

Aus dem Institut für Vegetative Anatomie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Hochsulfatierte Makromoleküle in Diagnostik und Therapie der  
rheumatoiden Arthritis

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Maria Birgitta Laube

aus Berlin

Datum der Promotion: 09.09.2016

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	2
<b>Zusammenfassung</b> .....	6
<b>Abstract</b> .....	8
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	10
<b>1. Einleitung</b> .....	12
1.1 Rheumatoide Arthritis .....	12
1.1.1 Epidemiologie .....	12
1.1.2 Pathophysiologie .....	12
1.1.3 Klinik.....	13
1.2 Bildgebende Diagnostik der rheumatoiden Arthritis .....	14
1.2.1 Etablierte Verfahren .....	14
1.3.2 Nahinfrarot-Fluoreszenzintensitätsmessung (NIR-FOI) .....	15
1.3.2.1 NIR-FOI im Rheumascanner mit dem unspezifischen Kontrastmittel ICG .....	15
1.3.2.2 NIR-FOI mit ICG-gebundenem dendritischen Polyglycerolsulfat und Polyestersulfat .....	16
1.4 Therapie der rheumatoiden Arthritis .....	19
1.4.1 DPGS und dPES als potenzielle Therapeutika bei rheumatoider Arthritis.....	20
<b>2. Zielsetzung der Arbeit</b> .....	21
<b>3. Material und Methoden</b> .....	23
3.1 Experimentell verwendete Makromoleküle .....	23
3.2 Therapeutische Anwendung der Makromoleküle im CIA-Modell der Ratte.....	25
3.2.1 Erhebung des klinischen rheumatischen Scores .....	26
3.3 Nahinfrarotbildgebung mit dPGS-ICG und dPES-ICG als Kontrastmittel.....	27
3.4 Versuchsende – Präparation der Organe .....	28
3.5 Auswertung der Nahinfrarot-Aufnahmen mit dem Programm Xiralite .....	28
3.6 Quantifizierung der Blutzellen in der Synovialflüssigkeit.....	29
3.6.1 Pappenheimfärbung der Synovialflüssigkeitsausstriche .....	29
3.6.2 Bestimmung der Zellzahl in den Synovialflüssigkeitsausstrichen.....	30
3.7 Histologische Methoden zur Detektion der polysulfatierten Makromoleküle in Organen und Zellen .....	30
3.7.1 Alcianblaufärbung.....	30
3.7.1.1 Färbung von Paraffinschnitten .....	31

3.7.1.2 Färbung von U937-Zellen .....	31
3.7.2 Qualitative Bestimmung der Akkumulation der polysulfatierten Makromoleküle in Organen.....	32
3.7.2.1 Die Erstellung und Beurteilung mikroskopischer Aufnahmen der gefärbten Paraffinschnitte .....	32
3.7.3 Semiquantifizierung der polysulfatierten Makromoleküle in Paraffinschnitten ausgewählter Organe .....	32
3.7.3.1 Erstellung von histologischen Schnitten verschiedener Organe .....	32
3.7.3.2 Modifizierte Alcianblaufärbung und Entfärbung mit Guanidin-HCl.....	33
3.7.3.3 Berechnung der Alcianblaukonzentration der Proben .....	34
3.7.3.4 Bestimmung der DNA-Konzentration der Paraffinschnitte .....	34
3.7.3.5 Flächenbestimmung der histologischen Schnitte .....	35
3.7.3.6 Auswertung der Daten zur Alcianblaukonzentration .....	35
3.7.4 Semiquantitative Konzentrationsmessung von dPGS und dPES in U937-Zellen in vitro.....	36
3.7.4.1 Vermehrung und Differenzierung der U937-Zellen in Richtung Makrophagen .....	36
3.7.4.2 Inkubation mit dPGS und dPES .....	36
3.7.4.3 Fixierung und Färbung der Zellen.....	36
3.7.4.4 Fotografische Aufnahmen der gefärbten Zellen .....	37
3.7.4.5 Bearbeitung und Auswertung der Bilder.....	37
3.8 Statistische Auswertung der erhobenen Daten.....	37
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
4.1 CIA-Modell der Ratte – Ausprägung der Inflammation .....	38
4.2 Nahinfrarotbildgebung mit dPGS-ICG und dPES-ICG als Kontrastmittel.....	38
4.2.1 Inflammationsdetektion in der Nahinfrarotbildgebung mit dPGS- und dPES-ICG.....	39
4.2.1.1 Ergebnisse der Fluoreszenzintensitätsmessungen der Sprunggelenke.....	39
4.2.1.1.1 Differenzierung zwischen Score 0-Tieren und gesunden Tieren.....	39
4.2.1.1.2 Darstellung verschiedener Inflammationsgrade mit dPGS- und dPES-ICG.....	39
4.2.1.1.3 Die FI von Sprunggelenken mit Rheumascore zwei als Fokus einer mittel-schweren autoimmunen Entzündungsreaktion im Vergleich zur FI der Augen .....	41
4.2.1.1.4 Vergleich der FI von Lebern und Sprunggelenke unabhängig vom Rheumascore mit der FI der Augen .....	43
4.2.2 NIR-FOI innerer Organe ex vivo unter Verwendung von dPGS- und dPES-ICG als Kontrastmittel .....	45

