

Aus der
Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München,
in Zusammenarbeit mit dem
Institut für Chirurgische Forschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München

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

**Der Einfluss der iNOS auf die Thrombozyten-
Endothelzellinteraktion 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 Oliver Gottschalk
aus Wuppertal

2007

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

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson
Mitberichterstatter:	Priv.Doz. Dr. med. P. Biberthaler Prof. Dr. med. L.J. Wurzinger
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. M. Schmitt-Sody
Dekan:	Herr Prof. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	20.12.2007

Mit bestem Dank meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	2
1.1 Rheumatoide Arthritis (RA).....	2
1.2 Pathogenese der RA.....	3
1.3 Therapie der RA.....	4
1.4 Bedeutung der Thrombozyten bei der RA.....	6
1.5 Bedeutung von Stickstoffmonoxid bei der RA.....	9
1.6 Stickstoffmonoxid und Thrombozyten.....	11
2. ZIEL DER STUDIE	13
3. MATERIAL UND METHODEN	14
3.1 Versuchstiere.....	14
3.2 Versuchsmodell.....	15
3.2.1 Antigen-induzierte Arthritis (AiA).....	15
3.2.2 Klinische Beurteilung.....	16
3.2.3 Kniegelenksdurchmesser.....	17
3.3 Praktische Durchführung der Versuche.....	17
3.3.1 Narkose.....	17
3.3.2 Mikrochirurgische Präparation.....	18
3.3.3 Histologische Untersuchung.....	20
3.3.4 Immunhistochemische Untersuchungen.....	21
3.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	22
3.4.1 Fluoreszenzmarkierung.....	23
3.4.1.1 Kardiale Punktion und Thrombozytenmarkierung.....	23
3.4.1.2 Leukozytenfärbung.....	25
3.4.1.3 Plasmafärbung.....	26
3.4.2 Mikrozirkulatorische Parameter.....	26
3.4.2.1 Erythrozytenfliessgeschwindigkeit.....	27
3.4.2.2 Venolendurchmesser.....	27
3.4.2.3 Funktionelle Kapillardichte.....	27
3.4.2.4 Thrombozyten- und Leukozyten-Endothel-Zell-Interaktion.....	27
3.5 Experimentelles Protokoll.....	28
3.5.1 Versuchsgruppen.....	28
3.5.2 Versuchsablauf.....	29
3.5.3 Versuchsprotokoll.....	30
4. STATISTISCHE AUSWERTUNG	31

5. ERGEBNISSE	32
5.1 Klinische Parameter	32
5.1.1 Gewicht	33
5.1.2 Kniegelenksdurchmesser	34
5.1.3 Durchflusszytometrie (FACS).....	35
5.1.4 Histologische Untersuchungen	35
5.1.5 Immunhistologische Untersuchungen	38
5.2 Makro- und Mikrohämodynamische Parameter	40
5.3 Thrombozyten-Endothelzellinteraktion	43
5.4 Leukozyten-Endothelzellinteraktion	46
6. DISKUSSION	51
6.1 Einleitung	51
6.2 Diskussion der Methoden	52
6.2.1 Die Antigen-induzierte Arthritis bei der Maus.....	52
6.2.2 Die Intravitalmikroskopie	54
6.2.3 Fluoreszenzmarkierung.....	55
6.2.4 Thrombozytenseparation	57
6.2.5 Einfluss der iNOS auf die Mikrozirkulation	57
7. ZUSAMMENFASSUNG	62
8. ABKÜRZUNGEN	65
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	68
10. LITERATURVERZEICHNIS	69
11. DANKSAGUNG	81
12. CURRICULUM VITAE	83

1. EINLEITUNG

1.1 Rheumatoide Arthritis (RA)

Die Rheumatoide Arthritis (RA) stellt eine Krankheit der Gesellschaft dar. Bei der RA handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Gelenke, die nach einer individuell unterschiedlich langen Erkrankungsdauer zur Destruktion der betroffenen Gelenke führen kann. Durch eine proliferierende Entzündung des Synovialgewebes und Pannusbildung kann es zur Knorpeldestruktion und Knochenerosion mit konsekutiven Gelenkdestruktionen kommen. Der klinische Verlauf kann individuell sehr unterschiedlich in Dauer und Ausmaß verlaufen.

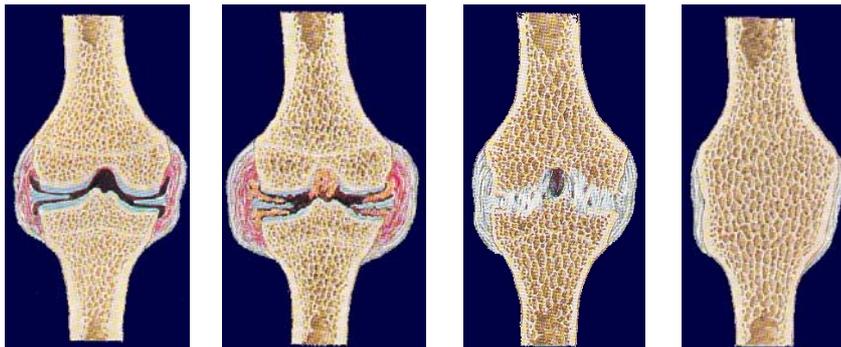


Abb-1: Stadien der Entwicklung der Arthritis. Von links nach rechts: entzündliche Veränderungen, Synovialhyperplasie, Knorpelverlust, Funktionsverlust. (<http://www.rheumanet.org>)

Meist beginnt die Erkrankung mit einem Bewegungsschmerz und einer Schwellung der Fingergrund- und Interphalangealgelenke. Die RA beginnt symmetrisch und setzt sich nach zentripetal fort. Zu unterscheiden sind die Patienten, bei denen sich die Erkrankung langsam über Wochen entwickelt, was den größeren Anteil ausmacht und den Patienten, bei denen es zu einer akuten Symptomatik kommt.

Die Prävalenz liegt bei ca. 1% in der erwachsenen Bevölkerung. Es erkranken 3-4 mal so viele Frauen wie Männer. Der Häufigkeitsgipfel liegt in etwa im 4. Lebensjahrzehnt. Man geht von einer Lebensverkürzung von ca. 15-20% nach Erkrankungsbeginn aus (<http://www.rheumanet.org/content/m2/k2/index.aspx>).

Um die RA besser erfassen zu können und auch solche Fälle mit einzuschließen, die oligosymptomatisch oder seronegativ in Bezug auf den Rheumafaktor verlaufen, hat das *American College of Rheumatology (ACR)* 1987 diagnostische Kriterien zu dessen Erfassung aufgestellt. Die Kriterien zeigen eine 91-94% Sensitivität und eine 89% Spezifität.

- Morgensteifigkeit der Gelenke von mindestens einer Stunde Dauer
- Arthritis von 3 oder mehr Gelenkbereichen: Weichteilschwellung oder Erguss gleichzeitig an mindestens 3 Gelenkbereichen
- Arthritis der Hand- oder Fingergelenke: Schmerzen und Schwellung von Handwurzelgelenken, proximalen Interphalangealgelenken (PIP) oder Metakarpophalangealgelenken (MCP)
- Symmetrische Arthritis: Gleichzeitiger Befall desselben Gelenkbereichs beider Körperhälften
- Rheumaknoten: Subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen oder Extensorflächen oder im juxtaartikulären Bereich
- Nachweis von Rheumafaktoren im Serum
- Typische Röntgenveränderungen der Hände: Gelenknahe Osteoporose und/oder Erosionen.

Die Voraussetzungen für eine RA gelten als anerkannt, wenn ein Patient 4 von 7 Kriterien aufweist. Die Kriterien 1 – 4 müssen für mindestens 6 Wochen vorliegen.

1.2 Pathogenese der RA

Die Ätiologie der RA ist weiterhin weitestgehend ungeklärt. Man geht aber von einer multifaktoriellen Genese aus (1). Bei genetisch disponierten Personen, etwa 70% der Patienten mit RA haben das HLA-Antigen DR4, kommt es zur Ausbildung einer Autoimmunreaktion. Man geht davon aus, dass die Entzündungskaskade angestoßen wird, indem ein Antigen unbekannter Herkunft in Anwesenheit bestimmter Klasse II-MHC-Antigene spezifischen CD4-positiven T-Lymphozyten präsentiert wird, welche dadurch aktiviert werden. Nachfolgend werden weitere Zelltypen aktiviert, darunter Makrophagen, B-Lymphozyten, andere T-Zell-Subtypen

und synoviale Fibroblasten und Chondrozyten. Diese Entzündungskaskade geht einher mit vermehrter Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle und gesteigerter Produktion proinflammatorischer Zytokine, lytischer Enzyme und Stickstoffmonoxid (NO) und führt zu einer Störung der synovialen Mikrozirkulation mit nachfolgender Gelenkdestruktion (2). Im Zentrum der immunologischen Reaktion steht die Interaktion von Lymphozyten und Monozyten mit Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-1, IL-6, TNF- α , Immunglobulinen und Autoantikörpern gegen das Fc-Fragment des IgG, was dem Rheumafaktor entspricht. Der Pannus (Verdickung der Synovialis) überwuchert den Knorpel und es kommt zu einer meist unaufhaltsamen Zerstörung dessen. Die systemische Beteiligung innerer Organe, welche selten ist, tritt infolge einer Immunkomplexvaskulitis auf.

1.3 Therapie der RA

Die Therapie der RA ist besonders in den ersten zwei Jahren nach Diagnosestellung entscheidend für den weiteren Krankheitsverlauf. Um einer Destruktion der Gelenke entgegen wirken zu können, muss der Entzündungsprozess effektiv unterdrückt werden.

Man unterscheidet bei der Therapie einen Stufenplan, bestehend aus physikalischen, medikamentösen und zuletzt operativen Komponenten.

Physikalische Therapie (Thermo-, Kryo-, Bewegungs- und Massagetherapie) und Krankengymnastik sind indiziert, wobei eine intensive Schulung und Information des Patienten unerlässlich sind. Es ist wichtig, die Mobilisation der betroffenen Gelenke schnell wieder herzustellen, bevor es zu Schrumpfungen der Gelenkkapsel und zu Muskelatrophien kommen kann.

Die symptomatische Therapie erfolgt mit Nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR), die jedoch nur kurz wirksam sind. Zu dieser Gruppe von Medikamenten gehören unselektive COX-1/2- Inhibitoren, die die Cyclooxygenase hemmen und somit die Prostaglandinsynthese. Beispiele sind Acetylsalicylsäure (ASS), Ibuprofen,

Diclofenac oder Indometacin, wobei es in bis zu 25% der Fälle zu gastrointestinalen Nebenwirkungen kommen kann (3) .

Disease Modifying Antirheumatic Drugs (DMARD) oder auch langwirksame Antirheumatika (LWAR) stellen die Basistherapeutika, in der Therapie der RA, dar. Sie sind in bis zu 70% wirksam, ohne dass man den genauen Wirkmechanismus kennt. Ihr Wirkungseintritt erfolgt nach ca. 2-3 Monaten, bei einzelnen Medikamenten schon früher. Diese DMARD (Methotrexat, Azathioprin, Ciclosporin, Leflunomid, Chloroquin, Hydroxychloroquin, Auranofin, Natriumaurothiomalat, D-Penicillamin, Sulfasalazin) weisen teilweise gravierende Nebenwirkungen wie gastrointestinale Ulzera mit Blutungen, Ekzeme, Nieren- und Leberschäden auf (4), weshalb regelmäßige Laborkontrollen und klinische Untersuchungen obligat sind. Bei schweren Verläufen kann mit Alkylantien wie Cyclophosphamid oder Azathioprin therapiert werden, wobei Panzytopenien, hepatotoxische und kanzerogene Nebenwirkungen auftreten können. Bei der hochaktiven RA lassen sich auch Glukkokortikoide, temporär oder als „low-dose“- Steroidtherapie, einsetzen, die sowohl die Entzündungsreaktion unterdrücken, wie auch die Gelenkdestruktion verzögern. Klinische Anwendung hat in den letzten Jahren auch die Verwendung von löslichen TNF- α -Rezeptorantagonisten (Infliximab, Etanercept und Adalimumab) gefunden, wobei sehr hohe Kosten zu erwähnen sind und bis dato keine Langzeiterfahrungen vorliegen. So können TNF- α -Antagonisten, einen freien zentralen Mediator im Rahmen von Immunreaktionen abfangen und dessen proinflammatorische Aktivität unterdrücken. Ein weiteres Medikament der biologischen DMARDs ist der Interleukin-1 Rezeptorantagonist, Anakinra, der die synthetisch hergestellte Form des körpereigenen Interleukin-1 Rezeptorantagonisten (IL-1 Ra) darstellt und so den Platz des eigentlichen Interleukin-1 blockiert (5;6). Ein ebenfalls neuer Wirkstoff, der seit 2004 in den USA und seit 2006 in Deutschland für Patienten mit starker Rheumatoider Arthritis zugelassen ist, ist Rituximab. Rituximab ist ein zellbiologisch hergestellter chimärer monoklonaler Antikörper, wobei sich der variable Teil gegen das Oberflächenmolekül CD20 richtet und an reife B-Zellen bindet (7). Bis dato wurde dieser Wirkstoff primär in der Therapie maligner Lymphknotenerkrankungen eingesetzt. Doch auch hier kann es zu schwerwiegenden

Nebenwirkungen kommen, unter anderem zum „cytokine-release syndrome“ (8). In den letzten Jahren wird vor allen Dingen auch eine Blockade der NO-Synthese bei RA (9) als viel versprechend diskutiert, ebenso die Hemmung der Neoangiogenese mittels VEGF-Rezeptorblockern (10). Bis dato findet jedoch keiner dieser Ansätze eine klinische Anwendung.

1.4 Bedeutung der Thrombozyten bei der RA

In den letzten Jahren wurde primär die Funktion und die Rolle der Leukozyten im Rahmen der RA untersucht. Es ist bekannt, dass Leukozyten eine wichtige Position in der Pathogenese einnehmen, jedoch weiß man von der Rolle der Thrombozyten nur sehr wenig.

Thrombozyten weisen, obwohl sie keinen Zellkern besitzen und nur einen Durchmesser von ca. 3 µm haben, ähnliche Fähigkeiten auf, wie Leukozyten. Der Thrombozyt besitzt ein dynamisches Zytoskelett, das er bei einem sog. „shape change“, einer Bildung von Pseudopodien, nach Aktivierung, verändern kann. Durch diese Pseudopodien ist es dem Thrombozyt möglich, sich fortzubewegen und er vergrößert dadurch seine Oberfläche, um so mit dem Endothel und auch anderen zellulären Bestandteilen in Kontakt zu treten (11;12).

Thrombozyten exprimieren zahlreiche Glykoproteine, proinflammatorische Mediatoren, sowie Wachstumsfaktoren, die sie bei Aktivierung ausstoßen. Diese ermöglichen ihnen z.B. die Adhäsion an Endothelzellen (13-16).

Der Prozess der Degranulation erfolgt ATP-abhängig. Man unterscheidet drei verschiedene Formen von Granula bei den Thrombozyten: dichte Granula, die den Aggregationsvorgang fördern, Lysosomen, die hydrolytische Enzyme enthalten und die zahlenmäßig am größten vertretene Menge der Granula, die α-Granula. Diese sind für verschiedenste biologische Funktionen verantwortlich: Adhäsion, Aggregation, Chemotaxis, Proliferation, Inflammation, Koagulation (17).

Dichte Granula	α Granula	Lysosomen
ATP ADP Ca ₂₊ Serotonin Phosphat Guaninnukleotide	Ezyme α_1 -Antitrypsin - α_2 -Makroglobulin - α_2 -Antiplasmin - C1-Esterase-Inhibitor Adhäsive Proteine - Fibrinogen - Fibronectin - vWF - Thrombospondin - Vitronectin - GPIIb/IIIa Wachstumsfaktoren - PDGF - Transforming growth factor- β - Epidermal growth factor - Endothelial cell growth factor Zytokinähnliche Proteine - Interleukin-1 - CD40-Ligand - Plättchenfaktor-4 - β -Thromboglobulin Koagulationsfraktion - HMWK - Plasminogen - PAI-1 - Faktor V - Faktor XI - Fibrinogen - Protein S α -Arabinoside β -Galactosidase β -Glucuronidase N-Acetyl-glucosaminidase Elastase Kollagenase Kathepsin	α -Arabinoside β -Galactosidase β -Glucuronidase N-Acetyl-glucosaminidase Elastase Kollagenase Kathepsin

Tab-1: Inhaltstoffe der unterschiedlichen, thrombozytären Speichergranula

Aufgrund der Freisetzung proinflammatorischer und proliferativer Stoffe ist es den Thrombozyten möglich, an der Entstehung und Aufrechterhaltung der RA beizutragen.

Auch ist es wahrscheinlich, dass die Aktivierung und Interaktion der Thrombozyten mit den Endothelzellen zu einer gesteigerten Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten führt und dadurch der Endothelzellschaden im Rahmen einer Entzündung noch gesteigert wird (18;19), was auch schon, im Rahmen der Arbeitsgruppe am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität, an vorausgegangenen Studien gezeigt werden konnte (20).

Durch Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle, ist es den Thrombozyten 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).

In der Kontaktphase kommt es zu einer Interaktion des thrombozytären Rezeptors Glykoprotein (GP)Ib-V-IX mit kollagenimmobilisiertem vWF. Besonders in Gefäßbereichen mit hoher Scherkraft, wie z.B. im arteriellen Stromgebiet, ist eine hohe Affinität bei der Interaktion von vWF mit GPIb-V-IX wichtig, um die Adhäsion der Thrombozyten an die Gefäßwand zu ermöglichen (21-24). In der anschließenden Stabilisierungsphase kommt es über weitere membranständige Rezeptoren der Thrombozyten wie GPIIb/IIIa, Fibronectin- und Lamininrezeptoren zu einer Stabilisierung der Plättchenadhäsion. Insbesondere die Bindung des thrombozytären Kollagenrezeptors an Kollagen führt zur Aktivierung und der bereits oben beschriebenen Formveränderung der adhärenen Thrombozyten und somit zur Aggregation mit schon adhärenen Thrombozyten.

1.5 Bedeutung von Stickstoffmonoxid bei der RA

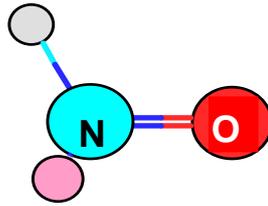


Abb-2: Strukturaufbau von Stickstoffmonoxid (NO)

Patienten mit RA weisen im Vergleich zu gesunden Patienten eine erhöhte Konzentration von Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-), den stabilen Metaboliten von Stickstoffmonoxid (NO), auf. Es konnten erhöhte Werte im Serum, im Urin und der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden (25-27). Diese korrelierten mit der Krankheitsaktivität (28) und konnten ebenfalls in tierexperimentellen Versuchen im Bereich der Rheumatoiden Arthritis bestätigt werden (29-31).

NO entsteht durch die Oxidation des endständigen Guanidin-Nitro-Atoms von L-Arginin durch das NADPH-abhängige Enzym Stickstoffmonoxidsynthase (NOS), von welchem mehrere unterschiedliche Isoformen existieren.

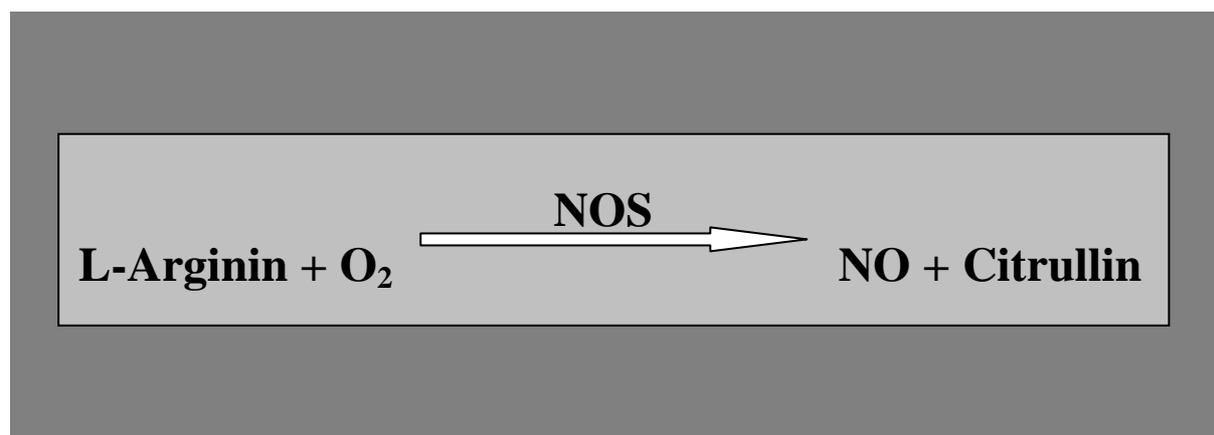


Abb-3: Synthese von Stickstoffmonoxid und Citrullin aus L-Arginin und Sauerstoff durch die NO-Synthase

Bis dato werden drei unterschiedliche NOS beschrieben, zwei konstitutiv exprimierte Formen (cNOS) (32;33) und eine induzierbare NOS (iNOS auch NOS II) (34;35). Bei den konstitutiven Formen wird die neuronale (ncNOS auch NOS I), die vor allem im Gehirn vorkommt und die endotheliale (ecNOS auch NOS III) Form, unterschieden. Der lange als Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) bekannte Vasoregulator wurde 1987 von Palmer und Moncada als NO identifiziert (33).

