and treatment. *Clin Orthop Relat Res* 1991 April;(265):42-53.
- (115) PEARSON CM. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956 January;91(1):95-101.
- (116) Holmdahl R, Goldschmidt TJ, Kleinau S, Kvick C, Jonsson R. Arthritis induced in rats with adjuvant oil is a genetically restricted, alpha beta T-cell dependent autoimmune disease. *Immunology* 1992 June;76(2):197-202.
- (117) Holoshitz J, Matitiau A, Cohen IR. Arthritis induced in rats by cloned T lymphocytes responsive to mycobacteria but not to collagen type II. *J Clin Invest* 1984 January;73(1):211-5.
- (118) van Eden W, Holoshitz J, Nevo Z, Frenkel A, Klajman A, Cohen IR. Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to Mycobacterium tuberculosis and to cartilage proteoglycans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 August;82(15):5117-20.
- (119) Cromartie WJ, Craddock JG, Schwab JH, Anderle SK, Yang CH. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J Exp Med* 1977 December 1;146(6):1585-602.
- (120) Koga T, Kakimoto K, Hirofuji T, Kotani S, Ohkuni H, Watanabe K, Okada N, Okada H, Sumiyoshi A, 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 October;50(1):27-34.
- (121) Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977 September 1;146(3):857-68.
- (122) Trentham DE, Townes AS, Kang AH, David JR. Humoral and cellular sensitivity to collagen in type II collagen-induced arthritis in rats. *J Clin Invest* 1978 January;61(1):89-96.
- (123) Wooley PH, Luthra HS, Stuart JM, David CS. Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. *J Exp Med* 1981 September 1;154(3):688-700.

- (124) Taurog JD, Kerwar SS, McReynolds RA, Sandberg GP, Leary SL, Mahowald ML. Synergy between adjuvant arthritis and collagen-induced arthritis in rats. *J Exp Med* 1985 September 1;162(3):962-78.
- (125) Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991 December;10(13):4025-31.
- (126) DUMONDE DC, GLYNN LE. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol* 1962 August;43:373-83.
- (127) Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Miller JA. [Antigen-induced arthritis in mice: genetic and immunologic studies]. *Verh Dtsch Ges Rheumatol* 1978;5:154-9.
- (128) Kataoka H, Kim SW, Plesnila N. Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004 June;24(6):668-76.
- (129) Villringer A, Haberl RL, Dirnagl U, Anneser F, Verst M, Einhaupl KM. Confocal laser microscopy to study microcirculation on the rat brain surface in vivo. *Brain Res* 1989 December 11;504(1):159-60.
- (130) Khandoga A, Stampfl A, Takenaka S, Schulz H, Radykewicz R, Kreyling W, Krombach F. Ultrafine particles exert prothrombotic but not inflammatory effects on the hepatic microcirculation in healthy mice in vivo. *Circulation* 2004 March 16;109(10):1320-5.
- (131) Tsuchiya M, Oda M. Recent advances in organ microcirculation research. *Int Angiol* 1987 July;6(3):253-70.
- (132) Eichhorn ME, Ney L, Massberg S, Goetz AE. Platelet kinetics in the pulmonary microcirculation in vivo assessed by intravital microscopy. *J Vasc Res* 2002 July;39(4):330-9.
- (133) Kupatt C, Wichels R, Horstkotte J, Krombach F, Habazettl H, Boekstegers P. Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion. *J Leukoc Biol* 2002 September;72(3):455-61.
- (134) Tillmanns H, Neumann FJ, Tiefenbacher C, Dorigo O, Parekh N, Waas W, Zimmermann R, Steinhausen M, Kuebler W. Activation of neutrophils in the microvasculature of the ischaemic and reperfused myocardium. *Eur Heart J* 1993 November;14 Suppl I:82-6.
- (135) Endrich B, Asaishi K, Gotz A, Messmer K. Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)* 1980;177(2):125-34.
- (136) Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl)* 1998 July;198(1):23-35.

