

Institut für Röntgendiagnostik, Technische Universität München,
Klinikum rechts der Isar

**Optische Bildgebung der Autoimmunarthritis
mit DiD markierten Leukozyten**

Julia Kau

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigte Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ. - Prof. Dr. E. Rummeny
2. Priv. - Doz. Dr. J. Chr. Stollfuss

Die Dissertation wurde am 05.09.2007 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.05.2008
angenommen.

Ich widme meinen Eltern meine Dissertation um Ihnen für ihre stetige Unterstützung zu danken und mir ermöglicht zu haben meine Dissertation in San Francisco durchführen zu können.

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	2
2.1.	<u>Rheumatoide Arthritis</u>	2
2.1.1	Epidemiologie und Pathogenese	2
2.1.2	Klinische Symptomatik	5
2.1.3	Gelenkveränderungen	5
2.1.4	Diagnostik	7
2.1.5	Therapie	8
2.2	<u>Optische Bildgebung</u>	10
2.2.1	Physikalisches Prinzip	10
2.2.2	Kontrastmittel für die Optische Bildgebung	12
2.2.3	DiD Fluoreszenzfarbstoff	14
2.3	<u>Methoden der Zellmarkierung mit bildgebende Verfahren</u>	15
2.3.1	Zell-Tracking mit der Optischen Bildgebung	15
3	Material und Methoden	16
3.1	<u>Tiermodell</u>	16
3.1.1	Anästhesie	16
3.1.1.1	Inhalationsnarkose	16
3.1.1.2	Injektionsnarkose	17
3.1.2	Gruppe 1 und 2: Arthritisinduktion	18
3.1.3	Gruppe 2: Spender von autologen Leukozyten	18
3.2	<u>In vitro Experimente</u>	19
3.2.1	Pilotstudien	19
3.2.2	Markierung der Leukozyten mit DiD Kontrastmittel	20
3.2.3	Vitalitätstests	22
3.2.4	Substanztestung	23
3.2.5	Optische Bildgebung	23

3.3	<u>In vivo Experimente</u>	25
3.3.1	Pilotstudien	25
3.3.2	Optische Bildgebung von Ratten mit Arthritis	25
3.3.3	Röntgenaufnahmen	26
3.4	<u>Histologie</u>	28
3.4.1	H&E Färbungen und Lichtmikroskopie	28
3.4.2	Fluoreszenzmikroskopie	28
3.5	<u>Datenauswertungen</u>	29
3.5.1	Quantitative Auswertung	29
3.5.2	Qualitative Auswertung	29
3.5.3	Statistik	29
3	Ergebnisse	30
4.1	<u>In vitro Experimente</u>	30
4.1.1	Pilotstudien	30
4.1.2	Vitalitätstests der Kontrastmittel-markierten Leukozyten	34
4.1.3	Substanztestung	36
4.1.4	Optische Bildgebung	37
4.2	<u>In vivo Experimente</u>	38
4.2.1	Pilotstudien	38
4.2.2	Histologie	39
4.2.3	Optische Bildgebung	41
4.2.4	Fusion von Fluoreszenz- und Röntgenaufnahmen	44
4.2.5	Statistik	45

5	Diskussion	47
6	Zusammenfassung	52
7	Summary	54
8	Literaturverzeichnis	56
9	Abbildungsverzeichnis	60
10	Tabellenverzeichnis	62
11	Abkürzungsverzeichnis	63
12	Lebenslauf	64
13	Danksagung	66

1. Einleitung

Die Rheumatoide Arthritis ist mit einer Prävalenz von 1% in der westlichen Bevölkerung eine weitverbreitete Erkrankung (24). Für die Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis kommt den humoralen und zellulären immunologischen Mechanismen, die eine einmal ausgelöste Entzündung weiter unterhalten eine wichtige Bedeutung zu (9).

Die Möglichkeit, die Zellmigration nicht invasiv in vivo darzustellen und zu verfolgen, würde die Diagnostik der RA verbessern und die Beobachtung von Therapieverläufen optimieren.

In der Nuklearmedizin ist auf der experimentellen und klinischen Ebene die Zellmarkierung mit radioaktiven Stoffen und anschließenden Zellverfolgung von markierten Leukozyten in vivo etabliert (1). Szintigraphietechniken mit Tc^{99m} -HMPAO oder In^{111} -Oxim markierten Leukozyten sind weitgehend im klinischen Alltag zur Diagnostik von Entzündungen anerkannt. Zudem wurde vor kurzem die Positron Emission Tomographie (PET) für die in vivo Leukozytenverfolgung eingeführt (1).

Hauptvorteil der Szintigraphie und der PET sind die hohe Sensitivität und die Eigenschaft, eine Ganzkörperdiagnostik durchführen zu können. Nachteile sind die Strahlenexposition des Patienten, die verhältnismäßige kurze Halbwertszeit mancher Isotope und beim PET, die begrenzte Verwendbarkeit und die hohen Kosten dieser Methode.

Die Optische Bildgebung ist eine relativ neue bildgebende Technik, die sich durch eine hohe Sensitivität in der Diagnostik von Entzündungsprozessen auszeichnet (10; 60). Die Optische Bildgebung ist relativ günstig in den Anschaffungskosten, nicht assoziiert mit einer Strahlenexposition für den Patienten und benötigt nur eine sehr kurzen Zeit, ein bis zwei Sekunden, zur Anfertigung der Optischen Bilder.

Hauptnachteile der Optischen Bildgebung sind die geringe räumliche Auflösung und die begrenzte Eindringtiefe des Lichtes in Gewebe, was die Diagnostik von tiefen Strukturen im Körper sehr erschwert, wenn nicht sogar unmöglich macht. Jedoch sollten diese Nachteile nicht für die Diagnostik der Rheumatoiden Arthritis von Bedeutung sein, da bei einer Erkrankung an RA hauptsächlich die kleinen Hand- und Fußgelenke betroffen sind und diese zudem zur Beurteilung des Therapieverlaufs herangezogen werden.

Frühere Studien von Chen et al (10) und Wunder et al (60) haben vielversprechenden Ergebnisse auf dem Gebiet der Arthritisdiagnostik nach Injektion von reinem fluoreszierenden Kontrastmittel erbracht. Soweit uns bekannt ist, wurden noch keine Leukozytenmarkierungen mit der Optischen Bildgebung durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Studie war es, herauszufinden, ob die Optische Bildgebung nach Injektion von ex vivo DiD markierten Leukozyten in der Lage ist, eine synoviale Entzündung aufzudecken. Zudem wurde untersucht, ob die Optische Bildgebung in der Lage ist, zwischen arthritischem und gesundem Kniegelenk und zwischen nicht-therapiertem und Kortison-therapiertem Kniegelenk zu unterscheiden.

2. Grundlagen

2.1 Rheumatoide Arthritis

2.1.1 Epidemiologie und Pathogenese

Die rheumatoide Arthritis ist eine chronische, symmetrische, deformierende Polyarthritits meist unbekannter Ursache. Die Hauptmanifestation betrifft die Gelenke, die Krankheit zeigt jedoch häufig auch zusätzliche systemische, extraartikuläre Manifestationen (46). Sie präsentiert sich mit Schwellungen, Rötungen und Schmerzen in multiplen Gelenken (48). Die rheumatoide Arthritis kommt mit einer Prävalenz von 1% in der erwachsenen Bevölkerung vor. Ihr Häufigkeitsgipfel ist zwischen dem 60. und 75. Lebensjahr. Es erkranken etwa 3 bis 4 mal häufiger Frauen als Männer. Eine familiäre Häufung wird beobachtet. Bei 70% der rheumatoiden arthritischen Patienten sind HLA-Antigene vorhanden, das HLA-Antigen DR 4 spricht für einen schweren (erosiven) Verlauf (24). Die Lebenserwartung sinkt infolge einer Erkrankung an rheumatoider Arthritis im Mittel bei Männern um 7,5 Jahre und bei Frauen um 3,5 Jahre (28).

Historisch wurde die rheumatoide Arthritis vor dem Jahre 1800 kaum beschrieben. Ihre Häufigkeit hat dann im Laufe der Jahre stetig zugenommen. Die höchste Frequenz der rheumatoiden Arthritis wurde in den Industrieländern, insbesondere der amerikanischen Bevölkerung, gefunden (49 n. 39).

Es besteht eine unterschiedliche Auftretungswahrscheinlichkeit der Krankheit in Bezug auf die geographische Lage. So ist zum Beispiel eine sehr hohe Prävalenz bei Pima Indianern (5,3%), den Chippewa Indianern (6,8%), jedoch eine viel geringere Prävalenz von 0,2% bis 0,3% bei Japanern und Chinesen bekannt (44 n.41, n.63, n.14, n.20). Diese geographischen Unterschiede können auf genetische Faktoren und Umwelteinflüsse hindeuten, die die Entstehung der RA beeinflussen.

Ein Hauptrisikofaktor zur Entwicklung der rheumatoiden Arthritis ist eine familiäre Disposition (44). Wie aus der Literatur von Silmann (44) hervorgeht kann mit Hilfe von Zwillingsstudien das Wiedererkrankungsrisiko innerhalb einer Familie ermittelt werden. In Zwillingsstudien werden gleich geschlechtliche eineiige und zweieiige Zwillinge mit einander verglichen. Man nimmt an, dass der Umwelteinfluss bei den Zwillingspaaren gleich ist und somit eine Erhöhung der Erkrankungskongruenz in eineiigen Zwillingen genetischer Ursache sein muss. Finnische und Englische Zwillingsstudien haben bewiesen, dass 50-60% der Erkrankungen im Allgemeinen bei Zwillingen durch geteiltes Erbgut zu erklären ist (31). In einer solchen Zwillingsstudien wurde herausgefunden, dass das Erkrankungsrisiko eines gesunden eineiigen Zwillings, dessen Zwillingsbruder/Schwester an rheumatoider Arthritis erkrankt ist, bei 15% liegt. Dies ist im wesentlichen ein höheres Risiko als bei nicht erkrankten Geschwistern oder das Erkrankungsrisiko der Allgemeinbevölkerung (1%) (49 n.45).

Eine genetische Prädisposition zur Entwicklung der RA liegt bei Vorhandensein des HLA Antigens vor. Das HLA (Histokompatibilitätsantigen) Antigen ist ein menschliches Leukozyten Antigen. Es liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6. Es wurden verschiedene HLA DRB1 Allele gefunden, die mit verschiedenen schweren Krankheitsverläufen assoziiert sind. Das Risiko an der RA zu erkranken ist nicht nur mit einem einzelnen dieser Allele verbunden, sondern mit dem ganzen HLA DRB 1 Genotyp (44 und n.33). Für den Nachweis der RA eignet sich besonders das HLA DRB1 0404 Allel. Individuen, die den heterozygoten Genotyp HLA DRB 0401/0404 tragen, haben ein größeres

Risiko, an RA zu erkranken, als Individuen die nur den einzelnen HLA DRB1 0101 Genotyp tragen (44).

Es können jedoch nur 50% der Erkrankungen mit dem HLA DRB1 erklärt werden (44 n. 31). Zudem ist bei den Zwillingsstudien keine 100% Konkordanz festgestellt worden, was dafür spricht dass andere nicht genetische Ursachen sogenannte Umwelteinflüsse auch eine Rolle bei der Erkrankung an rheumatoiden Arthritis spielen müssen (49). Eine Zahl modernster Studien haben einen Zusammenhang zwischen dem Zigarettenrauchen und der Erkrankung herausgefunden. Raucher entwickeln unabhängig vom Bestehen der Erkrankung rheumatoide Faktoren (44).

Es gibt noch eine Reihe von anderen Risikofaktoren. Ein wichtiger Einflussfaktor für die Entwicklung der Erkrankung ist der Hormonstatus des Patienten. Zum Beispiel ist der Testosteronspiegel bei Männern mit rheumatoider Arthritis niedriger als bei Männern ohne die Erkrankung. Zum anderen wurde in mehreren alten Studien (6) nachgewiesen, dass bei Frauen, die Kontrazeptiva nahmen, die Erkrankungshäufigkeit zurück ging. Eine neuste follow up Studie (17) jedoch widerlegte dies und zeigte das bei Betrachtungen über einen längeren Zeitraum die protektive Wirkung zurückging. Daraus lässt sich nur schließen das die Kontrazeptiva einen aufschiebenden Effekt auf die RA haben, jedoch keinen Schutz vor der Erkrankung bieten. Es besteht keine klare Erklärung für diesen Effekt (44 n. 43).

Nach der Schwangerschaft besteht ein hohes Risiko zur Entwicklung der RA und Frauen, die nach ihrer ersten Schwangerschaft stillen, haben das größte Risiko. In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass die proinflammatorische Wirkung des Prolaktins die Krankheitsentwicklung begünstigt (44 und n. 6, n.7).

„Der Verlauf der RA ist variabel und folgt schubweise einer proliferativen Phase, danach einer destruktiven und degenerativen Phase, um letztlich in die ausgebrannte und terminale Phase zu münden“(9).

Traditionell wurde die rheumatoide Arthritis als eine reine T-Zell vermittelte Krankheit betrachtet, Studien haben jedoch gezeigt, dass T-Zell unabhängige Wege in der Pathogenese, vor allem in den späten Stadien der Erkrankung existieren. Eine genaue Ätiologie der RA ist unbekannt. „Eine wichtige Bedeutung kommt humoralen und zellulären immunologischen Mechanismen zu, die eine einmal ausgelöste Entzündung weiter unterhalten“ (9). Als pathogenetischer Auslöser der Autoimmunerkrankung RA werden unter anderem bakterielle Erreger diskutiert. Wesentliche pathogenetische Elemente sind Makrophagen und Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten (FLS), die Zytokine und Matrix zerstörende Enzyme produzieren. Prostaglandine, Leukotriene, Immunkomplexe, Komponenten des Komplementsystems und Autoantikörper wie Rheumafaktoren oder Kollagen Typ 2 Antikörper besitzen auch pathogenetische Wirkungen (52).

Die RA beginnt mit der proliferativen Phase, bei der es nach initialer Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch Interleukine, zur Freisetzung von Gelatinase B kommt. Diese ist in der Lage, Kollagen Typ 2 zu schneiden und hinterlässt auf diesem Weg immunodominante Peptide, die anschließend durch MHC 2 Moleküle präsentiert werden und somit autoreaktive T-Zellen aktivieren, so genannte REGA-Hypothese:

remnant epitopes generate autoimmunity (9). Als Folge der autoimmun Reaktion zwischen antigen-präsentierenden Zellen und autoreaktiven T-Lymphozyten kommt es zur Auslösung einer Kaskade von Entzündungsreaktionen mit Freisetzung von Entzündungsmediatoren (52). Im Zentrum der immunologischen Reaktion steht die Interaktion von Lymphozyten und Monozyten mit Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. In der Synovialis finden sich Lymphozyten und Plasmazellen, die Immunglobuline vor allem vom TypG produzieren.

Gegen das Fc-Fragment dieser Immunglobuline sind bei 80% der Patienten Autoantikörper sogenannte Rheumafaktoren, meist IgM, gerichtet. Sie bilden zusammen Immunkomplexe die sich in der Synovialis ablagern. Die Entzündung ist zu Beginn auf das vaskularisierte Stratum synoviale beschränkt, die in ihrem akuten Schub zahlreiche neutrophile Granulozyten enthält. Die zunehmende Invasion von makrophagenähnlichen Zellen (Typ A Synoviozyten) sowie die Proliferation von FLS (Typ B Synoviozyten) führt zu einer weiteren Zunahme des Synovialisdurchmessers (24).

Das so entstandene, die Gelenkoberfläche bedeckende, Granulationsgewebe wird als Pannus bezeichnet. Mit dem Verlauf der Erkrankung nimmt der Pannus an Größe zu und wächst schließlich in Knorpel und subchondralen Knochen ein und folglich zerstört.

Oxidativer Stress und veränderte DNA Reparaturmechanismen wie zum Beispiel das p53 Tumor Suppressor Gen, können zu Mutationen führen, die wiederum die Synoviozyten Proliferation und die Knorpelschädigung unterstützen (48). Studien von Lafyatis et al untermauern (29) diese Behauptung indem sie herausfanden, das einige rheumatoide FLS ihre p53 Funktion verloren hatten. Das p53 ist ein Tumor Suppressor Gen, dass den Zellwachstum und Zelltod kontrolliert. Fehlt dieses Gen oder ist es außer Funktion so kommt es zu einem übermäßigen und unabhängigen Zellwachstum, was bei der rheumatoiden Arthritis die Hyperplasie der Synovialzellen erklären würde (61 n. 29, n.3). Man nennt diese unaufhaltsame Zerstörung auch „tumor like proliferation“ (24).

Die RA ist in die destruktive Phase übergegangen.

Es handelt sich in diesem Stadium bereits um einen chronischen Verlauf, indem zunehmend Makrophagen, Lymphozyten, Mastzellen und Lymphfollikel mit Keimzentren im Pannus zu finden sind. Zusätzlich werden Gelenkknorpel und Knochen durch die freiwerdende Enzyme wie Kollagenasen und Zytokine (Interleukin1 TNF a), die nach Aktivierung von Monozyten und Makrophagen von diesen abgegeben wurden, geschädigt (9).

In der terminalen Phase induzieren Zytokine wie IL 1 , TNF a und IL17 Metalloproteasen und Aggrekinasen (48). Die Aggrekinasen spalten das Aggrekan, Hauptproteoglykan des Knorpels, auf und nehmen ihm seine Elastizität und Komprimierbarkeit (61n.54). Der Knorpel verliert einer seiner wichtigsten Eigenschaften. Zusätzlich werden die rheumatoiden Gelenken größtenteils durch die Synthetisierung von Proteasen von Synoviozyten und deren zelluläre Invasion in die Matrix geschädigt (48).

Eine der wichtigsten Proteasen ist Cathepsin K. Cathepsin K kann Kollagen herabsetzen und reguliert gleichzeitig die Knochenresorption und Demineralisierung des Knochens. Unter normalen Umständen wird Cathepsin K von Osteoklasten gebildet, kann aber im Rahmen der RA auch von rheumatoiden Synovium und FLS gebildet werden (61und n.26, n.25). Die RA endet in einer fibrösen oder knöchernen Ankylose (9).

2.1.2 Klinische Symptomatik

Bei den meisten der Patienten wird ein heimtückischer Verlauf beobachtet. Bei einem Drittel der Patienten kann die Krankheit sich in Tagen oder Wochen manifestieren. Die Erkrankung kann schell aggressiv zu Gelenkdestruktionen führen oder schleichend verlaufen (28).

Klinische Symptome der RA sind im Frühstadium unspezifische Allgemeinsymptome, wie Abgeschlagenheit, nächtliches Schwitzen, ev. subfebrile Temperaturen, Myalgien, ev. glanzlose, brüchige Nägel, ev. Pigmentverschiebungen im Bereich des Handrückens und Palmarerythem“(24). Hinzu kommen Ruhe-, Bewegungs- und Dauerschmerzen der betroffenen Gelenken mit einhergehender morgendlicher Gelenksteifheit. Typischerweise sind die Symptome an den Händen am ausgeprägtesten. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es zu Gelenkschwellungen, die Ausdruck der Synovialitis sind, und es kommt zur Herabsetzung der

Greifkraft. Sehnen, Muskeln und periartikuläres Gewebe sind in dem Entzündungskomplex miteinbezogen und äußern sich in Tendovaginitis, Bursitis und Ergüsse. Entzündungen im Handgelenk führen häufig zum Karpaltunnelsyndrom.

Späte Folgen sind fibrös, knöcherne Gelenkversteifungen und Gelenkdeformitäten (52).

Zahlreiche extraartikuläre Komplikationen gehen mit der rheumatoiden Arthritis einher wie Rheumaknoten, rheumatoide Vaskulitis, Sjögren Syndrom, Skleritis und Pleuraperikarditis. Rheumaknoten werden bei 25% bis 50% der Patienten beobachtet. Sie können in Lunge, Herz, Nieren, Dura mater und sehr schmerzhaft am Olecranon vorkommen. Sie sind jedoch meist asymptomatisch (28).

„Histologisch sind Rheumaknoten palisadenförmig angeordneter Wall von Fibroblasten, Epitheloidzellen und mononukleären Zellen um einen fibrinoiden Herd.“(24)

Systemische Manifestationen sind bei 30% der Erkrankten Perikarditis, Splenomegalie und Lymphknotenhyperplasie. Durch IL 1 Inhibierte Erythropoese kann es zu einer normozytären hypochromen Anämie kommen (9).

2.1.3 Gelenkveränderungen

Die Hauptmanifestationsorte der RA sind das Handgelenk (in >85% der Fälle betroffen), das Kniegelenk (80%), die Fußgelenke (80%), das Hüftgelenk (50%) und die Gelenke der Halswirbelsäule (40%).

Beim Handgelenk findet man typischerweise einen symmetrischen Befall der Metakarpophalangealgelenke (MCP), der proximalen Interphalangealgelenke (PIP) und des Processus styloideus ulnae . Aufgrund der HWS Erkrankung kann es zu atlantoaxialen Subluxationen und daraus folgenden neuronalen Symptomen kommen (28).

Im Frühstadium der rheumatoiden Arthritis zeigt sich eine Synovialitis, die makroskopisch mit einer periartikuläre Weichteilschwellung, Rötung und morgendliche Gelenksteifigkeit einhergeht. Histologisch entspricht die frühe Veränderung der Gelenke einer Hyperplasie der Synovialzellschicht. Fokale Fibrinablagerungen und fibrinoide Nekrosen können sich in dieser Phase auch manifestieren (9).

Im Verlauf der Erkrankung sind Demineralisierung gelenknaher Knochenanteile, Auf-lösung der Kortikalis im Bereich der Knochen-Knorpel-Grenze und Gelenkspalt-verschmälerung zu beobachten (52).

Es kommt zu zunehmenden granulierenden Entzündung und Bildung eines Pannus mit ödematösen, gefäßreichen Zotten. Durch Beeinträchtigung der Knorpelernährung kommt es zudem zu zunehmender Knorpel und Knochenschädigungen (9). „Im Spätstadium sind Usuren, Subluxationen mit Achsenabweichungen, postentzündliche Arthrosezeichen und Ankylose zu sehen“(52).

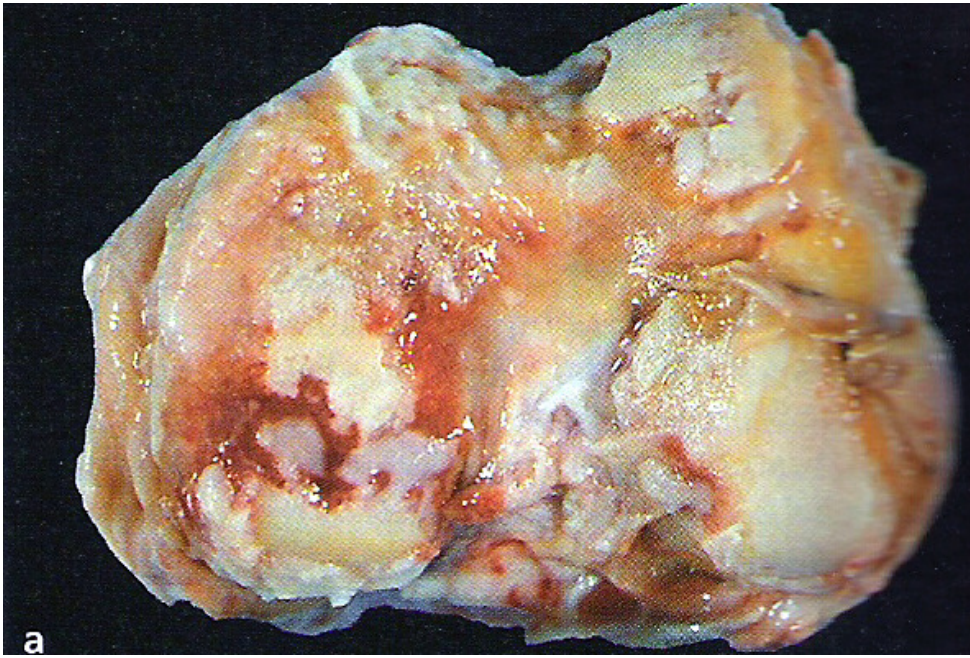


Abb.1: Makroskopie der pannösen Knorpeldestruktion am Kniegelenk (9).

2.1.4 Diagnostik

„Die Diagnostik der rheumatoiden Arthritis beruht nicht auf einem einzigen pathognomonischen Merkmal, sondern auf einem Zusammentreffen typischer Symptome mit klinischen, laborchemischen und radiologischen Befunden“ (52).