Die Enzymaktivität der einzelnen Formen ist von unterschiedlichen Regulationsmechanismen abhängig. Die Bildung der konstitutiven Formen ist Ca^{2+} -abhängig und wird unter physiologischen Bedingungen engmaschig kontrolliert, bei weitgehend konstanter Expression der mRNA sowie der Proteinmonomere.

Die iNOS ist Ca^{2+} -unabhängig und wird nach Stimulation durch Kontakt mit proinflammatorischen Zytokinen und bakteriellen Endotoxinen induziert (36;37). Es sind keine mRNA und Proteinmonomere im Zytosol der unstimulierten Zelle vorhanden. Nach Stimulation kommt es zur de novo Expression der mRNA, wobei Calmodulin irreversibel an das Enzym gebunden wird. Dadurch ist die iNOS in der Lage konstante Mengen an NO zu produzieren, die um etwa ein zehnfaches höher liegen, als die der konstitutiven NOS. Der limitierende Faktor, zur Bereitstellung des NO ist in diesem Fall die Verfügbarkeit von Substrat und Kofaktor (34;35;38).

Die iNOS kann in unterschiedlichen Zelltypen wie Makrophagen (39), neutrophilen Granulozyten (40), Endothelzellen (41), Chondrozyten (42) und synovialen Fibroblasten (43) synthetisiert werden.

Im Rahmen der Immunantwort wird der iNOS antimikrobielle und tumorizide Aktivität zugeschrieben (44), zusätzlich konnten zytotoxische Eigenschaften gegen eigene Zellen bei vermehrter Expression festgestellt werden (45;46). Wie in unserer Arbeitsgruppe festgestellt wurde, zeigten iNOS-defiziente Tiere in der akuten Phase der Antigen-induzierten Arthritis sogar eine Verschlechterung klinischer, histologischer und mikrozirkulatorischer Parameter im Vergleich zu homozygoten Wildtypen mit AiA (31). Durch all diese Studien konnte allerdings nicht geklärt werden, ob NO und im Speziellen die iNOS, nun einen protektiven oder schädigenden Charakter besitzt.

1.6 Stickstoffmonoxid und Thrombozyten

Das freigesetzte NO zeigt unterschiedliche Wirkungen im Körper, so dass das von der iNOS exprimierte NO hauptsächlich an der Abwehr von Bakterien, Parasiten, Viren und der Bekämpfung von Tumorzellen beteiligt ist (47;48).

Stickstoffmonoxid bewirkt durch Freisetzung aus dem Gefäßendothel eine kontinuierliche Vasodilation. Da NO sowohl luminal, wie auch abluminal freigesetzt werden kann, kommt es durch die abluminale Sekretion zur Gefäßdilataion der glatten Muskulatur (47). In einigen Untersuchungen zeigte sich, dass NO vor allem in großen Arteriolen der myogen gesteuerten Gefäßkontraktion entgegenwirkt (49-52). Von dieser kurzzeitigen Antwort durch NO, sind die längerfristigen antiproliferativen, antimigrativen und antherogenen Wirkungen zu unterscheiden. Albumin, z.B., tritt mit NO in Interaktion, wird nityrosyliert und dient somit als vermutlicher Stickstoffmonoxidspeicher, der sich frei im Plasma bewegt. Eine Freisetzung von NO kann durch Scherkräfte, Hypoxie und andere Substanzen erfolgen.

Ebenfalls wird von NO, das aus Endothelzellen stammt, zusammen mit Prostacyclin, die Adhäsion und Aggregation aktivierter Thrombozyten reguliert (41;42;53). Bei bereits durchgeführten in vitro Untersuchungen konnte eine Reduktion des shape change, sowie der Expression der Adhäsionsmoleküle, z.B. GPIIb/IIIa, P-Selektin, bei durch Agonisten stimulierten Thrombozyten dargestellt werden (54). Auch die Sekretionsreaktion der Thrombozyten wird durch Stickstoffmonoxid beeinflusst (55;56). Eine Reduktion des durch Agonisten-induzierten Anstieges der intrazellulären Calciumkonzentration durch NO wird dafür verantwortlich gemacht. Die Rekrutierung und Aktivierung von Thrombozyten kann nicht nur von Endothelzellen, sondern auch von Thrombozyten, durch deren eigene NO-Produktion, gesteuert werden (57;58). Hierfür sind sehr wahrscheinlich sowohl die ecNOS und die in Thrombozyten konstitutiv exprimierte iNOS verantwortlich. Die thrombozytären Varianten der NOS produzieren NO nicht erst nach Stimulation, sondern auch bereits unter physiologischen Bedingungen. Die dabei entstehenden Konzentrationen können sich zwischen 4.5 ± 0.6 pmol unter physiologischen

Bedingungen bewegen und sich bis auf 11.2 ± 1.3 pmol pro Minute pro 10^8 Zellen bzw. nach Aktivierung steigern (59).

Somit könnte der Einfluss von NO, bzw. der iNOS, protektiv auf die Thrombozyten-Endothelzellinteraktion sein und konsekutiv eine Reduktion des Ausmaßes der Inflammation und somit der Symptomatik der RA haben.

2. ZIEL DER STUDIE

Da die Zusammenhänge zwischen Stickstoffmonoxid und Thrombozyten im Rahmen der Rheumatoiden Arthritis bis dato noch nicht anhand eines in vivo Modells untersucht wurden, ist es Ziel dieser experimentellen Studie, die Rolle von NO in Bezug auf die Thrombozyten-Endothelzellinteraktion, anhand des Modells der Antigen-induzierten Arthritis der Maus in vivo zu untersuchen:

- Die Untersuchung der Mikrozirkulation und Thrombozyten-Endothelzellinteraktion im Synovialgewebe der Maus mit experimenteller Arthritis sowie Darstellung des klinischen und histologischen Verlaufs von Tieren mit AiA.
- Die Untersuchung der Bedeutung von NO für die Thrombozyten-Endothelzellinteraktion und die synoviale Mikrozirkulation sowie den klinischen und histologischen Verlauf durch die Verwendung von iNOS-defizienten Mäusen.
- Die Untersuchung der Unterscheidung der endothelialen iNOS gegenüber der thrombozytären iNOS in Bezug auf die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzellinteraktion.

Für diese Studie wird das von Veihelmann et al. entwickelte in vivo Modell für die mikroskopische Analyse der synovialen Mikrozirkulation verwendet (60). Als Arthritis-Modell dient das 1977 initial von Brackertz et al. beschriebene Modell der Antigen-induzierten Arthritis bei der Maus(61).

3. MATERIAL UND METHODEN

Vorbemerkung

Die im Folgenden vorgestellten Untersuchungen wurden im Zeitraum April 2003 bis April 2006, mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (AZ 78/04), am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt.

3.1 Versuchstiere

Für sämtliche Untersuchungen, die im Folgenden beschrieben werden, wurden weibliche C57/ BL6, sowie B6.129P2-*Nos2^{tm1Lau}/J* (iNOS defiziente) Tiere (Charles-River-Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere befanden sich in einem Alter zwischen 8 bis 10 Wochen und hatten ein Gewicht von 16 bis 22 Gramm. Während des Versuchszeitraumes waren je 5 Tiere in mit Sägespänen eingestreuten Polystyrenkäfigen untergebracht. Bei einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus betrug die Umgebungstemperatur 22°C, die relative Luftfeuchtigkeit 40%. Die Mäuse haben handelsübliches Trockenfutter für Nagetiere (ssniff®-Standarddiät für Ratten/Mäuse: 120 mg Vitamin E, 18 000 IU Vitamin A/kg; Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser ad libitum erhalten.

Nur Versuchstiere, die ein normales, unauffälliges Fress-, Putz- und Spielverhalten zeigten, wurden in die Versuche genommen.

3.2 Versuchsmodell

3.2.1 Antigen-induzierte Arthritis

Das für die Untersuchungen geeignete Modell der Antigen-induzierten Arthritis wurde erstmals von Dumonde und Glynn 1962 (62) am Kaninchen beschrieben und 1977 von Brackertz et al (61) für die Maus etabliert.

Vor der eigentlichen Arthritisinduktion werden die Tiere zweimal präimmunisiert. Dies erfolgt durch zwei subkutane Injektionen eines Protein-Antigen-Gemisches in die Flanke der Tiere; das erste Mal 21 und das zweite Mal 14 Tage vor der eigentlichen Induktion der Arthritis. Dabei wurden 100 µg methyliertes bovines Serumalbumin (mBSA, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gelöst in einer öligen Suspension (50 µg Complete Freund's Adjuvant (CFA), Sigma), die mit *Mycobacterium tuberculosis* (Stamm H37RA, Difco, Augsburg, Deutschland) gemischt wurden, appliziert. Zusätzlich erfolgte an den beiden Zeitpunkten je eine intraperitoneale Injektion von 2×10^9 hitzegetöteter *Bordetella pertussis* (Institut für Mikrobiologie, Berlin, Deutschland). Nach der Präimmunisierung erfolgte daraufhin an Tag 0 die eigentliche Arthritisinduktion durch eine intraartikuläre Injektion von 100 µg mBSA als Antigen gelöst in 50 µl NaCl ins linke Kniegelenk, bzw. eine äquivalente Injektion NaCl in das rechte Kniegelenk bei den Kontrolltieren.

Sämtliche Injektionen wurden in einer Äther-Kurzarkose durchgeführt. Für die intraartikuläre Injektion wurden Mikrokanülen, gauge 33, verwendet (Fine Science tolls GmbH, Heidelberg, Deutschland), mit denen das Gelenk nach Hautdesinfektion durch die Patellarsehne punktiert wurde. Entsprechend Literaturangaben (61) und nach Ergebnissen aus Vorversuchen (63) befinden sich die Tiere eine Woche nach Arthritisinduktion in der Akutphase. Nach 9 Wochen, in der chronischen Phase der Antigen-induzierten Arthritis, konnte keine signifikante Änderung festgestellt werden. Da über 90% der Tiere nach 6 Tagen eine beginnende Gelenkdestruktion im Sinne einer Arthritis aufweisen, wurde der Untersuchungszeitpunkt auf Tag 8 nach Arthritisinduktion festgesetzt.

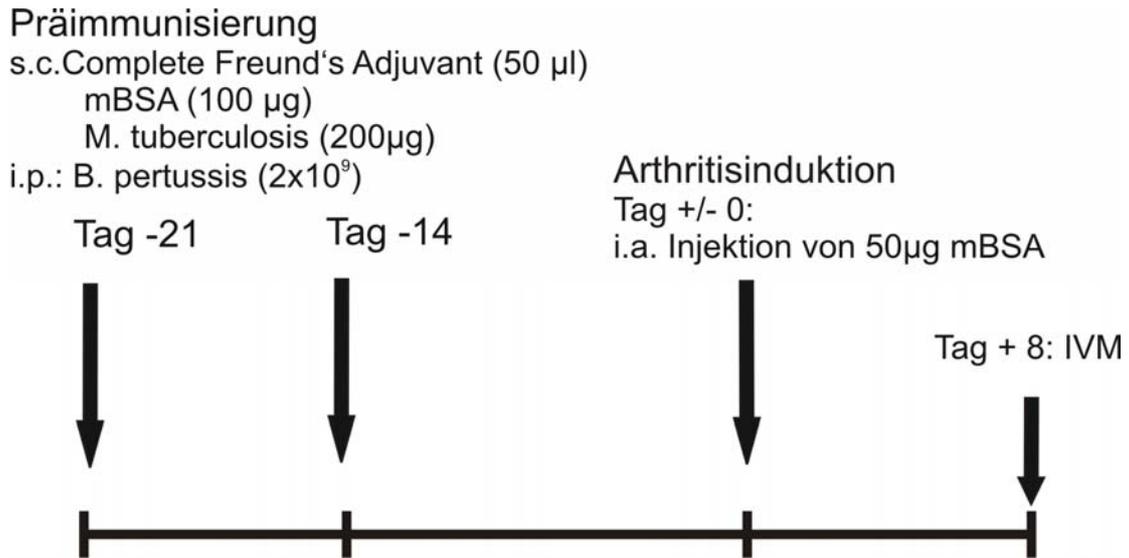


Abb-4: Präimmunisierung, Induktion und Meßzeitpunkte der Antigen-induzierten Arthritis (Brackertz et al., 1977). An Tag -21 und -14 erfolgt die Präimmunisierung mit subkutaner und intraperitonealer Injektion. An Tag 0 wird durch intraartikuläre Injektion von mBSA (methyliertes bovines Serumalbumin), in das linke Kniegelenk, die eigentliche Arthritis induziert. An Tag 8 wird dann die Intravitalmikroskopie durchgeführt.

3.2.2 Klinische Beurteilung

Damit die Antigen-induzierte Arthritis klinisch beurteilt werden kann, wurden ab dem ersten Tag der Präimmunisierung bis zum Versuchsende, am Tag der Intravitalmikroskopie, die Ausprägung anhand eines klinischen Scores beobachtet und eingestuft. Dafür 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 werden die Tiere aus dem Versuch genommen.

3.2.3 Kniegelenksdurchmesser

Der Kniegelenksdurchmesser wurde an Tag -21 und -14 der Präimmunisierung, sowie an Tag 0, der Arthritisinduktion, und von diesem Zeitpunkt an täglich bis zu Tag 8, der IVM, gemessen.

Zur Bestimmung der Kniegelenksschwellung wurde der sagittale Durchmesser mit einer Schiebelehre (Obi Baufachmarkt, München, Deutschland) in 0,1 mm Einheiten bestimmt.

3.3 Praktische Durchführung der Versuche

3.3.1 Narkose

Sämtliche Eingriffe an den Versuchstieren, von den präoperativen Injektionen, bis hin zur eigentlichen Operation mit Intravitalmikroskopie, wurden in Inhalationsnarkose durchgeführt. Die Narkose besteht aus einem Gemisch aus Sauerstoff (Fi O₂ 35%), Lachgas und Isofluran 1,2% (Forene, Abbott, Wiesbaden, Deutschland), welches über einen Vapor (Dräger, Lübeck, Deutschland) zugeführt wird.

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

3.3.2 Mikrochirurgische Präparation

Zunächst wurde das Versuchstier, nach Narkosebeginn, in Rückenlage auf einer Heizplatte (Effenberger, München, Deutschland) fixiert. Eine rektale Temperatursonde (Hugo Sachs, Elektronik, March, Deutschland) überwachte eine physiologische Körpertemperatur zwischen 36,5°C und 38,0°C.

Nun erfolgte die chirurgische Präparation der Schwanzarterie. Durch einen Hautschnitt, der am proximalen Drittel des Schwanzes der Maus angebracht wurde, konnte im Bereich der Gefäß-Nervenstrasse die Arterie freipräpariert und ein Verweilkatheter (Fa. Portex, Lynthe, Kent, England) zur arteriellen Blutdrucküberwachung (Druck-Transducer, Sirecust 300D, Siemens) gelegt werden. Ein zusätzlicher Katheter wurde in eine der beiden, sich lateral befindenden, Schwanzvenen gelegt. Beide Zugänge wurden mit zwei Fäden (5/0 Ethibond[®], Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) und durch Klebestreifen (BDF AG, Hamburg, Deutschland) an der Unterfläche fixiert. Durch diesen Katheter konnte eine kontinuierliche Volumensubstitution von 0,2 ml/Stunde zur Stabilisierung des Kreislaufs während der Narkose gewährleistet werden. Ebenfalls die Applikation der Fluoreszenzmarker wurde über diesen Katheter vorgenommen.

Für die Präparation des Kniegelenkes wurde das Versuchstier auf der Heizplatte umgelagert und das Kniegelenk in einem Winkel von 45° Flexion auf einem speziell angefertigten Plexiglasblock gelagert und mit Klebestreifen fixiert.

Die Haut wird nach Desinfektion von distal, proximal der Pfote, bis proximal, in den Inguinalbereich, durchtrennt und nach Spaltung der oberflächlichen Fascien zur Seite gelagert. Die Patellarsehne wird an ihrem distalen Ansatz, an der Tibia, über eine Pinzette (FST, Vancouver, B.C., Kanada) gespannt, durchtrennt und nach proximal weggeklappt. Durch diese Präparation wird der Hoffa'sche Fettkörper dargestellt.

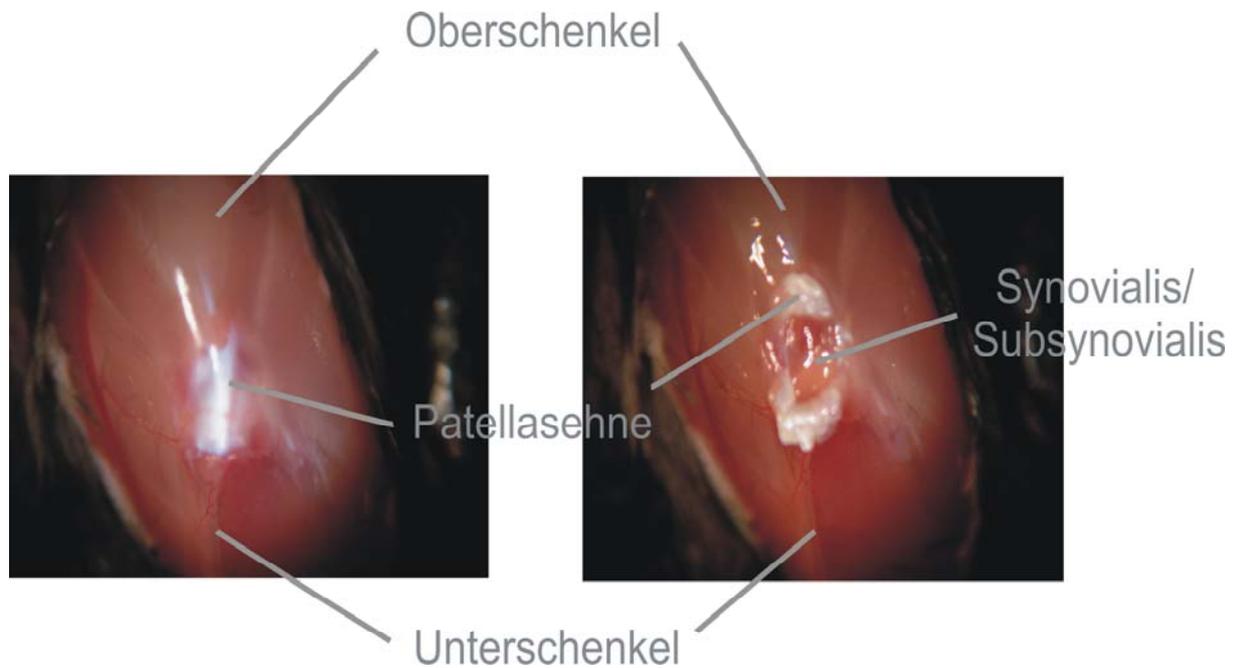


Abb-5: Links Operationssitus vor Durchtrennung der Patellarsehne, nach Präparation der Haut und Fascien. Rechts Patellarsehne durchtrennt und freier Blick auf den intraartikulären Raum mit Synovialis und distal liegendem Hoffa'schen Fettkörper.

Die Präparation erfolgte unter zu Hilfenahme eines Operationsmikroskopes (Leitz, Wetzlar, Deutschland). Nach Superfusion des Situs mit steriler 0,9% Kochsalzlösung wird nun ein Deckglas (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) auf einen Silicontropfen, der sich beidseits des Kniegelenkes befindet, gelegt, um so die Messungen mit dem Intravitalmikroskop zu ermöglichen und die Präparationsstelle nicht zu verletzen.

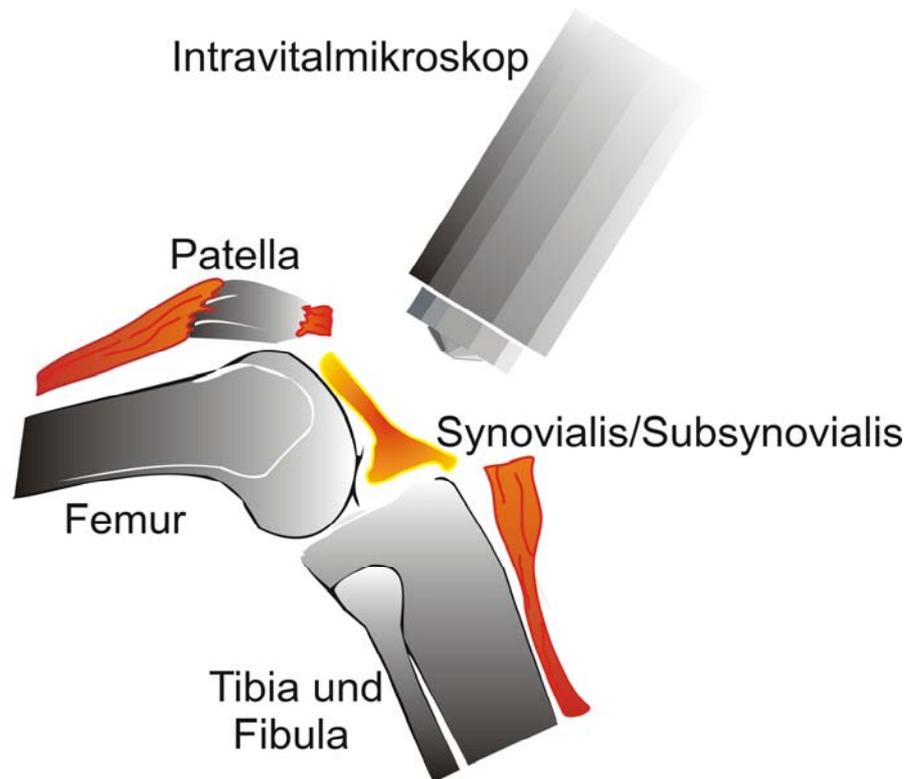


Abb-6: Vorgehen bei der Präparation: Fixierung des Kniegelenks in 45° Flexion und nach Freilegung der Patellarsehne und deren Durchtrennung. Darüber das IVM.