4.3 Effekte der therapeutischen Anwendung von dPGS und dPES .....	47
4.3.1 Entwicklung des Körpergewichts der Ratten im Verlauf der Therapie .....	48
4.3.2 Vergleich der Rheumascotes von behandelten und unbehandelten CIA-Ratten .....	49
4.3.3 Leukozytenzahlen in Synovialflüssigkeitsausstrichen von CIA-Ratten nach dPGS- oder dPES-Behandlung im Vergleich mit nicht therapierten und gesunden Ratten.....	50
4.3.4 Histologischer Nachweis der Akkumulation von dPGS und dPES in Organen von Ratten.....	52
4.3.4.1 Qualitativer Nachweis und detaillierte Betrachtung der Verteilung der Moleküle nach 15-tägiger Behandlung .....	52
4.3.4.1.1 Alcianblaufärbung in histologischen Schnitten des Dünndarms .....	53
4.3.4.1.2 Alcianblaufärbung histologischer Nierenschnitte .....	54
4.3.4.1.3 Alcianblaufärbung histologischer Milzschnitte .....	55
4.3.4.1.4 Alcianblaufärbung histologischer Leberschnitte.....	56
4.3.4.1.5 Alcianblaufärbung histologischer Schnitte der Popliteallymphknoten.....	56
4.3.4.2 Semiquantitative Bestimmung der polysulfatierten Makromoleküle in histologischen Schnitten innerer Organe nach achttägiger subkutaner Applikation von dPGS, dPES und Heparin bei Ratten .....	57
4.3.4.2.1 Quantifizierungsmethode der Alcianblau-Menge in histologischen Schnitten.....	57
4.3.4.2.2 Bestimmung der DNA-Menge und Fläche der histologischen Schnitte .....	57
4.3.4.2.3 Konzentration des Alcianblau in Paraffinschnitten von Rattenlebern .....	58
4.3.4.2.4 Konzentration des Alcianblaus in Paraffinschnitten von Rattenmilzen.....	59
4.3.4.2.5 Konzentration des Alcianblaus in Paraffinschnitten von Rattennieren.....	60
4.3.4.2.6 Überblick über die mittleren Alcianblau -Konzentrationen in den histologischen Organschnitten aller Behandlungsgruppen.....	61
4.3.5 Blutgerinnung von Ratten nach Behandlung mit dPGS, dPES oder Heparin.....	62
4.4 In vitro-Inkubation von U937-Zellen mit dPGS und dPES – Entwicklung der intrazellulären Anreicherung über 10 Tage .....	63
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>66</b>
5.1 Hintergrund der Arbeit.....	66
5.2 CIA-Modell in der Ratte – Einschränkungen.....	67
5.3 DPGS- und dPES-ICG als Kontrastmittel in der NIR-FOI.....	68
5.3.1 Darstellung der Arthritis .....	69
5.3.2 Pharmakokinetische Aspekte der Kontrastmittel dPGS- und dPES-ICG .....	70
5.3.2.1 Fluoreszenzintensität der Augen .....	70