Laborchemisch können normochrome oder hypochrome, normozytäre Entzündungs-anämien auftreten. Die Entzündung kann sich mit einer Thrombozytose, erhöhter Blutsenkungsgeschwindigkeit, erhöhtes CRP, erhöhtes Ferritin als auch Akute Phase Proteine, erniedrigte Serumeisen, verringerte Gesamteisenbindungskapazität und erhöhten Serumglobuline darstellen. Bei 90 % der Patienten sind Rheumafaktoren vorhanden, sie sind aber nicht spezifisch für die rheumatoide Arthritis (28).

Es handelt sich dabei um Antikörper, vorwiegend IgM, aber auch IgA und IgG. Die Rheumafaktoren sind gegen den Fc-Teil von körpereigenem IgG gerichtet. In der Synovialflüssigkeit und extraartikulären Geweben sind Immunkomplexe von Rheumafaktoren und IgG nachweisbar und aktivieren das Komplementsystem (9). Die Rheumafaktoren sind jedoch nicht spezifisch für die rheumatoide Arthritis. Hohe Rheumafaktoren Titer werden assoziiert mit dem Vorhandensein von rheumatoiden Knoten und Sprechen für einen schweren und komplizierte Verlaufsform. Rheumafaktoren sind auch bei nicht rheumatoiden Erkrankungen wie Sarkoidose, Endokarditis, Tuberkulose, interstitiellen Lungenkrankheiten und bei 25% der 60 bis 89 Jährigen zu finden.

Zusätzlich findet man in 30% der Fälle antinukleäre Antikörper (ANA) und in 50% der Fälle zirkulierende Immunkomplexe im Serum (24).

Um eine rheumatoide Arthritis zu diagnostizieren müssen mindestens vier der sieben Kriterien der American Rheumatology Association (ARA) gegeben sein:

- Morgensteifigkeit der Gelenke von mindestens 1h Dauer
- Arthritis von 3 oder mehr Gelenkbereichen: Weichteilschwellungen oder Ergussgleichzeitig an mindestens 3 Gelenkbereichen
- Arthritis der Hand- oder Fingergelenken: Schmerz + Schwellung von Handwurzelgelenken, proximalen Interphalangealgelenken (PIP) oder Metakarpophalangealgelenken (MCP)
- Symmetrische Arthritis: Gleichzeitiger Befall desselben Gelenkbereiches beider Körperhälften
- Rheumaknoten: subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen oder Extensorflächen oder im juxtaartikulären Bereich
- Nachweis von Rheumafaktoren im Serum
- Typische Röntgenveränderungen der Hände: Gelenknahe Osteoporose u./o. Erosionen, Dekalzifizierungen

Mindestens einer der vier ersten Kriterien muss für mindestens 6 Wochen bestehen. Der Rheumafaktor ist nur ein Kriterium muss jedoch vorhanden sein, um die Diagnose einer rheumatoiden Arthritis zustellen.

Radiologisch wird die rheumatoide Arthritis nach Steinbrockner eingeteilt.
Röntgenstadien:

- 1.St.: Gelenknahe Osteoporose
- 2.St.: Zusätzlich beginnende Knorpel- und Knochendestruktion
- 3.St.: Zusätzlich beginnende Subluxationen / Fehlstellungen
- 4.St.: Gelenkzerstörung mit Nachweis von Synovialhyperplasie und Knorpel / Gelenkschäden

Andere diagnostische Verfahren, die jedoch in der klinischen Praxis einen deutlich geringeren Stellenwert als die konventionelle Röntgendiagnostik haben, sind die Arthrosonografie zum Nachweis von Pannusbildungen und Ergüssen, die Magnetresonanztomographie zur direkten Darstellung der Synovialitis und genauen Darstellung der Gelenkstrukturen sowie die Szintigraphie zum Nachweis der Gelenksentzündungen (24).

2.1.5 Therapie

Der vielfältige und chronische Verlauf der rheumatoiden Arthritis bedarf einer Therapie mit verschiedenen Ansatzpunkten. „Eine effektive Therapie in den ersten beiden Jahren nach der initialen Diagnose entscheidet oft über den weiteren Krankheitsverlauf“ (24). Die ersten Eckfeiler der Behandlung und der Rehabilitation sind die Physiotherapie und die Ergotherapie, welche die Funktionseinschränkung und die krankheitsbedingten Einschränkungen im Alltag verbessern (52).

Chirurgische Interventionen umfassen die Synovektomie, Denervationen und Einsatz von Prothesen. Im frühen Krankheitsbeginn ist eine Synovektomie ein Therapieansatz. Eine Synovektomie kann die Gelenkzerstörung und die Zerstörung der extraartikulären Strukturen verzögern. Eine Reduktion der Schmerzen durch eine Denervation ist meist auch gegeben. Im Spätstadium kann bei massiven Gelenkdeformitäten eine Gelenkversteifung oder der Einsatz von Prothesen oft das einzige Mittel gegen die starken Schmerzen sein (52).

Die medikamentöse Therapie basiert auf den nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR), den Glukokortikoiden und den Basistherapeutika (=DMARD= Disease Modifying Antirheumatic Drugs).

Die nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) können die klinischen Symptome lindern, haben jedoch keinen Einfluss auf die Knorpelzerstörung oder den weiteren Krankheitsverlauf (28). Die NSAR wirken analgetisch, antipyretisch und antiphlogistisch.

Es werden zwei Gruppen der NSAR unterschieden: die nicht-selektiven Cox Inhibitoren mit Säurecharakter und die selektiven Cox2 Inhibitoren. Cyclooxygenasen (Isoenzym 1 und 2) verstoffwechseln Arachidonsäuren zu Prostaglandinen, Thromboxan, Prostacyclin und Leukotriene. Prostaglandine schützen die Magenschleimhaut vor körpereigener Magensäure, steigern die Schmerzempfindlichkeit, rufen charakteristische Symptome einer Entzündung (Schmerz, Schwellung, Rötung und Überwärmung) hervor und besitzen vasodilatatorische Eigenschaften. Thromboxan fördert die Blutstillung, stimuliert die Thrombozytenaggregation und führt zu einer Engstellung der Gefäße. Prostacyclin hemmt auch die Thrombozytenaggregation und macht eine Vasodilatation der Gefäße. Leukotriene erhöhen die Gefäßpermeabilität und locken chemotaktisch neutrophile Granulozyten an.

Wirkmechanismus der nicht-selektiven Cox Inhibitoren ist die reversibel Hemmung der Cyclooxygenase sowohl von Isoenzym 1 als auch von Isoenzym 2. Folglich werden weniger Produkte der Arachidonsäure gebildet. Zu den nicht-selektiven Cox 1 / 2 Inhibitoren gehören Propionsäurederivate (z.B. Ibuprofen), Arylessigsäurederivate (z.B. Diclofenac, Naproxen)

und Enolsäuren (z.B. Azapropazon). Leider führen alle nicht-selektiven Cox1 / 2 Inhibitoren bei längerer Einnahme neben zahlreichen Nebenwirkungen zu 30% gastrointestinale Nebenwirkungen wie Ulcera, Blutungen und Perforationen (30).

Bei den selektiven Cox2 Inhibitoren sind die gastrointestinalen Nebenwirkungen um 50% geringer. Zu ihnen zählt man das Rofecoxib und das Celecoxib (24). Auf Grund der Fähigkeit der selektiven Cox2 Inhibitoren selektiv nur das Cox 2 Isoenzym zu hemmen, sind diese in der Lage Entzündungsreaktion zu drosseln ohne auf das Isoenzym Cox1 zu wirken, welches für die Protektion der Magenschleimhaut zuständig ist (30).

Glukokortikoide haben antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkungen. Sie reduzieren die Gelenkerosionen, wenn sie über einen längeren Zeitraum genommen werden (z.B. Prednisolon 7,5mg über 2 Jahre). Niedrige Dosen an Glukokortikoiden können mit DMARD kombiniert werden. Zur Therapie bei akutem Schub der Krankheit mit systemischen Symptomen können Glukokortikoiden nützlich sein. Bei einer Therapie mit Glukokortikoiden sollte die Dosis möglichst niedrig gehalten werden, um Nebenwirkungen wie Osteopenie, Hautatrophie und Infektanfälligkeit vorzubeugen. Begleitend mit Glukokortikoiden sollten den Patienten Vitamin D und Kalzium verabreicht werden, um der Osteoporose entgegen zu wirken.

Die DMARDs modifizieren den pathologischen Prozess. Es gibt noch keine eindeutige Regel zur Verabreichung dieser Medikamente. Die Therapie mit mehreren Medikamenten aus dieser Substanzgruppe ist aber allgemeiner Standard. Methotrexat ist das am häufigsten eingesetzte DMARD (28). Methotrexat ist ein Folsäureantagonist mit immunsuppressiver Wirkung (30). Weitere Basismedikationen sind Leflunomide, Sulfasalazin, Hydroxichloroquin, Penicillamine, Azathioprine, Cyclosporine, Cyclo-phosphamide, Goldsalze, Anti-TNF-a und IL 1Rezeptorantagonisten (28).

Relativ neue Therapieansätze umfassen die Anti-TNF-a Therapie und die IL1 Rezeptorantagonist Therapie (48). Die TNF a Inhibitoren neutralisieren das umgebende TNF a im Blut und im Gewebe. Ein Drittel der Patienten sprechen sehr gut auf diese Therapie an. Forschungsergebnisse von Wendling et al haben gezeigt, dass Anti-IL-6 Rezeptorantikörper nahezu genauso effektiv sind wie die Anti-TNF a Therapie (48).

Weitere neue Therapieansätze, aus der Tumorthherapie übernommen, beschäftigen sich mit Medikamenten, die die Angiogenese der Entzündungsreaktion hemmen. Zum Beispiel werden Anti-VEGF-Antikörper zur Anti-Angiogenese Therapie eingesetzt.

Es ist eine Form der Immuntherapie bei der sich monoklonale Antikörper spezifisch an den VEGF (=vascular endothelial growth factor) binden und diesen folglich in seiner Aufgabe der Gefäßneubildung hemmen. Die Neovaskularisation im entzündeten Bereich wird unterdrückt (24). Neure Forschungsergebnisse von Vita haben mit einer B-Zell vermittelten Therapie mit Rituximab, welches an das CD 20 bindet, effektive Erfolge in der 2. Phase der Klinischen Studie gehabt (48).

2.2 Optische Bildgebung

2.2.1 Physikalisches Prinzip

Die optische Bildgebung kann unterschiedliche Prozesse darstellen: die Fluoreszenz und die Biolumineszenz. Der Hauptunterschied zwischen den beiden ist, dass die Fluoreszenz nach Anregung durch eine Lichtquelle entsteht, während die Biolumineszenz spontan (ohne externe

Anregung) durch chemische Reaktionen entsteht. Biolumineszenz kommt in der Natur zum Beispiel bei Leuchtkäfern und Quallen vor (55 n.36).

Der Nachweis der Fluoreszenz mittels optischer Bildgebung kann auf drei verschiedenen Arten erfolgen:

- Über zellgebundene fluoreszierende Substanzen
- Über aktivierbare fluoreszierende Substanzen
- Über Fluoreszenz modifizierter Gene

Die Optische Bildgebung von Fluoreszenzen basiert auf der spektralen Veränderung zwischen der Emissionswellenlänge und der Erregungswellenlänge. Wenn eine Fluoreszenz bei einer spezifischen Wellenlänge erregt wird, absorbieren die Elektronen eines Moleküls die Energie der Photonen und werden so auf ein höheres Energielevel gehoben ($S1'$). Für dieses Molekül ist dieser Zustand, ein Zustand höherer Elektronik und Vibration. Als nächstes entspannt sich das Elektron wieder zum Vibrationsgrundzustand dieses erhöhten elektronischen Zustandes ($S1$). Die Elektronen befinden sich nun auf einem mittleren Energielevel. Das bedeutet, dass ein Teil der Energie an die Umgebung weitergegeben worden ist ohne Emission (55 n.2). Von diesem mittleren Level kehren die Elektronen zurück in ihren energetischen Ausgangszustand. Während diesem letzten Prozess gibt das Elektron mit einem Mal seine ganze Energie in Form von Licht ab, seine sogenannte Emission (55).

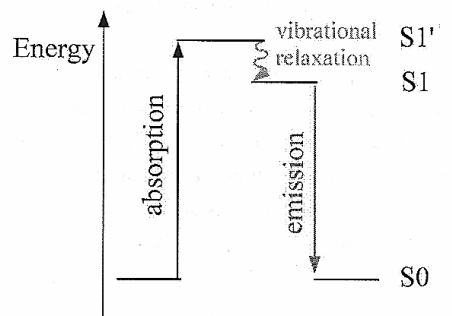


Abb. 2: Das zugrundeliegende Prinzip der Fluoreszenzen zur Optischen Bildgebung (55)

Die Grundlage der optischen Bildgebung mit fluoreszierenden Substanzen besteht darin, dass eine Lichtquelle das Objekt mit einer bestimmten Wellenlänge anleuchtet und eine CCD Kamera das emittierende Licht mit der veränderten Wellenlänge sammelt (50).

Ein Gerät für die Erstellung optischer Aufnahmen ist aus mehreren Komponenten aufgebaut. Es bedarf einer, die Fluoreszenz anregende, Lichtquelle, was im Falle der Optischen Bildgebung ein Laser ist. Der Laser besitzt die Eigenschaft auf verschiedenen Wellenlängen getriggert werden zu können um eine spezielle Fluoreszenz anzuregen. Der Laser muss in der Lage sein eine große Spektralenbandbreite an Wellenlängen vom tief roten Bereich bis zum nah Infrarot Bereich zu erzeugen. Der Laser wird über ein Faserbündel in das angeschlossene Gerät der Optischen Bildgebung geleitet. An der Austrittsstelle des Lasers ist ein Filter vorgeschaltet um sicherzustellen das nur mono-chromatisches Licht auf das zu untersuchende Objekt trifft. Die Emission der Fluoreszenz wird von einer mit flüssigen Stickstoff gekühlten CCD Kamera optisch festgehalten. Vor der Linse der CCD Kamera ist wiederum ein Filter vorgeschaltet, damit gewährleistet ist, dass das korrekte Spektrale Fenster, korrespondierend zur Emissionswellenlänge, der zu untersuchenden Fluoreszenz aufgenommen wird. Ein Laptop Computer operiert das ganze System. Um Irritation durch Tageslicht oder anderer Lichtquellen zu vermeiden, muss das ganze System in einen lichtundurchlässigen Behälter integriert sein.

CCD Kameras funktionieren über die Umwandlung von Lichtphotonen mit Wellenlängen von 400nm bis 1000nm, die mit einer Energie von 2-3eV die Pixel der CCD Kamera treffen, in Elektronen. Der CCD (Charged coupled device) Detektor ist aus dünn geschnitten Silikon Kristall Platten angefertigt. Eine Eigenschaft von auf Silikon basierten Detektoren ist die hohe Sensitivität gegenüber Licht, die es ihnen ermöglicht, selbst Licht im Infrarotbereich zu erfassen. Der CCD-Chip (512 mal 512 Pixel) ist sehr Temperatur empfindlich. Bei zu hohen Temperaturen kommt es zu einem vermehrten thermal bedingten Hintergrundrauschen (50). Für eine optimale optische Bildgebung kann die CCD Kamera und der LN/CCD Detektor mit Hilfe von flüssigem Stickstoff auf Temperaturen unter Null Grad gekühlt werden.

Da der infrarot Laser der optischen Bildgebung nur eine Eindringtiefe von 3 bis 4 cm unterhalb der Haut hat, werden tiefere fluoreszierende Moleküle nicht angeregt und können somit auch kein Licht emittieren (15).

2.2.2 Kontrastmittel für die optische Bildgebung

Ein effektiver Fluoreszenzfarbstoff für die Optische Bildgebung muss sowohl die Eigenschaft besitzen lokalisiert in eine Zelle oder Organelle eingeführt zu werden, als auch die Fähigkeit zu besitzen in diesem für einen längeren Zeitraum zu verbleiben. Wenn der Fluoreszenzfarbstoff in lebenden Zellen oder Gewebe genutzt wird muss er biologisch träge und nicht toxisch sein (21).

Für die Optischen Bildgebung geeignete Fluoreszenzfarbstoffe sollten idealer Weise bestimmte Kriterien erfüllen (5):

- Erregungs- und Emissionsmaximum im Nahen Infrarot Bereich (650-950nm)
- Hoher Extinktionskoeffizient
- Hohes Quantumsergebnis (hohes Fluoreszenzsignal)
- Kein Bleichen der Fotos
- Kein Foto Sensibilisierungseffekt
- Hydrophilie
- Geringe Toxizität

Zur Zellmarkierung eignen sich folgende Fluoreszenzfarbstoffe (22):

- Thiol-reaktive Zelltracer, geeignet zur permanenten Zytoplasmamarkierung z.B. bei transplantierten Zellen und Gewebe
- Polare Tracer, geeignet zur vorübergehenden Zytoplasmamarkierung z.B. bei Erforschung von Zell zu Zell Fusionen
- Nisslpräparate, geeignet zur retrograden Markierung von Neuronen
- Dextran Konjugate, geeignet zur Markierung von Zellreihen
- Proteine und Proteinkonjugate
- Lipophile Kohlestoffzyane, geeignet zur Membranmarkierung von Zellen

Zyanfarbstoffe sind auf Grund ihrer idealen Eigenschaften die bekanntesten Substanzen für die optische Bildgebung. Vorteile der Zyanfarbstoffe sind, dass sie einen hohen Extinktionskoeffizient mit den gewünschten Absorptions- und Emissionswellenlängen vom sichtbaren bis zum Nahinfrarot Wellenlängenbereich besitzen. Denn Licht in der Nähe des Infrarotbereichs (650nm-900nm) kann leichter Gewebe passieren, da die Absorption von Wasser und Hämoglobin relativ schwach in diesem Spektrum (diagnostisches Fenster) ist. Gleichzeitig können Zyanfarbstoffe an spezifischen Liganden gekoppelt werden, was zu molekularer Spezifität innerhalb der optischen Proben führt (5 und n. 4). Zellen sind in der Lage eine hohe Konzentration an lipophilen Kohlestoffzyan zu tolerieren und eine laterale Fusion der Zyane in die Zellmembran führt zur Anfärbung der ganzen Zellen. Es kommt in der Regel nicht zu einem Farbstoff-transfer zwischen benachbarten Zellen. Besonders gut geeignet sind sie zudem da es sich um aktivierbare fluoreszierende Substanzen handelt. Sie existieren zuerst in einem stillen Zustand ohne Emissionssignal. Sobald es jedoch zu einer Interaktion mit Enzymen in vivo kommt, strahlen sie nach einer Anregung Licht aus (55 n. 36,n. 11) Vorteil dieser Substanzen ist die Reduktion der Hintergrundsignale, den nur fluoreszierende Substanzen am Zielort geben ein Emissionssignal ab. Unter optimalen Bedingungen ist das emittierte Licht aus den Fluoreszenzproben proportional zu der Konzentration an bestehender Fluoreszenzprobe. Nur bei sehr hohen Konzentrationen wird das Verhältnis unlinear, das verdankt der Farbstoff seiner hohen Dichte (55)

Nachteil der Zyanfarbstoffe ist die Tatsache, dass sie wegen ihrer langen Verweildauer in den Zellmembranen, nur für Langzeitmarkierungen geeignet sind (22)

2.2.3 DiD Fluoreszenzfarbstoff

Der DiD Fluoreszenzfarbstoff (Vybrant® cell Labeling solution, molecular probes, Oregon, USA) ist ein lipophiler Kohlenstoffcyan DiIC₁₈ (5) Marker.

Er besitzt ein molekulares Gewicht von 1052.08 und seine molekulare Formel lautet:



Das DiD ist schwach fluoreszierend im Wasser, aber stark fluoreszierend und ziemlich photostabil wenn es in eine Membran eingebaut ist. Es besitzt einen sehr hohen Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 193,000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, so dass selbst ein schwaches Anregungslicht in tiefen Gewebe für die Anregung ausreichend ist (55). Es hat nur eine mittlere Quantumsausbeute. Das DiD besitzt sein Anregungsmaximum bei 644nm und sein Emissionsmaximum bei 665nm (22).

DiD: C₆₇H₁₀₃ClN₂O₃S Vybrant® Zellmarkierungslösung, Molecular Probes

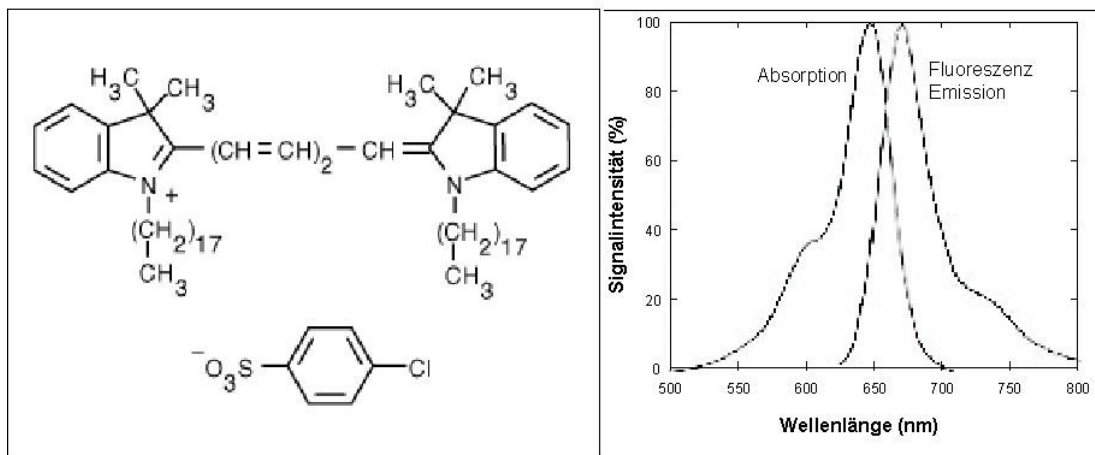


Abb. 3: Molekulare Struktur des DiD; Absorption- (linke Kurve) und Emissionsspektrum (rechte Kurve) des DiD (21).

2.3 Methoden der Zellmarkierung mit bildgebende Verfahren

2.3.1 Zell-Traking mit der optischen Bildgebung

Die fluoreszenzoptischen Verfahren für die molekulare Bildgebung sind auf Grund ihrer erhöhten Lichtstreuung in Geweben in ihrem Tiefenlimit auf cm beschränkt, haben aber einen hohen Nutzen im diagnostischen Fenster im Nahinfrarot Bereich. Leider besitzen sie eine nicht so hohe anatomische Auflösung wie das MRT. Vorteil der optischen Bildgebung sind die geringen Kontrastmittelkonzentrationen, die niedrigen Kosten, fehlende Strahlenexposition und die Schnelligkeit mit dem ein Bild im Sekundenbereich angefertigt werden kann (59). Bei der Zellmarkierung mit der optischen Bildgebung handelt es sich um ein nicht invasives Verfahren. Die zwei Hauptvorteile der fluoreszierenden Bildgebung sind nach Spergel et al (47) das sie in lebenden und fixierten Zellen/Geweben gemacht werden kann und es kein Substrat für ihre Sichtbarmachung braucht.

Es existieren zahlreiche Studien mit Fluoreszierenden Farbstoffen, die mit Proteinen oder Enzymen gekoppelt sind. So zum Beispiel eine Studie zur rheumatoiden Arthritis von Weissleder (59 n. 57) bei der ein fluoreszenzzierendes Kontrastmittel injiziert wurde, welches eine Schnittstelle enthielt, die durch Cathepsin B gespalten werden konnte. Die Spaltung des Kontrastmittels in den arthritischen Gelenken führte zur Aktivierung der Fluoreszenz. Die Zellmarkierung in der optischen Bildgebung ist noch nicht so weit verbreitet. Die in vivo Studie zur experimentellen Arthritis von Hansch (18) befasste sich mit der optischen Bildgebung von Makrophagen. Die Makrophagen wurden mit einem F4/80 monoklonalen Antikörper, der mit Cy5.5 Fluorochrom markiert war, an ihrem F4/80 Antigen an der Oberfläche markiert. Mit der Infiltration des rheumatoiden Gelenkes durch die Makrophagen, konnte mit der optischen Bildgebung im entzündeten Gelenk eine fluoreszierende Intensität gemessen werden.