3.3.3 Histologische Untersuchung

Am Ende der Versuche wurden den Versuchstieren die Kniegelenke entnommen, um das Ausmaß der Antigen-induzierten Arthritis, im Rahmen von histologischen Untersuchungen, beurteilen zu können. Dazu wurden die in toto resezierten Kniegelenke nach Formalinfixation, Entkalkung durch EDTA für 72 Stunden und Paraffineinbettung in 3µm dünne Präparate geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt.

Brackertz et al. etablierten einen histologischen Score nachdem die Präparate semiquantitativ ausgewertet wurden (61):

- 0 = Normales Kniegelenk
- 1 = Normales Synovium mit vereinzelt mononukleären Zellen

- 2 = Zwei oder mehr synoviale Zellschichten und perivaskuläre Infiltrate von Leukozyten
- 3 = Hyperplasie des Synoviums und dichte Infiltration
- 4 = Synovitis, Pannusbildung, Knorpel-/ subchondrale Knochenerosionen

Von den einzelnen Versuchsgruppen wurden jeweils 7 mit HE gefärbte histologische Schnitte verblindet ausgewertet.

3.3.4 Immunhistochemische Untersuchungen

Die Expression der iNOS wurde an in Paraffin eingebetteten Schnitten des gesamten Kniegelenks nachgewiesen, da die Expression auch in Chondrozyten gezeigt werden sollte. Es wurde eine Entkalkung mit EDTA-Zitrat verwendet, da diese die Oberflächenproteine nicht zerstört. Nach Erstellen der Gewebeschnitte mit einem Kryotom wurden die Präparate mit 0,5% Wasserstoffperoxid und Methanol zur Blockade der endogenen Peroxidase sowie mit 1,5% Schafserum zur Blockade unspezifischer Bindungen der Antikörper vorbehandelt. Ein biotinylierter anti-Ratten IgG-Antikörper (Vectastain, Vector Lab., Los Angeles, USA) wurde zur Inkubation der Schnitte nach einem Waschvorgang verwendet. Bevor die Schnitte nun mit Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt wurden, wurden sie nach einem weiteren Waschschrift und einer Inkubation mit Avidin-Biotin Komplex (Vectastain) mit 3-amino-9-ethylcarbazol 0,01% als Substrat inkubiert.

Die Expression der iNOS wurde mit einem polyklonalen Kaninchen anti-Ratte/ Maus Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland) nachgewiesen.

Die histologischen Schnitte wurden von mindestens drei unabhängigen Kollegen des Instituts semiquantitativ nach einem etablierten Score (64) wie folgt analysiert:

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

3.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Das verwendete Intravitalmikroskop wurde bereits zuvor von Harris et al. im Detail beschrieben (65). Für die Versuche wurde ein Auflichtmikroskop Axiotech Vario (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet, welches mit einem Projektionsokular von 1,25-fachem Vergrößerungsfaktor ausgestattet ist. Die intravitale Aufnahmen wurden mit einem 20x/ 0,5W Archoplan Immersionsobjektiv (Zeiss) durchgeführt und über eine schwarz-weiß Kamera (Camera FK 6990 IQ-S, Piper, Schwerte, Deutschland; Lichtempfindlichkeit 0,02 Luxm 699 x 581 Bildpunkte) aufgezeichnet. Pro Versuchstier wurden mindestens 3 Gesichtsfelder ausgewählt, die jeweils 1-3 postkapilläre Venolen (18-40µm Durchmesser) oder Arteriolen (8-14µm) beinhalteten. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 100 (AttoArc, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Die Feinfokussierung der jeweiligen Präparationsareale ermöglichte ein Mikro-/ Makrobetrieb, an dem das gesamte Mikroskop aufgehängt war. Mit Hilfe eines Fluoreszenzfilterschiebers konnten die entsprechenden Bandpaßfilter eingesetzt werden (Filter Set 09 (CFDA-markierte Thrombozyten, FITC-Dextran): BP 450-490, Farbteiler (FT) 510, long pass (LP) 520, Anregungsbereich blau; Filter Set 15 (Rhodamin 6G): BP 546/12, FT 580, LP 590, Anregungsbereich grün; Zeiss). Ein Umschalten der Filterblöcke und des Anregungslichts ermöglichte konsekutive Aufnahmen von Videosequenzen von allen untersuchten Gefäßen.

Die Kontrastierung mit CFDA erlaubte die Darstellung der ex vivo markierten Thrombozyten und die damit verbundene Thrombozyten-Endothelzellinteraktion, die Rhodamin 6G Kontrastierung die Leukozyten-Endothelzellinteraktion und durch die Kontrastierung mit FITC-Dextran konnte der Gefäßdurchmesser, die Erythrozytenfließgeschwindigkeit und die funktionelle Kapillardichte dargestellt werden. Nach Einblendung eines Zeitcodes und des Datums (Videozeitgenerator VT 633; Fora Company Ltd., Tokio, Japan) wurden die Videosequenzen auf einem S-VHS Videorecorder (SVO-9500 MDP, Sony GmbH, Köln, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde aufgezeichnet. Das online-Bild wurde auf einem Videobildschirm (PVM-2043 MD, Sony GmbH) dargestellt, so dass

die Aufnahmen zu jedem Zeitpunkt kontrolliert werden konnten. Die Aufnahmen wurden auf Videokassetten (KCA-180min, Sony GmbH) aufgenommen und später offline ausgewertet. Zur Auswertung wurde das Videobildanalysesystem „CAP-Image“ für dynamische Kapillarmikroskopie benutzt (66).

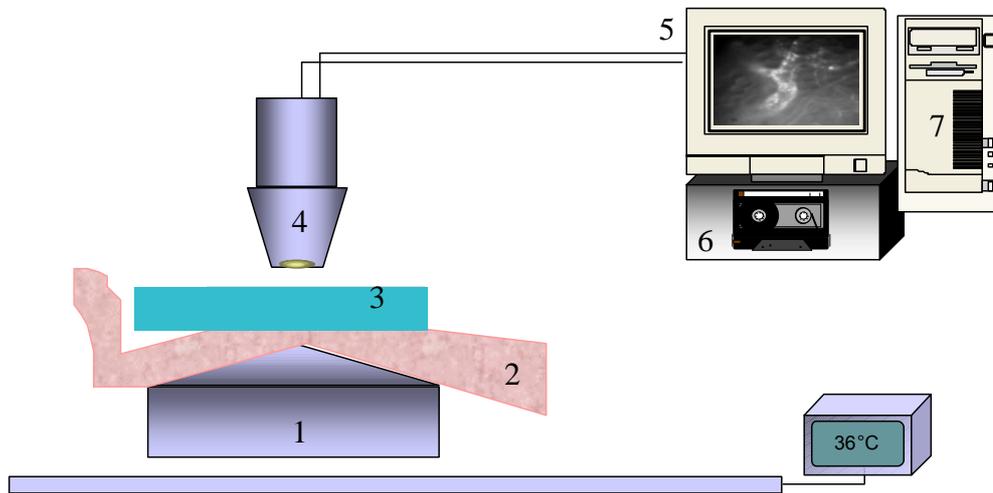


Abb-7: Technischer Aufbau der Intravitalmikroskopie bestehend aus (1) computergesteuertem Mikroskopiertisch mit (2) Versuchstier und Situs unter (3) Deckglas, (4) Intravitalmikroskop mit Videokamera, (5) Bildschirm, (6) Videoaufnahmegerät und (7) Computer (60;65).

3.4.1 Fluoreszenzmarkierung

Die Thrombozyten wurden nach Separation ex vivo direkt angefärbt. Ebenso die Leukozyten wurden in vivo direkt mit Rhodamin 6G als Fluoreszenzfarbstoff markiert. FITC-Dextran bindet an Proteine und stellt so das Plasma dar.

3.4.1.1 Kardiale Punktion und Thrombozytenmarkierung

Carboxyfluoreszein-Diacetatester (Molekulargewicht 535) (CFDA-SE, Molecular Probes, Eugene, OR) wurde verwendet, um die Thrombozyten ex vivo zu markieren und somit die Thrombozyten-Endothelzellinteraktion darstellen zu können (67). Ein Spendertier, welches synergen zum Versuchstier ist, wurde in Narkose gelegt und

durch kardiale Punktion wurde 1ml Vollblut gewonnen. Diese Probe wurde mit 0,2ml Alsevers-Puffer (38mM Zitronensäure, 75mM Trisodium Citrat/ 100mM Dextrose), 20µl Prostaglandin E₁ (PGE 1, Serva, Heidelberg, Deutschland) und 0,5ml Dulbecco phosphate-buffered Saline (D-PBS, PAN-Systems, Aidenbach, Deutschland) versetzt. Anschließend wurde das Blut für 10min bei 900U/min zentrifugiert. Das so entstandene thrombozytenreiche Plasma wurde in 1,5ml D-PBS, 0,4ml Alsevers und 50µl PGE 1 aufgenommen. Zu diesem Ansatz wurde der Fluoreszenzmarker aminoreactive succinimidylester carboxyfluoreszein-diacetat (CFDA-SE) hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5min im Dunkeln wurde der Ansatz für weitere 10min bei 3000U/min zentrifugiert.

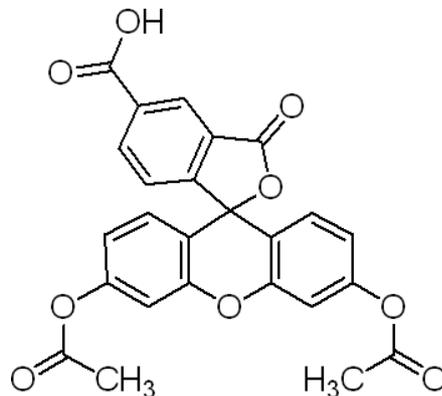


Abb-8: Strukturformel des Fluoreszenzmarkers Carboxyfluoreszein-Diacetatester (CFDA-SE)

Das resultierende Thrombozyten-Pellet wurde in 0,4ml DPBS resuspendiert. Mit Hilfe eines Coulter-Counters (Coulter, Miami, Florida, USA) konnte die Anzahl gewonnener Thrombozyten jeder Probe bestimmt werden. Im Anschluss wurde ein Volumen, welches 100×10^6 fluoreszenzmarkierter Thrombozyten enthielt, über den Schwanzvenenkatheter den Versuchstieren injiziert. Da die physiologische Thrombozytenanzahl bei Mäusen ca. $600 \times 10^3 / \mu\text{l}$ Vollblut beträgt und ein Blutvolumen von ca. 5,85ml/ 100g vorhanden ist, liegt der Anteil markierter Thrombozyten an der Gesamtpopulation zirkulierender Thrombozyten damit bei etwa 10-20% (68).

Um die Reinheit der zu infundierenden Suspension zu überprüfen, wurde eine durchflusszytometrische Untersuchung durchgeführt. Somit sollte eine Verunreinigung mit Leukozyten ausgeschlossen werden und die Funktionalität der markierten Thrombozyten getestet werden. Die Analyse wurde nativ und nach Aktivierung mit Phorbol-Mystrate-Acetat (PMA, Sigma-Aldrich, Deutschland) für 10min an einem FACSort Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt und mit Hilfe der Expression von P-Selektin als Marker für die α -Granula Sekretion gemessen.

3.4.1.2 Leukozytenfärbung

Die Leukozyten wurden durch eine Injektion von Rhodamin 6G in vivo angefärbt (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), wodurch man die Möglichkeit hatte, Thrombozyten und Leukozyten zeitgleich während eines Versuchs anzufärben. Durch Abhängigkeit zum Membranpotential reichert sich dieser lipophile, positiv geladene Farbstoff in der Mitochondrienmembran der Leukozyten an (69).

In den Versuchen wurde eine Dosis von 0,3 ml/kg/KG einer 0,2mM (0,096 mg/ml) Rhodamin 6G Lösung intravenös appliziert (70). Eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung kann in der für die Untersuchung gewählten Dosis ausgeschlossen werden (71).

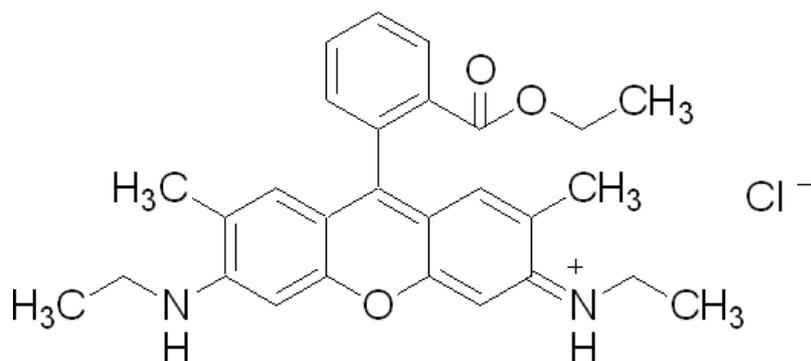


Abb-9: Strukturformel des Fluoreszenzmarkers Rhodamin 6G

3.4.1.3 Plasmafärbung

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) Dextran (5 g/DL, MW 150.000, Sigma, Deisenhofen, Deutschland), ein hochmolekularer, lang zirkulierender Fluoreszenzfarbstoff, wurde zur Kontrastierung des Plasmas intravenös im Bolus in einer Dosis mit 15 ml/kg/KG appliziert. Wird FITC-Dextran mit einem Licht angeregt, das eine Wellenlänge unter 500 nm hat (Exzitationsmaximum 490 nm), emittiert es ein gelblich-weißes Licht mit einer mittleren Wellenlänge von 525 nm. Diese Kontrastanhebung ermöglichte, dass sich die perfundierten Gefäße vom deutlich dunkleren umliegenden Gewebe abhoben, und somit die Messung des Gefäßdurchmessers, der Blutflussgeschwindigkeit und der funktionellen Kapillardichte (72).

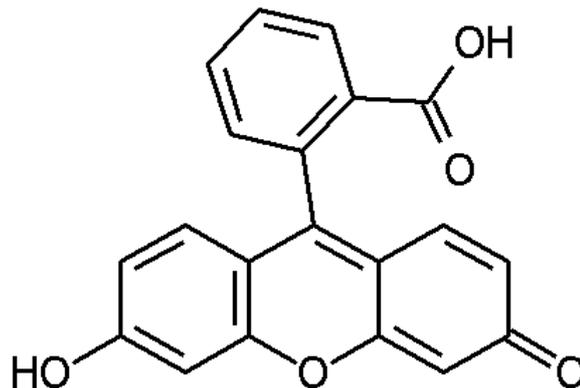


Abb-10: Strukturformel des Moleküls Fluorescein, die Grundlage des Farbstoffes FITC-Dextran

3.4.2 Mikrozirkulatorische Parameter

Neben dem mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) in mmHg wurden folgende Parameter mittels Intravitalmikroskopie bei jeder Untersuchung bestimmt:

3.4.2.1 Erythrozytenfließgeschwindigkeit

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

3.4.2.2 Venolendurchmesser

Dazu wird im Bereich einer Venole, Region of Interest (ROI), der Durchmesser, also der Abstand zwischen beiden Gefäßwänden, 10 Mal, über eine Gesamtlänge von 150µm gemessen und der Mittelwert in µm berechnet. Auch hier wurde das Softwareprogramm CapImage™ zur Berechnung genutzt.

3.4.2.3 Funktionelle Kapillardichte

Die Funktionelle Kapillardichte (Functional Capillary Density (FCD)) ist definiert als Länge, der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Beobachtungsfeld und wird in Zentimetern pro Quadratcentimeter (cm/cm^2) angegeben. Es ist somit ein Maß für die nutritive Perfusion des Gewebes (73;73;73). Nach der Markierung berechnete CapImage™ die Werte, von denen ebenfalls Mittelwerte errechnet wurden.

3.4.2.4 Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzellinteraktion

Die Thrombozyten, die ex vivo mit CFDA-SE, markiert wurden, sowie die in vivo mit Rhodamin 6G markierten Leukozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Sek ausgezählt und je nach der Interaktion mit dem Endothel in die folgenden Gruppen eingeteilt:

3.4.2.4.1 Rollende Thrombozyten, bzw. Leukozyten

Rollende Zellen sind solche Zellen, die im Randstrom fließen und sich am mikrovaskulären Endothel mit deutlich geringerer Geschwindigkeit entlang bewegen als der zentrale oder der gefäßwandnahe Blutstrom. Zusätzlich zeigen rollende Zellen kurze Kontakte mit dem Endothel. Sie stellen die Fraktion aller Zellen dar, die ein definiertes Gefäßsegment passieren (Division der rollenden Zellen durch die Summe der rollenden Zellen und der den Gefäßabschnitt passierenden Zellen).

3.4.2.4.2 Adhärenente Thrombozyten, bzw. Leukozyten

Adhärenente Zellen haben sich während der Beobachtungszeit von 30 Sek nicht vom Gefäßendothel gelöst, sondern sind an gleicher Stelle am Endothel haften geblieben. Sie werden als Zellen pro mm² Endotheloberfläche (Zellen/mm²) angegeben. Aus dem Gefäßdurchmesser und der Länge des untersuchten Gefäßabschnitts kann die Anzahl adhärenenter Thrombozyten bzw. Leukozyten pro mm² Endothelzelloberfläche nach folgender Formel berechnet werden:

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

(aZ bezeichnet dabei die Anzahl adhärenenter Zellen (Thrombozyten bzw. Leukozyten) während der Beobachtungszeit, D den Gefäßdurchmesser in µm, L die Länge des untersuchten Gefäßabschnitts (200µm) und π die Kreiskonstante)

3.5 Experimentelles Protokoll

3.5.1 Versuchsgruppen

In der Studie wurden insgesamt sechs einzelne Gruppen unterschieden, denen die Tiere randomisiert zugewiesen wurden. Die ersten beiden Gruppen stellen die Kontrollgruppen dar. Es wurden, wie schon zuvor in Punkt 3.1 erwähnt, weibliche C57/BL6, sowie B6.129P2-*Nos2^{tm1Lau}/J* (iNOS defiziente) Tiere verwendet. In Gruppe 1 wurden ausschließlich „wild-type“ Tiere verwendet, ohne Induktion einer

Arthritis. Gruppe 2 setzte sich aus nicht arthritisch iNOS defizienten Tieren zusammen.

Gruppe 3 und 4 wurden wie Gruppe 1 und 2 aufgebaut, in beiden Gruppen erfolgte allerdings bei den Versuchstieren eine Induktion der Arthritis (s. Punkt 3.2.1).

Für die letzten beiden Gruppen wurden die Tiere für Empfänger-, bzw. Spendertier aus unterschiedlichen Stämmen ausgewählt, um zwischen endothelialer und thrombozytärer iNOS unterscheiden zu können. In der Gruppe 5 waren die arthritischen Empfängertiere iNOS defizient und die Spendertiere C57/Bl6 Mäuse, im Gegensatz dazu waren die arthritischen Empfängertiere in Gruppe 6 C57/Bl6 Mäuse und die Spendertiere iNOS defizient.

Kontrollgruppen				
Gruppe	1	2		
Empfänger-/	iNOS+/+	iNOS-/-		
Spendertiere	iNOS+/+	iNOS-/-		

Antigen-induzierte Gruppen				
Gruppe	3	4	5	6
Empfänger-/	AiA iNOS+/+	AiA iNOS-/-	AiA iNOS-/-	AiA iNOS+/+
Spendertiere	iNOS+/+	iNOS-/-	iNOS+/+	iNOS-/-

Abb-11: Gruppenzusammensetzung; jeweils n=7

3.5.2 Versuchsablauf

Zu Beginn der Versuche wurde ein Spendertier narkotisiert und nach Herzpunktion mit Pentobarbital euthanasiert. Die Thrombozyten wurden wie unter Punkt 3.4.1.1 separiert und markiert. Während dieses Labellingprozesses konnte das Empfängertier bereits narkotisiert, gewogen und klinisch beurteilt werden. Nach Lagerung des Empfängertieres auf dem Operationstisch konnten nun die Katheter gelegt und die Kniepräparation vorgenommen werden. Im Anschluss folgten die IVM Aufnahmen mit Applikation der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe. Nach den Videoaufnahmen wurde der Versuch mit Probeentnahmen und der Euthanasie des

Tieres beendet. Alle weiteren Untersuchungen, sowie die Auswertung der Aufnahmen erfolgten zu späterem Zeitpunkt.