5.3.2.2 Fluoreszenzintensität der Leber .....	70
5.3.2.3 Fluoreszenzintensität verschiedener Organe ex vivo .....	71
5.3.2.4 Zusammenfassung der pharmakokinetischen Erkenntnisse zu dPGS- und dPES-ICG .....	72
5.3.3 Fazit zum Potenzial der diagnostischen Anwendung von dPGS- und dPES-ICG als Kontrastmittel in der NIR-FOI zur Darstellung der rheumatoiden Arthritis .....	73
5.4 Die therapeutische Anwendung von dPGS und dPES bei CIA .....	74
5.4.1 Klinisches Outcome .....	74
5.4.2 Auswirkung der Therapie auf die Leukozytenzahlen in Synovialflüssigkeitsausstrichen .....	75
5.4.3 Nachweis und Verteilung von dPGS und dPES in histologischen Schnitten innerer Organe.....	76
5.4.3.1 Qualitative Analyse .....	76
5.4.3.2 Methodik und Ergebnisse der semiquantitativen Bestimmung der Substanzen .....	79
5.4.4 Auswirkungen auf die Gerinnungszeit.....	81
5.5 Vergleich der Ergebnisse aus dem diagnostischen und dem therapeutischen Ansatz – organische Anreicherung der Makromoleküle mit und ohne Kopplung an ICG.....	82
5.6 Fazit zum Potenzial von dPGS und dPES zur therapeutischen Anwendung bei rheumatoider Arthritis.....	82
5.7 Nachweis der Moleküle in U937-Zellen .....	83
5.8 Ausblick .....	85
<b>6. Literatur.....</b>	<b>87</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>98</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>100</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>101</b>

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Die frühestmögliche Diagnostik und Therapie der rheumatoiden Arthritis (RA) ist als maßgeblich für ein ideales Outcome der betroffenen Patienten anerkannt. Hierfür ist die Entwicklung neuer bildgebender Methoden und krankheitsspezifischer Medikamente notwendig. Dendritisches Polyglycerolsulfat (dPGS) und dendritisches Polyestersulfat (dPES) sind vollsynthetische, hochsulfatierte Makromoleküle, die unter anderem durch Hemmung der Leukozytenimmigration eine antiinflammatorische Wirkung entfalten. Im Gegensatz zu dPGS besitzt dPES zahlreiche Esterguppen, die eine verbesserte Metabolisierung ermöglichen könnten. Die vorliegende Arbeit untersucht das diagnostische und therapeutische Potenzial der Moleküle bei RA.

**Methodik:** Für in vivo-Untersuchungen wurde das Modell der Kollagen-induzierten-Arthritis (CIA) an Ratten verwendet. Zur diagnostischen Darstellung der inflammatorischen Gelenkprozesse wurde nach intravenöser Injektion von an Indocyaningrün (ICG) gekoppeltem dPGS und dPES über 24 Stunden ein Nahinfrarotfluoreszenz-Imaging (NIR-FOI) durchgeführt. Zur Untersuchung der therapeutischen Wirksamkeit bei CIA erfolgte die subcutane Applikation von dPGS und dPES über acht bis fünfzehn Tage und eine Quantifizierung der Symptomschwere durch die Erhebung eines Rheumascores. Der Grad der Inflammationsausprägung im Gelenk wurde weiterhin durch Pappenheimfärbung und Auszählung der Leukozyten in Synovialflüssigkeitsausstrichen erfasst. Zur Analyse der Pharmakokinetik von dPGS und dPES wurde anhand von Gewebeschnitten innerer Organe mittels Alcianblaufärbung die Menge an dPGS und dPES qualitativ und semiquantitativ in Alcianblau/mm<sup>2</sup> Schnittgröße, bzw. DNA-Gehalt pro Schnitt bestimmt.