3. Material und Methode

Die Studie wurde durch das Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) der University of California, San Francisco, am 20.04.04 begutachtet und genehmigt. (Genehmigungsnummer A287-24049-01A)

3.1 Tiermodell

Bei den Versuchen zu dieser Arbeit wurden insgesamt 16 weibliche Sprague Dawley Ratten (Charles River Laboratories Inc. Wilmington, MA) mit einem Alter von drei bis vier Wochen und einem Gewicht zwischen 150g und 320g verwendet.

Die Tiere wurden in Makrolon-Käfigen Typ mit Gitterrostabdeckung (Ancore Corp.) in Gruppen zu je drei Tieren gehalten.

Das Einstreu besteht aus Papierschnitzeln und wurde einmal in der Woche gewechselt. Trinkwasser aus Flaschentränken und Futter (5008 rat chow, PMI Lab. Diet) standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. In dem fensterlosen Raum wird der Tag-Nacht-Rhythmus über ein automatisches Beleuchtungsprogramm geregelt. Die Tag und Nachtphasen wechseln sich alle 12 Stunden ab, eine Dämmerungsphase fehlt.

Die Rattenhaltung erfolgte unter sterilen Verhältnissen in einzelbelüftenden Käfigen in einem klimatisierten Raum bei 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 29%.

Der Transport zum Optical Imager erfolgte in den Käfigen umhüllt von einer lichtundurchlässigen Papiertüte.

„Bei dieser experimentellen Studie wurden Ratten gewählt, da die Antigen-induzierte Arthritis in Ratten in früheren Arbeiten als anwendbares Modell für die Rheumatoide Arthritis im Menschen charakterisiert worden ist.“ (53 n. 27) Die Antigen induzierte Arthritis zeigt Merkmale der Rheumatoiden Arthritis in ihrem histologischem Bild vom entzündeten Gelenk, Teile des klinischen Bildes und dem Ansprechen auf spezifische Therapien. In beiden Fällen entsteht eine akut entzündete Synovialmembran mit einer villösen Hyperthrophie, Hypervaskularisation und Infiltration durch Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen (53 n. 58).

3.1.1 Anästhesie

3.1.1.1 Inhalationsnarkose

Die Ratten wurden zur Arthritisinduktion, zur Gewinnung von autologen Leukozyten und für die optische Bildgebung >4h p.i. mittels Inhalationsnarkose in einen schmerzlosen, bewusstseinslosen Zustand gebracht. Sie wurden einzeln aus ihren Käfigen in eine ca. 1 ½ Liter fassenden durchsichtigen luftdichte Kammer überführt. Die Narkoseeinleitung wurde mittels eines Sauerstoff/Isofluran (Forane®, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL) Gemisch mit einer 5% Konzentration an Isofluran über einen Zulauf der Isofluranmaschine Modell100F (Medical Products, AIRCO Inc., Madison, WIS) in die Kammer eingeleitet.

Für den weiteren Narkoseverlauf wurden die Tiere nach ca. 2 Minuten aus der Kammer genommen und auf eine beheizte Unterlage, mit Zellstoff bedeckt, über eine Maske mit dem Sauerstoff/Isofluran Gemisch mit einer Isoflurankonzentration von 1,5%-2% beatmet. Die Tiefe der Narkose wurde durch einen Schmerzreiz an der Sohle des Hinterlaufs und durch Beobachtung der Atemfrequenz kontrolliert. Nach Beenden der Narkose wurden alle Ratten so lange beobachtet bis sie wieder bei vollen Bewusstsein waren.

3.1.1.2 Injektionsnarkose

Die Tiere wurden zur Rasur, Leukozyteninjektion, zur Aufnahme eines konventionellen Röntgenbildes und für die initiale optische Bildgebung vor und 1h nach der Leukozyteninjektion mit Pentobarbital (50mg/ml Nembutal® Sodium Solution, Abbott Laboratories, North Chicago, IL) narkotisiert. Die Anästhesie erfolgte mittels Pentobarbital, da die beschriebenen initialen Anwendungen eine relativ lange Zeit beanspruchten und an unterschiedlichen Orten erfolgten, zu denen das Narkosegerät nicht transportiert werden konnte. Den Tieren wurde jeweils eine Dosis von 50mg/kg Pentobarbital intraperitoneal verabreicht (Tab. 1). Auch die Pentobarbitalanästhesie wurde durch einen Schmerzreiz an der Sohle des Hinterlaufs und durch Beobachtung der Atemfrequenz kontrolliert.

Während der einzelnen Versuchsschritte wurden die Tiere unter einer Lampe gelagert und mit Handschuhen, die mit warmem Wasser gefüllt waren, vor dem Auskühlen geschützt. Die Augen wurden gegen das Austrocknen mit einer Augencreme (AKWA Tears®,Lubricant Ophthalmic Ointment, Akorn Inc., Buffalo Grove, IL) geschützt. Die Enthaarung der Tiere erfolgte unter Injektionsanästhesie. Das Fell am Bauch, zwischen den Beinen und an den Knien wurde zuerst manuell mit einem Rasierer (pet trimmer, Wahl®,Modell 8980, Wahl Clipper Co Sterling, IL) entfernt Dann wurde der Rest der Haare mit Enthaarungscreme (Nair, Church&Church Co. Inc., Princeton, NJ) entfernt. Die Autofluoreszenz der Haare war der Grund der Enthaarung.

Gewicht des Versuchstieres	Verabreichtes Volumen an Pentobarbital (Konzentration 50 mg/ml; Dosis 50 mg/kg)
0,150 kg	0,15 ml
0,160 kg	0,16 ml
0,170 kg	0,17 ml
0,180 kg	0,18 ml
0,200 kg	0,20 ml
0,250 kg	0,25 ml
0,300 kg	0,30 ml
0,320 kg	0,32 ml

Tab. 1: Pentobarbitaldosierung 50mg/kg (Nembutal® Sodium Solution, 50mg Pentobarbital/ml; Abbott Laboratories, North Chicago, IL)

3.1.2 Gruppe 1 und 2 Arthritisinduktion

Die 14 Versuchstiere wurden für die in vivo Studie in zwei Gruppen zu jeweils 6 Tieren unterteilt. Zusätzlich wurden initiale Pilotstudien an zwei zusätzlichen Tieren durchgeführt. Bei allen Ratten wurde eine monoartikuläre Arthritis des rechten Kniegelenkes induziert. Gruppe 1 wurde vor Cortisontherapie, Gruppe 2 wurde nach Cortisontherapie mit der Optischen Bildgebung untersucht.

Die monoartikuläre Arthritis wurde bei allen Ratten auf die gleiche Art und Weise induziert. Erster Schritt der Induktion war die Sensibilisierung mit einer Gesamtdosis von 0,5ml einer Emulsion von komplettem Freudschen Adjuvant (Lee Laboratorios, Grayson, CA) und methyliertem bovinem Serumalbumin (mBSA, 20mg/ml, Sigma, St. Louis, MO) im Verhältnis eins zu eins. Die Emulsion wurde unter Isoflurannarkose mit einer 22G,1" Nadel (Precision Glide^o Needle, Becton Dickinson&Co, Franklin Lakes, NJ) subkutan an 5 verschiedenen Stellen des Rückens in Portionen von je 0,1 ml appliziert. 10 bis 20 Tage nach dieser initialen Sensibilisierung erfolgte die Induktion der Arthritis durch eine intraartikuläre Injektion von 40µl mBSA (25mg/ml) in das rechte Kniegelenk mit einer 27G 1/2" Nadel (Precision Glide^o Needle, Becton Dickinson&Co, Franklin Lakes, NJ). Um Bildeffekte durch die Injektion allein auszuschließen, wurde in das linke Kniegelenk dieselbe Menge an 0,9%NaCl (Abbott Laboratories, North Chicago, IL) injiziert. Bei allen Tieren wurde unmittelbar vor der optischen Bildgebung der Durchmesser von beiden Knien mit einer Messlatte (Stainless hardened, Mitutoyo, Japan) gemessen.

Bei der zweiten Gruppe Versuchstiere zu sechs Ratten wurde auf die gleiche Art und Weise die monoartikuläre Arthritis induziert, aber die optische Bildgebung erfolgte nach Auftreten der Arthritis und anschließender 6-tägiger Kortisontherapie. Einen Tag nach dem Auftreten klinischer Zeichen der Arthritis im rechten Kniegelenk wurde bei dieser Gruppe die Kortisontherapie begonnen. Am ersten Tag der Therapie wurde den Ratten 30mg/kg Solu-Medrol (Methylprednisolone Sodium Succinat, 125mg/2ml, Pharmaciaa, Upjohn CO, Kalamazoo,MI) intra peritoneal mit einer 27G 1/2"Nadel als einfache Dosis injiziert. Die Hydrokortisontherapie wurde für fünf weitere Tage mit einer intraperitonealen Injektion einer Dosis von 3mg/kg weitergeführt. Sieben Tage nach dem Auftreten der Arthritis und Beginn der Kortisontherapie wurden dieser zweiten Gruppe von Versuchstieren die DiD markierten Leukozyten injiziert und die optische Bildgebung auf die gleiche Art und Weise wie bei Gruppe 1 vorgenommen.

3.1.3 Spenderratten von autologen Leukozyten

Für jedes Versuchstier aus den Gruppen eins und zwei wurden autologe Leukozyten benötigt. Als Spender dienten weibliche Sprague Dawley Ratten sogenannte „Retired Breeder“ mit einem Gewicht von 380 bis 400gr. Es wurde für jede Empfängerratte Blut von zwei Spenderatten benötigt. Initiale Pilotstudien hatten gezeigt, dass die Anzahl an gewonnenen Leukozyten von einer Spenderratte bei unserem Versuchsaufbau nicht für den Nachweis mit der optischen Bildgebung ausreichte. Die Spenderratten wurden wie oben beschrieben mittels Inhalationsanästhesie narkotisiert. Anschließend wurde mit einer 22G, 1" Nadel (Precision Glide^o Needle, Becton Dickinson&Co, Franklin Lake, NJ) von jeder Spenderratte etwa 10 ml Blut durch intrakardiale Injektion gewonnen. Die Blutgewinnung erfolgte mit 10 ml Spritzen (Luer Lok Tip, Becton Dickinson&Co, Franklin Lake, NJ) die jeweils 0,1 ml Heparin Sodium (1000USP/ml, American Pharmaceutical Partners Inc., Schaumburg, IL) und 1ml PBS-

(Phosphate buffered saline = Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) Dulbecco, - ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, Biochrom AG Berlin) enthielten.

Die gewonnenen Blutproben wurden getrennt nach Spendertier in Zentrifugenröhrchen (15ml, Corning Inc., Corning, NY) bis zum Markierungsprozess kühl gelagert.

3.2 In vitro Experimente

3.2.1 Pilotstudien

Die in vitro Pilotstudien wurden mit einer reinen Verdünnungsreihe des Fluoreszenzfarbstoffes DiD begonnen um, den Zusammenhang von Konzentration und Fluoreszenz des DiD zu untersuchen. Für die Verdünnungsreihe wurde das DiD in Ethanol verdünnt. Die mit der Verdünnungsreihe untersuchte höchste Konzentration des DiD betrug 50µmol DiD in 250µl Ethanol. Diese höchste untersuchte DiD-Konzentration entsprach somit genau der Konzentration, mit der jeder Leukozytenansatz markiert wurde. Ausgehend von dieser Konzentration wurde die DiD Konzentration 14 mal halbiert, jeweils in 250µl Ethanol angereichert. Als Kontrollprobe wurde 250µl Ethanol ohne DiD Farbstoff verwendet.

Die einzelnen DiD Verdünnungen wurden in eine Zellkulturplatte (Multiwell Primaria, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) pipettiert, die 6 mal 4 Löcher enthielt (sogenannte „24-well“ Platte) und aus durchsichtigem Plastik bestand, das keine Eigenfluoreszenz aufwies. Von jeder DiD Verdünnungsprobe wurde nach einer Anregung durch den Laser über eine Dauer von einer Sekunde mit der Optischen Bildgebung die Intensität der Fluoreszenz festgehalten.

No.1	50µmol
No.2	25µmol
No.3	12,5µmol
No.4	6,25µmol
No.5	3,125µmol
No.6	1,563µmol
No.7	0,781µmol
No.8	0,391µmol
No.9	0,195µmol
No.10	0,098µmol
No.11	0,049µmol
No.12	0,024µmol
No.13	0,012µmol
No.14	0,006µmol
No.15	250µmol reines Ethanol

Tab. 2: Verdünnungsreihe von Vybrant DiD in Ethanol

Bei einer zweiten in vitro Pilotstudie wurden absteigende Konzentrationen an DiD markierten Leukozyten untersucht, um festzustellen, welches Verhältnis zwischen zugegebener Zellzahl und zugegebenem Fluoreszenzfarbstoff eine optimale Markierung und Fluoreszenz der Zellen ergeben würde. Es wurden Konzentrationen von 10^8 , 5×10^7 , $2,5 \times 10^7$, $1,25 \times 10^7$, $6,25 \times 10^6$ und $3,125 \times 10^6$ Leukozyten untersucht. Jeder dieser Leukozytenansätze wurde jeweils mit 5µl DiD markiert und anschließend in eine Zellkulturplatte gegeben. Diese „Zell-Verdünnungsreihe“ wurde wie die oben beschriebene Kontrastmittel-Verdünnungsreihe im

optischen Scanner untersucht, die Anregung der Proben erfolgte jedoch hier für zwei Sekunden.

Bei einer dritten in vitro Pilotstudie wurden 10^8 Leukozyten mit 5 μ l DiD markiert. Diese 10^8 markierten Leukozyten wurden nach ihrer erfolgreichen Markierung in halbirungeschritten verdünnt, so dass eine absteigende Zellzahl von 10^8 bis $1,5625 \times 10^6$ Zellen entstand. Diese „Zell-Verdünnungsreihe“ sollte zeigen, welche minimale Anzahl an markierten Leukozyten mit der optischen Bildgebung nachweisbar ist. Auch diese Verdünnungsreihe wurde in eine Zellkulturplatte überführt und mit der optischen Bildgebung untersucht. Auch diese Proben wurden für zwei Sekunden mit dem Laser angeregt.

3.2.2 Markierung der Leukozyten mit DiD Kontrastmittel

Die Markierung der Leukozyten erfolgte in mehreren Schritten:

Der erste Schritt bestand in der Gewinnung von Vollblutproben von Spenderratten: Für jede Empfängerratte wurde ca. 20 ml Blut aus zwei Spenderratten durch kardiale Punktion gewonnen. Das so gewonnene Blut wurde bis zur Verarbeitung kühl gelagert.

Der zweite Schritt bestand in der Gewinnung von Serum aus den Vollblutproben:

Das gewonnene Blut wurde 10 min bei 6°C und 330 rcf in einer Zentrifuge Typ 5810R (Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde aus Zentrifugenröhrchen (corning inc., Corning, NY) unter einer Abzugshaube (biological safety cabinets class 2, type A2, NUAIRE, Plymouth, MN) unter sterilen Bedingungen mit einer 1000 μ l Pipette (Typ Pipetman, Gilson, Frankreich) in zwei für jede Ratte getrenntes 15ml Zentrifugenröhrchen abpipettiert.

Der dritte Schritt bestand in der Gewinnung von Leukozyten aus den Serumproben:

Als nächstes wurde das aus den Blutproben gewonnene Serum in den 15ml Zentrifugenröhrchen für 10min bei 6°C und 330rcf zentrifugiert.

Nach der Zentrifugierung hatten sich Erythrozyten und Leukozyten am Boden der Zentrifugenröhrchen abgelagert Die Erythrozyten befanden sich als rotes Pellet in der Spitze des Zentrifugenröhrchens, die Leukozyten lagerten sich darüber als weißes Zellpellet ab und über den Leukozyten befand sich das farblose Serum. Das Serum konnte unter der Abzugshaube unter sterilen Bedingungen vorsichtig mit einer 1000 μ l Pipette abpipetiert werden, so dass die gewonnen Leukozyten nicht beschädigt wurden. Das abpipetierete Serum wurde in ein weiteres 15ml Zentrifugenröhrchen gegeben und nochmals zentrifugiert. Hiermit wurden nochmals weitere Leukozyten gewonnen. Die Leukozyten wurden dann mit einer Pipette von dem Erythrozytenpellet abpipettiert. Die pro Ansatz gewonnenen Leukozyten wurden in 1ml DMEM Medium

(Dulbecco`s Modified Eagle Medium,+Glutamax,+low glucose,+110mg/l sodium pyruvate,+pyridoxine HCL; invitrogen corp.,Grand Island, NY) mit einer 1000 μ l Pipette gegeben und gut gemischt.

Der vierte Schritt bestand in der Markierung der Leukozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff: Die Markierung der Leukozyten erfolgte mit dem DiD Kontrastmittel (Vybrant® DiD cell-labeling solution,molecular probes, Eugene,Oregon). Jedem Leukozytenansatz wurde 5 μ l DiD mit einer 20 μ l Pipette (Pipetman, Gilson, Frankreich) unter sterilen Vorraustetzungen unter der Abzugshaube hinzugefügt. Alle vier Ansätze wurden daraufhin für 8 min in einen Brutschrank (HERA cell 150, Kendro, Langenselbold, Germany) bei 37°C inkubiert.

Der fünfte Schritt bestand in der Waschung der Leukozyten: Als nächstes wurde der freie DiD-Fluoreszenzfarbstoff von den Leukozyten gewaschen, so dass nur das Zell-gebunden DiD in den Ansätzen enthalten war.

Zu diesem Zwecke wurden die markierten Leukozytenansätze nach der Inkubation für 5 min bei 6°C und 330rcf zentrifugiert.

Danach wurde der Überstand von DMEM und freien DiD aus allen Ansätzen mit einer 1000µl Pipette abpipettiert. Am Boden der Zentrifugenröhrchen verblieben die blau markierten Leukozyten. Jedem der vier Ansätze wurde dann 1ml DMEM mit einer 1000µl Pipette hinzugefügt und anschließend zum letzten Mal für 5min bei 6° C und 330rcf zentrifugiert.

Nach diesem letzten Schritt wurde der Überstand an DMEM und DiD ein letztes Mal ab-pipetiert und immer zwei markierte Leukozytenansätze (Ansatz 1 und Ansatz 3; Ansatz 2 und Ansatz 4) zusammen in ein 15ml Zenrifugenröhrchen mit jeweils 500µl DMEM Medium mit einer 1000µl Pipette pipetiert.

Somit resultierte am Ende des gesamten Markierungsprozesses 1 ml Gesamtansatz mit DiD markierten Leukozyten in DMEM zur Injektion.



*Abb. 4: Versuchsablauf:
Gewinnung von Vollblutproben aus der Spenderratte unter Inhalationsnarkose.
Mehrere Zentrifugengänge zur Serumgewinnung und anschließender Gewinnung von Leukozyten aus den Serumproben und deren Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiD.
In Zentrifugenröhrchen DiD markiertes Zellpellet (blau) in DMEM gelöst.
Vorbereitung zur Optischen Bildgebung: Nach Trocknen- u. Nassrasur, erfolgte die Messung des linken und des rechten Kniedurchmessers.
Injektion der DiD markierten Leukozyten über eine Schanzvene unter Injektionsnarkose.
Installation des Versuchstiers zur Darstellung der DiD markierten Leukozyten mit Hilfe der Optische Bildgebung.*

3.2.3 Vitalitätstest

Bei jeder Leukozytenzellmarkierung wurde ein Vitalitätstest mit Hilfe von Trypan Blau (trypan blue stain 0,4%, invitrogen Co., Grand Island, NY) durchgeführt.

Der Vitalitätstest wurde vor und nach der Markierung mit DiD durchgeführt. Somit konnte direkt auf Veränderungen der Anzahl und Vitalität der Leukozyten durch den Markierungsvorgang geschlossen werden.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen: Nachdem die Leukozytenansätze gewonnen waren, wurden aus jedem Ansatz 10µl Zellsuspension in ein eigenes Eppendorfröhrchen (1,5ml microcentrifuge tubes, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) pipetiert. Zu jedem Eppendorfröhrchen wurde 40µl Trypan Blau hinzugefügt und gut gemischt. Dieser Vorgang erfolgte wieder unter sterilen Bedingungen unter der Abzugshaube.

Aus diesen vier einzelnen Zell-Trypan Blau Gemischen wurde jeweils 10µl mit einer 20µl Pipette herauspipetiert und für den Vitalitätstest auf eine Neubauer Zählkammer (Hauser Scientific, USA) gegeben. Die in der Zählkammer verteilten Zellen aus der Zellsuspension wurden mit Hilfe eines Mikroskops (Nikson eclipse TS100, Technical Instrument San Francisco, Burlingame, CA) unter 20 und 40 facher Vergrößerung angeschaut

und ausgezählt. Da Trypan Blau nur von geschädigten Zellen aufgenommen wird, waren die nicht gefärbten Leukozyten unter dem Mikroskop die Vitalen. Die Anzahl der Leukozyten pro 1ml Ansatz wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{gezählte Leukozyten mal } 16 \times 5 \times 10.000$$

Die Formel leitet sich wie folgt ab:

Die Neubauerzählkammer besteht aus neun großen Quadraten mit jeweils einem Volumen von 0,1µl. Jedes dieser 9 Quadrate besteht wiederum aus 16 kleinen Quadraten. Zur Berechnung der Leukozytenkonzentration wurde ein solches kleines Quadrat ausgezählt. Die gezählte Leukozytenanzahl wurde multipliziert mit der Zahl 16, die der Gesamtheit aller kleinen Quadraten eines großen Quadrates entspricht. Das Ergebnis entsprach der Anzahl an Leukozyten in einem Großen Quadrat. Dieses Ergebnis wurde mit der Zahl 5 multipliziert. Diese Zahl leitet sich aus dem Verdünnungsverhältnis 1:5 der Leukozyten im Medium zum Trypan Blau ab. Um die Leukozytenkonzentration im Verhältnis zu einem ml herzuleiten, musste die ermittelte Zahl noch mit 10.000 multipliziert werden, denn ein großes Quadrat enthält 0,1µl.

Nach dem gleichen Prinzip wurde mit den markierten Leukozyten nach der Inkubation mit dem DiD Fluoreszenzfarbstoff verfahren. Folglich erhielten wir eine direkte Angabe über die im jeweiligen Ansatz enthaltenen vitalen markierten Leukozyten und über einen zahlenmäßigen Verlust an vitalen Leukozyten durch den Markierungsprozess.

3.2.4 Substanztestung

Vor Beginn der in vivo Versuche wurden noch die Substanzen auf ihre fluoreszierende Eigenschaft untersucht, die eventuell auf die Studie Einfluss nehmen könnten. Dabei handelte es sich um das Futter der Ratten (5008 rat chow, PMI Lab. Diet), das Einstreu, die Enthaarungscreme (Nair, Church&Church Co, Princeton, NJ) und das Pentobarbital (Nembutal® Sodium Solution, Abbott Lab., North Chicago, IL).

Alle diese Substanzen wurden einzeln und unter den gleichen Bedingungen wie die Leukozyten in den Pilotstudien zuvor getestet und dargestellt.

3.2.5 Optische Bildgebung

Eine Fotografie unseres Optischen Bildgebendes Systems ist in Abbildung fünf gezeigt.

Unser Gerät der Optischen Bildgebung verband einen OPO Laser mit einer Wellenlänge von 532nm mit einem zweiten Nd:YAG Laser. Der Nd:YAG Laser konnte Wellenlängen von 660nm bis 970 nm erzeugen. Zusätzlich war noch ein He-Ne Laser der Wellenlänge von 632,8 integriert. In unserer experimentellen Studie verwendeten wir ausschließlich den He-Ne Laser. Der Laser wurde so getriggert, dass er mit einer Wellenlänge von 632,8nm für 2 Sekunden das unter ihm liegende Objekt beleuchtete. Dabei betrug die mittlere Laserkraft 30mW, korrespondierend zu $0,5\text{mW}/\text{cm}^2$ innerhalb des belichtenden Areals.

Aufgrund der Tatsache, dass Wellenlängen unter 600nm von Hämoglobin absorbiert werden und Wellenlängen von über 1500nm von Wasser absorbiert werden, wurde der Laser zwischen diesen Wellenbereichen gewählt (15). Vor der Kamera wurden zwei Filter (andover cop.) von 695nm Wellenlänge angebracht. Die Filter blockten alle Emissions-Wellenlängen jenseits von 695 nm aus.