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

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

Blutdruckmessung: konstant / inkonstant keine, weil: _____
 Blutdruckverlauf:

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

Körpergewicht: _____
 Kniegelenksdurchmesser: _____

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

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

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

Abb-12: Versuchsprotokoll

4. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die quantitativen Werte in dieser Arbeit sind als Mittelwert mit Standardfehler (MW \pm SEM) angegeben. Als signifikant wurden Differenzen von $p < 0,05$ angesehen. Die Mittelwerte der einzelnen Messungen errechnen sich aus der Anzahl der Versuchstiere pro Versuchsgruppe ($n=7$). Für die statistische Auswertung wurde nur der Mittelwert aus sämtlichen Venolen pro Versuchstier verwendet. Analoge Vorgehensweise fand sich bei den mikrozirkulatorischen Parametern.

Die Statistik wurde mit Hilfe des Statistikprogramms, Sigma StatTM (Jandel Scientific, V5.1, USA), durchgeführt. Zunächst wurde auf Normalverteilung getestet. Beim Vergleich mehrerer Gruppen sämtlicher Parameter wurde mit einem Rangsummentest, ANOVA on ranks, geprüft. Falls zwischen Gruppen signifikante Unterschiede vorhanden waren, wurde im Anschluss mit dem Dunn's Test weiterverfahren. Bei repetitiven Messungen wurde der Friedman Test zur statistischen Analyse verwendet.

Die histologischen Untersuchungen wurden aufgrund der geringen Fallzahlen als Median angegeben und deskriptiv dargestellt. Es erfolgte keine separate statistische Auswertung.

5. ERGEBNISSE

In dem folgenden Abschnitt werden die Daten der einzelnen Untersuchungen in unterschiedlicher Weise zur Rolle von iNOS im Zusammenhang mit Arthritis dargestellt.

5.1 Klinische Parameter

Die Veränderungen der klinischen Parameter werden im Folgenden beschrieben.

Bei allen Tieren, sowohl den C57/Bl6, wie auch den iNOS defizienten Tieren, konnten keine Defizite hinsichtlich der Pflege, im Verhalten oder in der Erscheinung im Verlauf der Arthritisinduktion festgestellt werden. Alle Tiere nahmen im Verlauf der Untersuchungen an Gewicht zu. Lediglich bezüglich des Kriteriums der Kniegelenksschwellung waren Unterschiede in den einzelnen Gruppen festzustellen.

Gruppen	Klinischer Score			
	Verhalten	Erscheinung	Schwellung	Gewicht
Kontrolle	0	0	0	0
AiA C57/Bl6	0	0	14	0
AiA iNOS	0	0	14	0

Tab-2: Klinischer Score bei den Tieren

Klinischer Score: 0 = normales gesundes Tier; 1 = keine Körpergewichtszunahme oder ungewöhnliches Verhalten oder Vernachlässigung der Fellpflege; 2 = Körpergewichtsverlust oder auffällig gestörtes Verhalten oder struppiges Fell; 3 = Körpergewichtsverlust > 3g oder somnolentes Verhalten oder schmutziges Fell. Schwellung: Anzahl der Tiere, die nach intraartikulärer Injektion eine Kniegelenksschwellung aufwiesen.

5.1.1 Gewicht

Das Gewicht der Versuchstiere nahm im Verlauf, wie oben schon erwähnt, zu. Die Mehrheit der Tiere lag zwischen 18-20g Körpergewicht.

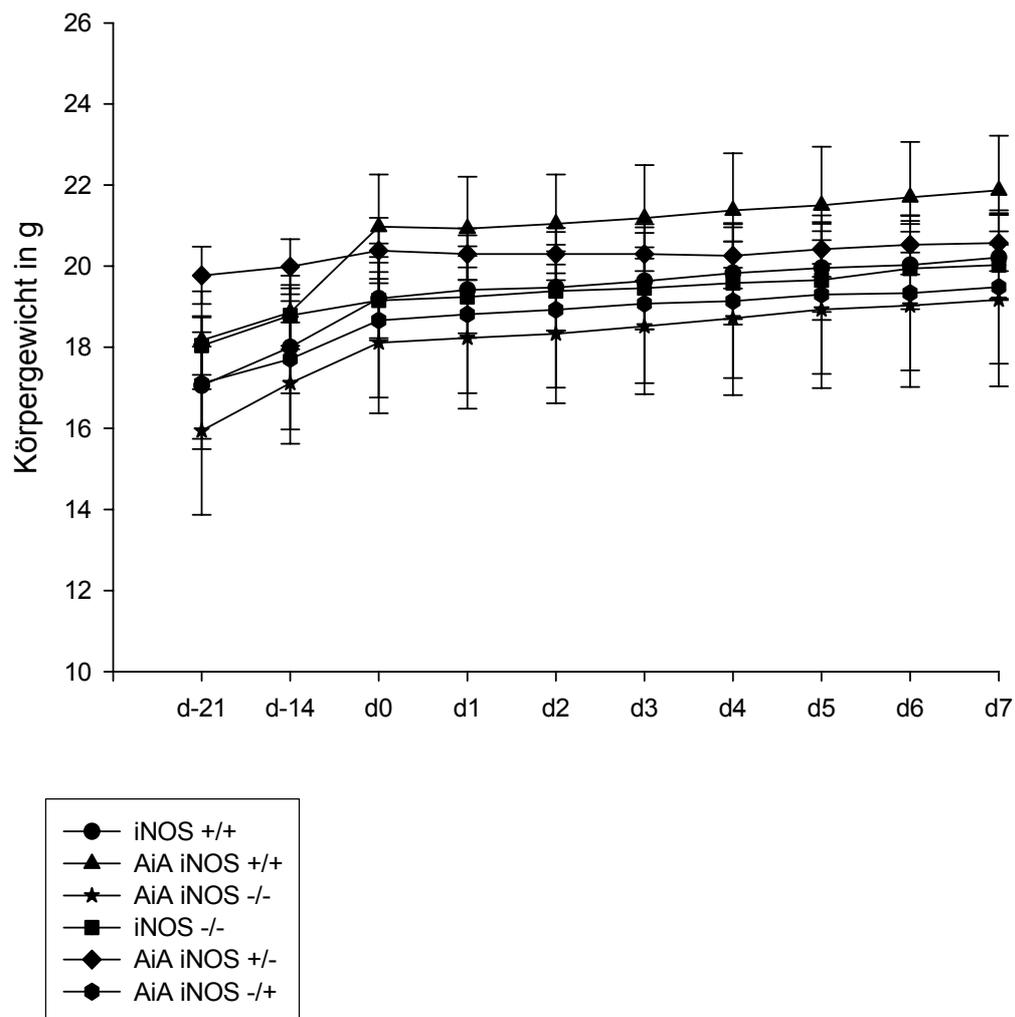


Abb-13: Körpergewicht. Verlauf des Körpergewichtes in den einzelnen Gruppen von Tag -21 bis zum Tag der IVM Aufnahmen. Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM. Es waren keine Signifikanzen ermittelbar.

5.1.2 Kniegelenkdurchmesser

An Tag 0, Tag der eigentlichen Arthritisinduktion in das linke Kniegelenk, war eine Zunahme des Kniegelenkdurchmessers bei allen Tieren, sowohl den Kontroll- wie auch den arthritischen Tieren zu sehen. Die Schwellung hielt jedoch nur bei den Arthritis Gruppen über den gesamten Zeitraum bis Tag 7 an. Bei den Kontrollgruppen, bei denen eine äquivalente Dosis steriler Kochsalzlösung in das linke Kniegelenk appliziert wurde, ging die Schwellung an Tag 2 wieder, auf Werte vergleichbar dem Ausgangswert zurück.

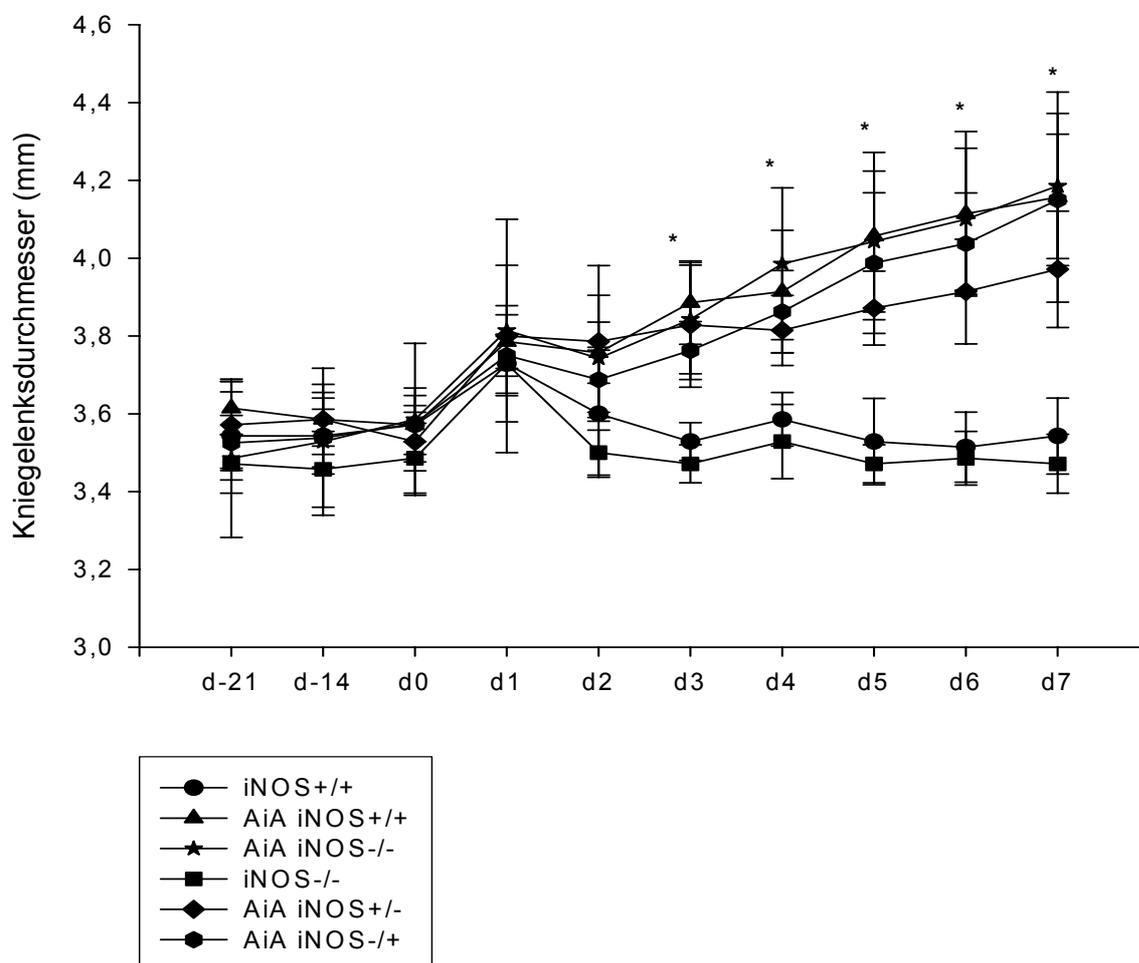


Abb-14: Veränderungen des Kniegelenkdurchmessers in mm von Beginn der Arthritisinduktion bis zum Tag der IVM. Mittelwert \pm SEM; $p < 0,05$ arthritische Gruppen vs. Kontrollgruppen.

5.1.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Im Rahmen der FACS Analyse sollte getestet werden, inwieweit die Thrombozyten nach Separation noch aktivierbar sind.

Die Analyse ergab eine fast reine Thrombozytenlösung mit einer geringen, vernachlässigbaren Anzahl an anderen Zellen, wie Erythrozyten oder Leukozyten.

In einem weiteren Schritt sollte überprüft werden, ob die Thrombozyten weiterhin adäquat auf von außen wirkende Stimuli reagieren und sich physiologisch verhalten.

Nach unterschiedlicher Aktivierung, wurde die P-Selektin Expression als Marker für die Thrombozytenaktivierung gemessen und es zeigte sich eine Verschiebung zu gesteigerter Größe und erhöhter Granularität, was dafür spricht, dass die Thrombozyten nicht durch die Separation ihre Funktionalität verloren haben.

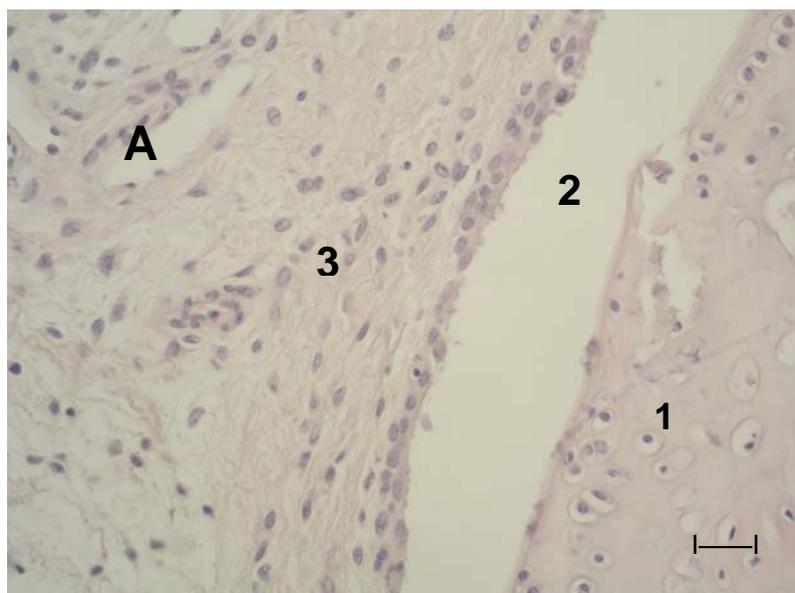
5.1.4 Histologische Untersuchungen

Bei allen Versuchstieren wurden zur Überprüfung der Arthritisinduktion histologische Untersuchungen, nach der IVM, nach dem Score von Brackertz et al. durchgeführt. Alle arthritischen Tiere zeigten Veränderungen im Sinne einer entzündlichen Infiltration des Gewebes. Die Kontrollgruppen, sowohl C57/Bl6, wie auch iNOS defiziente Mäuse wiesen physiologische Histologien auf. Im Rahmen der histologischen Untersuchungen konnten keine Differenzen zwischen den beiden Tierstämmen ausgemacht werden.

Gruppen	Histologischer Score				
	0	1	2	3	4
C57/Bl6 Kontrolle	6	1	0	0	0
iNOS-defizient Kontrolle	7	0	0	0	0
C57/Bl6 AiA	0	0	1	5	1
iNOS-defizient AiA	0	0	1	4	2

Tab-3: Histologischer Score nach Brackertz et al.

AiA = Antigen-induzierte Arthritis, Histologischer Score: 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 (61).



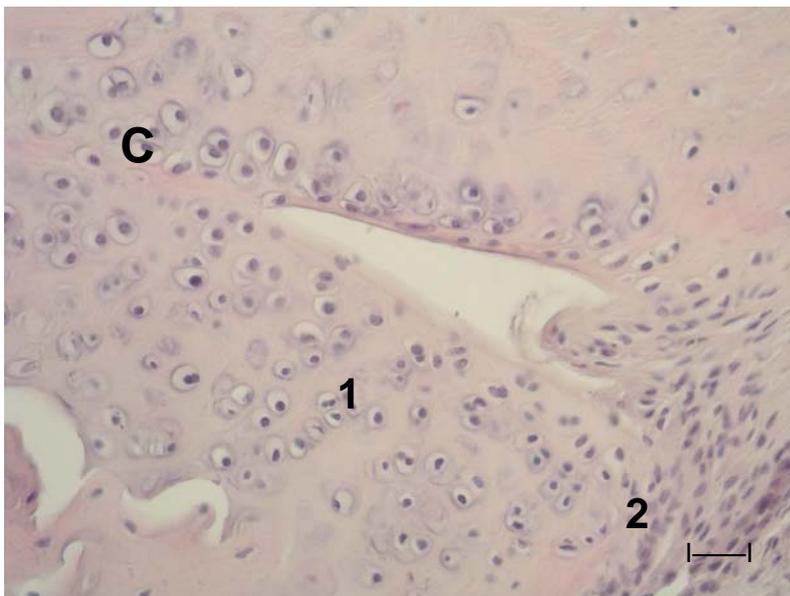
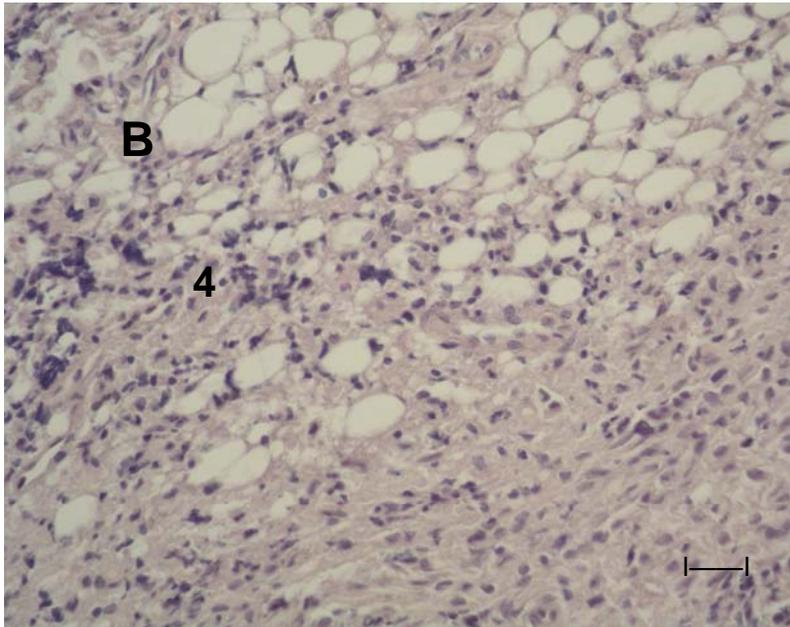
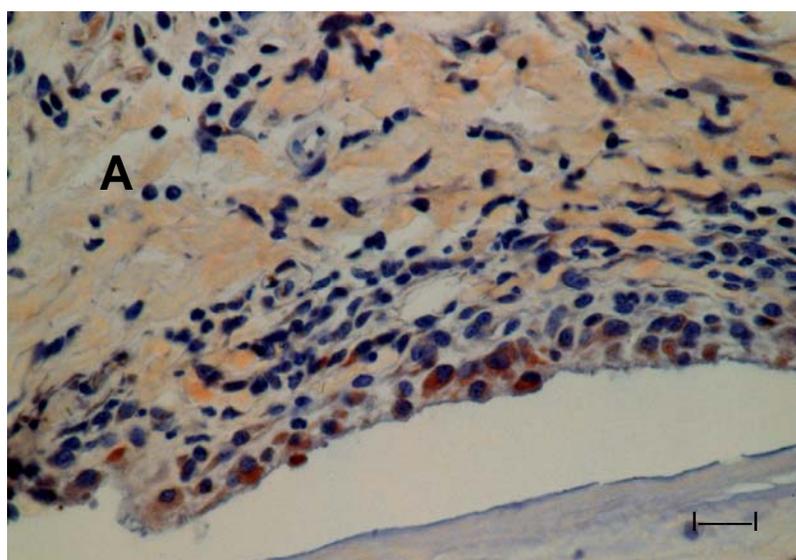


Abb-15: Histologische Schnitte durch das Kniegelenk der Maus (HE-Färbung, 40-fache Vergrößerung; Maßstab: |—| = 40µm) Legende: A = Kontrolltier; B/ C = Arthritisches Tier; 1 = Knorpel; 2 = synoviale Zellschicht; 3 = Subsynovium; 4 = Subsynovium mit deutlicher leukozytärer Infiltration

5.1.5 Immunhistologische Untersuchungen

Die Expression der iNOS konnte sowohl in Chondrozyten, synovialen Fibroblasten, wie auch in Endothelzellen nachgewiesen werden.

Auch wenn die Expression in unterschiedlichen Zellen nachgewiesen werden konnte, so war das Ausmaß der Expression doch sehr unterschiedlich stark ausgeprägt in den einzelnen Gruppen. Die beiden iNOS defizienten Gruppen wiesen sowohl in der Kontrollgruppe, wie auch in der arthritischen Gruppe, keinerlei Expression der iNOS auf. Die C57/Bl6 Kontrollgruppe zeigte leichte Anfärbungen, wohingegen die arthritischen C57/Bl6 Mäuse eine starke Expression der iNOS präsentierten.