- (137) Eichhorn ME, Strieth S, Krasnici S, Sauer B, Teifel M, Michaelis U, Naujoks K, Dellian M. Protamine enhances uptake of cationic liposomes in angiogenic microvessels. *Angiogenesis* 2004;7(2):133-41.
- (138) Schmitt-Sody M, Landes J, Zysk SP, Pellengahr C, Krombach F, Refior HJ, Messmer K, Veihelmann A. Quantitative assessment of angiogenesis in murine antigen-induced arthritis by intravital fluorescence microscopy. *J Vasc Res* 2003 September;40(5):460-6.
- (139) Veihelmann A, Hofbauer A, Refior HJ, Messmer K. Oxaceprol, an atypical inhibitor of inflammation, reduces leukocyte adherence in mouse antigen-induced arthritis. *Acta Orthop Scand* 2001 June;72(3):293-8.
- (140) Veihelmann A, Landes J, Hofbauer A, Dorger M, Refior HJ, Messmer K, Krombach F. Exacerbation of antigen-induced arthritis in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. *Arthritis Rheum* 2001 June;44(6):1420-7.
- (141) Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 2000 July;385(4):290-8.
- (142) Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 1985 September;101(3):880-6.
- (143) Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Teupser D, Axmann S, Luchting B, Hutter J, Messmer K, Krombach F. P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo. *Shock* 2002 December;18(6):529-35.
- (144) Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998 July 15;92(2):507-15.
- (145) Massberg S, Schulz C, Gawaz M. Role of platelets in the pathophysiology of acute coronary syndrome. *Semin Vasc Med* 2003 May;3(2):147-62.
- (146) Palmer G, Chobaz V, Talabot-Ayer D, Taylor S, So A, Gabay C, Busso N. Assessment of the efficacy of different statins in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2004 December;50(12):4051-9.
- (147) Endo A, Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K. Effects of ML-236B on cholesterol metabolism in mice and rats: lack of hypocholesterolemic activity in normal animals. *Biochim Biophys Acta* 1979 November 21;575(2):266-76.
- (148) Kita T, Brown MS, Goldstein JL. Feedback regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in livers of mice treated with mevlinol, a competitive inhibitor of the reductase. *J Clin Invest* 1980 November;66(5):1094-100.

- (149) Turesson C, Jacobsson LT, Matteson EL. Cardiovascular co-morbidity in rheumatic diseases. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4(3):605-14.
- (150) Menge T, von Budingen HC, Zamvil SS, Hartung HP, Kieseier BC, Stuve O. [Statins for treatment of CNS diseases. Status report from research and clinical practice]. *Nervenarzt* 2005 April;76(4):426-37.
- (151) Vollmer T, Key L, Durkalski V, Tyor W, Corboy J, Markovic-Plese S, Preiningerova J, Rizzo M, Singh I. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 2004 May 15;363(9421):1607-8.
- (152) Youssef S, Stuve O, Patarroyo JC, Ruiz PJ, Radosevich JL, Hur EM, Bravo M, Mitchell DJ, Sobel RA, Steinman L, Zamvil SS. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 2002 November 7;420(6911):78-84.
- (153) Kotyla PJ, Sliwinska-Kotyla B, Kucharz EJ. Tumor necrosis factor-alpha as a potential target in the treatment of systemic lupus erythematosus: a role for the HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin. *J Rheumatol* 2006 November;33(11):2361-3.
- (154) Kuipers HF, van den Elsen PJ. Immunomodulation by statins: inhibition of cholesterol vs. isoprenoid biosynthesis. *Biomed Pharmacother* 2007 August;61(7):400-7.
- (155) Musial J, Undas A, Gajewski P, Jankowski M, Sydor W, Szczeklik A. Anti-inflammatory effects of simvastatin in subjects with hypercholesterolemia. *Int J Cardiol* 2001 February;77(2-3):247-53.
- (156) Chou TC, Lin YF, Wu WC, Chu KM. Enhanced nitric oxide and cyclic GMP formation plays a role in the anti-platelet activity of simvastatin. *Br J Pharmacol* 2008 March;153(6):1281-7.
- (157) Obi C, Wysokinski W, Karnicki K, Owen WG, McBane RD. Inhibition of platelet-rich arterial thrombus in vivo: acute antithrombotic effect of intravenous HMG-CoA reductase therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 September;29(9):1271-6.
- (158) Kawakami A, Tanaka A, Nakajima K, Shimokado K, Yoshida M. Atorvastatin attenuates remnant lipoprotein-induced monocyte adhesion to vascular endothelium under flow conditions. *Circ Res* 2002 August 9;91(3):263-71.
- (159) Rezaie-Majd A, Prager GW, Bucek RA, Schernthaner GH, Maca T, Kress HG, Valent P, Binder BR, Minar E, Baghestanian M. Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 March 1;23(3):397-403.
- (160) Teupser D, Bruegel M, Stein O, Stein Y, Thiery J. HMG-CoA reductase inhibitors reduce adhesion of human monocytes to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 December 14;289(4):838-44.