Auf diese Art und Weise war der Optical Imager genau auf den DiD Fluoreszenzfarbstoff eingestellt. DiD hat sein Anregungsmaximum bei 644nm und sein Emissionspeak bei 665nm. Nach Anregung des DiD Fluoreszenzfarbstoffes mit dem Laser von 632,8nm konnte die Emission bis zu einer Wellenlänge von 695nm erfasst werden. Somit war sicher gestellt, dass bei der optischen Bildgebung mit der CCD Kamera auch nur der DiD Fluoreszenzfarbstoff optisch dargestellt und gemessen wurde. Die Aufnahmen der optischen Bildgebung wurden mit einer High Resolution Digital CCD Kamera (1024 HER, Roper Scientific, USA) dargestellt. Die CCD Kamera wurde immer auf -120 C° mit flüssigen Stickstoff gekühlt, da das Bildrauschen durch Kühlung der Kamera minimiert wird. Die CCD Digital Kamera war in einen 1,50m x 1m großen Kunststoffbehälter integriert und zusätzlich mit einem schwarzen nichtfluoreszierenden Stoff überspannt, um Messungen unter Ausschluss des Tageslichtes zu ermöglichen. Alle Messungen fanden in einem abgedunkelten Raum statt, um Interferenzen durch das Tageslicht auszuschließen.

Die Software zum Management (z.B. Belichtungszeit) und zur Kontrolle der Kamera (z.B. Einstellungen wie Kühlung des CCD Chips) sowie zur Datenauswertung (region of interest (ROI)) war Win View (Roper Scientific, NJ, USA).

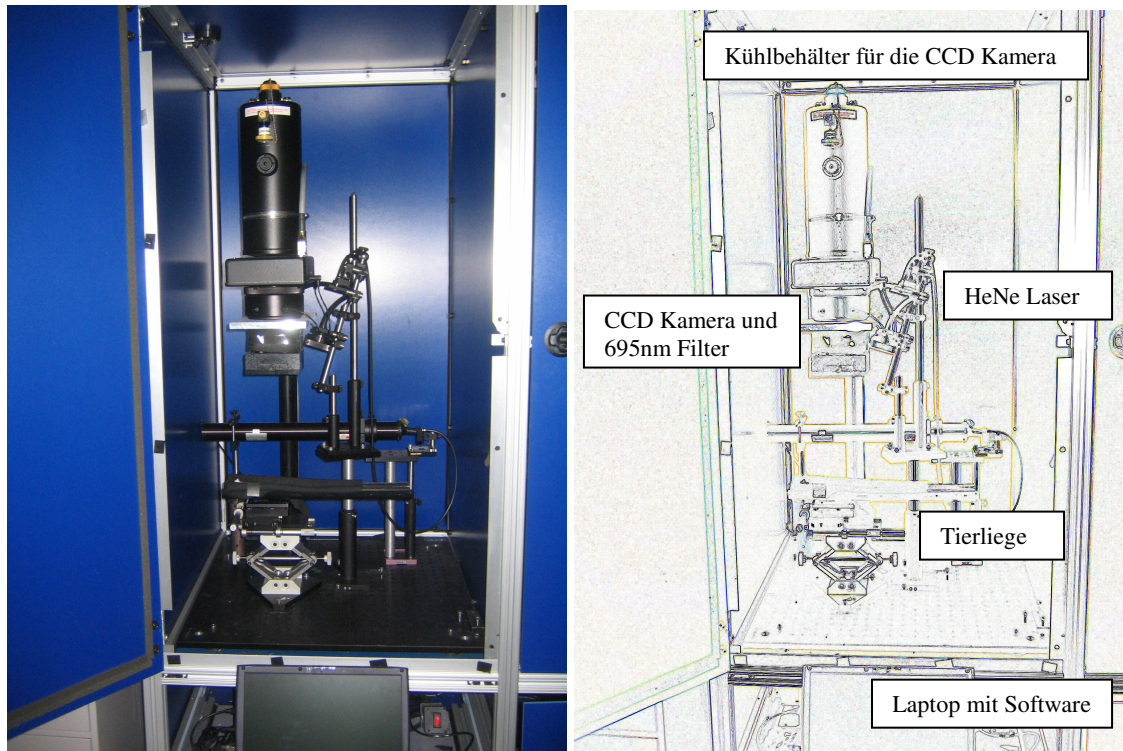


Abb. 5: Aufbau des Optischen Bildgebenden Systems (= Optical Imager)

Für die *in vitro* Untersuchungen von Kontrastmittel- und Zellverdünnungsreihen wurden die Lochplatten mit den Proben auf die Halterung innerhalb des Scanners, direkt unter dem Laser und der CCD Kamera platziert. Für die *in vivo* Versuche wurden die Tiere innerhalb des Scanners in Rückenlage auf einer kleinen konkavförmigen Liege unter den Laser und die CCD Kamera gelagert. Die Liege war verschieblich und mit einem schwarzen, nicht autofluoreszierenden Stoff bedeckt. Das zu untersuchende Versuchstier wurde so gelagert, dass beide Knie sich im Zentrum des Laserstrahls befanden. Zusätzlich wurde die Bauchregion mit schwarzem Stoff abgedeckt. Somit wurde verhindert, dass möglicherweise störende fluoreszierende Nahrungsbestandteile innerhalb des Darmes Einfluss auf die optische Bildgebung nehmen konnten. Die Aufnahmen fanden immer unter abgedunkelten Verhältnissen, unter Ausschluss von Tageslicht, statt.

3.3 In Vivo Experimente

3.3.1 Pilotstudien

Initiale in vivo Pilotstudien wurden durchgeführt, um festzustellen, wie viele DiD markierte Spenderleukozyten notwendig sind, um eine Anreicherung der Zellen im arthritischen Kniegelenk sichtbar zu machen. Hierzu wurden zwei Pilotratten untersucht, bei denen nach dem oben beschriebenen Protokoll eine monoartikuläre Arthritis induziert wurde.

Der ersten Pilotratte wurden über einen Butterfly Kanüle (Butterfly®, 23mal3/4, 12“ Tubing Infusion Set, Abbott Lab., North Chicago, IL) $1,8 \times 10^8$ markierte Leukozyten in die Schwanzvene injiziert, entsprechend den Leukozyten von einer Spenderratte.

Der zweiten Pilotratte wurden $2,3 \times 10^8$ DiD markierte Leukozyten injiziert, das entspricht dem gewonnenen Blut aus zwei Spenderratten. Von beiden Ratten wurden optische Aufnahmen vor, direkt danach, eine, vier und 24 Stunden nach der Zellinjektion erstellt. Bei Pilotratte 1 wurden zusätzlich späte Verlaufsuntersuchungen, 48 Stunden nach der Zellinjektion erstellt.

3.3.2 Optische Bildgebung von Ratten mit Arthritis

Die optische Bildgebung der Ratten mit Arthritis erfolgte bei 6 Tieren (Gruppe 1) unmittelbar nach Manifestation der Monoarthritis, bei 6 weiteren Tieren (Gruppe 2) nach Manifestation der Monoarthritis und nach 7 Tagen Kortisontherapie. Bei allen Tieren wurde zum Zeitpunkt der optischen Bildgebung der Durchmesser beider Knie mit einer Messlatte gemessen.

Sämtlichen Ratten wurden jeweils 3 bis 5×10^8 DiD markierte Leukozyten intravenös injiziert, das entspricht dem Blut von zwei Spendertieren.

Vor der Zellinjektion wurde von jedem Tiere eine native Aufnahme mit der CCD Kamera erstellt. Im folgenden wurden direkt nach Injektion, 1 Stunde, 4 Stunden und 24 Stunden nach der Zell-Applikation weitere Aufnahmen mit der CCD Kamera aufgenommen. Bei vier Tieren (2 aus Gruppe 1, 2 aus Gruppe 2) wurde zusätzlich noch eine 48 und 72 Stunden Aufnahme erstellt.

Vor der Zellinjektion wurde von jedem Tiere eine prae Aufnahme mit der CCD Kamera erstellt Sämtlichen Ratten wurden jeweils 3 bis 5×10^8 DiD markierte Leukozyten intravenös injiziert, das entspricht dem Blut von zwei Spendertieren.

Im folgenden wurden direkt nach Injektion, 1 Stunde, 4 Stunden und 24 Stunden nach der Zell-Applikation weitere Aufnahmen mit der CCD Kamera. Bei drei der Tiere wurde zusätzlich noch eine 48 und 72 Stunden Aufnahme erstellt.

Alle 14 Tiere wurden nach der letzten Aufnahme mit dem Optical Imager unter Inhalationsnarkose mit einer intrakardial applizierten Überdosis Pentobarbital (50mg/ml Nembutal® Sodium Abbott Laboratories, North Chicago, IL) euthanasiert.

3.3.3 Röntgenaufnahmen

Zusätzlich zu der optischen Bildgebung wurden von drei Tieren aus der ersten Versuchsgruppe und von zwei aus der zweiten Versuchsgruppe Röntgenbilder angefertigt. Die Röntgenbilder wurden eine Stunde nach der Zelinjektion angefertigt. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere noch unter Pentobarbitalnarkose. Sie wurden in einem konkav geformten Pappkarton so fixiert, dass Beine und Füße bei der Aufnahme nicht verrutschen konnten. Zudem hatte der Pappkarton die gleiche Form und Größe der Liege unter dem Optical Imager, so dass in der späteren Verarbeitung eine direkte Überlagerung von Röntgenbild und Optischen Bild erfolgen konnte. Die Überlagerung mit dem Röntgenbild ermöglicht eine eindeutige anatomische Zuordnung der erfassten Fluoreszenz zum arthritischen rechten Knie.



Abb. 6: Ratte fixiert zur Röntgenaufnahme

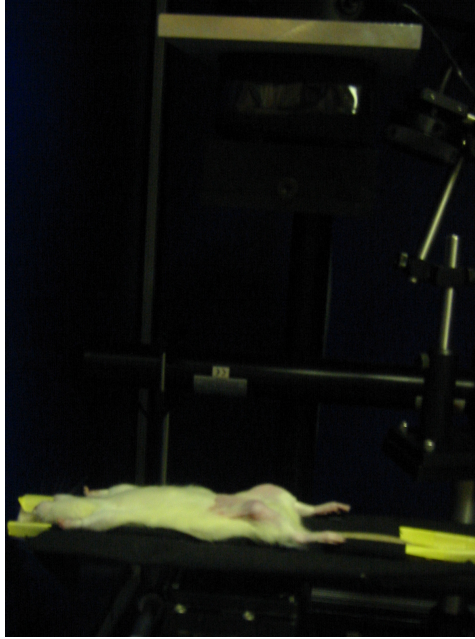


Abb.7: Ratte bereits zur 1h p.i. Aufnahme in Fixationsschiene fürs Röntgen im Optical Imager fixiert.

3.4 Histologie

Nachdem die Tiere direkt nach der letzten Optischen Bildgebung euthanasiert worden sind, wurden die Kniegelenke entnommen und für die nachfolgende histologische Evaluation vorbereitet. Die Rattenknie wurden in 10% Paraformaldehyde in Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) für vier Tage bei 4°C gelegt, anschließend in einer Lösung zu gleichen Anteilen 20% Natriumcitrat und 50% Ameisensäure bei 4°C für zwei weitere Tage dekalzifiziert. Anschließend wurden die Proben para-sagittal halbiert, dehydriert durch hochwertigen Alkohol, gewaschen und in Parafin eingelegt. Es wurden von jedem Knie drei Schnitte von 5µm Dicke mit einem Schnittabstand von ungefähr 350µm angefertigt.

3.4.1 H&E Färbungen und Lichtmikroskop

Von jedem Knie wurde ein Schnitt mit Standard Hämatoxylin& Eosin (H&E) gefärbt. Die histologischen Schnitte wurden mit einem Zeeman Mikroskop ausgewertet. Die H&E Färbung sollte die Anwesenheit oder Abwesenheit von Entzündungszellen im arthritischen Knie vor und nach Therapie untermauern.

3.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Zusätzlich wurden von jedem Kniegelenk zwei Schnitte mit der Fluoreszenzmikroskopie, nachdem die Zellkerne zusätzlich mit Diamidino-2-phenylinole (DAPI, BIOMOL research laboratories, Plymouth, USA; Lösung 1:10.000) mit einer Inkubationszeit von einer Minute gegen gefärbt wurden, dargestellt. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Fluoreszenz Mikroskop (Axioplan 2; Zeiss, Jena; Deutschland), angeschlossen an eine Digital AxioCam Kamera (Zeiss, Jena, Deutschland) und reguliert von einem Axiovision Program (Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet. Wir wählten einen Anregungsfilter von 553nm und einen Emissionsfilter von 575nm um den Fluoreszenzfarbstoff DiD und das DAPI im Gewebeschnitt zu ermitteln. Die Fluoreszenzhistologie sollte die Anwesenheit oder Abwesenheit von DiD markierten Leukozyten im arthritischen Knie vor und nach Therapie bestätigen.

3.5 Datenauswertung

Die Optische Bildgebung der einzelnen in vitro Studien wurden auf unterschiedliche Maxima skaliert.

Alle Bilder der Optischen Bildgebung der in vivo Studien wurden auf das gleiche Maximum von 700 Einheiten skaliert. Die Bildanalysen wurden von zwei Beobachtern in Übereinstimmung durchgeführt.

3.5.1 Quantitative Auswertung

Die quantitative Auswertung der optischen Bildgebung wurde mit dem Programm Win View/32 (Roper Scientific, Inc., Tucson, AZ) vorgenommen. Die Auswertung der in vitro Studien erfolgte größtenteils mit einer vom Beobachter freigewählten gleichen Untersuchungsregion (ROI: 460 bis 700 Pixel).

Die Messung der Fluoreszenzsignalintensitäten vom rechtem arthritischen und dem contralateralem gesundem Kniegelenk jedes Tieres, erfolgte mit einer vom Beobachter freigewählten Untersuchungsregion (ROI: 450 bis 550 Pixel). Das Verhältnis der Signalintensitäten des arthritischen zu normalen Knie (A/N) wurde für jedes Tier berechnet. Auf diese Art und Weise beeinflussten die räumlichen Ungleichmäßigkeiten der Belichtung unsere experimentelle Resultate nicht. Jede Bildanalyse wurde ohne vorheriges Wissen, ob es sich um ein mit Kortison therapiertes Knie handelte, und vor pathologischen Resultaten ausgewertet.

3.5.2 Qualitative Auswertung

Die qualitative Auswertung der optischen Bildgebung erreichten wir, indem wir das Vorhandensein oder das Fehlen einer sichtbaren Fluoreszenzsignalanstiegs der Entzündung mit dem Fluoreszenzsignal des gesunden Muskels im Oberschenkel verglichen.

3.5.3 Statistik

Das Verhältnis von arthritischem zu normalen Knie (A/N) wurde als Mittelwert und als Standardabweichung zum Mittelwert für die unbehandelten (Gruppe1: n = 6) und für die Kortison behandelten (Gruppe 2: n = 6) Tiere berechnet.

Die A/N Verhältnisse der Gruppe 1 und der Gruppe 2 wurden mit einem unpaarigen t-Test verglichen. Die A/N Verhältnisse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zellinjektion wurden mit den Ausgangsverhältnissen mit Hilfe eines paarigen t-Test miteinander verglichen. Zur statistischen Analyse verwendeten wir das statistische Software Programm Stateview 4.1 (Abacus, Berkley, CA, USA).

P-Werte weniger als 0,05 wurden als statistisch signifikant festgelegt.

Der in vitro Vitalitätstest der Leukozyten wurde statistisch ausgewertet mit Microsoft® Works 2000 5.0.

4. Ergebnisse

4.1 In vitro Ergebnisse

4.1.1 Pilotstudien

Die Verdünnungsreihe des DiD Kontrastmittels zeigte mit zunehmender Kontrastmittelkonzentration einen Anstieg des gemessenen Fluoreszenzsignals. Die höchste untersuchte Konzentration entsprach der Konzentration, die auf die Zellen gegeben wurde oder der Konzentration, die maximal den Ratten appliziert werden konnte, falls das gesamte Kontrastmittel von den Zellen aufgenommen würde. Diese maximale Konzentration zeigte einen deutlichen Fluoreszenzeffekt und noch keinen „Quenching“-Effekt (Abnahme der Fluoreszenz bei hohen Kontrastmittelkonzentrationen). Die minimal nachweisbare Konzentration des Kontrastmittels war $0,781\mu\text{mol}$.

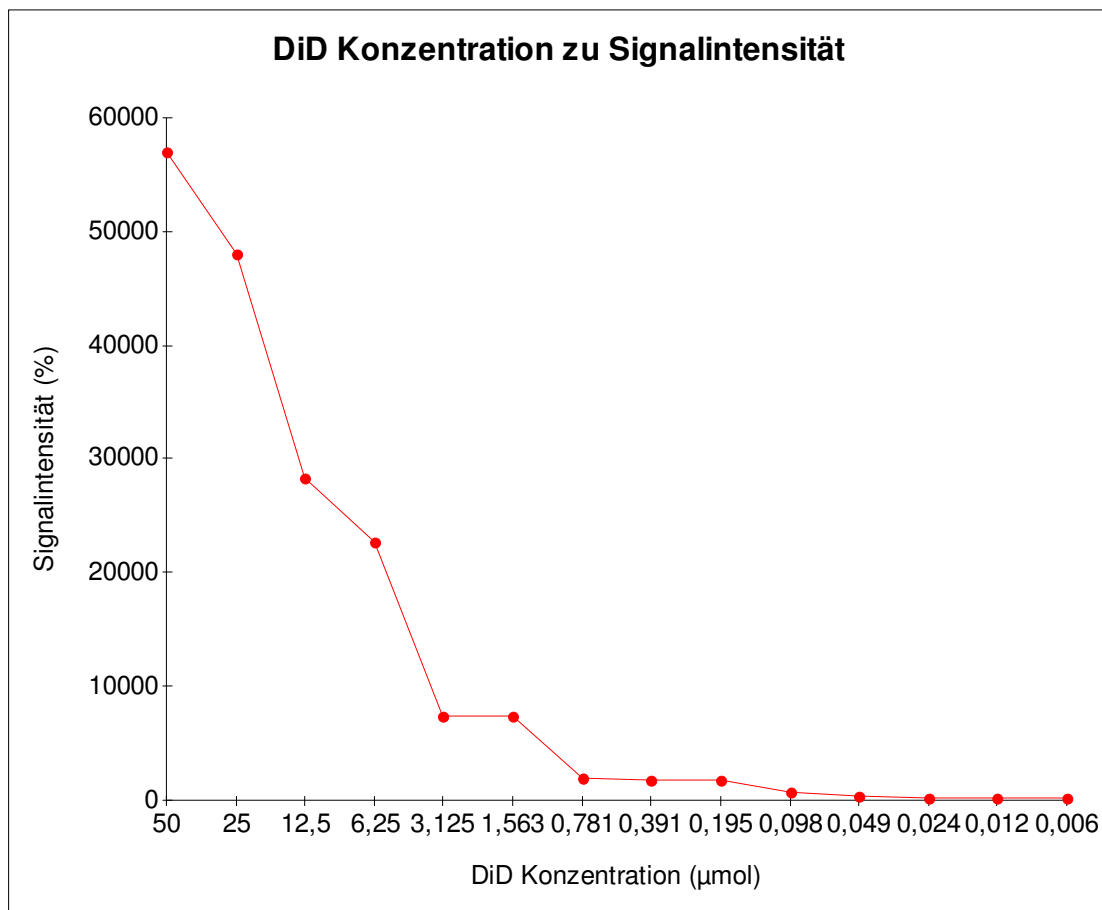


Abb. 8: Verhältnis von DiD Konzentration zu Signalintensität

Bei der zweiten Pilotstudie wurden die verschiedenen Anzahlen an DiD markierten Leukozyten ausgewertet. Eine absteigende Anzahl von Leukozyten war mit jeweils $5\mu\text{l}$ DiD markiert worden. Die Zellen zeigten einen Anstieg des Fluoreszenzsignals mit zunehmender Zellzahl.

Für die Zellzahl $2,5 \times 10^7$ konnte die Signalintensität nicht adäquat ausgewertet werden und wurde folglich im Ergebnis nicht mit einbezogen.

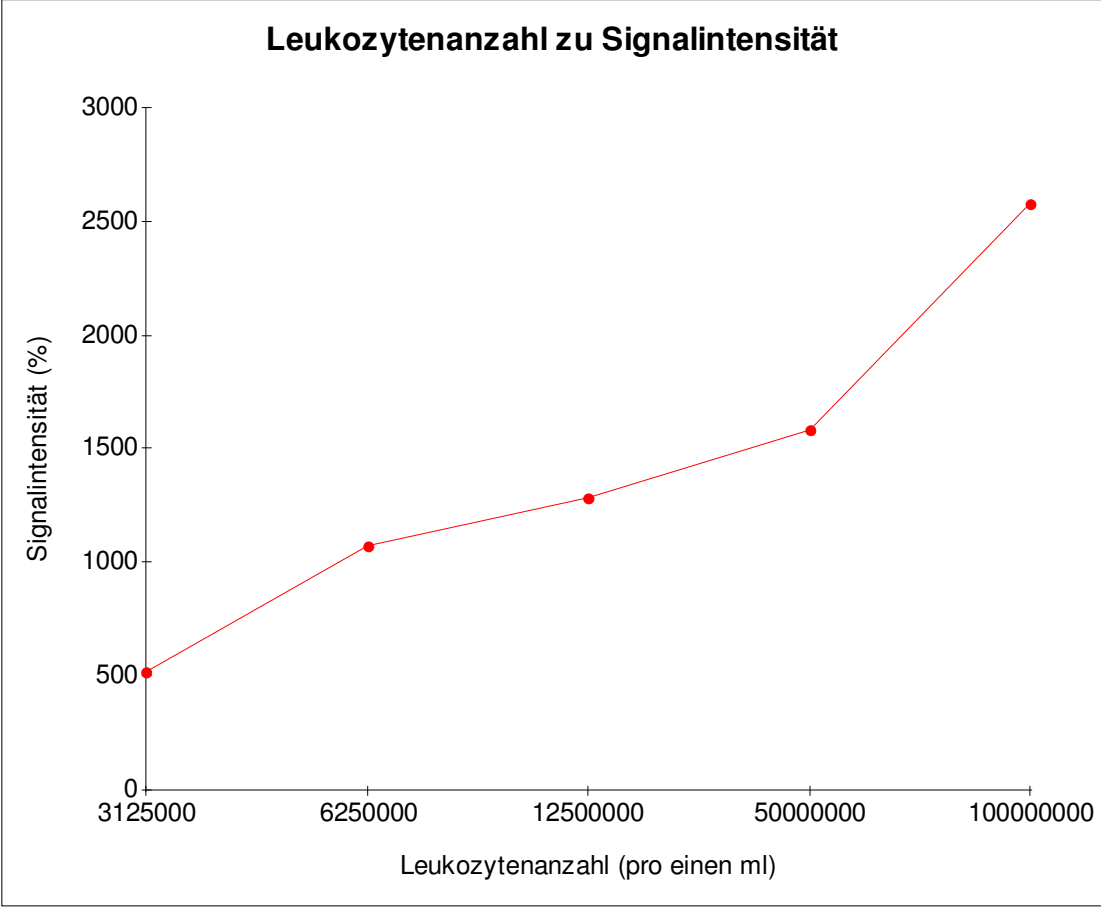


Abb. 9: Verhältnis von Leukozytenanzahl zu Signalintensität

In der dritten in vitro Pilotstudie wurden 10^8 Leukozyten mit $5\mu\text{l}$ DiD markiert und anschließend in Halbierungsschritten bis zu einer Leukozytenanzahl von $1,5625 \times 10^6$ pro ml verdünnt. Es zeigte sich ein linearer Abfall der Fluoreszenz mit abnehmender Zellzahl. Die minimal nachweisbare Anzahl an Leukozyten pro einen ml war $1,25 \times 10^7$ DiD markierter Leukozyten.