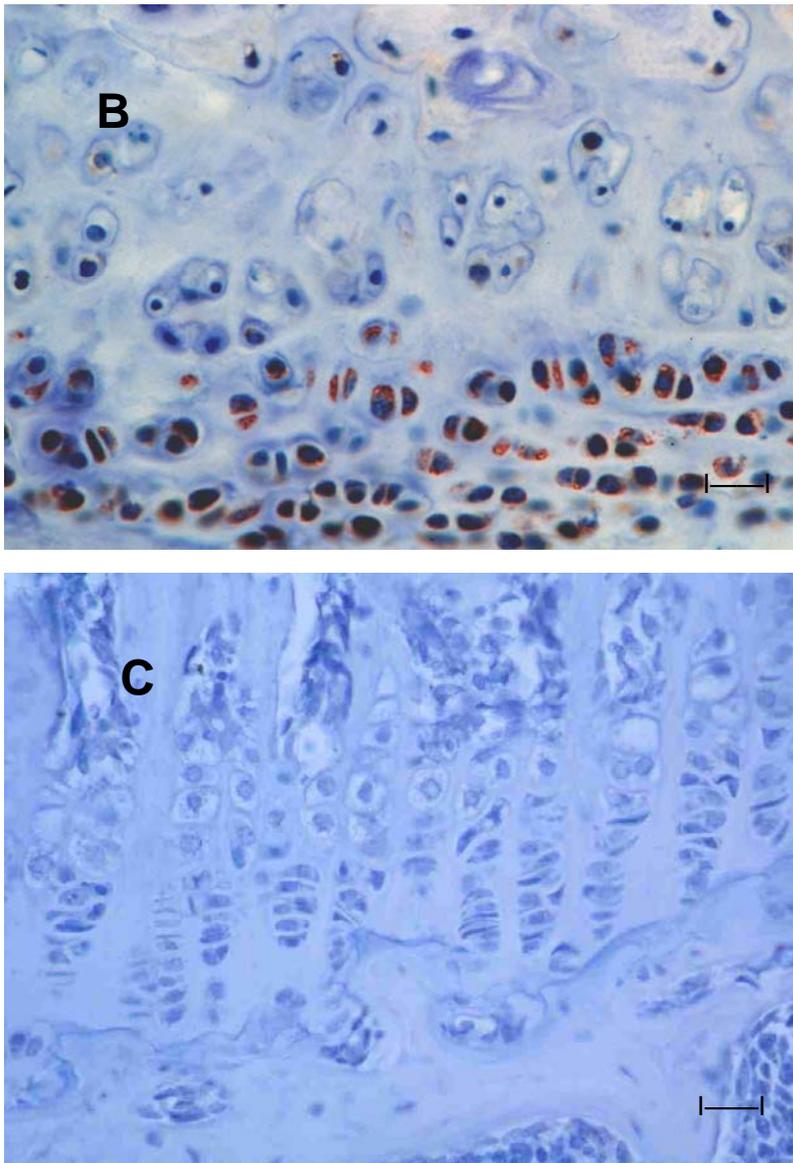


Abb-16: Immunhistologische Bilder

Expression von iNOS in (A) synovialen Fibroblasten und (B) in Chondrozyten in arthritischen C57/Bl6 Tieren; im Vergleich dazu keine Anfärbung in Chondrozyten in einem iNOS defizienten arthritischen Tier (C). (40-fache Vergrößerung; Maßstab: |—| = 40µm)

5.2 Makro- und Mikrohämodynamische Parameter

Die intraoperativ gemessenen Parameter blieben über den Zeitraum der Messungen konstant, so dass man davon ausgehen kann, dass die chirurgische Präparation die Kreislaufsituation des Versuchstieres nicht negativ beeinträchtigt hat. Der mittlere arterielle Blutdruck lag bei den C57/Bl6 Kontrolltieren im Schnitt bei 80 ± 3 mmHg und bei den iNOS-defizienten Tieren bei 82 ± 4 mmHg. Bei den arthritischen Gruppen konnte ein gewisser Unterschied zwischen der AiA wild-type (85 ± 3 mmHg) und der Knock-out Gruppe (77 ± 5 mmHg) festgestellt werden. Die endotheliale und die thrombozytäre Gruppe lagen zwischen den beiden anderen arthritischen Gruppen mit 79 ± 2 mmHg und 82 ± 2 mmHg. Insgesamt konnte aber kein signifikanter Unterschied ausgemacht werden.

Auch bezüglich des Durchmessers der postkapillären Venolen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Werte variierten von $9,9 \pm 0,2$ μm bei der AiA Knock-out Gruppe bis hin zu $12,4 \pm 0,9$ μm bei der C57/Bl6 Kontrollgruppe. Die iNOS-defiziente Kontrollgruppe lag bei $10,7 \pm 0,7$ μm , die nicht-defiziente AiA-Gruppe bei $11,9 \pm 0,3$ μm . Endotheliale und thrombozytäre Tiere zeigten Ergebnisse von $11,4 \pm 1,0$ μm und $11,8 \pm 0,5$ μm . Kleinere Gefäße wurden nicht in die Wertung eingenommen, da ab einer Größe $<7-8$ μm die Auswertung der IVM Aufnahmen nicht mehr exakt durchzuführen ist.

Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der nicht-defizienten ($255,6 \pm 14,9$ cm/cm^2) und der iNOS-defizienten ($298,1 \pm 5,2$ cm/cm^2) Kontrollgruppe bezüglich der funktionellen Kapillardichte. Auch die arthritischen Tiere, sowohl wild-type ($334,7 \pm 8,6$ cm/cm^2), wie auch iNOS-defizient ($279,0 \pm 9,3$ cm/cm^2) zeigten keine signifikanten Unterschiede gegenüber den anderen arthritischen Tieren, wie der endothelialen ($277,3 \pm 6,5$ cm/cm^2) und der thrombozytären ($313,9 \pm 7,7$ cm/cm^2) Gruppe.

Im Rahmen der Erythrozytenfließgeschwindigkeit in den postkapillären Venolen zeigten die Kontrolltiere Werte von $0,43 \pm 0,05$ mm/s bei den C57/Bl6 Tieren und $0,58 \pm 0,11$ mm/s bei den iNOS-defizienten. Die arthritischen Gruppen präsentierten gewisse, jedoch nicht signifikante Schwankungen mit $0,38 \pm 0,04$ mm/s bei der AiA wild-type Gruppe und $0,5 \pm 0,04$ mm/s bei der AiA Knock-out Gruppe. Lediglich

zwischen der endothelialen ($0,49 \pm 0,08$ mm/s) und der thrombozytären ($0,25 \pm 0,01$ mm/s) Gruppe konnte ein Unterschied festgestellt werden.

Parameter	Kontrolle	
	C57/Bl6	iNOS -/-
MAP, mm Hg	80±3	82±4
Gefäßdurchmesser (µm)	12.4±0.9	10.7±0.7
FCD (cm/cm ²)	255.6±14.9	298.1±5.2
RBC velocity (mm/s)	0.43±0.05	0.58±0.11

Parameter	AiA			
	iNOS+/+	iNOS-/-	iNOS+/-	iNOS-/+
MAP, mm Hg	85±3	77±5	79±2	82±2
Gefäßdurchmesser (µm)	11.9±0.3	9.9±0.2	11.4±1.0	11.8±0.5
FCD (cm/cm ²)	334.7±8.6	279.0±9.3	277.3±6.5	313.9±7.7
RBC velocity (mm/s)	0.38±0.04	0.5±0.04	0.49±0.08	0.25±0.01

Tab-2: Makro-und Mikrohämodynamische Parameter

MAP = mittlerer arterieller Blutdruck; FCD = funktionelle Kapillardichte; RBC velocity = Erythrozytenfließgeschwindigkeit. Gefäßdurchmesser, FCD und RBC velocity wurden durch computerunterstützte Bildverarbeitung erstellt. Daten sind angegeben als Mittelwert ± SEM.

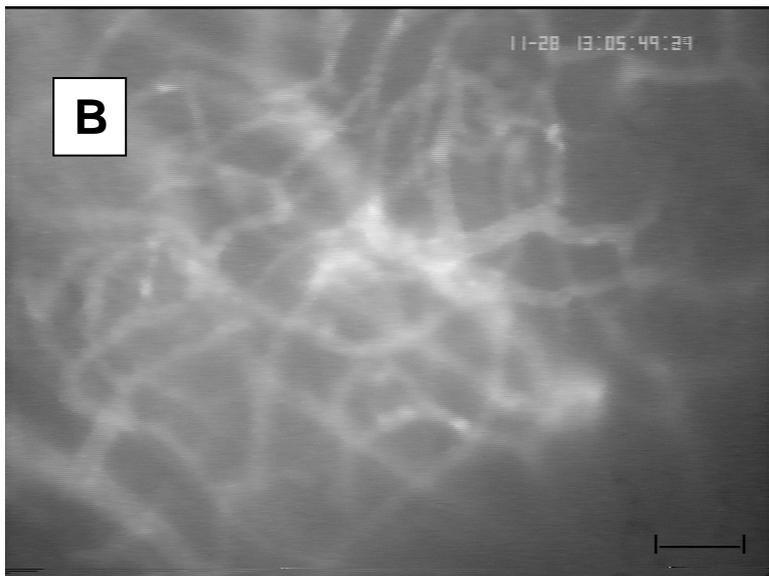
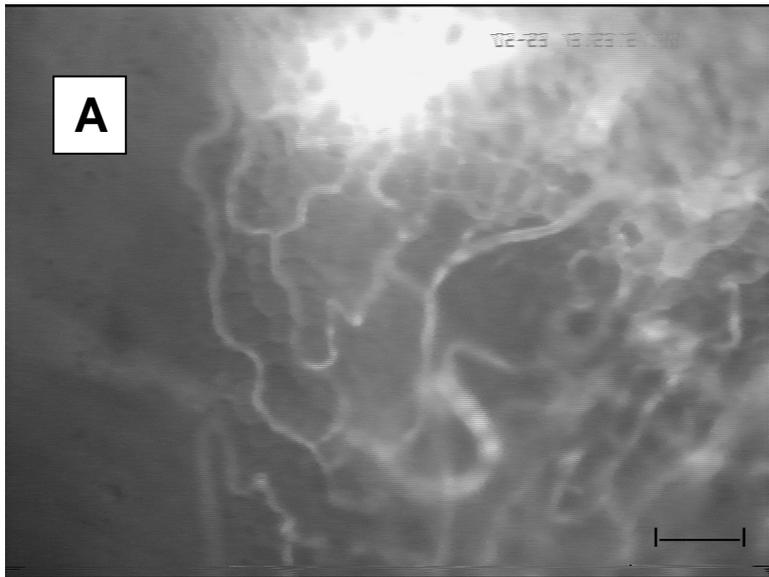
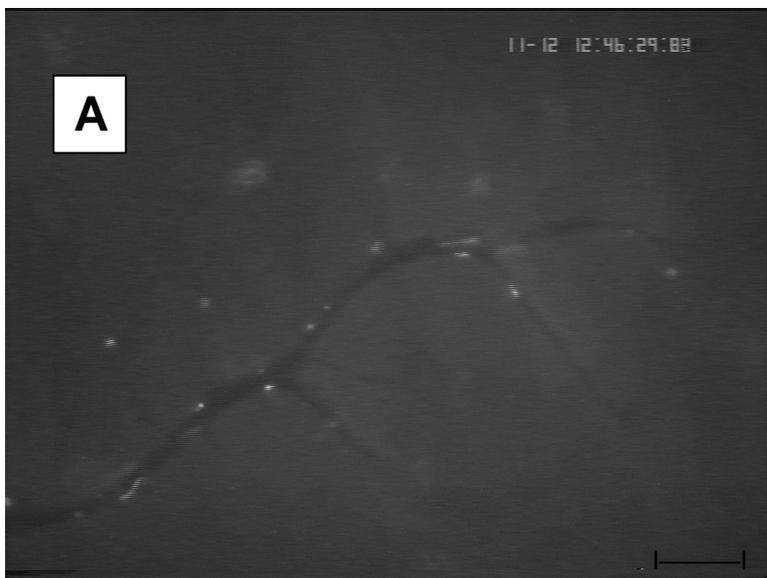


Abb-17: Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Funktionellen Kapillardichte, A) eines Kontroll- und B) eines arthritischen Tieres. (Maßstab: |——| = 50µm)

5.3 Thrombozyten-Endothelzellinteraktion

Alle arthritischen Gruppen zeigten eine signifikant erhöhte Interaktion der Thrombozyten mit dem Endothel, sowohl bei den rollenden, wie auch bei den adhärennten Zellen, im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Rolling: iNOS +/+ $0,03 \pm 0,03$; iNOS -/- $0,01 \pm 0,002$).



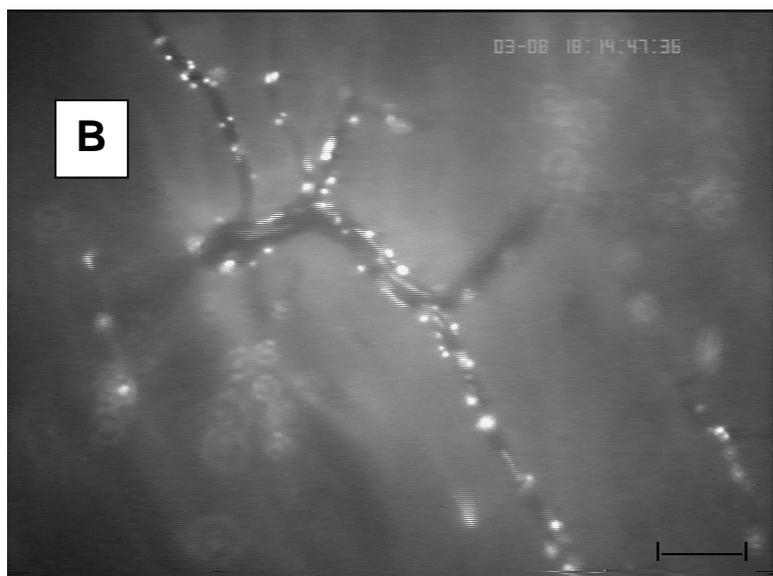


Abb-18: IVM Aufnahmen der CFDA-gefärbten Thrombozyten innerhalb der Mikrozirkulation in vivo.
(Maßstab: |——| = 50µm)

- A Thrombozyten-Endothelzellinteraktion bei einem Kontrolltier
B Thrombozyten-Endothelzellinteraktion bei Mäusen mit AiA

Die Fraktion rollender Thrombozyten der AiA C57/Bl6 Gruppe befand sich auf dem gleichen Niveau ($0,12 \pm 0,01$), wie die Gruppe, die C57/Bl6 Versuchs- und iNOS defiziente Spendermäuse, beinhaltet ($0,12 \pm 0,01$). Die beiden anderen arthritischen Gruppen waren signifikant, gegenüber den oben genannten Gruppen, erhöht (AiA iNOS $-/-$ $0,16 \pm 0,004$; AiA iNOS $-/+$ $0,15 \pm 0,01$), aber es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen selbst festzustellen. Betrachtet man die adhärennten Zellen, so sind die Verhältnisse hier ähnlich denen der Fraktion rollender Thrombozyten, mit einem signifikanten Anstieg der AiA Gruppen gegenüber den Kontrollgruppen (iNOS $+/+$ $99,5 \pm 23,3 \text{ mm}^{-2}$; iNOS $-/-$ $149,8 \pm 54,5 \text{ mm}^{-2}$). Kein signifikanter, Unterschied konnte zwischen der arthritischen nicht-defizienten und der AiA Gruppe mit nicht-iNOS-defizientem Versuchstier und defizientem Spendertier bestimmt werden (AiA iNOS $+/+$ $993,5 \pm 33,7 \text{ mm}^{-2}$; AiA iNOS $+/-$ $1062,7 \pm 151,2 \text{ mm}^{-2}$). Die AiA iNOS defiziente ($1858,1 \pm 188,0 \text{ mm}^{-2}$), sowie die Gruppe, die iNOS defiziente Versuchs- und C57/Bl6 Spendertiere beinhaltete ($1714,7 \pm 117,7 \text{ mm}^{-2}$), zeigten zwar untereinander keine Signifikanz, jedoch einen signifikanten Anstieg im Vergleich mit den beiden anderen arthritischen Gruppen. Insgesamt zeigte sich ein signifikanter

Anstieg der Interaktionen bei Fehlen der endothelialen iNOS, womit sich ein endothelialer Effekt beschreiben lässt. Die Signifikanzen waren bei den adhärenenten Zellen stärker ausgeprägt, als in der Fraktion rollender Thrombozyten.

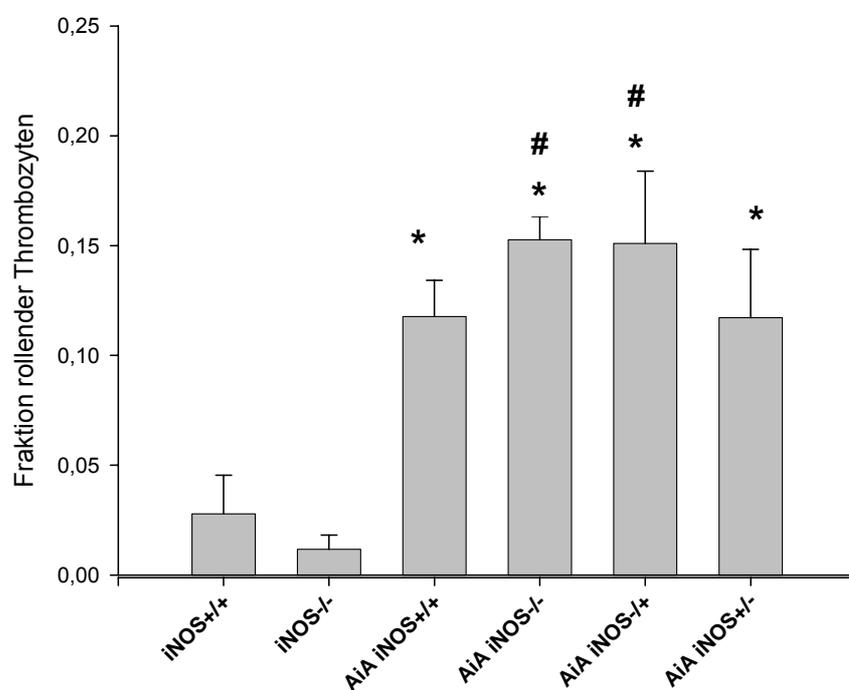


Abb-19: Fraktion rollender Thrombozyten. Ergebnisse der IVM Aufnahmen am Tag 7. Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ AiA Gruppen vs. Kontrollgruppen; # $p < 0,05$ AiA iNOS ^{-/-} und ^{-/+} vs. AiA iNOS ^{+/+} und ^{+/-}.

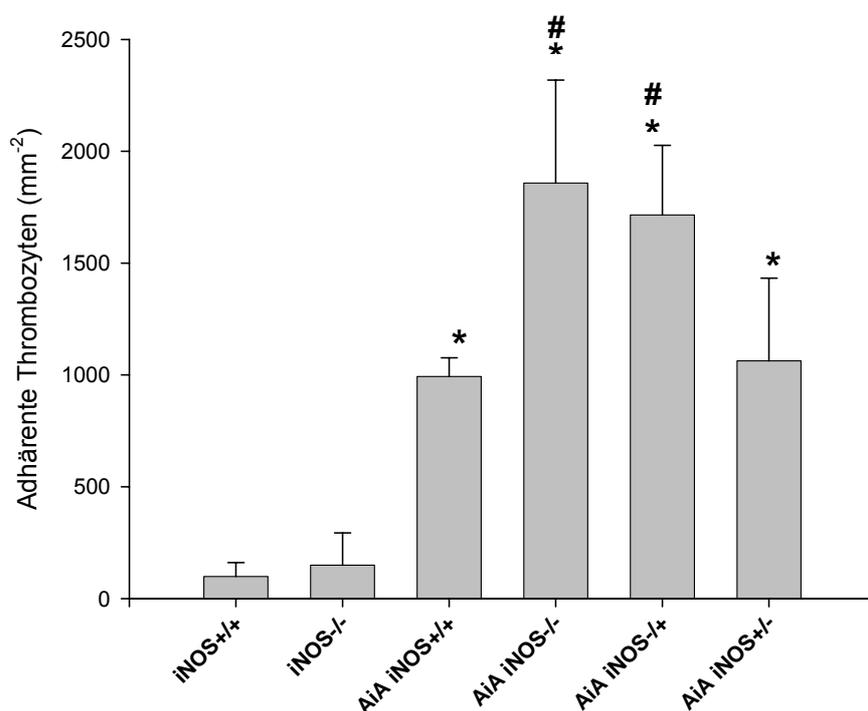


Abb-20: Adhärenz Thrombozyten. Ergebnisse der IVM Aufnahmen am Tag 7. Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ AiA Gruppen vs. Kontrollgruppen; # $p < 0,05$ AiA iNOS -/- und -/+ vs. AiA iNOS +/+ und +/-.

5.4 Leukozyten-Endothelzellinteraktion

Die Leukozyten zeigten in ihrer Interaktion mit dem Endothel Ähnlichkeiten zu der, der Thrombozyten. Rollende und adhärenz Leukozyten wurden in den Kontrollgruppen nur geringfügig festgestellt (Rolling: iNOS +/+ $0,04 \pm 0,02$; iNOS -/- $0,02 \pm 0,001$; Adhärenz: iNOS +/+ $264,4 \pm 37,3 \text{ mm}^{-2}$; iNOS -/- $367,6 \pm 110,7 \text{ mm}^{-2}$). Allerdings fand sich, wie bereits bei den Thrombozyten, ein signifikanter Anstieg der Fraktion rollender Leukozyten und adhärenz Leukozyten bei den arthritischen Tieren im Gegensatz zu den Kontrollen.