**Ergebnisse:** Es konnte gezeigt werden, dass

1. dPGS-ICG in der NIR-FOI ein zweifach stärkeres Signal in Gelenken mit subklinischer Inflammation gegenüber Gelenken gesunder Tiere erzeugt ( $p \leq 0,001$ ),
2. dPGS-ICG und dPES-ICG eine signifikante Unterscheidung zwischen Gruppen mit hoher und niedriger Entzündungsaktivität ermöglichen,
3. die therapeutische Anwendung von dPGS und dPES eine hochsignifikante Reduktion der klinischen Symptomatik bewirkt,
4. in Synovialflüssigkeitsausstrichen von mit dPGS und dPES behandelten Tieren die Zahl der Inflammationszellen signifikant unter der von nicht therapierten Ratten liegt,

5. dPGS und dPES nach therapeutischer Anwendung vor allem in Leber, Milz und Niere nachweisbar sind. Imaging und Quantifizierung ergaben Hinweise darauf, dass dPES einer schnelleren Metabolisierung unterliegt.

**Schlussfolgerung:** In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass dPGS- und dPES-ICG eine Detektion von Arthritis selbst in frühen Stadien ermöglichen. DPGS und dPES sind zudem hochwirksam in der Therapie der CIA. Sie stellen folglich eine vielversprechende neue Wirkstoffgruppe dar, deren Nutzen und pharmakologische Eigenschaften weiter untersucht werden sollten, um die diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten für Patienten mit RA in Zukunft weiter optimieren zu können.

## Abstract

**Introduction:** Early diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis (RA) is one of the most important aspects to create an optimal outcome for patients. Therefore, evaluation and development of new imaging techniques and specific drugs are necessary.

Dendritic Polyglycerol Sulfate (dPGS) and Dendritic Polyester Sulfate (dPES) are fully synthetic, polysulfated macromolecules with anti-inflammatory effects inhibiting immigration of leucocytes. Unlike dPGS, the basic structure of dPES consists of ester groups that could allow an improved metabolisation. This thesis examines the potential of these molecules in diagnosis and therapy of arthritis.

**Methods:** Collagen-induced arthritis (CIA) in rats was used for in vivo experiments. To display the inflammatory process in joints, near-infrared fluorescence optical imaging (NIR-FOI) was executed for 24 hours after intravenous injection of Indocyanine green (ICG) conjugated to dPGS and dPES. To examine the therapeutic effect of dPGS and dPES in CIA, the substances were administered subcutaneously for eight to fifteen days. Intensity of symptoms was subsequently quantified by using an arthritisscore. The degree of inflammation was determined by Pappenheim staining of smears of synovial fluid and counting of leucocytes. For analysis of pharmacokinetic properties of dPGS and dPES, the level of substances after treatment were qualitatively determined in tissue sections of inner organs via alcian blue staining. Semi quantitative analysis was performed in a similar way and measured in alcian blue/mm<sup>2</sup> size of the section or in alcian blue/DNA amount per section.

**Results:** It could be shown that

1. the signal induced by dPGS-ICG in NIR-FOI of joints with subclinical inflammation is twice as high than in joints of healthy subjects ( $p \leq 0,001$ ),
2. dPGS-ICG and dPES-ICG allow significant discrimination between groups with heavy activity of arthritis and those with low activity of arthritis,
3. the therapeutic use of dPGS and dPES results in highly significant reduction of clinical symptoms,
4. dPGS and dPES are found mainly in the liver, spleen and kidney after therapeutic use. Imaging and quantification results raise the hypothesis that dPES may be subject to a higher metabolisation rate than dPGS.

**Conclusion:** For the first time, this study was able to show that dPGS- and dPES-ICG allow the detection of arthritis even in a very early stage. Furthermore, dPGS and dPES are highly effective therapeutic drugs in CIA rats. Consequently, they provide a promising new drug class.

## Abstract

Regarding their therapeutic value and pharmacological characteristics they should be further examined to allow improvement of diagnosis and therapy in patients with RA.