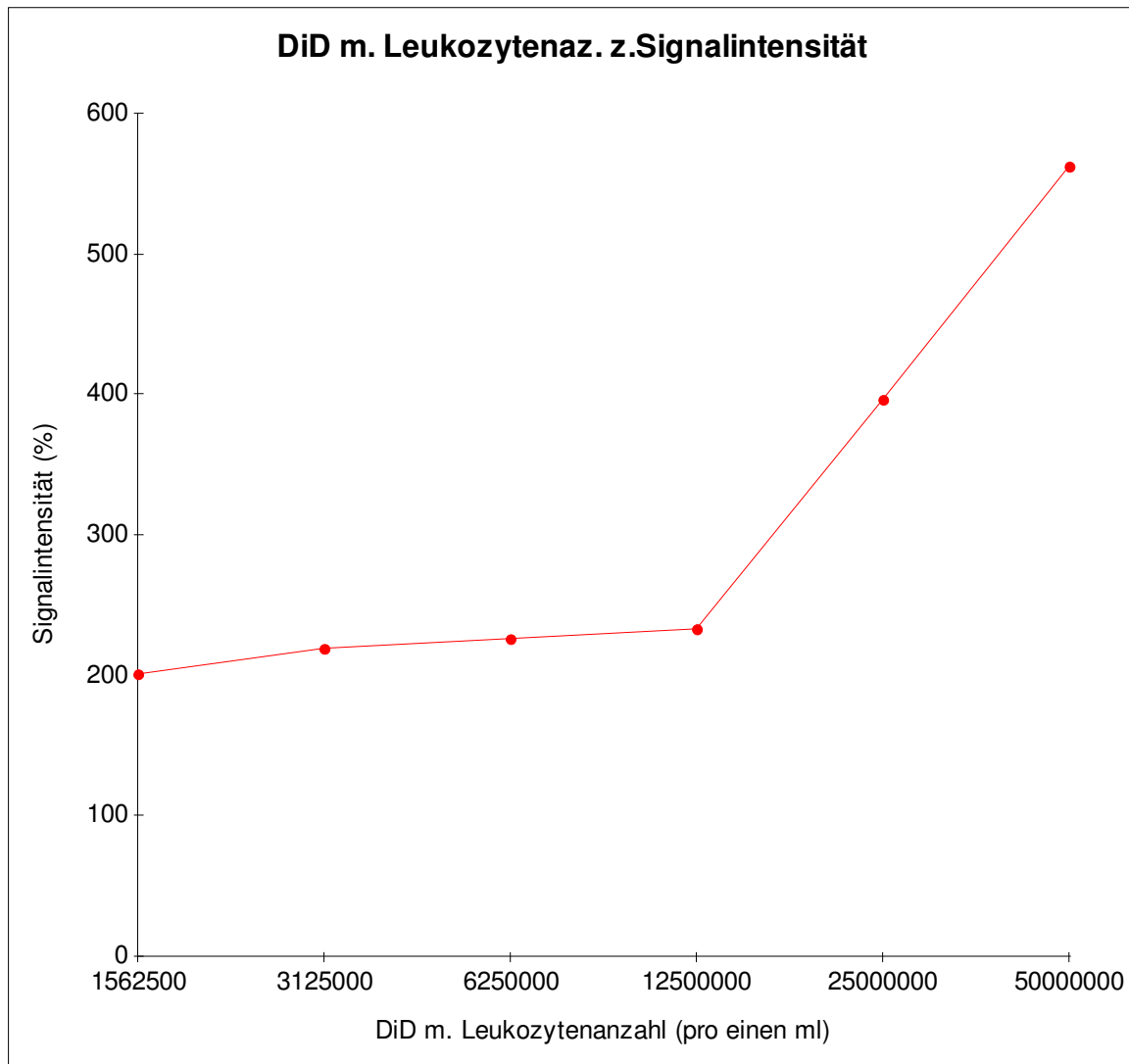


Abb. 10: Verhältnis von DiD markierten Leukozytenanzahl zu Signalintensität

Ein Vergleich der Daten aus der Pilotstudie zwei und drei zeigte, dass mit der von uns gewählten Markierungsmethode (10^8 Leukozyten markiert mit $5\mu\text{l}$ DiD), die maximale Kapazität der Leukozyten zur Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffs noch nicht erreicht war, da eine Inkubation der Hälfte der Leukozyten mit der gleichen Menge Fluoreszenzfarbstoff eine höhere Fluoreszenz ergab als eine Halbierung der initial markierten Leukozyten. Wäre mit unserer Methode eine maximale Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes in die Zellen erreicht,

dürfte eine weitere Erhöhung der zugegebenen Farbstoffmenge nicht zu einer weiteren Erhöhung der zellulären Aufnahme führen. Wir wählten, diese, noch nicht maximierte Markierungsmethode (10^8 Leukozyten markiert mit $5\mu\text{l}$ DiD), da die Leukozyten bei diesem Ansatz eine erhaltene Vitalität zeigten, während weitere Erhöhungen der zugegebenen Farbstoffkonzentration zu einer Beeinträchtigung der zellulären Vitalität führten.

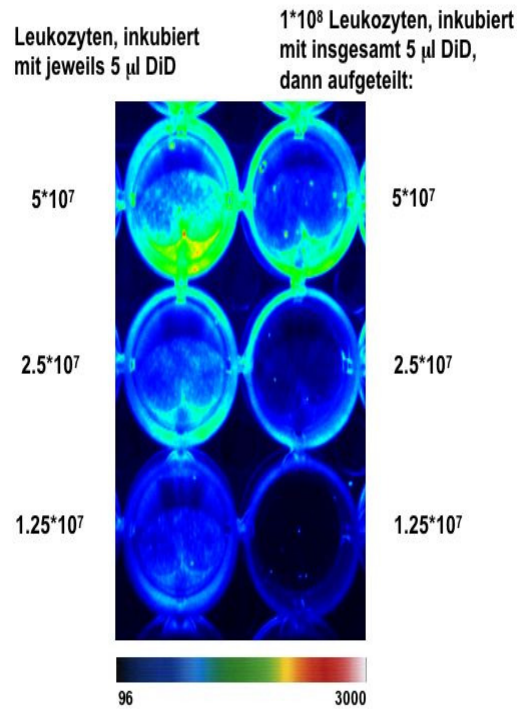


Abb. 11: Vergleich von Pilotstudie zwei und drei in Bezug auf die Signalintensitäten der DiD markierten Leukozyten.

4.1.2 Vitalitätstest der Kontrastmittel-markierten Leukozyten

Der Vergleich der einzelnen Leukozytenanzahlen vor und nach dem Markierungsprozess ergab, dass sich die Leukozytenanzahl nur gering änderte. Nach der Markierung zeigten die Leukozyten eine Vitalität von $93,7\% \pm 13,56\%$. Dies bedeutet, dass $93,7\%$ der Leukozyten nach dem Markierungsprozess noch vital waren. Die Toxizität des DiD war somit für die Leukozyten sehr gering. Eine niedrige Toxizität des Fluoreszenzfarbstoffes auf die zu markierende Zellen ist eine Grundvoraussetzung eines erfolgreichen Markierungsprozesses. Folglich war es uns möglich das DiD bedenkenlos für unsere experimentelle Arbeit zu verwenden.

Leukozytenanzahl prae:	Leukozytenanzahl post:
0,88x 10 ⁸ /ml	0,88x 10 ⁸ /ml
1,2x 10 ⁸ /ml	1,0x 10 ⁸ /ml
1,7x 10 ⁸ /ml	1,6x 10 ⁸ /ml
1,2x 10 ⁸ /ml	1,4x 10 ⁸ /ml
2,0x 10 ⁸ /ml	2,2x 10 ⁸ /ml
2,2x 10 ⁸ /ml	2,0x 10 ⁸ /ml
2,2x 10 ⁸ /ml	2,0x 10 ⁸ /ml
1,7x 10 ⁸ /ml	1,8x 10 ⁸ /ml
2,2x 10 ⁸ /ml	2,3x 10 ⁸ /ml
2,2x 10 ⁸ /ml	2,2x 10 ⁸ /ml
3,2x 10 ⁸ /ml	3,0x 10 ⁸ /ml
2,2x 10 ⁸ /ml	2,4x 10 ⁸ /ml
2,7x 10 ⁸ /ml	2,7x 10 ⁸ /ml
2,3x 10 ⁸ /ml	2,4x 10 ⁸ /ml
2,5x 10 ⁸ /ml	2,4x 10 ⁸ /ml
2,2x 10 ⁸ /ml	1,4x 10 ⁸ /ml
3,8x 10 ⁸ /ml	2,8x 10 ⁸ /ml
2,0x 10 ⁸ /ml	1,9x 10 ⁸ /ml
3,2x 10 ⁸ /ml	3,1x 10 ⁸ /ml
3,0x 10 ⁸ /ml	3,0x 10 ⁸ /ml
3,2x 10 ⁸ /ml	3,1x 10 ⁸ /ml
3,0x 10 ⁸ /ml	3,0x 10 ⁸ /ml
3,8x 10 ⁸ /ml	3,0x 10 ⁸ /ml
2,4x 10 ⁸ /ml	2,4x 10 ⁸ /ml

Tab. 3: Leukozytenanzahl vor und nach DiD Markierung

Im Diagramm sind die Leukozytenanzahlen vor und nach dem Markierungsprozess gegenübergestellt.

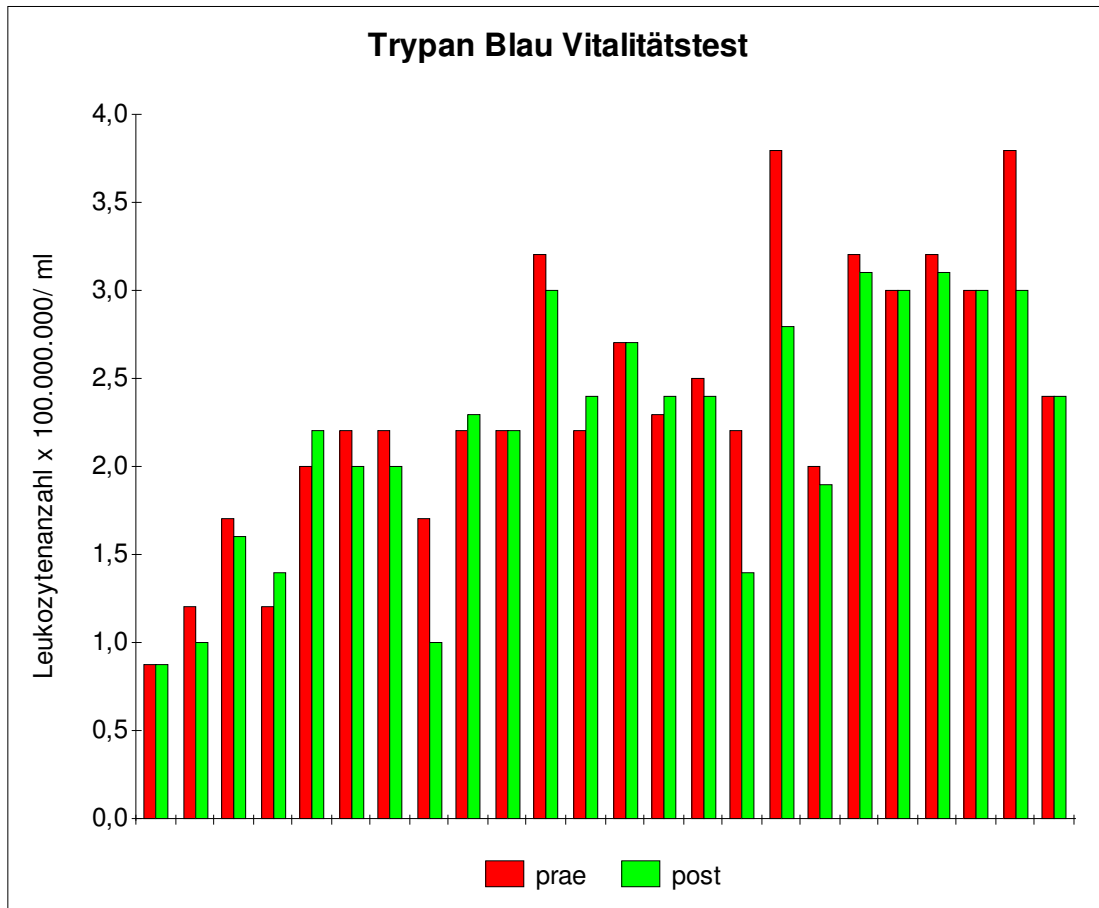


Abb. 12: Trypan Blau Vitalitätstest

4.1.3 Substanztestung

Es stellte sich heraus das die Enthaarungscreme keine fluoreszierende Eigenschaft besaß. Das Streu zeigte geringe und das Futter massive fluoreszierende Eigenschaften. Auch das Pentobarbital zeigte geringe fluoreszierende Eigenschaften. Die verschiedenen Testsubstanzen wiesen verschiedene Intensitätsunterschiede im Bezug zum Hintergrund auf. Die Messung des Intensitätssignal war mit einer ROI von 420 bis 552 Pixel erfolgt. Diese Erkenntnisse waren sehr wichtig für die experimentelle Arbeit und wurden in den Versuchsaufbau für die in vivo Studien mit einbezogen:

Die Ratten wurden, bevor sie unter den Optical Imager gelegt wurden, von jeglichem Einstreu befreit und mit einem schwarzen nicht fluoreszierenden Stoff am Bauch abgedeckt, so dass es bei der optischen Bildgebung zu keinen Überschneidungen der fluoreszierenden Stoffe und den mit DiD markierten Zellen kommen konnte. Das Pentobarbital wurde intraperitoneal appliziert, wobei die Abdeckung am Bauch auch diese Stelle mit abdeckte.

Optische Bildgebung von verschiedenen Substanzen, die potentiell mit der geplanten Messung interferieren könnten

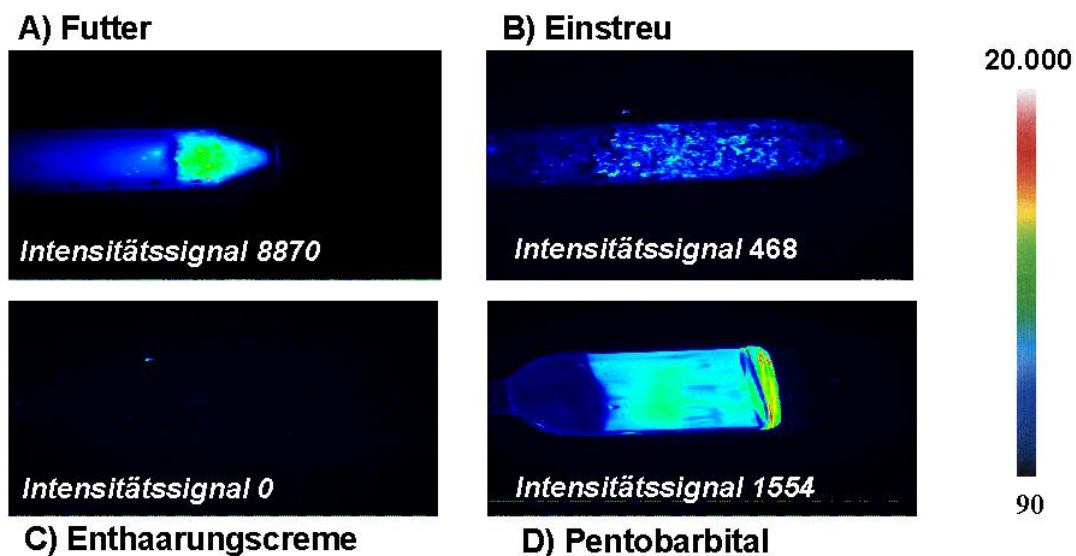


Abb. 13: Optische Bildgebung der verschiedenen Testsubstanzen

4.1.4 Optische Bildgebung

Die nachstehende Optische Bildgebung veranschaulicht die fluoreszierende Eigenschaft des Kontrastmittels DiD. Die direkte Gegenüberstellung von 5×10^8 Leukozyten vor Markierung mit 5×10^8 Leukozyten nach DiD Markierung verdeutlichte noch einmal, dass es nach dem Markierungsprozess zu einer Signalintensitätszunahme der Zellen in der Optischen Bildgebung kam. Die Leukozyten ohne Markierung zeigten eine Signalintensität von 200, während die Leukozyten nach DiD Markierung eine Signalintensität von 1500 aufwiesen.

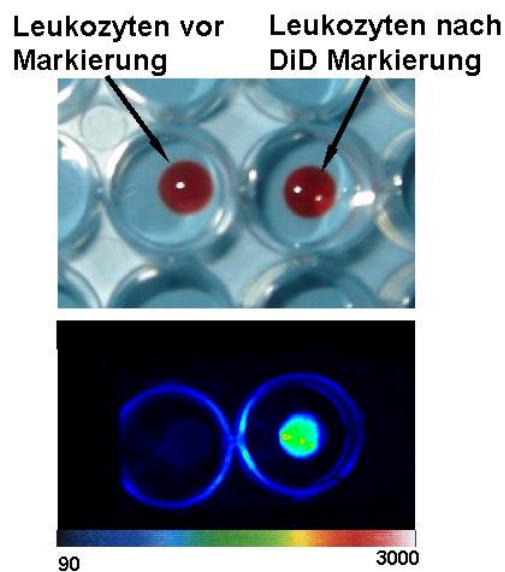


Abb. 14: Gegenüberstellung von einem unmarkierten und einem DiD markierten Leukozytenpellets. Der obere Bildausschnitt zeigt ein Foto des unmarkierten Zellpellets und des DiD markierten Zellpellets in einer Lochplatte. Beide Zellpellets enthalten 5×10^8 Leukozyten. Die optische Bildgebung der Selbigen, nicht markiertes und DiD markiertes Zellpellets, zeigt nur eine minimale Fluoreszenz der nicht markierten Leukozyten und eine deutliche Fluoreszenz der markierten Leukozyten (unterer Bildausschnitt). Die optische Bildgebung ist auf ein Maximum von 3000 Einheiten skaliert.

4.2 In vivo Experimente

4.2.1 Pilotstudien

In den Pilotstudien wurden einer Empfängerratte (Pilotratte 1) nach Injektion von $1,8 \times 10^8$ DiD markierten Leukozyten aus einem Spendertier und einer Empfängerratte (Pilotratte 2) nach Injektion von DiD markierten Leukozyten aus zwei Spendertieren. Optische Bildgebungen durchgeführt. Die Auswertung der optischen Bildgebung direkt nach Injektion, sowie eine und 24 Stunden nach Injektion der DiD markierten Leukozyten ergaben folgende Signalintensitäten für das rechte arthritische Kniegelenk:

Aufnahmezeitpunkt	Pilotratte 1	Pilotratte 2
	(Injektion von $1,8 \times 10^8$ Zellen)	(Injektion von $2,3 \times 10^8$ Zellen)
5 min nach Injektion	514	514
1 h nach Injektion	364	1150
24 h nach Injektion	696	914

Tab. 4: Vergleich der Signalintensitäten von Pilotratte eins und zwei

Der Vergleich der beiden in vivo Pilotstudien zueinander ließ klar erkennen, dass eine höhere Konzentration an DiD markierten Leukozyten zu einer vermehrten Akkumulation in arthritischen Knie führte und somit eine erhöhte Signalintensität besaß. Die zweite Pilotratte wies zudem größere Intensitätsschwankungen im zeitlichen Verlauf auf. Dies könnte durch die geringe Menge an DiD markierten Leukozyten hervorgerufen worden sein, die sich nicht gleichmäßig im Gewebe verteilt hatten. Im Vergleich dazu war bei der ersten Pilotratte ein deutlicher linearer Signalintensitätsanstieg nach Injektion und nach 24 Stunden ein Signalintensitätsabfall zu beobachten.

Aus den gewonnen Erkenntnissen der in vivo Pilotstudien rückschließend und wegen der besseren Akkumulation der Leukozyten, wurde für die experimentelle Studie die gewonnenen Leukozyten von zwei Spendertieren (3 bis 5×10^8) mit DiD markiert und injiziert.

4.2.2 Histologie

Die H&E Färbung zeigte in den unbehandelten arthritischen Kniegelenken eine deutlich hyperplastische Synovialmembran mit variabler Infiltration von Leukozyten und Makrophagen. Die Kortison-behandelten arthritischen Kniegelenke zeigten eine leicht hyperplastische Synovialmembran, die sich an einigen Stellen bereits wieder wie gesundes Gewebe darstellte und keine Entzündungszeichen mehr zeigte. Alle contralateralen Kontroll-Kniegelenke zeigten keinerlei Anzeichen einer Entzündung.

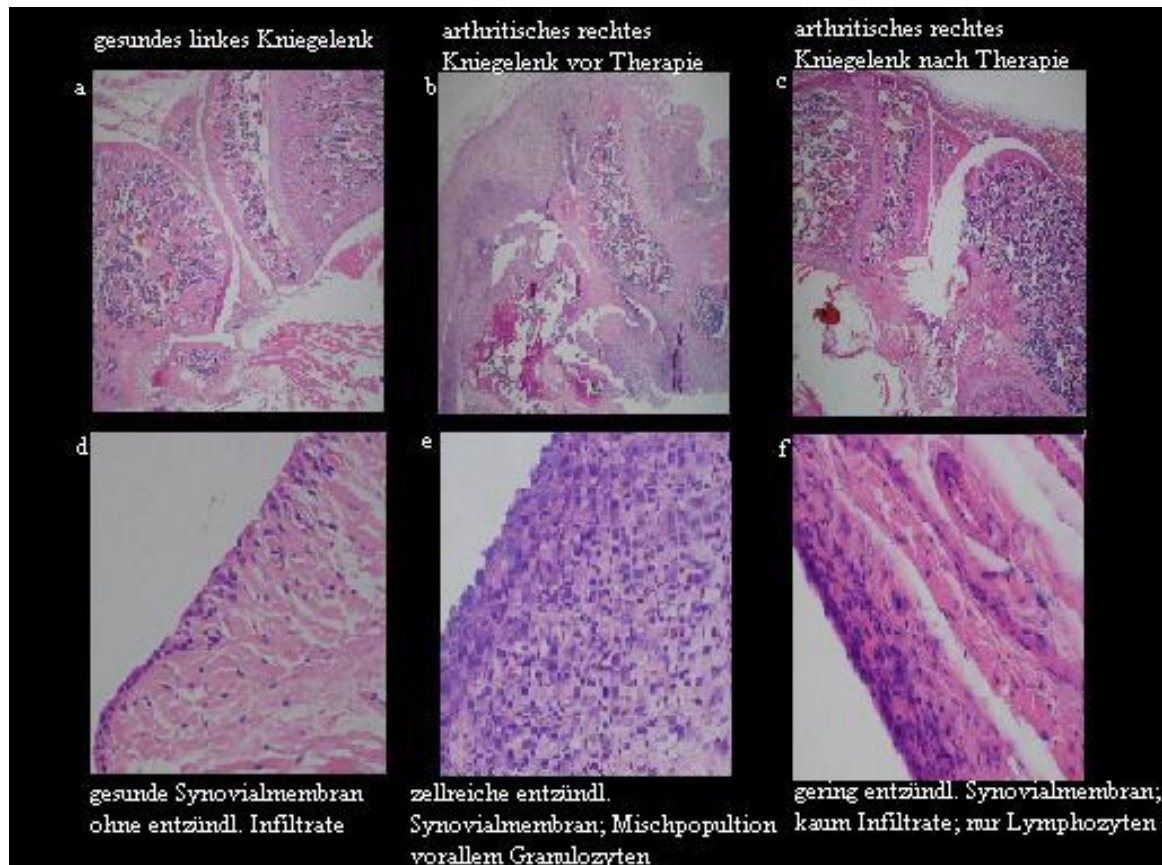


Abb. 15: H&E Färbung eines gesunden linken Kniegelenks (a) (d), eines arthritischen rechten Kniegelenks vor Therapie (b) (e) und eines arthritischen rechten Kniegelenks nach Kortisontherapie (c) (f); a-c: Kniegelenk in 1,25x vergrößert; d-e: Synovialmembran 40x vergrößert

Mit der Fluoreszenzmikroskopie konnten im arthritischen Kniegelenk DiD markierte Leukozyten mit einer positiven Fluoreszenz in der hyperplastischen Synovialmembran nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte im Kortison-therapierten Knie eine deutlich geringere Anzahl an DiD markierte Leukozyten nachgewiesen werden und im gesunden contralateralen Knie waren gar keine positiven fluoreszierende Leukozyten nachzuweisen.