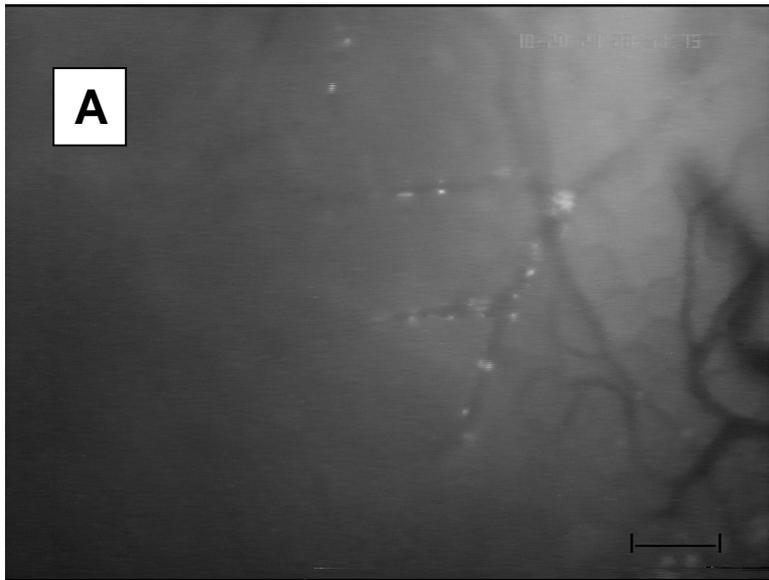


Abb-21: IVM Aufnahmen der mit Rhodamin 6G gefärbten Leukozyten innerhalb der Mikrozirkulation in vivo. (Maßstab: |——| = 50µm)

- A Leukozyten-Endothelzellinteraktion bei einem Kontrolltier
- B Leukozyten-Endothelzellinteraktion bei Mäusen mit AiA

Es konnte nur eine geringe Differenz bezüglich der Fraktion rollender Leukozyten in den arthritischen Gruppen mit unterschiedlichen Versuchs- und Spendertieren verzeichnet werden (AiA iNOS -/+ $0,16 \pm 0,01$; AiA iNOS +/- $0,16 \pm 0,02$).

Ebenfalls befand sich eine geringe Signifikanz der arthritischen Knock-out Gruppe (AiA iNOS -/- $0,18 \pm 0,03$) gegenüber der arthritischen C57/Bl6 Tiere (AiA iNOS +/+ $0,14 \pm 0,01$). Wenn man sich die adhärennten Zellen bei den AiA Gruppen anschaut, so präsentierten sich die Ergebnisse in einem größeren Rahmen, als dies bei den Thrombozyten der Fall war. Die drei arthritischen Gruppen, die in ihrem Versuchsaufbau iNOS defiziente Tiere beinhalteten, zeigten einen signifikanten Anstieg der adhärennten Leukozyten (AiA iNOS -/- $1501,9 \pm 293,4 \text{ mm}^{-2}$; AiA iNOS +/- $1157,1 \pm 97,7 \text{ mm}^{-2}$; AiA iNOS -/+ $1552,9 \pm 153,6 \text{ mm}^{-2}$) im Vergleich zur AiA C57/Bl6 Gruppe (AiA iNOS +/+ $783,9 \pm 44,3 \text{ mm}^{-2}$).

Zusätzlich war ein signifikanter Anstieg zwischen den Mäusen mit endothelial iNOS-defizienten Versuchstieren (AiA iNOS -/+ $1552,9 \pm 153,6 \text{ mm}^{-2}$) im Gegensatz zur Gruppe mit thrombozytär iNOS-defizienten Versuchstieren (AiA iNOS +/- $1157,1 \pm 97,7 \text{ mm}^{-2}$) festzustellen, was schon zuvor bei den Thrombozyten für einen endothelialen Effekt gegenüber dem thrombozytären Effekt sprach.

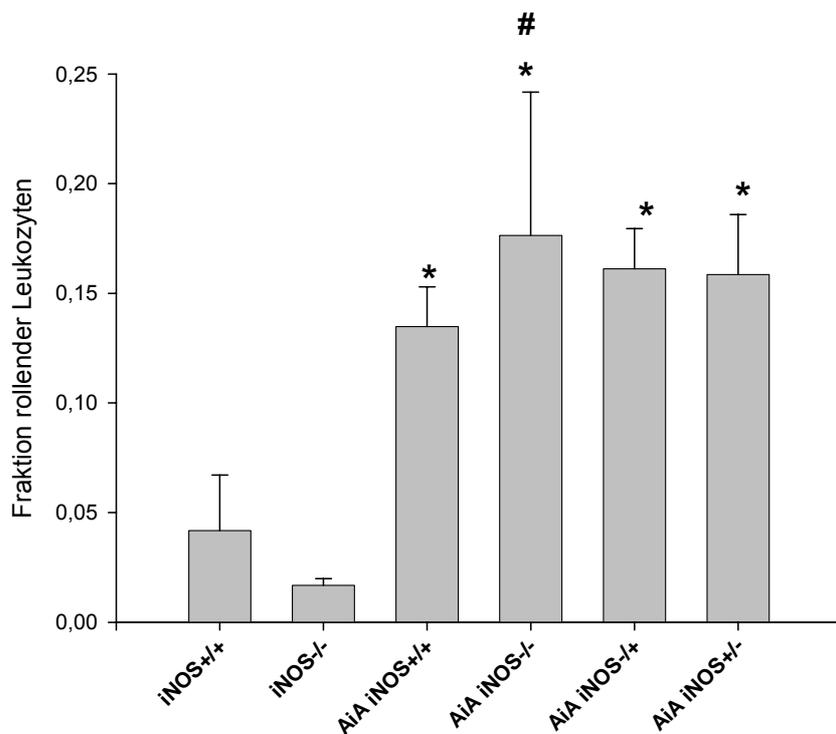


Abb-22: Fraktion rollender Leukozyten. Ergebnisse der IVM Aufnahmen am Tag 7. Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ AiA Gruppen vs. Kontrollgruppen; # $p < 0,05$ AiA iNOS -/- vs. AiA iNOS +/+.

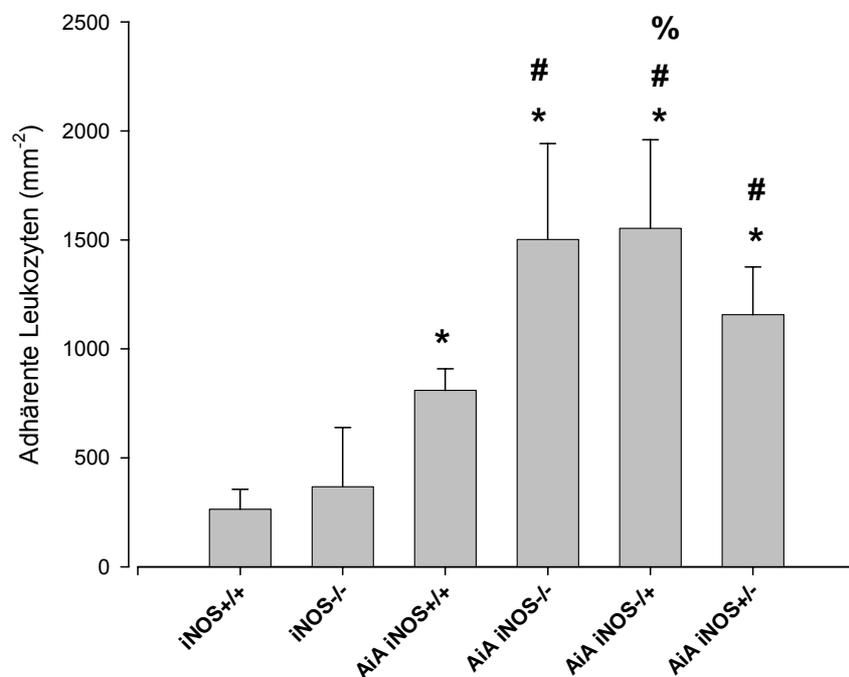


Abb-23: Adhärenz Leukozyten. Ergebnisse der IVM Aufnahmen am Tag 7. Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ AiA Gruppen vs. Kontrollgruppen; # $p < 0,05$ AiA iNOS ^{-/-}, ^{+/-} und ^{-/+} vs. AiA iNOS ^{+/+}; % $p < 0,05$ AiA iNOS ^{-/+} vs. AiA iNOS ^{+/-}.

6. DISKUSSION

6.1 Einleitung

Der umstrittene Begriff „Rheumatismus“ bezeichnet eine Reihe von Erkrankungen. Mittlerweile werden rund 400 Erkrankungen als „rheumatisch“ angesehen. Es handelt sich dabei meist um entzündliche Prozesse mit häufig unbekannter Ätiologie. Diese entzündlichen Erkrankungen präsentieren sich am Stütz- und Bindegewebe des Bewegungsapparates. Die Rheumatoide Arthritis (RA, oder auch chronische Polyarthritis, cP genannt) stellt dabei die häufigste entzündliche Erkrankung der Gelenke dar, noch vor Spondylarthropathien, Kollagenosen oder Vaskulitiden.

In der Entzündungskaskade der RA kommt es zur Präsentation eines Antigens unbekannter Herkunft, welches in Anwesenheit von bestimmter Klasse II-MHC-Antigene spezifische CD4-positive T-Zellen aktiviert.

Ebenfalls extraartikuläre Manifestationen der RA sind bekannt und äußern sich zumeist in einer Vaskulitis, Pleuritis und Peritonitis, allerdings ist die Herzischämie, die bei RA Patienten am meisten zum Tode führende Erkrankung und die Hospital-Mortalität nach einem Infarkt erhöht (74;75).

Im Verlauf einer inflammatorischen Kaskade kommt es zur Freisetzung lytischer Enzyme, Adhäsionsmolekülen, aber auch zu einer gesteigerten Produktion an NO. Diese Faktoren zusammen führen zum Zusammenbruch der Mikrozirkulation und zur konsekutiven Destruktion des betroffenen Gelenkes (1;2).

Leukozyten werden vom entzündeten Gewebe angelockt, dabei werden vor allem Granulozyten für den Gewebeschaden verantwortlich gemacht (76-78), aber auch Endothelzellen scheinen einen entscheidenden Einfluss zu haben und sind mehrfach charakterisiert worden (79;80).

Thrombozyten sind in der letzten Zeit vermehrt in Zusammenhang mit der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion gebracht worden. So konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Thrombozyten mit dem Schweregrad der Entzündung, wie z.B. bei Morbus Crohn, Asthma Bronchiale, Arteriosklerose und RA korreliert (81-84). Auch in Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen der Inflammation zu einem signifikanten Anstieg der Thrombozyten-Endothelzellinteraktionen kam (20).

Die Stickstoffmonoxidkonzentration ist bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis in unterschiedlichen Bereichen, wie Serum, Urin und Synovialflüssigkeit erhöht (25;26;85). Die Schwere aktivierter entzündlicher Arthritis scheint mit der Konzentration an NO zu korrelieren (86). Allerdings ist die Rolle von NO, genauer gesagt der Einfluss der induzierbaren NO Synthase (iNOS) noch nicht eindeutig geklärt, da es sowohl zu pro-, wie aber auch zu anti-inflammatorischen Reaktionen gekommen ist. NO ist an der Regulation der Aggregation und Adhäsion und gleichzeitig auch an der Rekrutierung und Aktivierung der Thrombozyten beteiligt (41;42;53;57;58). Daher war es Ziel der Studie, genauer den Einfluss der iNOS auf die Thrombozyten-Endothelzellinteraktion und die Leukozyten-Endothelzellinteraktion bei experimenteller Arthritis zu untersuchen.

6.2 Diskussion der Methoden

6.2.1 Die Antigen-induzierte Arthritis bei der Maus

In der Studie wurde das Modell der Antigen-induzierten Arthritis genutzt, welches ein etabliertes Tiermodell zur Untersuchung pathophysiologischer Prozesse in der humanen Rheumatoiden Arthritis darstellt. Nachdem Dumonde und Glynn 1962 (62) das auf durch methyliertes bovines Serumalbumin basierende Modell erstmals am Kaninchen zeigten, etablierten es Brackertz et al. bei der Maus und untersuchten dort die arthritischen Veränderungen (61;87-89).

Zusätzlich zur Antigen-induzierten Arthritis gibt es weitere etablierte Formen der Arthritisinduktion.

Die auf zellulärer Ebene ablaufende „Adjuvans-Arthritis“ der Ratte aktiviert primär Makrophagen nach Immunisierung gegen Mykobakterium Tuberculosis durch die Persistenz der öligen Injektionsemulsion. Es kommt zu einer massiven Zytokinproduktion, einer Aktivierung von autoreaktiven B- und T-Zellen, sowie zu einer Bildung autoreaktiver Antikörper gegen Knorpel und schließlich zu einer chronischen Gelenkentzündung. Eine Kreuzantigenität zwischen Mykobakterium-Antigenen und Knorpel-Proteoglykan-Autoantigenen scheint als pathogenetischer Faktor ausschlaggebend zu sein, da ein stark arthrogener T-Zell-Klon, welcher spezifisch für *M. tuberculosis* ist, isoliert werden konnte (90-92).

Eine akute Gelenkentzündung konnte durch die systemische Injektion einer wässrigen Lösung mit Zellwandfragmenten von Gruppe A Streptokokken bei mehreren Mäusen, darunter z.B. BALB/c, DBA/1J und C3H/He, sowie bei einigen Rattenstämmen, induziert werden. Im Vergleich zur AiA kommt es in diesem Tiermodell zu einer starken Schwellung der Hand- und Fußgelenke, welche bereits nach drei Stunden auftritt und nach ca. 2 Tagen ihr Maximum zeigt. Diese Schwellung ist mit Proliferation, Infiltration und Fibrinexsudation in Gelenken und Synovialgewebe verbunden. Diese Krankheitszeichen schwächen allerdings innerhalb einer Woche ab und sind dann fast vollständig verschwunden. Antikörper gegen Peptidoglykane der Zellwände und Komplementfaktoren in der Frühphase konnten nachgewiesen werden und scheinen ätiologisch wichtig zu sein (93). Genauere Mechanismen dieser Streptokokken- Zellwand-Arthritis (SCW) sind jedoch noch nicht geklärt.

Zu einer Schwellung, sowie zu einem Weichteilödem, Pannusbildung, Knorpel- und Knochenerosionen kommt es bei einer kombinierten Immunreaktion des humoralen und zellulären Wegs nach einer Immunisierung mit heterologen Kollagen Typ II und einer öligen Suspension, die mit einem mykobakteriellem Erreger angereichert ist. Diese Kollagen-II-induzierte Arthritis (CIA) scheint aufgrund einer genetischen Prädisposition zu bestehen, da nur DBA/1 H2 Mäuse nach der Immunisierung sichere Anzeichen einer Arthritis, nach ca. 4-6 Wochen, aufweisen (94;95).

Eine weitere Variante der Kollagen induzierten Arthritis, die erst in den letzten Jahren genauer untersucht wurde, ist die Kollagen-Antikörper-induzierte Arthritis, bei der nach Antikörpergabe, z.B. M2139 oder CIIC1 und einer Injektion von Lipopolysacchariden, bereits nach wenigen Tagen eine Schwellung und histologische Veränderung der Gelenke auftritt (96;97).

Allerdings ist bei diesem Modell das Problem, wie bei vielen anderen systemischen Induktionen auch, dass es nicht zu einer spezifischen Schwellung des Kniegelenks, sondern zu einer allgemeineren Schwellung unterschiedlicher Gelenke kommt.

Da die Pathogenese der humanen RA, sowie der AiA sich sehr ähnlich sind und dieses Modell bereits bei Studien zur Untersuchung der Leukozyten etabliert wurde (61;63), wurde dieses Tiermodell für diese Studie gewählt. Zusätzlich kommt es bei der AiA zu einer lokalisierten Schwellung des Kniegelenks, welches als Zugang zur IVM wesentlich besser geeignet ist, als systemische Schwellungen. Auch können hier eine wesentlich größere Anzahl an Mäusestämmen verwendet werden (61).

Der Kniegelenksdurchmesser stieg in unserer Studie bis zu einem gewissen Grad an, zeigte allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen arthritischen Gruppen. Das kann damit erklärt werden, dass sich das Kniegelenk aufgrund der Anatomie nur bis zu einem gewissen Maximum hin ausdehnen kann und nicht darüber hinaus. Lediglich zwischen AiA Tieren und den Kontrollgruppen konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

6.2.2 Die Intravitalmikroskopie

Erfinder der Intravitalmikroskopie war Julius Friedrich Cohnheim, der von 1867-1873 die „Neue Untersuchungen über die Entzündung“ beschrieb und somit die These seines Lehrers Virchow widerlegte, da er die Migration der Leukozyten durch die Gefäßwände beschrieb.

Die Intravitalmikroskopie wird heutzutage in den unterschiedlichsten Bereichen der Forschung verwendet: Gehirn (98;99), Leber (100;101), Herz (102;103), Haut und

Muskel (104;105), Lunge (106), Darm (107), sowie Tumore in der Rückenhautkammer (108).

Es können so Pathomechanismen bei Inflammation, Transplantatabstoßungsreaktion und Autoimmunkrankheiten in vivo präsentiert und untersucht werden.

Durch die Applikation verschiedener Fluoreszenzmarker können so Zellen der einzelnen Gewebe miteinander in vivo dargestellt werden. Für unsere Untersuchungen von immenser Wichtigkeit war es, Leukozyten und Thrombozyten in vivo zeitgleich mit unterschiedlichen Filtern darstellen zu können.

Wichtig für die Durchführung der Versuche sind über eine Zeitspanne von 90-120 min stabile Voraussetzungen bei der Präparation und den anschließenden Aufnahmen. Diese Voraussetzungen sind wichtig, um pathophysiologische Veränderungen bei Inflammation und nach Anwendung von Therapeutika zu untersuchen. Aufgrund der stabilen Mikro- und Makrohämodynamischen Parametern in unserer Studie können wir von konstanten Bedingungen während der Versuche ausgehen.

Mehrere Studien, in denen die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie verwendet wurde, wurden in unserer Arbeitsgruppe, zur Untersuchung der Mikrozirkulation unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen bereits durchgeführt (20;31;60;63;109).

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die IVM eine geeignete Untersuchungsmethode, für die in unserer Studie erhobenen Daten, darstellt. Durch die IVM sind in vivo Einblicke in die Mikrozirkulation möglich, ohne dabei ein, den Versuchsablauf beeinflussendes, Trauma zu setzen.

6.2.3 Fluoreszenzmarkierung

Heutzutage existieren viele Fluoreszenzmarker, mit denen es möglich ist, unterschiedliche Zellen ex vivo und in vivo, teilweise zeitgleich mit verschiedenen Filtern, darzustellen.

Wichtig beim Gebrauch der Fluoreszenzmarker ist, dass diese Stoffe so selektiv wie möglich das gewünschte Gewebe, bzw. Zellen anfärben und gut mit den

vorhandenen Filtern messbar sind. Außerdem sollte die Toxizität möglichst gering gehalten werden.

Für die einzelnen Gewebe/ Zellen in unserer Studie wurden unterschiedliche Fluoreszenzmarker mit teilweise unterschiedlichen Filtern verwendet. Obwohl für die mit CFDA angefärbten Thrombozyten der gleiche Filter verwendet wurde, wie auch für die Anfärbung des Plasmas mit FITC-Dextran, wurden mit FITC die RBC und die FCD bestimmt und somit die Anzahl der jeweils vorbeiziehenden, rollenden und adhärennten Thrombozyten nicht beeinflusst. Auch konnten die Thrombozyten-Endothelzellinteraktionen nicht beeinflusst werden, da die FITC Messungen erst nach den Thrombozyten-Endothelzellinteraktionen gemessen wurden.

Sowohl der Farbstoff CFDA, wie auch FITC-Dextran, basieren beide auf dem Farbstoff Fluorescein. In bereits durchgeführten Studien und in den Dosierungen, die in unserer Studie verwendet wurden, konnte keine, sich auf die Ergebnisse negativ auswirkende, Toxizität festgestellt werden (110;111).

Leukozyten wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G angefärbt. Die relevanten Daten wurden direkt nach der Applikation der Farbstoffe und einer kurzen Anflutungszeit aufgenommen. Die Datenerhebung mittels IVM dauerte in etwa 60 min, wobei bei der von uns applizierten Dosis 99,6% aller Granulozyten angefärbt sind (70). Erst ab einer 100 fach höheren Dosis hemmt Rhodamin die oxidative Phosphorylierung der Mitochondrien, ebenso die phototoxische Wirkung ist auszuschließen (71;111).

Da die Parameter wie Blutdruck, Herzfrequenz und Erythrozytenfließgeschwindigkeit sich über den Zeitraum der IVM Messungen nicht wesentlich verändert haben, können wir davon ausgehen, dass die verwendeten Fluoreszenzmarker, auch im Vergleich zu den NaCl-Injektionen, keinen Einfluss auf die mikrozirkulatorischen Parameter und die Thrombozyten-Leukozytenendothelzellinteraktion genommen haben.

6.2.4 Thrombozytenseparation

Für die Markierung der Thrombozyten existiert bis dato kein Fluoreszenzfarbstoff, mit dem die Thrombozyten in vivo angefärbt werden können. Daher wurden die Thrombozyten einem Spendertier entnommen und ex vivo mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDA markiert und dem Versuchstier intravenös appliziert.