- (161) Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 1997 November 1;30(5):1212-7.
- (162) Zapolska-Downar D, Siennicka A, Kaczmarczyk M, Kolodziej B, Naruszewicz M. Simvastatin modulates TNF $\alpha$ -induced adhesion molecules expression in human endothelial cells. *Life Sci* 2004 July 30;75(11):1287-302.
- (163) Bellosta S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 November;18(11):1671-8.
- (164) Seidel MF, Keck R, Vetter H. ICAM-1/LFA-1 expression in acute osteodestructive joint lesions in collagen-induced arthritis in rats. *J Histochem Cytochem* 1997 September;45(9):1247-53.
- (165) Huo Y, Xia L. P-selectin glycoprotein ligand-1 plays a crucial role in the selective recruitment of leukocytes into the atherosclerotic arterial wall. *Trends Cardiovasc Med* 2009 May;19(4):140-5.
- (166) Szekanecz Z, Besenyei T, Paragh G, Koch AE. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 2009 November;42(7):563-73.
- (167) Araujo FA, Rocha MA, Mendes JB, Andrade SP. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1. *Biomed Pharmacother* 2010 January;64(1):29-34.
- (168) Khaidakov M, Wang W, Khan JA, Kang BY, Hermonat PL, Mehta JL. Statins and angiogenesis: is it about connections? *Biochem Biophys Res Commun* 2009 September 25;387(3):543-7.
- (169) Eccles KA, Sowden H, Porter KE, Parkin SM, Homer-Vanniasinkam S, Graham AM. Simvastatin alters human endothelial cell adhesion molecule expression and inhibits leukocyte adhesion under flow. *Atherosclerosis* 2008 September;200(1):69-79.
- (170) Oka H, Ikeda S, Koga S, Miyahara Y, Kohno S. Atorvastatin induces associated reductions in platelet P-selectin, oxidized low-density lipoprotein, and interleukin-6 in patients with coronary artery diseases. *Heart Vessels* 2008 July;23(4):249-56.
- (171) Kubes P, Kerfoot SM. Leukocyte recruitment in the microcirculation: the rolling paradigm revisited. *News Physiol Sci* 2001 April;16:76-80.
- (172) Vergnolle N, Derian CK, D'Andrea MR, Steinhoff M, Andrade-Gordon P. Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. *J Immunol* 2002 August 1;169(3):1467-73.
- (173) Chung HK, Lee IK, Kang H, Suh JM, Kim H, Park KC, Kim DW, Kim YK, Ro HK, Shong M. Statin inhibits interferon-gamma-induced expression of

- intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Exp Mol Med* 2002 December 31;34(6):451-61.
- (174) Takeuchi S, Kawashima S, Rikitake Y, Ueyama T, Inoue N, Hirata K, Yokoyama M. Cerivastatin suppresses lipopolysaccharide-induced ICAM-1 expression through inhibition of Rho GTPase in BAEC. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 March 5;269(1):97-102.
- (175) Schmitt-Sody M, Gottschalk O, Metz P, Zysk S, Hausdorf J, von Schulze PC, Veihelmann A, Jansson V. Endothelial iNOS versus platelet iNOS: responsibility for the platelet/leukocyte endothelial cell interaction in murine antigen induced arthritis in vivo. *Inflamm Res* 2007 June;56(6):262-8.
- (176) Myers CL, Wertheimer SJ, Schembri-King J, Parks T, Wallace RW. Induction of ICAM-1 by TNF-alpha, IL-1 beta, and LPS in human endothelial cells after downregulation of PKC. *Am J Physiol* 1992 October;263(4 Pt 1):C767-C772.
- (177) Chello M, Spadaccio C, Anselmi A, Patti G, Lusini M, Di SG, Covino E. Simvastatin reduces CD40 expression in an experimental model of early arterialization of saphenous vein graft. *J Surg Res* 2006 December;136(2):302-8.
- (178) Wagner AH, Gebauer M, Guldenzoph B, Hecker M. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent inhibition of CD40 expression by atorvastatin in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 November 1;22(11):1784-9.
- (179) Pignatelli P, Sanguigni V, Lenti L, Loffredo L, Carnevale R, Sorge R, Violi F. Oxidative stress-mediated platelet CD40 ligand upregulation in patients with hypercholesterolemia: effect of atorvastatin. *J Thromb Haemost* 2007 June;5(6):1170-8.
- (180) Turk U, Alioglu E, Tengiz I, Ercan E, Mahmudov R, Duygu H, Turkoglu C. Statin use is associated with decreased CD-40 ligand expression on T lymphocytes of coronary atheroma plaque in patients with stable coronary artery disease. *Anadolu Kardiyol Derg* 2008 April;8(2):99-103.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

AA	Adjuvans Arthritis
ACR	American College of Rheumatology
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CFA	Complete Freund´s Adjuvant
CFDA	Carboxyfluoreszein-Diacetatester
CIA	Collagen-induced arthritis
CAIA	Collagen-antibody-induced arthritis
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
DAS	disease activity score
D-PBS	dulbecco phosphate-buffered saline
DMARD	Disease Modifying Antirheumatic Drugs
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EULAR	European League against Rheumatism
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCD	funktionelle Kapillardichte
FITC	Fluorescein isothiocyanate–dextran
FLS	fibroblast-like synoviocytes
g	Gramm
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IVM	Intravitalmikroskopie
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LFA	leucocyte function antigen
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
mBSA	methyliertes bovines Serum-Albumin
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Wassersäule

µm	Mikrometer
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaCl	0,9% Natriumchlorid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PDGF	platelet derived growth factor
PGE	Prostaglandin E
RA	Rheumatoide Arthritis
RBC	Erythrozytenfließgeschwindigkeit
ROI	Region of Interest
s	Sekunde
SCW	Streptokokken-Zellwand-Arthritis
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
<sup>TM</sup>	Geschütztes Warenzeichen
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VEGF	Vascular Endothel Growth Factor
vWF	von-Willebrand-Faktor
WBZ	Walter-Brendel-Zentrum