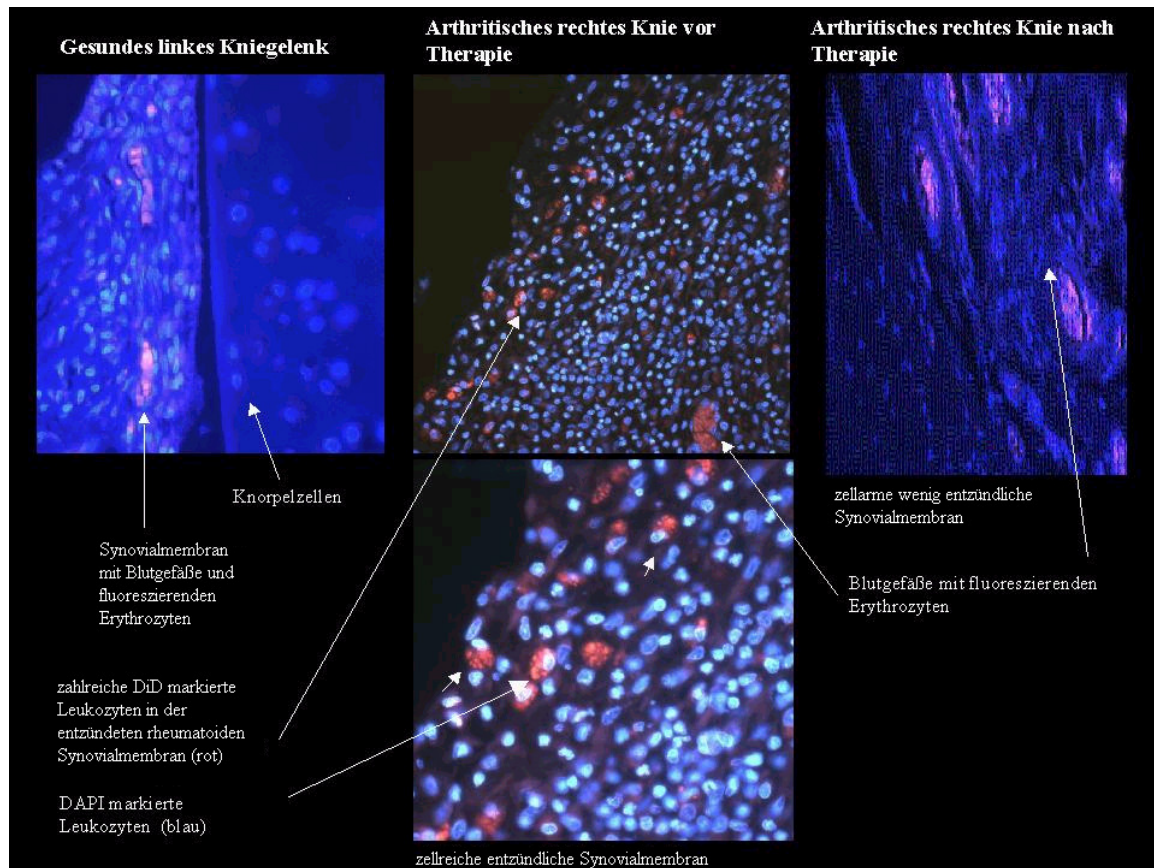


Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopie der Synovialmembran von einem gesundem linken Knie, einem arthritischen rechten Knie und einem therapierten rechten Knie. Obere Abbildungsreihe ganz links 40x Vergrößerung; Oben Mitte und oben rechts 20x Vergrößerung; Unten Mitte 40 x Vergrößerung; Die DiD markierten Leukozyten konnten mit einem Exzitationsfilter von 553nm und einem Emissionsfilter von 575nm, rötlich fluoreszierend nachgewiesen werden. Die Zellkerne stellen sich durch das DAPI blau dar.

4.2.3 Optische Bildgebung

Alle 12 Tiere (Gruppe 1 und Gruppe 2) entwickelten eine Monoarthritis im rechten Kniegelenk sieben bis zehn Tage nach intraartikulärer Injektion des mBSA. Die Monoarthritis machte sich durch eine deutliche Schwellung des betroffenen Kniegelenkes und durch Humpeln der Tiere bemerkbar. Vor jeder optischen Bildgebung wurde der Durchmesser beider Knie der zu untersuchenden Ratten mit einer Messlatte gemessen. Bei der Gruppe vor Therapie konnte eine Durchmesserzunahme von 4 bis 7mm des rechten arthritischen Knies im Gegensatz zum linken gesunden Knie gemessen werden. Die Gruppe nach erfolgter Therapie (nach sechs Tagen Kortisongabe), zeigte am Tag der optischen Bildgebung 0 bis 1mm Durchmesserzunahmen des rechten Knies im Vergleich zum Linken. Nur bei einem Tier nach Therapie konnte eine Kniedurchmesserzunahme von 3mm beobachtet werden. Die Zunahme des Kniedurchmessers vor Therapie beziehungsweise fehlende oder geringe Zunahme nach Therapie entsprachen dem histologisch nachgewiesenen unterschiedlichem Ausmaß der entzündlichen Gelenk-veränderungen.

Die optische Bildgebung zeigte bereits vor Leukozyteninjektion Signalintensitätsunterschiede zwischen den arthritischen und den contralateralen normalen Kniegelenken. Die arthritischen Kniegelenke zeigten eine deutlichere Fluoreszenz als die normalen Kniegelenke. Dies konnte vermehrt bei den unbehandelten Tieren als bei den behandelten Tieren beobachtet werden. Die normalen Kniegelenke zeigten gleich starke Signalintensitäten verglichen zu der umgebenden normalen Skelettmuskulatur (siehe Abb. 17) Angemerkt sei, dass die unrasierten Knöchel und Füße bei allen Tieren eine starke Autofluoreszenz zeigten.

Nach Injektion der DiD markierten Leukozyten nahmen die Signalintensitätsunterschiede zwischen den arthritischen und den normalen Knie sehr stark zu:

Die optische Bildgebung zum Zeitpunkt von vier und 24 Stunden nach Injektion der DiD markierten Zellen zeigte hochgradige Signalintensitätszunahmen in den arthritischen Knien, jedoch nur geringe Signalintensitätszunahmen in den contralateralen nicht entzündlich veränderten Kniegelenken. Bei allen unbehandelten Tieren waren die Signalintensitäten deutlich erhöht verglichen zur normalen Muskulatur. In allen sechs Kortison behandelten Kniegelenken war dieser Effekt deutlich geringer ausgeprägt. Die Signalintensität der therapierten Kniegelenke war leicht erhöht (n=3) oder gleich (n=3) verglichen zum normalen Muskelgewebe.

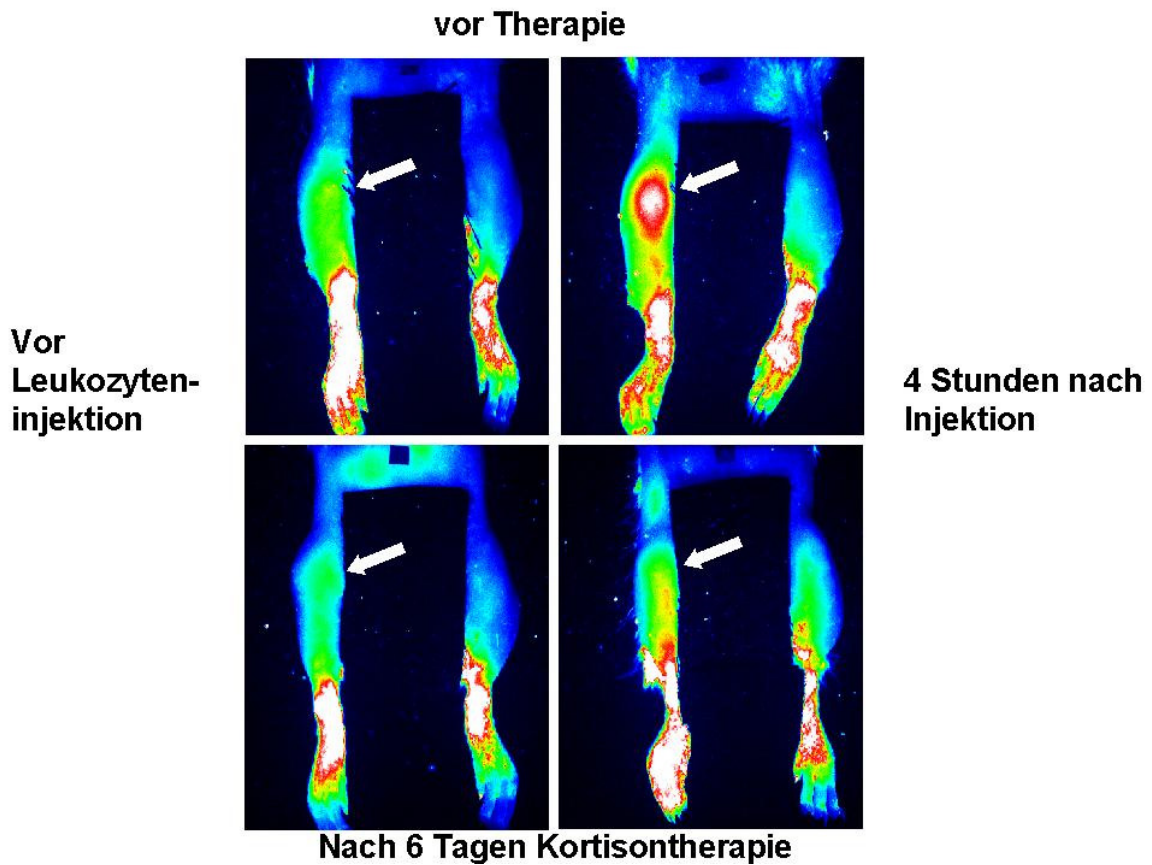
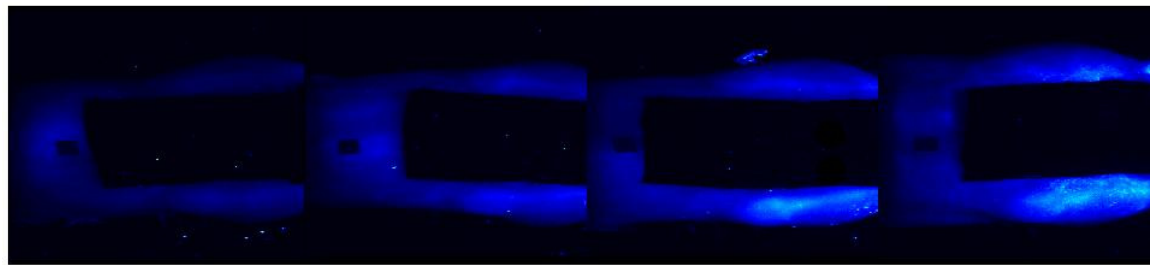
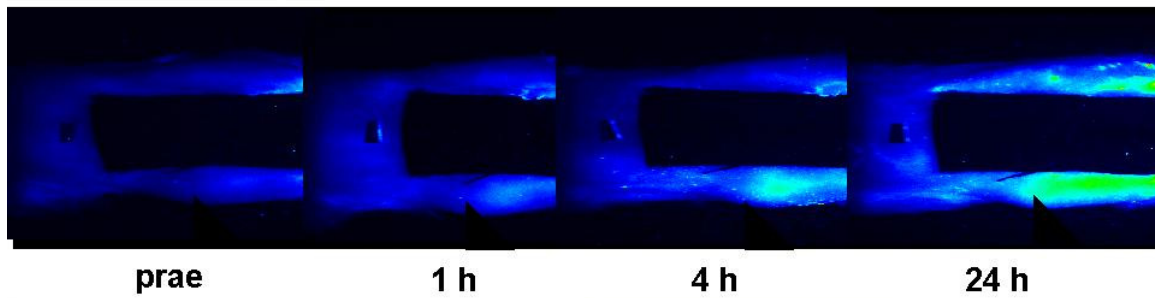


Abb. 17: Optische Bildgebung einer unbehandelten Ratte mit einer Arthritis des rechten Kniegelenkes und einer Kortison-therapierten Ratte mit Arthritis des rechten Kniegelenkes vor und vier Stunden nach Injektion der DiD markierten Leukozyten. Die Optische Bildgebung ist bei jedem Experiment auf das gleiche Maximum von 700 Einheiten skaliert. Der Pfeil zeigt auf das rechte Kniegelenk: Die optische Bildgebung des arthritischen Kniegelenkes zeigt eine deutliche Signalzunahme nach Injektion der DiD markierten Zellen. Das behandelte Knie zeigt eine geringere Signalzunahme nach Zellinjektion. Das starke Signal im Fuß und Fußgelenk ist durch die Autofluoreszenz des Felles in diesem unrasierten Bereich begründet.

Vor Therapie



Nach 6 Tagen Kortisontherapie

Abb.

18: Repräsentative Optische Bildgebungen der unteren Extremitäten von einer unbehandelten Ratte mit einer induzierten Arthritis im rechten Knie und einer Kortisontherapierten Ratte mit Autoimmunarthritits rechts vor und nach einer, vier und 24 Stunden Injektion der DiD markierten Leukozyten. Die Optische Bildgebung ist bei der unbehandelten Ratte auf ein Maximum von 1600 Einheiten skaliert und bei der behandelten Ratte auf ein Maximum von 2500 skaliert. Beide Optischen Bildgebungen sind auf ein gemeinsames Minimum von 90 skaliert.

4.2.4 Fusion von optischen Bildgebungs- und Röntgenaufnahmen

Mit Hilfe der optischen Bildgebung der DiD markierten Leukozyten war es uns möglich einen Entzündungsprozess sichtbar zu machen. Jedoch war die anatomische Zuordnung der Entzündung im Kniegelenk zu den Skelettstrukturen mit der optischen Bildgebung nicht möglich. Aus diesem Grund wurden Überlagerungen der erfassten Fluoreszenzen mit einem Röntgenbild des gleichen Versuchstiers bei gleicher Lagerung angefertigt. Die Überlagerungen ergaben den Beweis dafür, dass die DiD markierten Leukozyten eindeutig in die anatomische Struktur des Kniegelenks gewandert waren um dort dem Entzündungsprozess der induzierten Arthritis entgegen zu wirken. Somit konnte die rheumatoide Arthritis mit der optischen Bildgebung diagnostiziert werden und der Erfolg einer Kortisontherapie bestätigt werden.

Optische Bildgebung 24 h nach Injektion der DiD markierten Leukozyten

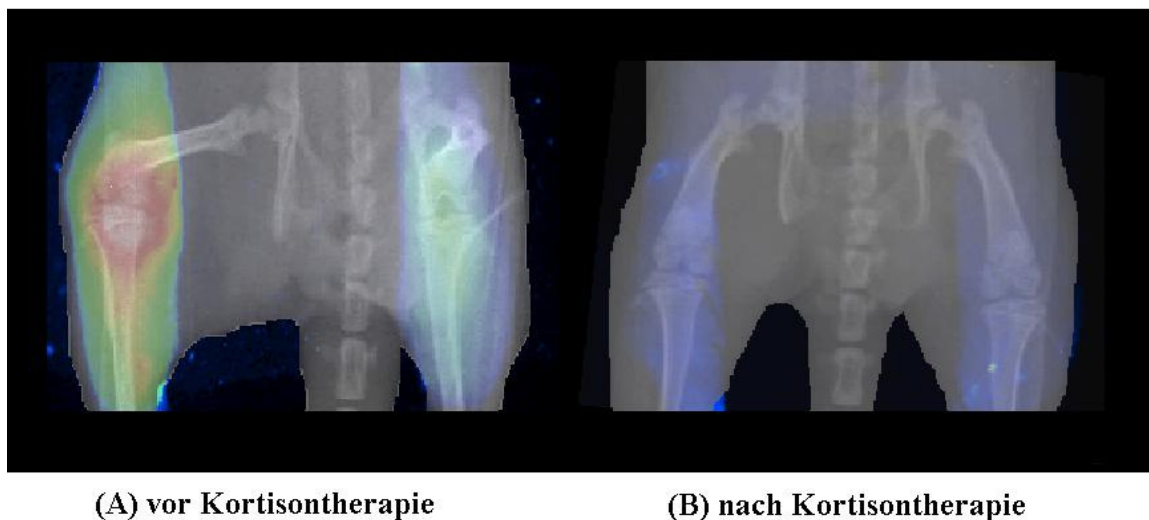


Abb. 19: Überlagerung von Röntgenbild und Optischer Bildgebung

4.2.5 Statistik

Quantitative Ergebnisse (A/N Verhältnisse = gemessene Signalintensität des arthritischen Kniegelenkes, normiert auf das contralaterale normale Kniegelenk) der unbehandelten und Kortison-behandelten Tiere werden in Tabelle fünf aufgeführt.

Die Ausgangsverhältnisse der A/N vor Leukozyteninjektion zeigten leicht höhere Signalintensitätswerte von unbehandelten Tieren verglichen mit behandelten Tieren mit einer grenzwertigen Signifikanz von $P=0,047$. Nach Injektion der DiD markierten Leukozyten, stieg das Verhältnis A/N stufenweise im zeitlichen Verlauf der Untersuchung an. Die A/N Quotienten waren signifikant erhöht für die unbehandelten Tiere an ($P < 0,05$), jedoch nicht für die behandelten Tiere ($P > 0,05$). Die behandelten Tiere zeigten ein A/N Maximum vier Stunden nach Zellinjektion. Zu diesem Zeitpunkt waren die A/N Verhältnisse der unbehandelten Tiere signifikant erhöht verglichen mit den Ausgangswerten ($P = 0,006$) und signifikant verschieden verglichen mit den Kortison behandelten Tieren ($P = 0,008$). Dieser Effekt bestand bei 24 p.i. fort, war zu diesem späteren Beobachtungszeitpunkt jedoch geringer ausgeprägt. Die A/N Verhältnisse der behandelten Gelenke waren signifikant geringer als die der unbehandelten Gelenke.

	therapiert					
prae	1,53	1,81	1,79	1,27	1,66	1,79
5min p.i.	1,70	2,16	1,60	0,96	1,64	1,79
60 min p.i.	1,66	2,63	1,56	1,49	1,77	1,98
4h p.i.	1,67	2,26	2,38	1,87	1,82	2,43
24h p.i.	2,01	1,33	1,66	1,65	1,66	2,19
	nicht therapiert					
prae	1,31	1,36	1,39	1,30	1,23	1,73
5min p.i.	1,17	1,36	1,66	1,59	1,27	1,43
60 min p.i.	1,35	1,39	1,22	1,24	1,50	2,09
4h p.i.	1,13	1,60	1,51	1,32	1,28	1,39
24h p.i.		1,55	1,32	1,03	1,04	1,31

Tab. 5: A/N Verhältnisse der unbehandelten und Kortison-behandelten Tiere über die Zeit.

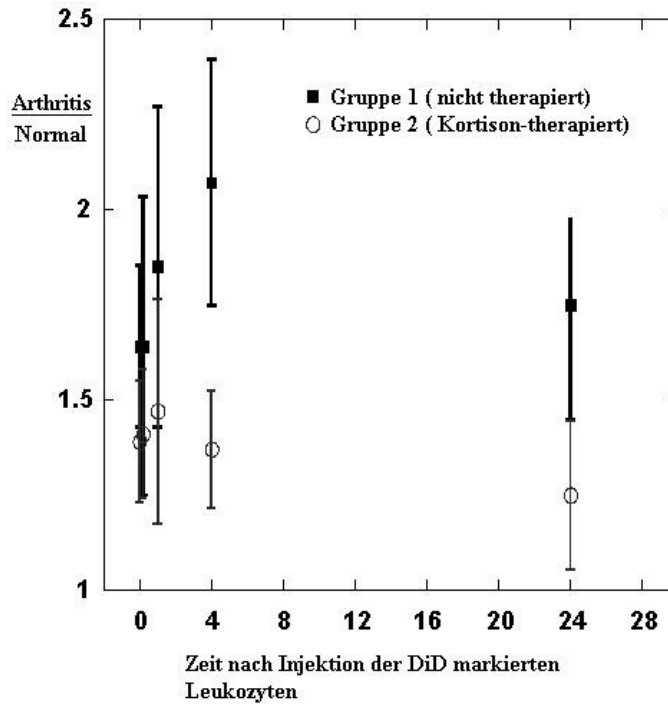


Abb. 20: Gegenüberstellung der gemessenen Signalintensitäten der arthritischen Kniegelenke, normiert auf die contralateralen normalen Kontrollkniegelenke, quantifiziert als A/N Quotienten (Mittelwerte von jeweils 6 Versuchstieren mit Standardabweichungen). Die A/N Quotienten der nicht therapierten Tiere (Gruppe 1, n=6) und der Kortison therapierte Tiere (Gruppe 2, n=6) zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen zum Zeitpunkt 4h ($p=0,008$) und 24h ($p=0,014$) nach Zellinjektion.

5. Diskussion

Die Auswertung dieser Studie ergab, dass die Akkumulation von intravenös injizierten allogenen Leukozyten, ex vivo markiert mit einem Fluoreszenzkontrastmittel, im arthritischen Knie mit der Optischen Bildgebung (OB) dargestellt werden konnte. Die Akkumulation der fluoreszierenden Leukozyten in den entzündeten Gelenken konnte am besten vier Stunden nach i. v. Zellinjektion ermittelt werden. Zusätzlich stellten unsere Resultate dar, dass der gut bekannte anti-entzündliche Effekt einer Steroidebehandlung zu einer bedeutenden Signalintensitätsabnahme in der OB der arthritischen Gelenke führte und mit einer Abnahme der Akkumulation der fluoreszierenden Zellen, mit Hilfe der Histologie bestimmt, korrelierte. Somit könnte die OB geeignet sein, anti-entzündliche Behandlungsentwicklungen zu überwachen.

Die Technik der OB mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen wurde bereits in früheren Studien für verschiedene Indikationen verwendet und erforscht, wie z. B. die OB von ex vivo markierten hämatopoetischen Progenitorzellen im Knochenmark (37). Bei dieser Studie wurde das Kontrastmittel Gadophrin verwendet. Dies ist eigentlich ein MRT Kontrastmittel, das aber aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaft auch für die OB geeignet ist. Hauptvorteil ist die Bifunktionalität dieses Kontrastmittels, die einen Vergleich von MRT und OB Ergebnissen ermöglicht. Nachteil des Gadophrin ist jedoch, dass sowohl die Fluoreszenz als auch die Relaxivitäten des Kontrastmittels nicht dem optimalen Bereich für OB und MRT entsprechen, so dass eine große Menge an markierten Zellen benötigt wurde, um signifikante Ergebnisse zu erhalten. Weiteres Beispiel früherer Anwendungen der OB mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen, ist die in vivo Markierung von Stromazellen des Knochenmarks in Hirninfarkten von Mäusen (42). In dieser Studie wurden Mäuse gewonnene Stromazellen, die das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimierten, ins Striatum implantiert. Durch die Detektion des GFP mit Hilfe der OB konnte die Einwanderung, Wachstum und Differenzierung der transplantierten Zellen beobachtet werden. Vorteil dieser Studie war die Transplantation von Stammzellen im Tiermodell auf eine Weise, die keiner histologischen Analyse bedurfte, um den Einwanderungsverlauf der Zellen erst zum Zeitpunkt des Todes zu beobachten. Sondern eine Beobachtung der Zellen kontinuierlich über die Zeit und nicht invasiv mit der OB ermöglichte. Nachteil jedoch war das die OB nur bis zu einer Tiefe von 3mm ins Gehirn Stromazellen aufdecken konnte.

Noch ein Beispiel der OB ist die in vivo Markierung der diabetischen CD8+ T- Zellen Rekrutierung im Pankreas (34). In der Studie von Moore et al wurde das Fluoreszenzkontrastmittel Isothiocyanat (FITC) zur Markierung der CD8+ T- Zellen verwendet. Vorteil dieses Kontrastmittels ist, dass es zu einem Nanopartikelkomplex mit I^{125} , Kontrastmittel für die Szintigraphie und einem Eisenoxid, Kontrastmittel für die MRT zusammengelagert werden konnte. Somit zeigte auch dieses Kontrastmittel sogar eine Trifunktionalität, die eine parallele Darstellung der applizierten Zellen mit OB, Szintigraphie und MRT ermöglichte. Nachteil dieses Kontrastmittels war, dass es nur von 2% der im peripheren Blut vorhandenen T-Zellen aufgenommen wurde. Folglich war auch dieses Kontrastmittel für die OB nicht gut geeignet.

Der Vorteil des von uns verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes DiD im Vergleich zu den genannten zuvor verwendeten Kontrastmittel ist dagegen, dass die chemische Struktur, Extinktion, Emission und verwendete Dosis unseres Farbstoffes für die OB optimiert wurde. In den genannten früheren Studien, inklusive unserer Studie, wurden die Zellen für die in vivo OB zuvor ex vivo mit Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dies ermöglichte eine gezielte und optimierte Markierung der zu beobachtenden Zellen. Eine in vivo Markierung von Leukozyten wäre für etwaige klinische Applikationen einfacher in der Durchführung, wurde jedoch unseres Wissens nach bis jetzt noch nicht beschrieben.