Um eine, durch den Separations- und Labellingprozess, ausgelöste Aktivierung ausschließen zu können, wurde die P-Selektin Expression im Vollblut und nach Separation gemessen. Die Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche dient als Marker für die α -Granula Sekretion und gilt als sensitiver Marker für eine Thrombozytenaktivierung (112). Zwischen Thrombozyten im Vollblut und separierten Thrombozyten konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von P-Selektin festgestellt werden. In beiden Fällen konnte eine immense Steigerung der P-Selektin Expression nach Inkubation mit PMA bestimmt werden. Somit konnte eine Thrombozytenaktivierung durch den Separations- und Labellingprozess ausgeschlossen werden.

Andere Arbeitsgruppen am Institut für Chirurgische Forschung konnten im Rahmen unterschiedlicher Studien gleiche Ergebnisse zeigen (67;113-115).

Ebenfalls die Daten der Kontrollgruppen, bei denen es unter physiologischen Bedingungen nur zu einer geringen Interaktion zwischen den mit CFDA-markierten Thrombozyten und dem Endothel kam, weisen darauf hin, dass es im Rahmen der ex vivo Markierung zu keiner bedeutungsvollen Aktivierung kam.

6.2.5 Einfluss der iNOS auf die Mikrozirkulation

Thrombozyten scheinen in der Pathogenese und Aufrechterhaltung der Rheumatoiden Arthritis involviert zu sein, aber die genauen Mechanismen sind noch nicht geklärt.

Der Einfluss von Stickstoffmonoxid, genauer der induzierbaren NO Synthase, wurde in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht, und auch wenn die Funktion von

NO unterschiedliche Ergebnisse zeigte (116-118), ist die Rolle im Zusammenhang mit der Thrombozyten-Endothelzellinteraktion bei der AiA nicht klar.

Daher haben wir das erste Mal in vivo den Einfluss von NO auf die Thrombozyten-Endothelzellinteraktion bei der AiA analysiert und in einem weiteren Schritt untersucht, inwieweit die gesehenen Effekte auf die endotheliale iNOS oder auf die thrombozytäre iNOS zurückzuführen sind.

In früheren Studien, sowohl aus unserer Arbeitsgruppe, wie auch aus anderen Untersuchungen, konnte bereits den Leukozyten eine wesentliche Rolle an der Aufrechterhaltung der RA zugesprochen werden (63;109;119). Besondere Rolle am schädigenden Effekt der Leukozyten kommt dabei den polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) zu (120-122). Stoffe, die auf molekularer Ebene von Leukozyten freigesetzt werden, zeigen dabei einen gewebeschädigenden Effekt (123-127). Ebenso konnte aber auch durch Inhibition der PMNs eine Reduktion des RA Aktivitätsgrades gezeigt werden (120;128;129). Somit kann man von einem Zusammenhang zwischen der Präsenz von PMNs und dem entstehenden Gewebeschaden ausgehen.

Nach einer lockeren Bindung der Leukozyten an das Endothel kommt es zur Adhärenz der Leukozyten an das Endothel, woraufhin die Transmigration durch das Endothel folgt. Die primäre lockere Bindung der Leukozyten kommt durch so genannte Selektine zustande, die mit Glykoproteinen auf der Partnerzelle korrespondieren (130;131).

Frühere Studien, in denen die Intravitalmikroskopie benutzt wurde, konnten einen Anstieg der Thrombozyten-Endothelzellinteraktion bei der AiA in vivo darstellen (20). Ein Anstieg der Thrombozyten ging meist auch mit einem Anstieg von Entzündungsparametern, wie CRP und Il-6, einher (132-134). Zusätzlich wurde der Zusammenhang von platelet-derived microparticles (PMP) und Thrombozyten in Verbindung mit entzündlichen Prozessen, wie der RA untersucht. Es wurde eine Verbindung zwischen PMPs und der RA hergestellt, wobei die PMP Level mit dem Schweregrad der RA korrelieren. Durch die Bedeutung der PMPs bei kardiovaskulären Erkrankungen, wird vermutet, dass es daher zur verstärkten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität bei der RA kommt (135).

In allen Gruppen unserer Studie konnten wir zeigen, dass alle arthritischen Gruppen einen signifikanten Anstieg der rollenden und adhärenen Thrombozyten und Leukozyten gegenüber den Kontrollgruppen aufwiesen. Diese Ergebnisse bestätigten, was wir aus bereits durchgeführten Studien erwartet hatten (20).

Bei den iNOS defizienten arthritischen Mäusen konnte ein Anstieg der intravital gemessenen Parameter, also der Fraktion rollender und die Adhärenz der Thrombozyten und Leukozyten im Vergleich zu den nicht defizienten Tieren gemessen werden. Ähnliche Ergebnisse, die in der Literatur kontrovers diskutiert wurden, konnten in Ischämie/ Reperfusion Studien des Darms gezeigt werden (136). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass das von den iNOS freigesetzte NO einen eher anti-inflammatorischen Effekt hat, was ferner in Studien mit selektiver und nicht-selektiver NOS Inhibition bestätigt werden konnte (31;137).

Da man davon ausgeht, dass NO einen potenten Inhibitor der Thrombozytenfunktion darstellt, war es in einem weiteren Schritt unser Ziel, den differenzierten Einfluss der endothelialen gegenüber der thrombozytären iNOS zu untersuchen.

Seit längerem ist in der Literatur bekannt, dass Thrombozyten die induzierbare Form der NOS exprimieren (138-140). Thrombozyten scheinen im Vergleich zu anderen Zellen die iNOS auch unter physiologischen Bedingungen zu exprimieren.

Durch eine große Übereinstimmung im Rahmen der Aminosäuresequenz kann man Rückschlüsse vom Tiermodell auf den Menschen schließen (141).

Nach Stimulation kann die iNOS im Verhältnis zu den beiden konstitutiv exprimierten Formen bis zu 10mal soviel NO freisetzen. Der regulative Faktor der iNOS Expression hängt von der Verfügbarkeit von Substrat und Co-Substrat ab (34;35;38).

Das von den Endothelzellen freigesetzte NO reguliert zusammen mit Prostacyclin die Adhäsion und die Aggregation aktivierter Thrombozyten (41;53).

Da die Ergebnisse der iNOS defizienten arthritischen Versuchs- und C57/Bl6 Spendertiere im Vergleich zur arthritischen C57/Bl6 Gruppe erhöht waren, jedoch auf dem gleichen Level wie die iNOS defiziente arthritische Gruppe waren, gehen wir davon aus, dass der endotheliale Effekt hauptsächlich an der Thrombozyten-Leukozytenendothelzellinteraktion beteiligt ist.

Die Gruppe der arthritischen C57/Bl6 Versuchs- und iNOS defizienten Spendertieren zeigte Ergebnisse, die unterhalb derer lag, die bei beiden anderen Gruppen, die iNOS defiziente arthritische Mäuse beinhalteten, ausgewertet wurden. Die Werte lagen auf gleicher Höhe, bzw. minimal erhöht im Gegensatz zur arthritischen C57/Bl6 Gruppe, was der thrombozytären iNOS nur eine untergeordnete Rolle im Zusammenhang der Aufrechterhaltung und dem Entzündungsgrad des Gewebes zukommt.

Ein möglicher Grund, warum die thrombozytäre iNOS keine Ergebnisse auf gleichem Niveau wie die endotheliale iNOS aufwies, könnte sein, dass wir in unserer Studie nur eine gewisse Anzahl an fluoreszenzmarkierten Thrombozyten in das Versuchstier resuspendiert haben. Daher könnte der geringere Prozentsatz eine Erklärung für den geringeren Einfluss der thrombozytären iNOS sein. Da man sowohl bei der Thrombozyten-Endothelzellinteraktion, wie auch bei der Leukozyten-Endothelzellinteraktion geringere Werte für die thrombozytäre iNOS festgestellt hat, scheint es doch relativ klar, dass sich die Thrombozyten und Leukozyten in die gleiche Richtung tendierend beeinflussen. Steigende Werte für die Thrombozyten-Endothelzellinteraktion zeigte auch gesteigerte Werte für die Leukozyten-Endothelzellinteraktion und umgekehrt erniedrigte Ergebnisse für Thrombozyten oder Leukozyten brachte auch verminderte Werte für die jeweilige andere Zellpopulation mit sich.

Geht man also davon aus, dass die endotheliale iNOS einen gesteigerten protektiven Charakter hat, steht das nicht im Gegensatz zur Inhibition der Thrombozyten und/oder Leukozyten. Zusätzlich muss man beachten, dass wir in unserer Studie den Einfluss der iNOS untersucht haben, was den Einfluss der reinen endothelialen NOS nicht berücksichtigt. Man weiß, dass auch die endotheliale NOS (ecNOS) in Thrombozyten vorkommt (142;143), allerdings konnte bei Entzündungsversuchen gezeigt werden, dass die ecNOS sowohl im physiologischen, wie auch im entzündlichen Gewebe nur bis zu einem gewissen Grad exprimiert wird. Die iNOS hingegen zeigte eine wesentlich stärkere Expression von NO im inflammatorischen Gewebe (144).

Der Einfluss der endothelialen iNOS steht zwar im Gegensatz zu Ergebnissen von Freedman et al., allerdings wurde in diesen in vitro Studien lediglich die NOS-

Inhibition mittels L-NAME in einer Plättchensuspension getestet, wo es zu einer erhöhten Aggregation und Sekretion der Thrombozyten führte (57). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten, deren NO-Synthese inhibiert worden war, eine erhöhte Aggregabilität und Sekretion bei später zugegebenen, nicht aktivierten Thrombozyten, induzierten (57). Diese in vitro Studie stützt sich allerdings nur auf separierte Thrombozyten und unterscheidet nicht, unter in vivo Bedingungen, zwischen der endothelialen und thrombozytären iNOS.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Abwesenheit von iNOS, und hier vor allen Dingen der endothelialen zu einer gesteigerten Thrombozyten-Endothelzellinteraktion führt und dies konsekutiv zu einem gesteigerten Gewebeschaden kommen könnte. Somit würde die Anwesenheit von Stickstoffmonoxid einen anti-inflammatorischen Effekt auf die Entzündungsreaktion haben. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die endotheliale iNOS einen, im Vergleich zur thrombozytären iNOS, größeren Einfluss auf die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzellinteraktionen zu haben scheint. Das Stickstoffmonoxid der endothelialen iNOS zeigt daher einen protektiven Charakter. Die Hemmung der Thrombozyten sollte daher keinen Einfluss auf die Protektivität der endothelialen iNOS nehmen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist in ihrem Verlauf progredient und führt meist im Endstadium der Erkrankung zu erheblichen Einschränkungen der Patienten.

Bis heute konnte noch nicht genau geklärt werden, was die Ursache der RA ist, geht man doch von einer multifaktoriellen Ätiologie aus. Im Rahmen einer chronisch inflammatorischen Erkrankung kommt es zu einer proliferierenden Entzündung des Synovialgewebes mehrerer Gelenke und zur konsekutiven Zerstörung von Knorpel und Knochen. Dies kann schmerzhafte Bewegungseinschränkungen, Versteifung der Gelenke und oft einen künstlichen Gelenkersatz zur Folge haben.

Bis dato wurden viele Studien durchgeführt, die den Einfluss des Gefäßendothels mit der Produktion und Sekretion von Zytokinen, der Präsentation von Antigenen, der Einwanderung von immunkompetenten Zellen oder der Leukozytenwanderung untersuchten.

Allerdings existieren bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Studien, die sich mit dem Einfluss der Thrombozyten und der NO Produktion bei der RA beschäftigen.

Bei Inflammation und Gelenkdestruktion bei RA konnten erhöhte Werte von Stickstoffmonoxid (NO) und der induzierbaren Form der NO Synthase (iNOS) festgestellt werden. Thrombozyten nehmen bei Aktivierung eine Formänderung vor und exprimieren vermehrt Stoffe, die zu gesteigerter Aggregation und Adhäsion führen. Zusätzlich kann die Funktion von Leukozyten durch Thrombozyten moduliert werden.

Somit kann den Thrombozyten eine entscheidende Rolle an der Pathogenese der RA zugesprochen werden, genauso wie NO, das im Rahmen der Inflammation hochreguliert wird.

Daher war es Ziel unserer Studie sich mit der Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzellinteraktion bei der RA zu beschäftigen, mit besonderer Beobachtung auf die Auswirkungen von NO, im Besonderen der endothelialen und der thrombozytären iNOS.

Wir haben mit Hilfe der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie die Veränderungen der Thrombozyten- und Leukozyten- Endothelzellinteraktion unter physiologischen und pathologischen Bedingungen untersucht. Alle Untersuchungen wurden nach Antigen-induzierter Arthritis am Kniegelenk der Maus in vivo durchgeführt.

Mit Hilfe von unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern wurde das Plasma, die Leukozyten, sowie nach Thrombozytenseparation und ex vivo Markierung mit CFDA, die Thrombozyten dargestellt und die Parameter gemessen. Die Anzahl an rollenden und adhärenen Thrombozyten und Leukozyten, der Gefäßdurchmesser, die Erythrozytenfließgeschwindigkeit und die funktionelle Kapillardichte wurden bestimmt und später offline am Computer ausgewertet. Der Kniegelenksdurchmesser, histologische und immunhistologische Auswertungen wurden zur Quantifizierung hinzugezogen.

Es wurden insgesamt sechs Gruppen mit C57/Bl6 und iNOS defizienten Tieren verwendet, um in einem ersten Schritt zwischen defizienten und nicht-defizienten Kontroll- und Arthritisgruppen zu unterscheiden und in einem weiteren zwischen endothelialer iNOS und thrombozytärer iNOS.

In allen arthritischen Gruppen konnte eine signifikante Erhöhung der Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzellinteraktion im Vergleich zu den Kontrollgruppen gezeigt werden. Die Ergebnisse zur Differenzierung zwischen dem endothelialen und dem thrombozytären Einfluss zeigten einen vermehrten Anstieg der Thrombozyten- und Leukozytenparameter bei der endothelialen Gruppe und nur einen untergeordneten bei der thrombozytären. Die endotheliale Gruppe befand sich auf dem Level der arthritischen Doppel-Knock-out Gruppe. Die Werte der thrombozytären Versuchstieren präsentierten Daten, die denen der arthritischen C57/Bl6 Gruppe ähnlich waren, bzw. leicht erhöht waren.

Die Ergebnisse der Kniegelenksdurchmesser, sowie der histologischen Scores bestätigten dies, mit einem Anstieg der arthritischen Gruppen. Die immunhistologischen Ergebnisse zeigten eine gesteigerte Expression der iNOS in der C57/Bl6 AiA Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe und keine Expression bei den iNOS defizienten Tieren.

Insgesamt konnte in dieser Studie, anhand der Antigen-induzierten Arthritis, die Wirkung der iNOS auf die Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzellinteraktion

gezeigt werden. Es kam zu einem signifikanten Anstieg, was auch mit einem gesteigerten Gewebeschaden in Zusammenhang stehen könnte. Besonders scheint die endotheliale iNOS an der Aufrechterhaltung, durch Interaktion der Thrombozyten und Leukozyten, des progredienten Verlaufs der AiA beteiligt zu sein.

Somit könnten die Inhibition von Thrombozyten und der protektive Einfluss der endothelialen iNOS zu einer Reduktion des Gewebeschadens führen, und damit von wichtiger, therapeutischer Bedeutung sein.

8. ABKÜRZUNGEN

%	Prozent von Hundert
°C	Grad Celsius
aZ	adhärente Zellen
AiA	Antigen-induzierte Arthritis
ADP	Adenosin Diphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosin Triphosphat
BP	Bandpaßfilter
C57	C57/Bl6-Stamm
CFA	Complete Freund´s Adjuvant
CFDA	Carboxyfluoreszein-Diacetatester
CIA	Collagen-induced arthritis
cNOS	constitutive NO Synthase
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
D-PBS	dulbecco phosphate-buffered saline
DMARD	Disease Modifying Antirheumatic Drugs
ecNOS	endotheliale constitutive NO Synthase
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCD	funktionelle Kapillardichte
FiO ₂	Sauerstoffgehalt Inspiration
FITC	Fluorescein isothiocyanate–dextran
FT	Farbteiler
g	Gramm
GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMWK	High-molecular weight kininogen

iNOS	induzierbare NO Synthase
IVM	Intravitalmikroskopie
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LP	Long pass
LWAR	langwirksame Antirheumatika
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
mBSA	methyliertes bovines Serum-Albumin
min	Minuten
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Wassersäule
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonucleid Acid
MW	molecular weight
NaCl	0,9% Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ncNOS	neuronale constitutive NO Synthase
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PDGF	platelet derived growth factor
PGE	Prostaglandin E
PMA	Phorbol-Mystrate-Acetat
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PMP	platelet derived microparticles
P-Sel	P-Selektin
RA	Rheumatoide Arthritis
RBC	Erythrozytenfließgeschwindigkeit

ROI	Region of Interest
s	Sekunde
SCW	Streptokokken-Zellwand-Arthritis
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
™	Geschütztes Warenzeichen
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VEGF	Vascular Endothel Growth Factor
vWF	von-Willebrand-Faktor
W	Watt

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Stadien der Entwicklung der Arthritis	2
Abbildung 2	Strukturaufbau von Stickstoffmonoxid (NO)	9
Abbildung 3	Synthese von Stickstoffmonoxid und Citrullin aus L-Arginin und Sauerstoff durch die NO-Synthase	9
Abbildung 4	Präimmunisierung, Induktion und Meßzeitpunkte der Antigen-induzierten Arthritis	16
Abbildung 5	Operationssitus	19
Abbildung 6	Vorgehen bei der Präparation	20
Abbildung 7	Technischer Aufbau zur Intravitalmikroskopie	23
Abbildung 8	Strukturformel von CFDA-SE	24
Abbildung 9	Strukturformel von Rhodamin 6G	25
Abbildung 10	Strukturformel von FITC-Dextran	26
Abbildung 11	Gruppenzusammensetzung	29
Abbildung 12	Versuchsprotokoll	30
Abbildung 13	Körpergewicht	33
Abbildung 14	Veränderungen des Kniegelenkdurchmessers	34
Abbildung 15	Histologische Schnitte durch das Kniegelenk der Maus	37
Abbildung 16	Immunhistologische Bilder	39
Abbildung 17	Intravitalmikroskopische Aufnahmen der funktionellen Kapillardichte	42
Abbildung 18	IVM- Aufnahmen der Thrombozyten	44
Abbildung 19	Fraktion rollender Thrombozyten	45
Abbildung 20	Adhärente Thrombozyten	46
Abbildung 21	IVM-Aufnahmen der Leukozyten	47
Abbildung 22	Fraktion rollender Leukozyten	49
Abbildung 23	Adhärente Leukozyten	50

10. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Sewell KL, Trentham DE. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Lancet* 1993; 341(8840):283-286.
- (2) Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996; 85(3):307-310.
- (3) 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.
- (4) Schiemann U, Kellner H. [Gastrointestinal side effects in the therapy of rheumatologic diseases]. *Z Gastroenterol* 2002; 40(11):937-943.
- (5) 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.
- (6) 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; 20(5):879-896.
- (7) Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; 350(25):2572-2581.
- (8) Perez-Gala S, Delgado-Jimenez Y, Goiriz R, Fraga J, Garcia-Diez A, Fernandez-Herrera J. Cytokine-release syndrome related to rituximab limited to lesions and excision scars of lesions of primary cutaneous lymphoma. *Arch Dermatol* 2006; 142(11):1516-1517.
- (9) 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; 556(1-3):190-199.
- (10) Veale DJ, Fearon U. Inhibition of angiogenic pathways in rheumatoid arthritis: potential for therapeutic targeting. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006; 20(5):941-947.

- (11) Blockmans D, Deckmyn H, Vermeylen J. Platelet activation. *Blood Rev* 1995; 9(3):143-156.
- (12) Gear AR. Platelet adhesion, shape change, and aggregation: rapid initiation and signal transduction events. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72(3):285-294.
- (13) Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 1997; 99(9):2118-2127.
- (14) Bubel S, Wilhelm D, Entelmann M, Kirchner H, Kluter H. Chemokines in stored platelet concentrates. *Transfusion* 1996; 36(5):445-449.
- (15) Deuel TF, Senior RM, Chang D, Griffin GL, Heinrikson RL, Kaiser ET. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(7):4584-4587.
- (16) Piccardoni P, Evangelista V, Piccoli A, de Gaetano G, Walz A, Cerletti C. Thrombin-activated human platelets release two NAP-2 variants that stimulate polymorphonuclear leukocytes. *Thromb Haemost* 1996; 76(5):780-785.
- (17) Holt JC, Niewiarowski S. Biochemistry of alpha granule proteins. *Semin Hematol* 1985; 22(2):151-163.
- (18) Evangelista V, Celardo A, Dell'Elba G, Manarini S, Mironov A, de Gaetano G et al. Platelet contribution to leukotriene production in inflammation: in vivo evidence in the rabbit. *Thromb Haemost* 1999; 81(3):442-448.
- (19) Lou J, Donati YR, Juillard P, Giroud C, Vesin C, Mili N et al. Platelets play an important role in TNF-induced microvascular endothelial cell pathology. *Am J Pathol* 1997; 151(5):1397-1405.
- (20) Schmitt-Sody M, Klose A, Gottschalk O, Metz P, Gebhard H, Zysk S et al. Platelet-endothelial cell interactions in murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44(7):885-889.
- (21) de Groot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion. *Br J Haematol* 1990; 75(3):308-312.
- (22) Hantgan RR, Hindriks G, Taylor RG, Sixma JJ, de Groot PG. Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb:IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood. *Blood* 1990; 76(2):345-353.
- (23) Nurden AT. Platelet membrane glycoproteins and their role in platelet adhesion and aggregation. *Agents Actions Suppl* 1986; 20:29-44.
- (24) Ruggeri ZM. New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Semin Hematol* 1994; 31(3):229-239.