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadien der Entwicklung der Arthritis.....	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines synovialen Gelenks nach Feldmann et al. <sup>13</sup> , links normal und rechts bei einer RA.....	5
Abbildung 3: Strukturformel von Simvastatin.....	12
Abbildung 4: Versuchsablauf .....	21
Abbildung 5: Präparation des Kniegelenks.....	23
Abbildung 6: Vorgehen bei der Präparation .....	24
Abbildung 7: Versuchsprotokoll.....	25
Abbildung 8: Technischer Aufbau zur Intravitalmikroskopie .....	26
Abbildung 9: Strukturformel des Fluoreszenzmarkers Carboxyfluorescein-Diacetatester (CFDA-SE).....	28
Abbildung 10: Strukturformel des Fluoreszenzmarkers Rhodamin 6G .....	29
Abbildung 11: Strukturformel des Moleküls Fluorescein, die Grundlage des Farbstoffes FITC-Dextran.....	30
Abbildung 12: Körpergewicht.....	38
Abbildung 13: Kniegelenksdurchmesser .....	39
Abbildung 14: Funktionelle Gefäßdichte der verschiedenen Versuchsgruppen. ....	42
Abbildung 15: Kapillardichte eines nicht-arthritischen Kontrolltieres .....	43
Abbildung 16: Kapillardichte eines arthritischen Versuchstieres .....	43
Abbildung 17: Kapillardichte eines Statin-behandelten AiA-Tieres.....	44
Abbildung 18: IVM Aufnahmen der CFDA-gefärbten Thrombozyten in vivo eines nicht-arthritischen Kontrolltieres. ....	45
Abbildung 19: IVM Aufnahmen der CFDA-gefärbten Thrombozyten in vivo eines arthritischen Kontrolltieres.....	46
Abbildung 20: IVM Aufnahmen der CFDA-gefärbten Thrombozyten in vivo eines mit Statin behandelten AiA-Tieres. ....	46
Abbildung 21: Fraktion rollender Thrombozyten .....	47
Abbildung 22: Anzahl der adhärenen Thrombozyten/mm <sup>2</sup> Gefäßendothel .....	48
Abbildung 23: IVM Aufnahmen der mit Rhodamin 6G gefärbten Leukozyten in vivo eines nicht-arthritischen Kontrolltieres.....	49
Abbildung 24: IVM Aufnahmen der mit Rhodamin 6G gefärbten Leukozyten in vivo eines arthritischen Kontrolltieres.....	50
Abbildung 25: IVM Aufnahmen der mit Rhodamin 6G gefärbten Leukozyten in vivo eines mit Statin-behandelten AiA-Tieres. ....	50
Abbildung 26: Fraktion rollender Leukozyten.....	51

Abbildung 27: Anzahl adhärenter Leukozyten/mm<sup>2</sup> ..... 52  
Abbildung 28: Histologische Schnitte von nichtarthritischen Kniegelenken..... 54  
Abbildung 29: Histologische Schnitte von arthritischen Kniegelenken..... 55

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beitrag der Thrombozyten zur Entzündungsreaktion und die dabei involvierten Mediatoren <sup>42</sup>..... 9  
Tabelle 2: Übersicht der Thrombozytengranula und ihrer Inhaltsstoffe <sup>50</sup> ..... 11  
Tabelle 3: Klinischer Score ..... 37  
Tabelle 4: Mikrohämodynamische Parameter bei der Intravitalmikroskopie. ....41  
Tabelle 5: Histologische Auswertung der einzelnen Versuchsgruppen nach dem histologischen Score nach Brackertz et al..... 53

## 11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Marcus Schmitt-Sody für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit, vor allem aber für seine überaus freundschaftliche Unterstützung und wissenschaftliche Förderung. Er war ein stets hilfsbereiter und kompetenter Ansprechpartner, der mein Interesse für die experimentelle Forschung und die Orthopädie hinausgehend wecken konnte.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Pohl für seine Unterstützung und die technischen und räumlichen Möglichkeiten des konzentrierten Arbeitens im Walter-Brendel-Zentrum.

Herrn Dr. med. Oliver Gottschalk möchte ich von Herzen für alle seine Bemühungen während der langjährigen Betreuung danken. Mit viel Engagement und Geduld arbeitete er mich in die anspruchsvolle mikrochirurgische Technik der Kniepräparation bei der Maus und in die Arbeit mit dem Intravitalmikroskop ein und unterstützte mich bei jedem Schritt dieser Arbeit. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Ich möchte zusätzlich allen Mitarbeitern des Walter-Brendel-Zentrums für experimentelle Forschung für die überaus angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre stetige Hilfsbereitschaft danken. Besonderer Dank gilt dabei Frau Sirii Lüdemann, die mir immer mit viel Motivation, Wissen und Sympathie beistand, Frau Alke Schropp für ihre hervorragende Unterstützung bei den histologischen Untersuchungen, und Herrn Dr. Jürgen Peters, der mir immer mit viel Geduld und Zeit bei allen technischen Fragen zur Seite stand.

Schließlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Walli und Frau Barbara Siegele aus der Abteilung für klinische Chemie im Klinikum Großhadern für ihre freundliche Unterstützung bedanken.

Danke an meine Eltern für ihre stets aufbauenden und ermunternden Worte, ihre fortwährende moralische Unterstützung und die Ermöglichung des Medizinstudium