Es wurden verschiedene Studien zur Detektion und Charakterisierung der Arthritis nach Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen (ohne Zellen) durchgeführt (10, 60). Die Diagnostik der Arthritis anhand dieser Studien folgte jedoch anderen Mechanismen:

Zum Beispiel beschrieben Chen et al eine Folat-beladene, im nahinfrarot Bereich fluoreszierende Probe, die von aktivierten Makrophagen in entzündeten Gelenken aufgenommen wurden (10). Vorteil dieser Studie verglichen mit unserer Studie ist die leichtere Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes ohne vorherige notwendige Zellisolation und ex vivo Markierungsprozess. Ein Nachteil dieser Folat-Rezeptor vermittelten Methode ist, dass die Akkumulation dieses Fluoreszenzfarbstoffes im Entzündungsprozess über Folat-Rezeptor-exprimierende Makrophagen durch Konkurrenz mit anderen Folaten aus Diäten oder Therapeutika gehemmt werden kann.

In einer anderen Studie berichteten Wunder et al eine hohe Sensitivität von Fluoreszenzfarbstoffen, die in der Lage waren, Cathepsin B zu markieren, ein Matrix abbauendes Enzym, das zur Zerstörung von arthritischen Gelenken beiträgt. Diese Technik wurde zur Überwachung von frühen Therapieverläufen unter anti-rheumatischer Medikation mit Methotrexate angewendet (60). Ein Vorteil dieser Technik könnte ihre höhere Spezifität verglichen mit unserem Ansatz sein. Jedoch könnte dieser Vorteil zur gleichen Zeit ein Nachteil sein, da die höherer Spezifität mit einer geringeren Sensitivität verbunden ist und eine klinische Anwendbarkeit fraglich ist vor dem Hintergrund der Heterogenität der Genexpression bei Patienten verglichen mit dem Tiermodell. Der Aufbau unserer Studie lässt eine einfachere Umsetzung für etwaige klinische Applikationen und eine höhere Sensitivität für die Erkennung von entzündlichen Prozessen erwarten. Jedoch ist bisher kein direkter Vergleich dieser unterschiedlichen Methoden durchgeführt worden

Andere optische bildgebende Techniken können für die Diagnostik der Arthritis mit markierten Leukozyten angewendet werden. Der Nachweis von Leukozyten mit Hilfe der Optischen Bildgebung könnte auch durch Genmanipulation der untersuchten Zellen, z.B. Einfügen von Genen erreicht werden, die eine Produktion von Luciferase (Luc) oder anderer lumineszierender Proteine kodieren. Die Zellen würden dann nicht erforderlicherweise ex vivo mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden müssen, jedoch ein eher konstantes eigenes Biolumineszenzsignal produzieren, das mit der OB detektiert werden könnte (35). Ein großer Vorteil dieser biolumineszenz-basierten OB Studien ist die niedrige Autofluoreszenz des untersuchten Gewebes, in dem sich die Zellen anreichern, und das geringere Hintergrundrauschen verglichen mit unserer Fluoreszenz-basierten Studie. Jedoch ist die Biolumineszenz derart manipulierter Zellen meistens sehr schwach ausgeprägt und dadurch nur mit sehr sensitiven Geräten zur Signalaufdeckung darstellbar. Zusätzlich ist die Technik der Zellvorbereitung kompliziert und erfordert eine Transfektion der Zellen mit dem Luciferasegen. Diese würde sehr viel schwieriger oder gar nicht in der klinischen Praxis einzuführen sein, im Gegensatz zu unserer einfachen Inkubationsmethode der Fluoreszenzproben, die sehr der klinisch etablierten Leukozytenszintigraphie ähnelt (19).

Die Methode der Leukozytenmarkierung ist in der nuklearmedizinischen Bildgebung seit Jahrzehnten etabliert und hat sich für die Detektion und Charakterisierung von Entzündungsprozessen in experimentellen und klinischen Studien bewährt. Die Markierung von Zellen mit Radionukleotiden ist für die Suche und die Lokalisation der systemischen Verteilung von Zellen gut geeignet (1).

Die Szintigraphietechniken mit Tc^{99m} -HMPAO oder In^{111} -Oxin markierten Leukozyten sind weitgehend im klinischen Alltag zur Aufdeckung von Entzündungen anerkannt. Die Studie von Peters et al (38) hat gezeigt, dass neben dem gängigen In^{111} Oxin das In^{111} Tropolon ein neues potentes Radionukleotid zur Zellmarkierung ist. Es besitzt eine hohe Effektivität, was die Bindung an Zellen betrifft und bedeutet somit eine Verbesserung der Lebendigkeit

der Zellen. Das Tropolonat ist ein Chelat Kontrastmittel im Gegensatz zum lipophilen Komplex In ¹¹¹ Oxin. Obwohl die Zeit nach Zellinjektion für die nuklearmedizinische Darstellung von Entzündungen in der Regel erst nach drei Stunden erfolgen kann, ist es mit Tropolonat Markierungen schon möglich gut, früher (drei Stunden) aussagekräftige Bilder zu erlangen. Die Markierung von Leukozyten zur Diagnostik von Entzündungen ist eine sichere, nicht invasive und objektive Methode (40) und folglich zur Zeit der „Goldstandart“ in der klinischen Diagnostik (1). Neben der Entzündungsdiagnostik werden die Leukozytenszintigraphien für die Diagnostik und den Therapieverlauf von Myokardinfarkten eingesetzt.

Eine myokardiale Leukozyteninfiltration ist ein Zeichen des akuten Infarktes. Zur Leukozytenmarkierung in der Myokardinfarktdiagnostik können sowohl ¹¹¹ In als auch ^{99m}Tc verwendet werden (16).

Vor kurzem wurde auch die Positron Emissions Tomographie (PET) für den in vivo Nachweis von ⁶⁴ Cu-pyruvaldehyd-bis (N⁴ -methylthiosemicabazone) markierten Leukozyten eingeführt (1). Die Studie von Adonai ergab, dass im Gegensatz zu den geläufigen Anwendungen von 2-[18F]-Fluoro-2-deoxy-d-glucose Tracern mit Halbwertszeiten um die drei bis sechs Stunden, die Markierung von Leukozyten mit ⁶⁷Cu-PTSM eine Reduzierung der Halbwertszeit auf 24 bis 36 Stunden ermöglichte. Die Hauptvorteile der Szintigraphie und der PET sind die hohe Sensitivität und das Potential, den ganzen Körper in einer Untersuchung nach potentiellen Entzündungsprozessen absuchen zu können. Nachteile dieser Techniken gegenüber unserer Technik sind die Strahlenexposition des Patienten, die verhältnismäßige lange Halbwertszeit mancher Isotope und im Falle der PET, die begrenzte Verwendbarkeit und die hohen Kosten dieser Methode. Unsere OB Methode dagegen ist auf die Untersuchung von begrenzten Körperabschnitten beschränkt, z.B. die Untersuchung von Händen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. Die OB verwendet keine radioaktiven Strahlen, die Aufnahmen werden kostengünstig innerhalb von Sekunden erstellt und können mit Röntgen-aufnahmen fusioniert werden, die als Standardbildgebung für den Therapieverlauf erstellt werden.

Ein Nachweis von Kontrastmittel-markierten Leukozyten ist auch mit der MR Tomographie möglich. Mit einer reinen Inkubation und modernen Transfusionstechniken konnten verschiedene Zelltypen effizient mit Eisenoxid-Partikeln ex vivo markiert werden (32).

Diese Eisenoxid-markierten Zellen konnten in experimentellen Tiermodellen in vivo mit der MRT verfolgt werden (12, 13, 62). Diese neue Technik kombiniert die Vorteile der überlegenen anatomischen Auflösung der MR Bildgebung mit der fehlenden Strahlenbelastung wie bei der OB. Jedoch bleibt es der Zukunft überlassen ob diese auf MR basierende Zellmarkierung, die momentan nur den experimentellen Aufbau in Tieren vorbehalten ist und noch nicht im Menschen angewendet wurde, in der Sensitivität mit der Szintigraphietechnik und OB konkurrieren kann.

Wir erkennen einige Einschränkungen unserer Studie:

Erstens, werteten wir nicht die Leistungsfähigkeit der DiD-Markierung von verschiedenen Leukozyten Subpopulationen aus und wir stellten nicht fest, ob alle oder nur spezifische Leukozyten Subpopulationen in die arthritischen Knie einwanderten und Ursache der beobachtbaren Veränderungen der Signalintensitäten in der OB waren. Unsere Studie wurde so entworfen, dass sie so nah wie möglich der „Leukozyten-szintigraphie“ in der Nuklearmedizin entsprach und einen einfachen Aufbau hatte, um eventuellen zukünftigen klinischen Anwendungen zur Verfügung stehen zu können.

In Anbetracht der bekannten Pathogenese der Antigen-induzierten Arthritis (53 n. 27), waren die beobachteten Signaländerungen in den arthritischen Gelenken am wahrscheinlichsten verursacht durch DiD markierte T-Zellen und Monozyten (53 n.58). Weitere Studien konnten unsere Methode anwenden, nachforschen und die Akkumulation von spezifischen, getrennt markierten Leukozyten-Subpopulationen in arthritischen Gelenken vor und nach gezielten Therapien vergleichen.

Zweitens erkannten wir, dass die zu beobachtende Signalintensitätsabnahme in der OB der arthritischen Knie nach Kortisontherapie durch verschiedene Faktoren verursacht worden sein könnte. Die Histopathologie bestätigte, dass die Akkumulation der DiD markierten Leukozyten in den arthritischen Knien nach Kortisontherapie deutlich abgenommen hatte. Jedoch, konnten wir auch bereits höhere Signalintensitäten in den unbehandelten verglichen mit den behandelten arthritischen Knien in den Ausgangsbildern erkennen, vor Injektion der DiD markierten Leukozyten. Dieser Effekt hatte höchstwahrscheinlich seinen Ursprung in einer verringerten Hyperämie (Hb sollte die Fluoreszenz unseres Farbstoffes absorbieren) in den arthritischen Knien nach Kortisontherapie. So ist es wahrscheinlich, dass die niedrigeren Signalintensitäten in den behandelten verglichen mit den nicht behandelten Knien in den Bildern der OB nach Injektion der markierten Leukozyten auch Folge eines kombinierten Effekts waren, zum einen durch eine verringerte Akkumulation DiD markierter Leukozyten in der Synovia und zum anderen durch eine Abnahme des Blutvolumens in der Synovia. Angemerkt sei, dass die Unterschiede im Blutvolumen allein zwischen den unbehandelten und behandelten arthritischen Knien nur in den Ausgangsbildern signifikant waren und die Injektion der DiD markierten Leukozyten deutlich den Unterschied bezüglich des Fluoreszenzsignals erhöhten und so unsere Fähigkeit zwischen den Gruppen zu unterscheiden vereinfachte.

Drittens versuchten wir einen klinisch durchführbaren und leichten technischen Aufbau für die OB, basierend auf der „Leukozytenszintigraphie“, zu erstellen. Die Rheumatoide Arthritis würde ein ideales Ziel für die OB sein, da sie eine sensitive Beschreibung der Gelenkentzündung innerhalb weniger Sekunden, ohne Strahlenbelastungen für den Patient, ermöglicht. Die Gelenke der Hand, die normalerweise zur Beobachtung des Therapieverlaufs herangezogen werden, sind mit dieser Technik leicht zugänglich. Jedoch ist der Fluoreszenzfarbstoff, der in dieser Studie verwendet wurde, nicht für den Gebrauch an Patienten zugelassen. Somit müssen klinische Anwendungen die Entwicklung von Fluoreszenzfarbstoffen, die klinisch verabreicht werden können, noch abwarten.

Viertens wurden die DiD markierten Leukozyten in DMEM gelöst in das Versuchstier injiziert. Aus neusten Studien von Weisser (55) ging jedoch hervor das DiD gelöst in DMEM Auslöschungseffekte hervorruft, die dazu führen das, das Emissionssignal 20x schwächer ist als die Messungen von DiD gelöst in Ethanol. Weisser (55) räumte jedoch eine, das der Markierungsprozess an sich nicht zwangsläufig gestört sein würde, da während dem Markierungsverfahren kein anregendes Licht zugegen war. Somit hat dieser Auslöschungseffekt keinen Einfluss auf unsere optische Bildgebung gehabt.

Schlussfolgernd, hat die OB Technik nach Injektion von ex vivo markierten allogenen Leukozyten das Potential, Entzündungen in der Synovia der Antigen-induzierten Arthritis aufzudecken und zu graduieren. Diese Daten regen zu Weiterentwicklungen von klinisch applizierbaren Fluoreszenzkontrastmitteln und der OB-Technik an. Mögliche klinisch-therapeutische Anwendungen unserer OB-Methode wäre zum Beispiel die Beobachtung des Wirkmechanismus neuer Medikamente, die Akkumulation und Aktivität der Zytokin-Freigabe durch T-Zellen und Monozyten in der Synovia beeinflussen.

Die OB-Methode könnte, analog zu der „Leukozytenszintigraphie“, dazu dienen, auf nicht-invasive Weise die Arthritis zu diagnostizieren und zu charakterisieren ohne den Patienten Strahlenbelastungen auszusetzen, und individuelle Therapieprotokolle auf Patienten mit Rheumatoider Arthritis zuzuschneiden und den Therapieverlauf zu beobachten.

6. Zusammenfassung

Optische Bildgebung der Autoimmunarthrititis mit DiD markierten Leukozyten

Zielsetzung: Ziel der vorliegenden Studie war es, zu untersuchen, ob die Optische Bildgebung nach Injektion von ex vivo DiD markierten Leukozyten, in der Lage ist, eine Entzündung der Synovialmembran in Ratten mit einer Antigen-induzierten Monoarthrititis des rechten Kniegelenkes aufzudecken. Die Optische Bildgebung wurde auf ihre Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen arthritischen und gesunden Kniegelenken und zwischen nicht-therapierten und Kortison-therapierten Kniegelenken untersucht. Folglich untersuchten wir die Möglichkeiten der Optischen Bildgebung, eine Rheumatoide Arthritis zu diagnostizieren sowie die Möglichkeit zur Beurteilung eines Therapie-verlaufs.

Material und Methoden: 12 Versuchstiere wurden für die in vivo Studie in zwei Gruppen zu jeweils 6 Tieren unterteilt. Bei allen Ratten wurde eine monoartikuläre Arthritis des rechten Kniegelenkes induziert. Die Sensibilisierung erfolgte mit einer Emulsion von komplettem Freudschen Adjuvant (Lee Laboratorios, Grayson, CA) und methyliertem bovinem Serumalbumin (mBSA, 20mg/ml, Sigma, St. Louis, MO). Nach 10 bis 20 Tagen erfolgte die Induktion der Arthritis durch eine intraartikuläre Injektion von mBSA in das rechte Kniegelenk. Zur Kontrolle wurde in das linke Kniegelenk dieselbe Menge an 0,9%NaCl (Abbott Laboratories, North Chicago, IL) injiziert. Gruppe 1 wurde vor Kortisontherapie, Gruppe 2 wurde nach Kortisontherapie mit der Optischen Bildgebung untersucht. Bei der zweiten Gruppe wurde einen Tag nach dem Auftreten klinischer Zeichen einer Arthritis im rechten Kniegelenk die Kortisontherapie eingeleitet. Am ersten Tag erfolgte eine Injektion von 30mg/kg Solu-Medrol (Methylprednisolone Sodium Succinat, 125mg/2ml, Pharmaciaa. Upjohn CO, Kalamazoo, MI) intraperitoneal und für fünf weitere Tage eine intraperitoneale Kortison-Injektion mit einer Dosis von 3mg/kg. Nach beendeter Therapie erfolgte für die Gruppe 2 die optische Bildgebung.

Für jedes Versuchstier aus den Gruppen eins und zwei wurden autologe Leukozyten gewonnen. Es wurde für jede Empfängerratte Blut von zwei Spenderatten benötigt, das entspricht einer Leukozytenzahl von 3 bis 5×10^8 /ml. Die Markierung der Leukozyten erfolgte in mehreren Schritten: Gewinnung von Serum aus den Vollblutproben, Gewinnung von Leukozyten aus den Serumproben, Markierung der Leukozyten mit dem Fluoreszenzkontrastmittel DiD (Vybrant® DiD cell-labeling solution, molecular probes, Eugene, Oregon) und Inkubation des Zellansatzes mit anschließender Auswaschung des Kontrastmittels. Jedem Versuchstier wurden die DiD markierte Leukozyten intravenös injiziert. Von allen Versuchstieren beider Gruppen wurden eine native Aufnahme (prae), direkt nach Injektion, 1 Stunde, 4 Stunden und 24 Stunden nach der Leukozyteninjektion Aufnahmen mit der Optischen Bildgebung angefertigt. Bei vier Tieren (2 aus Gruppe 1, 2 aus Gruppe 2) wurde zusätzlich noch eine 48 und 72 Stunden Aufnahme erstellt. Zusätzlich zu der Optischen Bildgebung wurden von drei Tieren aus der ersten Gruppe und von zwei aus der zweiten Gruppe Röntgenbilder angefertigt, um diese später mit den korrespondierenden Optischen Aufnahmen zu überlagern.

Ergebnisse: Die optische Bildgebung zeigte bereits vor Leukozyteninjektion Signalintensitätsunterschiede zwischen den arthritischen und den kontralateralen normalen Knien. Dies konnte deutlicher bei den nicht-therapierten Tieren als bei den Kortison-

therapierten Tieren beobachtet werden ($P=0,047$). Nach Injektion der DiD markierten Leukozyten nahmen die Signalintensitätsunterschiede zwischen den arthritischen und den normalen Knie sehr stark zu ($P<0,05$). Signifikant unterschiedliche Signalintensitätsmaxima des rechten Kniegelenks im Vergleich zum contralateralen gesunden Kniegelenk konnten zum Zeitpunkt von vier und 24 Stunden nach Injektion der DiD markierten Zellen beobachtet werden. Bei allen nichttherapierten Tieren waren die Signalintensitäten deutlich erhöht verglichen zum normalen Muskelgewebe. In allen sechs Kortison-therapierten Tieren, war dieser Effekt geringer ausgeprägt als bei den nicht-therapierten Tieren ($P>0,05$). Die behandelten Tiere zeigten ein A/N (Arthritis Knie/normalen Knie) Maximum vier Stunden nach Zellinjektion. Zu diesem Zeitpunkt waren die A/N Quotienten der unbehandelten Tiere signifikant erhöht verglichen mit den Ausgangswerten ($P = 0,006$) und signifikant verschieden verglichen mit den Kortison-therapierten Tieren ($P = 0,008$). Dieser Effekt bestand bei 24 p.i. fort, aber war geringer ausgeprägt als zum Zeitpunkt 4 h p.i.

Schlussfolgerung: Die optische Bildgebung von ex vivo DiD markierten allogenen Leukozyten hat das Potential, Entzündungen der Synovialmembran bei der Antigen-induzierten Arthritis aufzudecken und zu graduieren. Gleichzeitig besitzt die optische Bildgebung die Fähigkeit, Therapieeffekte zu beobachten und im Verlauf darzustellen. Die einfache Technik der Zellmarkierung und neue Entwicklungen von klinisch einsetzbaren Fluoreszenzkontrastmitteln könnte den klinischen Einsatz dieser neuen bildgebenden Methode in naher Zukunft, analog zur „Leukozytenszintigraphie“ auf nicht-invasive Weise und ohne Strahlenbelastung für den Patienten, ermöglichen.

7. Summary

Optical Imaging of the Autoimmune-Arthritis with DiD labelled Leukocytes

Objectives: A goal of the available study was to find out whether the optical imaging has the ability, after injection of ex vivo DiD marked leukocytes into the rat, to uncover an inflammation of the Synovialis in the antigen induced model. We detect the optical imaging for its ability to distinction between arthritic and normal knee joint and between untreated and cortisone-treated knee joint. Therefore to find out if it is possible to diagnose with the optical imaging a Rheumatoide Arthritis and if this were the case the possibility to observe a therapy process.

Materials and methods: The 12 experimental animals were partitioned for the in vivo study in two groups to in each case 6 animals. All rats were induced an antigen-mediated monoarthritis of the right knee joint. Group 1 was examined before cortison treatment, group 2 after cortison treatment with the optical imaging. The monoarthritis was induced at both groups in the same way. The sensitisation took place with an emulsion from complete Freud's adjuvant (Lee Laboratories, Grayson, GA.) and methylated bovine serum albumin (mBSA, 20mg/ml, sigma, ST. Louis, MO). After 10 to 20 days the arthritis was induced in the right knee by an intra-articular injection of mBSA. The left knee served as an internal control and received an intra-articular injection of sterile saline (Abbott Laboratories, North Chicago, IL). The second group received cortison treatment before the optical imaging procedure. The treatment was started after signs of an arthritis. The animals received at the first day intraperitoneal injections of 30mg/kg Solu Medrol (Methylprednisolone Sodium Succinat, 125mg/2ml, Pharmacia. Upjohn CO, Kalamazoo, MI) and for five further days intraperitoneal injections of 3mg/kg. For each experimental animal of group one and two allogeneous leukocytes were won. Each receiver rat needed blood by two donation rats, corresponds to a leukocyte number from 3 to 5×10^8 /ml. The leukocytes labelling took place in several steps: Production of serum from the full blood, production of leukocytes from the serum samples, labelling the leukocytes with the fluorescence contrast dye DiD (Vybrant® DiD cell labelling solution, molecular probes, Eugene, Oregon) and incubation of the cells with following washing out the contrast dye. Then each experimental animal received an intravenous injection of the DiD labelled leukocytes. A native image (prae), directly after injection, 1 hour, 4 hours and 24 hours after the leukocyte injection were made with the optical imager for all experimental animals of both groups. With four animals (2 from group 1, 2 from group 2) additionally still another 48 and 72 hours image was provided. Additionally to the optical imaging x-rays were made from three animals of the first group and two of the second group, in order to overlay those later with the corresponding optical imaging.

Results: Optical images demonstrated already before leukocyte injection differences in signal intensity between the arthritic and the contralateral normal knees. This could be observed increased in the untreated animals compared to treated animals ($P=0,047$). After injection of the DiD labelled leukocytes the signal intensity differences between the arthritic and the normal knees increased gradually and significantly for the untreated animals ($P<0,05$), but not for the treated animals ($P>0,05$). The treated animals showed a peak A/N (Arthritis knee/normal knee) at four hours after cell injection. At this time the A/N of the untreated animals was significantly increased compared with the baseline values ($P = 0.006$) and significantly differently compared with the cortisone-treated animals ($P = 0.008$). This effect persisted at 24 post injection, but was less clear at 4 hour post injection.

Conclusion: The optical imaging of ex vivo DiD labelled allogeneic leukocytes has the potential to uncover inflammations in the synovium in the antigen-induced arthritis and to grade it. At the same time it has the ability to observe the effect mechanisms from cortisone treatment and to represent its process. The simple technology of the cell labelling and the use of clinically certified fluorescence contrast dyes could let the clinical employment appear in the near future, similarly to the "leukocyte scan" as a non-invasive way and without radiation dose for the patient, possible.