- (25) Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992; 51(11):1219-1222.
- (26) Grabowski PS, England AJ, Dykhuizen R, Copland M, Benjamin N, Reid DM et al. Elevated nitric oxide production in rheumatoid arthritis. Detection using the fasting urinary nitrate:creatinine ratio. *Arthritis Rheum* 1996; 39(4):643-647.
- (27) McInnes IB, Leung BP, Field M, Wei XQ, Huang FP, Sturrock RD et al. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med* 1996; 184(4):1519-1524.
- (28) Ueki Y, Miyake S, Tominaga Y, Eguchi K. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996; 23(2):230-236.
- (29) Ialenti A, Moncada S, Di Rosa M. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1993; 110(2):701-706.
- (30) Cannon GW, Openshaw SJ, Hibbs JB, Jr., Hoidal JR, Huecksteadt TP, Griffiths MM. Nitric oxide production during adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1996; 39(10):1677-1684.
- (31) Veihelmann A, Landes J, Hofbauer A, Dorger M, Refior HJ, Messmer K et al. Exacerbation of antigen-induced arthritis in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. *Arthritis Rheum* 2001; 44(6):1420-1427.
- (32) Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(22):9030-9033.
- (33) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327(6122):524-526.
- (34) Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994; 78(6):927-930.
- (35) Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78(6):915-918.
- (36) Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376(6):327-343.
- (37) Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992; 256(5054):225-228.

- (38) Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268(17):12231-12234.
- (39) Hibbs JB, Jr., Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987; 235(4787):473-476.
- (40) McCall TB, Palmer RM, Moncada S. Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. *Eur J Immunol* 1991; 21(10):2523-2527.
- (41) Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2(8567):1057-1058.
- (42) Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, Curran RD, McIntyre LA, Georgescu HI et al. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 1991; 147(11):3915-3920.
- (43) Stefanovic-Racic M, Stadler J, Georgescu HI, Evans CH. Nitric oxide synthesis and its regulation by rabbit synoviocytes. *J Rheumatol* 1994; 21(10):1892-1898.
- (44) Nathan CF, Hibbs JB, Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 1991; 3(1):65-70.
- (45) Liu P, Yin K, Nagele R, Wong PY. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates peroxynitrite generation, but augments neutrophil accumulation in hepatic ischemia-reperfusion in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284(3):1139-1146.
- (46) Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25(4-5):392-403.
- (47) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2):109-142.
- (48) Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell* 1994; 78(6):919-925.
- (49) de Wit C, Jahrbeck B, Schafer C, Bolz SS, Pohl U. Nitric oxide opposes myogenic pressure responses predominantly in large arterioles in vivo. *Hypertension* 1998; 31(3):787-794.
- (50) Pohl U, de Wit C. Interaction of nitric oxide with myogenic and adrenergic vasoconstrictor processes in the control of microcirculatory blood flow. *Pflugers Arch* 1996; 432(3 Suppl):R107-R110.
- (51) Pohl U, de Wit C. A Unique Role of NO in the Control of Blood Flow. *News Physiol Sci* 1999; 14:74-80.

- (52) Pohl U, de Wit C, Gloe T. Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium-dependent dilation. *Acta Physiol Scand* 2000; 168(4):505-510.
- (53) Zoldhelyi P, McNatt J, Xu XM, Loose-Mitchell D, Meidell RS, Clubb FJ, Jr. et al. Prevention of arterial thrombosis by adenovirus-mediated transfer of cyclooxygenase gene. *Circulation* 1996; 93(1):10-17.
- (54) Michelson AD, Benoit SE, Furman MI, Breckwoldt WL, Rohrer MJ, Barnard MR et al. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am J Physiol* 1996; 270(5 Pt 2):H1640-H1648.
- (55) Broekman MJ, Eiroa AM, Marcus AJ. Inhibition of human platelet reactivity by endothelium-derived relaxing factor from human umbilical vein endothelial cells in suspension: blockade of aggregation and secretion by an aspirin-insensitive mechanism. *Blood* 1991; 78(4):1033-1040.
- (56) Lieberman EH, O'Neill S, Mendelsohn ME. S-nitrosocysteine inhibition of human platelet secretion is correlated with increases in platelet cGMP levels. *Circ Res* 1991; 68(6):1722-1728.
- (57) Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest* 1997; 100(2):350-356.
- (58) Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(13):5193-5197.
- (59) Zhou Q, Hellermann GR, Solomonson LP. Nitric oxide release from resting human platelets. *Thromb Res* 1995; 77(1):87-96.
- (60) 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; 198(1):43-54.
- (61) Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 1977; 20(3):841-850.
- (62) DUMONDE DC, GLYNN LE. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol* 1962; 43:373-383.
- (63) Veihelmann A, Harris AG, Krombach F, Schutze E, Refior HJ, Messmer K. In vivo assessment of synovial microcirculation and leukocyte-endothelial cell interaction in mouse antigen-induced arthritis. *Microcirculation* 1999; 6(4):281-290.
- (64) Neumann B, Zantl N, Veihelmann A, Emmanuilidis K, Pfeffer K, Heidecke CD et al. Mechanisms of acute inflammatory lung injury induced by abdominal sepsis. *Int Immunol* 1999; 11(2):217-227.

- (65) Harris AG, Hecht R, Peer F, Nolte D, Messmer K. An improved intravital microscopy system. *Int J Microcirc Clin Exp* 1997; 17(6):322-327.
- (66) Zeintl H, Sack FU, Intaglietta M, Messmer K. Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 1989; 8(3):293-302.
- (67) Manegold PC, Hutter J, Pahernik SA, Messmer K, Dellian M. Platelet-endothelial interaction in tumor angiogenesis and microcirculation. *Blood* 2003; 101(5):1970-1976.
- (68) Tangelder GJ, Slaaf DW, Arts T, Reneman RS. Wall shear rate in arterioles in vivo: least estimates from platelet velocity profiles. *Am J Physiol* 1988; 254(6 Pt 2):H1059-H1064.
- (69) Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 1995; 15(2):85-91.
- (70) Kuebler WM, Kuhnle GE, Groh J, Goetz AE. Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J Appl Physiol* 1994; 76(1):65-71.
- (71) Gear AR. Rhodamine 6G. A potent inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 1974; 249(11):3628-3637.
- (72) Bonney CH, Schmidt RE, Hunter DM, Conley GE. Fluorescein angiography and light microscopy studies of retinas irradiated by oxygen nuclei. *Aviat Space Environ Med* 1977; 48(5):418-423.
- (73) Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp* 1995; 15(5):244-249.
- (74) Maradit-Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Ballman KV, Roger VL, Jacobsen SJ et al. Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Arthritis Rheum* 2005; 52(2):402-411.
- (75) Maradit-Kremers H, Nicola PJ, Crowson CS, Ballman KV, Gabriel SE. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2005; 52(3):722-732.
- (76) Bochner BS. Road signs guiding leukocytes along the inflammation superhighway. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(5):817-828.
- (77) Geng JG. Directional migration of leukocytes: their pathological roles in inflammation and strategies for development of anti-inflammatory therapies. *Cell Res* 2001; 11(2):85-88.

- (78) Lingen MW. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125(1):67-71.
- (79) Geng JG. Interaction of vascular endothelial cells with leukocytes, platelets and cancer cells in inflammation, thrombosis and cancer growth and metastasis. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24(12):1297-1300.
- (80) Sunderkotter C, Mosser D, Ridley A, Sorg C, Roth J. Meeting report: molecular mechanisms of inflammation: how leukocytes come, see and seize. *Eur J Cell Biol* 2003; 82(7):379-383.
- (81) Danese S, Katz JA, Saibeni S, Papa A, Gasbarrini A, Vecchi M et al. Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients. *Gut* 2003; 52(10):1435-1441.
- (82) Danese S, de la MC, Sturm A, Vogel JD, West GA, Strong SA et al. Platelets trigger a CD40-dependent inflammatory response in the microvasculature of inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterology* 2003; 124(5):1249-1264.
- (83) Huo Y, Ley KF. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14(1):18-22.
- (84) Pitchford SC, Riffo-Vasquez Y, Sousa A, Momi S, Gresele P, Spina D et al. Platelets are necessary for airway wall remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Blood* 2004; 103(2):639-647.
- (85) Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126(1):131-138.
- (86) Pham TN, Rahman P, Tobin YM, Khraishi MM, Hamilton SF, Alderdice C et al. Elevated serum nitric oxide levels in patients with inflammatory arthritis associated with co-expression of inducible nitric oxide synthase and protein kinase C- η in peripheral blood monocyte-derived macrophages. *J Rheumatol* 2003; 30(12):2529-2534.
- (87) Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR. Studies on antigen-induced arthritis in mice. III. Cell and serum transfer experiments. *J Immunol* 1977; 118(5):1645-1648.
- (88) Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR, Miller JF. Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *J Immunol* 1977; 118(5):1639-1644.
- (89) Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Miller JA. [Antigen-induced arthritis in mice: genetic and immunologic studies]. *Verh Dtsch Ges Rheumatol* 1978; 5:154-159.

- (90) Kleinau S, Erlandsson H, Holmdahl R, Klareskog L. Adjuvant oils induce arthritis in the DA rat. I. Characterization of the disease and evidence for an immunological involvement. *J Autoimmun* 1991; 4(6):871-880.
- (91) 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; 162(3):962-978.
- (92) 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; 82(15):5117-5120.
- (93) Koga T, Kakimoto K, Hirofuji T, Kotani S, Ohkuni H, Watanabe K et al. Acute joint inflammation in mice after systemic injection of the cell wall, its peptidoglycan, and chemically defined peptidoglycan subunits from various bacteria. *Infect Immun* 1985; 50(1):27-34.
- (94) Trentham DE. Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1982; 25(8):911-916.
- (95) 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; 154(3):688-700.
- (96) Nandakumar KS, Svensson L, Holmdahl R. Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice: description of the disease and the influence of age, sex, and genes. *Am J Pathol* 2003; 163(5):1827-1837.
- (97) Nandakumar KS, Holmdahl R. Efficient promotion of collagen antibody induced arthritis (CAIA) using four monoclonal antibodies specific for the major epitopes recognized in both collagen induced arthritis and rheumatoid arthritis. *J Immunol Methods* 2005; 304(1-2):126-136.
- (98) Kataoka H, Kim SW, Plesnila N. Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24(6):668-676.
- (99) 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; 504(1):159-160.
- (100) Khandoga A, Stampfl A, Takenaka S, Schulz H, Radykewicz R, Kreyling W et al. Ultrafine particles exert prothrombotic but not inflammatory effects on the hepatic microcirculation in healthy mice in vivo. *Circulation* 2004; 109(10):1320-1325.
- (101) Tsuchiya M, Oda M. Recent advances in organ microcirculation research. *Int Angiol* 1987; 6(3):253-270.

- (102) Kupatt C, Wichels R, Horstkotte J, Krombach F, Habazettl H, Boekstegers P. Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion. *J Leukoc Biol* 2002; 72(3):455-461.
- (103) Tillmanns H, Neumann FJ, Tiefenbacher C, Dorigo O, Parekh N, Waas W et al. Activation of neutrophils in the microvasculature of the ischaemic and reperfused myocardium. *Eur Heart J* 1993; 14 Suppl I:82-86.
- (104) 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):125-134.
- (105) Khandoga A, Kessler JS, Hanschen M, Khandoga AG, Burggraf D, Reichel C et al. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil and T cell recruitment and migration in the postischemic liver. *J Leukoc Biol* 2006; 79(6):1295-1305.
- (106) Eichhorn ME, Ney L, Massberg S, Goetz AE. Platelet kinetics in the pulmonary microcirculation in vivo assessed by intravital microscopy. *J Vasc Res* 2002; 39(4):330-339.
- (107) Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998; 92(2):507-515.
- (108) Eichhorn ME, Strieth S, Krasnici S, Sauer B, Teifel M, Michaelis U et al. Protamine enhances uptake of cationic liposomes in angiogenic microvessels. *Angiogenesis* 2004; 7(2):133-141.
- (109) 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; 72(3):293-298.
- (110) Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl)* 1998; 198(1):23-35.
- (111) Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385(4):290-298.
- (112) Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 1985; 101(3):880-886.
- (113) Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998; 92(2):507-515.

- (114) Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Teupser D, Axmann S, Luchting B et al. P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo. *Shock* 2002; 18(6):529-535.
- (115) Massberg S, Schulz C, Gawaz M. Role of platelets in the pathophysiology of acute coronary syndrome. *Semin Vasc Med* 2003; 3(2):147-162.
- (116) De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr. et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96(1):60-68.
- (117) Kurose I, Kubes P, Wolf R, Anderson DC, Paulson J, Miyasaka M et al. Inhibition of nitric oxide production. Mechanisms of vascular albumin leakage. *Circ Res* 1993; 73(1):164-171.
- (118) St Clair EW. Nitric oxide--friend or foe in arthritis? *J Rheumatol* 1998; 25(8):1451-1453.
- (119) Macey MG, Wilton JM, Carbon R, Edmonds S, Perry JD, McCarthy D. Leukocyte activation and function-associated antigens in inflammatory disease. *Agents Actions* 1993; 38 Spec No:C39-C40.
- (120) Hanly JG, Bresnihan B. Reduction of peripheral blood lymphocytes in patients receiving gold therapy for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1985; 44(5):299-301.
- (121) Schulze-Koops H, Davis LS, Haverty TP, Wacholtz MC, Lipsky PE. Reduction of Th1 cell activity in the peripheral circulation of patients with rheumatoid arthritis after treatment with a non-depleting humanized monoclonal antibody to CD4. *J Rheumatol* 1998; 25(11):2065-2076.
- (122) Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R et al. Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1):38-47.
- (123) Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates N-epsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J Clin Invest* 1999; 104(1):103-113.
- (124) Yang YH, Hall P, Little CB, Fosang AJ, Milenkovski G, Santos L et al. Reduction of arthritis severity in protease-activated receptor-deficient mice. *Arthritis Rheum* 2005; 52(4):1325-1332.

- (125) Bush KA, Farmer KM, Walker JS, Kirkham BW. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum* 2002; 46(3):802-805.
- (126) Horneff G, Sack U, Kalden JR, Emmrich F, Burmester GR. Reduction of monocyte-macrophage activation markers upon anti-CD4 treatment. Decreased levels of IL-1, IL-6, neopterin and soluble CD14 in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 1993; 91(2):207-213.
- (127) Thomas R, Carroll GJ. Reduction of leukocyte and interleukin-1 beta concentrations in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Arthritis Rheum* 1993; 36(9):1244-1252.
- (128) Kamel M, Hanafi M, Bassiouni M. Inhibition of elastase enzyme release from human polymorphonuclear leukocytes by N-acetyl-galactosamine and N-acetyl-glucosamine. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9(1):17-21.
- (129) Davis P, Johnston C. Effects of gold compounds on function of phagocytic cells. Comparative inhibition of activated polymorphonuclear leukocytes and monocytes from rheumatoid arthritis and control subjects. *Inflammation* 1986; 10(3):311-320.
- (130) Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76(2):301-314.
- (131) Picker LJ, Warnock RA, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* 1991; 66(5):921-933.
- (132) Ertenli I, Kiraz S, Ozturk MA, Haznedaroglu I, Celik I, Calguneri M. Pathologic thrombopoiesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2003; 23(2):49-60.
- (133) Milovanovic M, Nilsson E, Jaremo P. Relationships between platelets and inflammatory markers in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* 2004; 343(1-2):237-240.
- (134) Bunescu A, Seideman P, Lenkei R, Levin K, Egberg N. Enhanced Fc gamma receptor I, alpha M beta 2 integrin receptor expression by monocytes and neutrophils in rheumatoid arthritis: interaction with platelets. *J Rheumatol* 2004; 31(12):2347-2355.
- (135) Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar MA. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46(6):1498-1503.
- (136) Eisenmenger SJ, Wichmann MW, Angele P, Faist E, Hatz R, Chaudry IH et al. Differences in the expression of LPS-receptors are not responsible for the sex-specific immune response after trauma and hemorrhagic shock. *Cell Immunol* 2004; 230(1):17-22.

- (137) Veihelmann A, Krombach F, Refior HJ, Messmer K. Effects of NO synthase inhibitors on the synovial microcirculation in the mouse knee joint. *J Vasc Res* 1999; 36(5):379-384.
- (138) Chen LY, Mehta JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27(1):154-158.
- (139) Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med* 1995; 125(3):370-377.
- (140) Wallerath T, Gath I, Aulitzky WE, Pollock JS, Kleinert H, Forstermann U. Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. *Thromb Haemost* 1997; 77(1):163-167.
- (141) Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23(6 Pt 2):1121-1131.
- (142) Sase K, Michel T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci* 1995; 57(22):2049-2055.
- (143) Chen LY, Mehta JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27(1):154-158.
- (144) Ishiwata T, Guo F, Naito Z, Asano G, Nishigaki R. Differential distribution of ecNOS and iNOS mRNA in rat heart after endotoxin administration. *Jpn Heart J* 1997; 38(3):445-455.

11. DANKSAGUNG

Die Dissertation wurde am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med U. Pohl in der Arbeitsgruppe der Orthopädischen Klinik und Poliklinik unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med Dipl. Ing. V. Jansson durchgeführt.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med A. Baethmann für die freundliche Aufnahme und Integration in das Institut für Chirurgische Forschung.

Seine Ratschläge, sowie seine konstruktive Kritik haben mich in das wissenschaftliche Denken eingeführt und mir über die Dauer der Arbeit stets geholfen.

Herrn Prof. Dr. med Dipl. Ing. V. Jansson möchte ich ganz herzlich für die Aufnahme in die orthopädische Arbeitsgruppe und das Überlassen des Dissertationsthemas danken.

Ganz besonderer Dank gilt vor allen Dingen meinem Betreuer, Dr. med M. Schmitt-Sody, der mir die Option dieser Arbeit angeboten hat.

Er hat mich an das Modell herangeführt, mir über die ganze Zeit hilfreich zur Seite gestanden und mir sehr geholfen, den wissenschaftlichen Gedanken umsetzen zu können. Er hat mir die wesentlichen Grundlagen, das Modell, das wissenschaftliche Arbeiten, Erheben von Daten und deren Auswertung, sowie deren Integration in wissenschaftliche Kontexte beigebracht. Auch für die Hilfe bei Kongressen, Manuskripten oder anderen Fragen, die auch teilweise über die Arbeit hinausgingen, möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei A. Klose und Dr. med P. Metz bedanken, für die nette Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe und den mir entgegengebrachten Teamgeist.

Grossen Dank auch an Dr. med M. Eichhorn, Dr. med A. Khandoga, Prof. Dr. med N. Plesnila, N. Terpollili und besonders an S. Lüdemann, die mir alle über die Zeit der

Arbeit und darüber hinaus zur Seite standen und mich mit unterschiedlichsten Ratschlägen zum Nachdenken anregten.

Mein Dank gilt weiter den medizinisch-technischen Assistentinnen C. Csapó, S. Münzing, A. Schropp und A. Allmelling bei ihrer Hilfe und Durchführung bei unterschiedlichsten Laborarbeiten und der Erstellung von zahlreichen Abbildungen und deren fachkundige und engagierte Mithilfe.

Darüber hinaus möchte ich Herrn Müller und allen weiteren Mitarbeitern des Instituts sowie allen Doktoranden ganz herzlich für ihre Unterstützung und Hilfe danken.

12. CURRICULUM VITAE

Name: Oliver Gottschalk

Anschrift: Kreittmayrstrasse 17
80335 München

Telefon: 0049-(0)89-41152663
0049-(0)177-8089443

E-Mail: Oliver.Gottschalk@med.uni-muenchen.de

Geburtsdatum: 13.08.1977

Geburtsort: Wuppertal

Eltern: Peter Gottschalk, selbst. Kaufmann
Ursula Gottschalk, geb. Bläsi, kaufm. Angestellte

Geschwister: Sandra Gottschalk, Kauffrau für audiovisuelle Medien

Familienstand: Ledig

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Sprachen: Französisch, fließend in Sprache und Schrift
Englisch, fließend in Sprache und Schrift
Spanisch, erweiterte Kenntnisse in Sprache und Schrift

08/1988–06/1997 Besuch des Burgau-Gymnasium, Düren
Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife, bilingual
(deutsch-französisch) Burgau-Gymnasium, Düren

08/1994–06/1995 Thompson Valley High School,
Loveland, Colorado, USA

1989–1992 drei Austauschprogramme in Frankreich

07/1997–07/1998 Zivildienst im St. Marien-Hospital in Birkesdorf, Düren

1999-2003 Studium der Humanmedizin
Rheinisch-Westfälisch-Technische Hochschule, Aachen

2003-2006 Studium der Humanmedizin
Ludwig-Maximilians-Universität, München

Seit 07/2006 Wissenschaftlicher Assistent
Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum Großhadern
Ludwig-Maximilians-Universität München
(Prof. Dr. med U. Pohl)