8. Literaturverzeichnis

1. Adonai, N., Khoi, N.N., Walls, J., Lyer, M., Phelps, M.E., Mc Carthy, T., Mc Carthy, D.W., Ex vivo cell labelling with ^{64}Cu -pyruvatdehide-bis(N^4 -methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in positron-emission tomography, Proc Natl. Acad. Sci USA, 99(5) (2002) 3030-3035
2. Atkins, P.W., Physical Chemistry, 2002
3. Aupperle, K.R., Boyle, D.Z., Hendrix, M., Selfor EA, Zveifler NJ, Barbosa M, Firestein GS, Regulation of synoviocyte proliferation apoptosis and invasion by the p53 tumor suppressor gene, Am. J. Pathol., 152, (1998) 1091
4. Bornhop, D.J., Contag, O.H., Licha, K., Murphy, C.J., Advance in contrast agents reporters and detection, J Biomed, Opt 6 (2001) 106-110
5. Bremer, C., Ntziachristos, V., Weissleder, R., Optical based molecular imaging: Contrast agents and potential medical applications, Eur Radiol, 13 (2003) 231-243
6. Brennan, P., Bankhead, C., Silman, A., Symmons, D., oral contraceptives and rheumatoid arthritis results from primary carebased incident case-control study, Semin Arthritis Rheum. Dis, 26 (1997) 817-823
7. Brennan, P., Hajeer, A., Ong, K.R., Warthington, J., John, S., Thomsan, W., Silman, A., Ollier, B., Allelic markers dose to prolactin are associated with HLA-DRB1 susceptibility alleles among women with RA and Systemic Lupus Eryth., Art. Rheum., 40 (1997) 1383-1386
8. Brennan, P., Silmann, A., Breast feeding and the onset of rheumatoid arthritis, Arthritis Rheum., 37, (1994) 808-813
9. Bruder, E., Denk, H., Heitz, Ph. U., Gelenke, Chronisch entzündliche Gelenkerkrankungen, In: " Pathologie", Böcker W., Denk H., Heitz PH. U., Urban&Fischer, München, 3. Auflage, (2004) 1063-1065
10. Chen, W.T., Mahmood, U., Weissleder, R., Tung, C.H., Arthritis imaging using near-infrared fluorescence folate targeted probe, Arth. Res. Ther., 7(2) (2005) 310-317
11. Cherry, S. R., In vivo molecular and genomic imaging: new challenges for imaging physics, Phys Med Biol. (2004) Feb7; 49 (3) R 13-48
12. Daldrup-Link. H.E., Rudelius, M., Piontek, G., Metz, St., Brauer, R., Debus, G., Gorot, C., Schlegel, J., Link, T.N.I., Peschel, C., Rummeny, E.J., Oostendorp, R.A., Migration of Iron-oxide labeled human hematopoetic progenitor cells in mouse model: in vivo monitoring with 1.5 T-MR imaging equipment, Rad., 234(1) (2005)197-205
13. Daldrup-Link. H.E., Rudelius, M., Settles, M., Piontek, G., Metz, s., Rosenbrock, H., Keller, U., Heinzmann, U., Rummeny, E.J., Schlegel, J., Link, T.N.I., Targeting of hematopoetic progeniator cells with MR contrast agents, Rad. 228(3) (2003) 760-767
14. del Puente, A., Knowler, W.C., Pettit, D.J., Bennet, P.H., High incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Pima Indians, am. J. Epidemiol., 129 (1989) 1170-1178
15. Department of Energy, A report on the Department of Energy at the University of California, Office of Research, UC Office of the President, (Summer 2002) 4-5
16. Weiss ES, Ahmed SA, Thaku ML, Welch MJ, Coleman RE, Sobel BE, Imaging of the inflammatory response in ischemic canine myocardium with III Indium labeled leukocytes, Am J Cardiol., Vol.40 (1977) 195-199
17. Hammafard, P.C., Kay, C.R., Hirsch, S., Oral contraceptives and rheumatoid arthritis new data from the Royal College of General Practioners`oral contrareption study, Ann Rheum Dis., 49 (1990) 744-746

18. Hansh, A., Frey, O. Sauner, D., Hilger, I., Haas, M., Malich, A., Brauer, R., Kaiser, W. A., In vivo imaging of experimental arthritis with near infrared fluorescence, *Arth.& Rheumatism*, Vol. 50, Issue 3 (2004) 961-967
19. Hardy J., Edinger M., Badmann MH, Negrin RS, Fathman CG, Contag CH; Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking in vivo, *Exp. Hematol.* 29(12), 2001 Dec 1353-60
20. Harvey, J., Lotze, M., Stevens, M.B., Lambert, G., Jacobson, D., Rheumatoid arthritis in a Chippewa band. Pilot screening study of disease prevalence, *Arth Rheum*, 24 (1981) 717-721
21. Haugland R.P., 14.4 Fluorescent Lipophilic tracers , In: *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*; Haugland R.P.; Molecular Probes, Netherlands, 9. Auflage (2002) 573-576
22. Haugland R.P., 13.4 Dialkylcarbocyanine and Diakylaminostyryl Probes, In: *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*; Haugland R.P.; Molecular Probes, Netherlands, 9. Auflage (2002) 530-533
23. Hayes, N., Howard-Cofield, E., Gullik, W., Green fluorescent protein as a tool to study epidermal growth factor receptor function, *Cancer Lett.*, Vol. 206 (2004) 129-135
24. Herold, G., Harten, P., Rheumatoide Arthritis. In: "Innere Medizin- Eine vorlesungsorientierte Darstellung", Herold G., Gerd Herold, Köln, 2005, 557-563
25. Hummel, K.M., Petrow, P.K.; Franz, J.K., Müller-Ladner U, Aicher WK, Gay RE, Brömme D, Gay S, Cysteine proteinase cathepsin K mRNA is expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis and is detected at sites of synovial bone destruction, *J. Rheumatol.* 25, 1887. (1998)
26. Inaoka, T., Bilbe, G., Ishibashi, O., Tezuka K, Kumegawa M, Kokubo T, Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K. Novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone, *Biochem. Biophys Res. Commun* 206: 89, (1995)
Iowa, 2001, 4. edition, chapter 7; <http://www.vh.org/adult/provider/familymedicine/FPHAndbool/Chapter07/02-7.html>
27. Klareskog, L., What can we learn about Rheumatoide Arthritis from Animal Models? *Springer Semim Immunopathol.*, 11(3) 1989 315-33
28. Krupp, D. C., Graber, M. A., Rheumatology: Rheumatoid Arthritis. In: „University of Iowa Family Practice Handbook” Graber M. A., Mosby Handbook,
29. Lafyatis, R., Remers, E.F., Roberts, A.B., Yocum DE, Sporn MB, Wilder RL, Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation exogenous platelet- derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids, *J. Clin. Invest.*, 83 (1989) 1267
30. Lüllmann, H., Mohr, K., Rheumatoide Arthritis und ihre Behandlung, In: "Taschenatlas der Pharmakologie", Lüllmann, H., Mohr, K., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001, 4. Auflage, 330-331
31. Mac Gregor, A. J., Snieder, H., Rigby, A. S., Koskenkuvuo, M., Kaprio, J., Aho, K., Silman, A.J., Characterizing the quantitative genetic contribution to rhaumatoid arthritis using data from twins, *Arth. Rheum.*, 43 (2000) 30-37
32. Metz, S., Bonaterra, G., Rudelius, M., Settler, M., Rummeny, E.J., Daldrup-Link, H.E., Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrastagents in vitro, *Eur. Radiol.*, 14(10) (2004) 1851-1858
33. Meyer, J.M., Evans, T.I., Small, R.E., Redford, T.W., Han, J.F., Singh, R., Moxley, G., HLA-DRB1 genotype influences risk for and severity of rheumatoid arthritis, *J. Rheumatolo.*, 26 (1999) 1024-1034
34. Moore, A., Grimm J, Han B, Santamaria P, Tracking the recruitment of diabeticogenic CD8+ T-Cells to the pancreas in realtime, *Diabetes.*, 53(6) (2004) 1459-1466

35. Nakajima, T., Khoa, N.D., Hasunuma, T., Nakajima, T., Nakamura, H., Kobata, T., Nishioka, K., Potential role of HOXD9 in synoviocyte proliferation, *Arth. Rheum.* 44(5) (2001) 1013-1021
36. Ntziachristos, V., Bremer, C., Weissleder, R., Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging, *Eur Radiol*, Vol. 13 (2003) 195-208
37. Obermann, S., Magnetresonanztomographischer Nachweis Eisenoxid Kontrastmittel markierter humaner hämatopoetischer Stammzellen im Mausmodell, Dissertation 2004, 68-72
38. Peter, A.M., Sethna, H., Saverymattu, H.J., Reavy, H.J., Danpure, H.J., Osman, S., Lavender, J.P., Imaging of inflammation with Indium III Topolonate labeled leukocytes, *J Nucl. Med* 24 (1983) 39-44
39. Rothshild, B., Rheumatoid arthritis at a time of passage, *J. Rheumatol.*, 28 (2001) 245-250
40. Saverymattu, S.H., Peters, A.M., Lavender, J.P., Hodgson, H.J., Chadaick, V.S., III Indium autologous leukocytes in inflammation bowel disease, *Gut* 24 (1983) 293-299
41. Shichikawa, K., Inoue, K., Hirota, S. Maeda, A, Ota, H., Kimura, M., Ushiyama, T., Tsujimoto, M., Changes in the incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Kamitonda, Wakayama, Japan 1965-1996, *Anm. Rheum. Dis.*, 58 (1999) 751- 756
42. Shichinohe, H., Kuroda S, Lee JB, Nishimura G, Yano S, Seki T, Ikeda J, Tamura M, Iwasaki Y, In vivo tracking of bone marrow stromal cells transplanted into mice cerebral infarct by fluorescence optical imaging, *Res Brain Res Protoc*, 13(3) (2004) 166-175
43. Silman, A. J., Hochberg, M.C., Rheumatoid Arthritis in Epidemiology of the Rheumatoid disease, Oxford University press, 2001, 31-71
44. Silman, A. J., Pearson, J. E., Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis, *Arthritis Res.* 4(suppl. 3), (2002), 265-272
45. Silman, A.J., Mac Gregor, A.J., Thomas, W., Holligans S, Carthy D, Farhan A, Ollier WE, Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study, *Br J Rheumatol.*, 32, (1993) 303-307
46. Sokoloff, L., Animal Models of rheumatoid arthritis, *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 26, (1984), 107-145
47. Spergel, DJ, Kruth, U., Shimshek, DR, Sprengel, R, Seeburg, PH; Using reporter genes to label selected neuronal populations in transgenic mice for gene promoter, anatomical and physiological studies, *Prog. Neurobiol.* 63: 673-686 (2001)
48. Sweeney, S. E., Firestein, G. S., Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation, *The International Journal of Biochemistry&Cell Biology*, 36, Issue 3, (2004), 372-378
49. Symmons, D.P.M., Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome, *Best Pract Res Clin Rheumatol.*, Vol.16, No 5, (2002), 707-722
50. Tarek, F. M., Sanjiv, S.G., Molecular imaging in living subjects seeing fundamental biological processes in a new light, *Gen Devel.*, Vol. 17, No. 5, (2003) 545-580
51. Van den Berg, W. B., Lessons from arthritis models, *Baillières Clin Rheumatol.*, Vol.14, No. 4, (2000) 599-616
52. Villinger, P. M. Brühlmann, P., Rheumatoid Arthritis, In.“Thiemes Innere Medizin“, Michel, B. A., Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1999) 1622-1631
53. Von Vopelius, J., Experimentelle Studie zur Wertigkeit von neuen Eisenoxid-Kontrastmitteln für die MRT der Arthritis, 2005
54. Watanabe, H., Yamada, Y., Kimata, K., Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function, *J. Biochem. (Tokyo)* 124:687, (1998)

55. Weisser, U., Multi Spectral Fluorescence Imaging for in vivo Studies on Small Animals, Diploma Thesis, Department of Biomedical Engineering, University of California, Davis, USA, (2004) 4-48
56. Weissleder, R., Mahmood, U., Molecular imaging , *Rad.* 219; 2001 316-333
57. Weissleder, R., Tung, C.H., Mahmood, U., Bogdanov, A. Jr, In vivo imaging of tumors with protease activated near infrared fluorescent probes, *Nat Biotechnol*, 17 (1999) 375-378
58. Wooley, P. H., The usefulness and the limitations of animal models in identifying targets for therapy in arthritis, *Best Pract Res Clin Rheumatol.* , Vol. 18, Issue 1, (2004) 47-58
59. Wunder, A., Grimm, J., Müller-Ladner, U., Molekulare Bildgebung bei rheumatoider Arthritis, *Z Rheumatol.*, 62: Suppl. 2 (2003) II/33-II/36
60. Wunder, A., Tung, C.H., Müller-Ladner, U., Weissleder, R., Mahmood, U., In vivo imaging of protease activity in arthritis: a novel approach for monitoring treatment, *Arth. Rheum.*, 50(8) (2004) 2459-2465
61. Yamanishi, Y., Firestein, G.S., Pathogenesis of rheumatoid arthritis: The role of synoviocytes, *Rheum Dis Clin North Am.*, Vol. 27, No. 2, (2001) 355-366
62. Yeh, TC, Zhang, W., Istad, ST, Ho, C.; In vivo dynamic MRI of rat T-cells labeled with supermagnetic iron-oxid particles, *Magn. Reson. Med.*, 33(2) (1995) 200-208
63. Zeng, Q., Huang, S., Chen, R., 10 years epidemiological study on rheumatic diseases in Shantov area Zhonghina, *Nei Ke Za Zhi*, 36 (1997) 193-197

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	<i>Makroskopie der pannösen Knorpeldestruktion am Kniegelenk (9).</i>	S. 6
Abb. 2	<i>Das zugrundeliegende Prinzip der Fluoreszenzen zur Optischen Bildgebung (55).</i>	S. 10
Abb. 3	<i>Molekulare Struktur des DiD; Absorption- (linke Kurve) und Emissionsspektrum (rechte Kurve) des DiD (21).</i>	S. 14
Abb. 4	<i>Versuchsablauf: Gewinnung von Vollblutproben aus der Spenderratte unter Inhalationsnarkose. Mehrere Zentrifugengänge zur Serumgewinnung und anschließender Gewinnung von Leukozyten aus den Serumproben und deren Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiD. In Zentrifugenröhrchen DiD markiertes Zellpellet (blau) in DMEM gelöst. Vorbereitung zur Optischen Bildgebung: Nach trocken und nass Rasur, erfolgte die Messung des linken und des rechten Kniedurchmessers. Injektion der DiD markierten Leukozyten über eine Schanzvene unter Injektionsnarkose. Installation des Versuchstiers zur Darstellung der DiD markierten Leukozyten mit Hilfe der Optische Bildgebung.</i>	S. 21
Abb. 5	<i>Aufbau des Optischen Bildgebenden Systems (= Optical Imager)</i>	S. 24
Abb. 6	<i>Ratte fixiert zur Röntgenaufnahme</i>	S. 26
Abb. 7	<i>Ratte bereits zur 1h p.i. Aufnahme in Fixationsschiene fürs Röntgen im Optical Imager fixiert</i>	S. 27
Abb. 8	<i>Verhältnis von DiD Konzentration zu Signalintensität</i>	S. 30
Abb. 9	<i>Verhältnis von Leukozytenanzahl zu Signalintensität</i>	S. 31
Abb. 10	<i>Verhältnis von DiD markierten Leukozytenanzahl zu Signalintensität</i>	S. 32
Abb. 11	<i>Vergleich von Pilotstudie zwei und drei in Bezug auf die Signalintensitäten der DiD markierten Leukozyten.</i>	S. 33
Abb. 12	<i>Trypan Blau Vitalitätstest</i>	S. 35
Abb. 13	<i>Optische Bildgebung der verschiedenen Testsubstanzen</i>	S. 36
Abb. 14	<i>Gegenüberstellung von einem unmarkierten und einem DiD markierten Leukozytenpellets. Der obere Bildausschnitt zeigt ein Foto des unmarkierten Zellpellets und des DiD markierten Zellpellets in einer Lochplatte. Beide Zellpellets enthalten 5×10^8 Leukozyten. Die optische Bildgebung der Selbigen, nicht markiertes und DiD markiertes Zellpellets, zeigt nur eine minimale Fluoreszenz der nicht markierten Leukozyten und eine deutliche Fluoreszenz der markierten Leukozyten (unterer Bildausschnitt). Die optische Bildgebung ist auf ein Maximum von 3000 Einheiten skaliert</i>	S. 37
Abb. 15	<i>H&E Färbung eines gesunden linken Kniegelenks (a) (d), eines arthritischen rechten Kniegelenks vor Therapie (b) (e) und eines arthritischen rechten Kniegelenkes nach Kortisontherapie (c) (f); a-c: Kniegelenk in 1,25x vergrößert; d-e: Synovialmembran 40x vergrößert</i>	S. 39
Abb. 16	<i>Fluoreszenzmikroskopie der Synovialmembran von einem gesundem linken Knie, einem arthritischen rechten Knie und einem therapierten rechten Knie. Obere Abbildungsreihe ganz links 40x Vergrößerung; Oben Mitte und oben rechts 20x Vergrößerung; Unten Mitte 40 x Vergrößerung; Die DiD markierten Leukozyten konnten mit einem Exzitationsfilter von 553nm und einem Emissionsfilter von 575nm,</i>	S. 40

rötlich fluoreszierend nachgewiesen werden. Die Zellkerne stellen sich durch das DAPI blau dar.

- Abb. 17 *Optische Bildgebung einer unbehandelten Ratte mit einer Arthritis des rechten Kniegelenkes und einer Kortison-therapierten Ratte mit Arthritis des rechten Kniegelenkes vor und vier Stunden nach Injektion der DiD markierten Leukozyten. Die Optische Bildgebung ist bei jedem Experiment auf das gleiche Maximum von 700 Einheiten skaliert. Der Pfeil zeigt auf das rechte Kniegelenk: Die optische Bildgebung des arthritischen Kniegelenkes zeigt eine deutliche Signalzunahme nach Injektion der DiD markierten Zellen. Das behandelte Knie zeigt eine geringere Signalzunahme nach Zellinjektion. Das starke Signal im Fuß und Fußgelenk ist durch die Autofluoreszenz des Felles in diesem unrasierten Bereich begründet.* S. 42
- Abb. 18 *Repräsentative Optische Bildgebungen der unteren Extremitäten von einer unbehandelten Ratten mit einer induzierten Arthritis im rechten Knie und einer Kortisontherapierten Ratte mit Autoimmunarthritis rechts vor und nach einer, vier und 24 Stunden Injektion der DiD markierten Leukozyten. Die Optische Bildgebung ist bei der unbehandelten Ratte auf ein Maximum von 1600 Einheiten skaliert und bei der behandelten Ratte auf ein Maximum von 2500 skaliert. Beide Optischen Bildgebungen sind auf ein gemeinsames Minimum von 90 skaliert.* S. 43
- Abb. 19 *Überlagerung von Röntgenbild und Optischer Bildgebung* S. 44
- Abb. 20 *Gegenüberstellung der gemessenen Signalintensitäten der arthritischen Kniegelenke, normiert auf die contralateralen normalen Kontrollkniegelenke, quantifiziert als A/N Quotienten (Mittelwerte von jeweils 6 Versuchstieren mit Standardabweichungen). Die A/N Quotienten der nicht therapierten Tiere (Gruppe 1, n=6) und der Kortison therapierte Tiere (Gruppe 2, n=6) zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen zum Zeitpunkt 4h ($p=0,008$) und 24h ($p=0,014$) nach Zellinjektion.* S. 46

10. Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1</i>	<i>Pentobarbitaldosierung 50mg/kg (Nembutal® Sodium Solution, 50mg Pentobarbital/ml; Abbott Laboratories, North Chicago, IL)</i>	<i>S. 17</i>
<i>Tab. 2</i>	<i>Verdünnungsreihe von Vybrant DiD in Ethanol</i>	<i>S. 19</i>
<i>Tab. 3</i>	<i>Leukozytenanzahl vor und nach DiD Markierung</i>	<i>S. 34</i>
<i>Tab. 4</i>	<i>Vergleich der Signalintensitäten von Pilotratte eins und zwei</i>	<i>S. 38</i>
<i>Tab. 5</i>	<i>A/N Verhältnisse der unbehandelten und Kortison-behandelten Tiere über die Zeit</i>	<i>S. 45</i>

11. Abkürzungsverzeichnis

<i>Abb.</i>	<i>Abbildung</i>
<i>C°</i>	<i>Grad Celsius</i>
<i>ca.</i>	<i>Circa</i>
<i>CCD-Chip</i>	<i>Charge Coupled Device Chip</i>
<i>cm</i>	<i>Zentimeter</i>
<i>DiD</i>	
<i>entzündl.</i>	<i>Entzündlich</i>
<i>FLS</i>	<i>Fibroblasten ähnliche Synoviozyten</i>
<i>g</i>	<i>Gramm</i>
<i>h</i>	<i>Stunde</i>
<i>i.p.</i>	<i>intra peritoneal</i>
<i>i.v.</i>	<i>intravenös</i>
<i>kg</i>	<i>Kilogramm</i>
<i>Leukozytenaz.</i>	<i>Leukozytenanzahl</i>
<i>m.</i>	<i>markiert</i>
<i>min</i>	<i>Minute</i>
<i>mg</i>	<i>Milligramm</i>
<i>ml</i>	<i>Milliliter</i>
<i>MRT</i>	<i>Magnetresonanztomographie</i>
<i>n.</i>	<i>nach</i>
<i>nm</i>	<i>Nanometer</i>
<i>μmol</i>	<i>Mikromoll</i>
<i>μl</i>	<i>Mikroliter</i>
<i>n</i>	<i>Anzahl</i>
<i>OB</i>	<i>Optische Bildgebung</i>
<i>p</i>	<i>Signifikanz</i>
<i>PET</i>	<i>Positronen Emission Tomography</i>
<i>post</i>	<i>nach</i>
<i>p.i.</i>	<i>Post Injection = nach Injektion</i>
<i>prae</i>	<i>Vor</i>
<i>RA</i>	<i>Rheumatoide Arthritis</i>
<i>ROI</i>	<i>region of interest</i>
<i>Tab.</i>	<i>Tabelle</i>
<i>x</i>	<i>mal</i>
<i>z.</i>	<i>zu</i>
<i>z. B.</i>	<i>Zum Beispiel</i>

12. Lebenslauf

PERSÖNLICHE INFORMATION

Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum/ort: 28.09.1979 Verviers/Belgien
Eltern: Dipl. Psych. Univ. Karine Kau, Prof. Dr. med. Reinhardt Kau,
Facharzt für HNO

SCHULBILDUNG

- 1986 - 1990 Don Bosco Städt. Gemeinschaftsgrundschule
Düsseldorf
- 1990 – 1992 Städt. Cecilien Gymnasium Düsseldorf
- 1992 – 1999 Gymnasium Am Anger der Armen Schulschwestern v.
U. L. Fr. in München
- 25.06.1999 Allgemeine Hochschulreife

BERUFSAUSBILDUNG

20.09.1999 – 10.06.2000 Ausbildung zur Tierarzhelferin in der
Experimentellen Onkologie und Chirurgie an der Technischen Universität
München, Klinikum Rechts der Isar

STUDIUM

2000 – 2003 Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians
Universität München

Ärztliche Vorprüfung am 14.03.2003

2003 – 2005 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität
München

Ärztliche Prüfung am 12.06.2007

FAMULATUREN

- Im Bereich Chirurgie – Wohlfahrtsklinik/München Gräfelfing
- Im Bereich Innere Medizin -- Kreiskrankenhaus Wolfratshausen
- Im Bereich der HNO -- Arabellakrankenhaus München
- Im Bereich der HNO -- Krankenhaus Krefeld.

PROMOTION

„Die Optische Bildgebung der Rheumatoiden Arthritis mit DiD markierten Leukozyten“

Die experimentellen Grundlagen wurden von August 2004 bis Oktober 2004 in der Contrast Agent Research Group der radiologischen Abteilung der UCSF, San Francisco, Kalifornien erarbeitet. Promotionsbetreuung durch Prof. Dr. Ernst Rummeny und Prof. Dr. Heike Daldrup-Link, Institut für Radiologie, Klinikum Rechts der Isar, München.

SPRACHKENNTNISSE

Französisch (bilingual)

Englisch in Wort und Schrift

EHRENAMTLICHE TÄTIGKEITEN

Seit März 2003 aktive Teilnahme am Projekt „Teddyärzte München“ (Medizinische Aufklärung für Kindergartenkinder) und seit Februar 2004 im Organisationsteam der „Teddyärzte München“.

AUSLANDSAUFENTHALTE

UCSF, San Francisco, Kalifornien: Promotion
im Bereich der Experimentellen Radiologie
(8/2004 – 10/2004)

St. John's Medical College, Bangalore, Indien:
Chirurgie im Rahmen des PJ
(2/2006 – 4/2006)

Inselspital Bern, Schweiz: HNO im Rahmen des
PJ (10/2006 – 11/2006)

13. Danksagung

Herrn Univ. Prof. Dr. med. E. J. Rummeny danke ich für die Übernahme der Arbeit an die Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

Frau Dr. med. H.E. Daldrup-Link danke ich sehr für die hervorragende und freundliche Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit

Herrn Univ. Prof. Dr. med. J. Schlegel danke ich für seine Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Histopathologie

Herrn Prof. Dr. med. J. Metz danke ich für die nette Unterstützung bei der Anfertigung der Fluoreszenzhistologie

Herrn Dr. med. S. Metz danke ich für seine Bemühungen bei der Anfertigung der Fluoreszenzhistologie

Herrn Bernd Pichler, PhD danke ich für seine Bemühungen im Bereich der Fluoreszenzhistologie

Herrn Stavros Demos danke ich sehr für seine Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Optischen Bildgebung

Herrn Guido Pointek danke ich für seine guten histologische Aufarbeitung

Herrn Ulli Weisser danke ich für seine Hilfsbereitschaft und Geduld bei all meinen Fragen

Herrn Gerhardt Simon, PhD, Herrn Johannes Vopelius-Feldt, Herrn Olaf Saborowski, Herrn Kirill Berenoi, Herrn Yanjun Fu, Michel und Frau Cherry Pinsky für ihre Unterstützung und den schönen Aufenthalt in San Francisco

Herrn Tim Hiller danke ich für sein Verständnis und seine Unterstützung bei meinem Aufenthalt