## Abkürzungsverzeichnis

AB	Alcianblau
Abb.	Abbildung
ACPA	Anti Citrullinated Peptide Antibodies
ACR	American College of Rheumatology
AP-1	Transcription Factor Activating Protein 1
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
CIA	Collagen-Induced Arthritis
DMARD	Disease-Modifying Antirheumatic Drug
dPES	dendritisches PES-CDI-PEG-Amin (Polyester-Carbonyldiimidazol-Polyethylenglycol-Amin: Hyperbranched Bis-MPA polyester-64-hydroxyl konjugiert mit 6S-ICG-Maleimid)
dPGS	dendritisches Polyglycerolsulfat
EULAR	The European League Against Rheumatism
FFPE	In Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe
FI	Fluoreszenzintensität
GAG	Glukosaminoglykane
HLA	Human Leukocyte Antigen
HWZ	Halbwertszeit
ICG	Indocyaningrün
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio
KG	Körpergewicht
KM	Kontrastmittel
LF	Lymphfollikel
LK	Lymphknoten
MALT	Mucosa Associated Lymphatic Tissue
MFG	Mittelfußgelenke
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert

## Abkürzungsverzeichnis

MTX	Methotrexat
NIR-FI	Nahinfrarot-Fluoreszenzintensität
NIR-FOI	Nahinfrarot-Fluoreszenzintensitätsmessung
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappaB
OAT	Organic Anion Transporter
OATP	Organic Anion Transporter Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RA	Rheumatoide Arthritis
RGB	Rot-Grün-Blau-Farbraum
ROI	Region of Interest
s.c.	subkutan
SG	Sprunggelenk
Tab.	Tabelle
TGF-beta 1	Transforming Growth Factor beta 1
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor Alpha
US	Ultraschall
V 1 - 4	Versuch eins bis vier
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## **1. Einleitung**

### **1.1 Rheumatoide Arthritis**

Als rheumatoide Arthritis (RA) bezeichnet man eine systemische inflammatorische Erkrankung, die sich typischerweise in Gelenken und periartikulär niederschlägt. Die RA kann in ihrem progressiven Verlauf über Gelenkläsionen zu Gelenkdeformierungen und Knochenerosionen mit nahezu vollständigem Funktionsverlust führen<sup>1</sup>. Die Erkrankung geht dabei mit Schmerzen und zum Teil extraartikulären Manifestationen<sup>2,3</sup> einher und schränkt die Arbeitsfähigkeit und Lebensqualität der Betroffenen stark ein<sup>4</sup>.

#### **1.1.1 Epidemiologie**

0,5 – 1,0% der Bevölkerung der westlichen Welt sind an RA erkrankt, wobei Frauen ca. dreimal häufiger betroffen sind als Männer. Die Inzidenz beträgt 5–50 von 100000, der Häufigkeitsgipfel liegt bei 65 Jahren<sup>5-7</sup>. Tabakkonsum gilt als sicherer Risikofaktoren für die Entwicklung einer RA<sup>8</sup>. Die Bedeutung anderer Faktoren wie die Einnahme oraler Kontrazeptiva oder der Konsum roten Fleisches sind dagegen umstritten<sup>8</sup>.

#### **1.1.2 Pathophysiologie**

Die RA kann in drei Stadien eingeteilt werden: Initiation, Destruktion und Perpetuation. Vor allem über die Initiation und den spezifischen Trigger der RA ist heute nach wie vor wenig bekannt und auch auf dem Gebiet der pathophysiologischen Prozesse im weiteren Verlauf der Erkrankung sind noch viele Aspekte unklar. Als entscheidender Faktor der Ätiologie ist die Genetik zu nennen: ungefähr 50% des Risikos, an RA zu erkranken, wird den Genen zugeschrieben. Hierzu zählen bestimmte HLA-Allele (Human Leukocyte Antigen-Allele), z.B. das HLA-DRB1-Molekül, ein Ligand für den T-5 Zellrezeptor auf CD4-Zellen, dessen Träger ein über 30fach erhöhtes Risiko haben, an RA zu erkranken<sup>7,9</sup>. Ebenso allgemein anerkannt ist, dass es sich bei der Entwicklung der RA um ein Zusammenspiel aus angeborenem und adaptivem Immunsystem sowie den zwei Typen der Synovialzellen (makrophagenähnliche und fibroblastenähnliche) handelt<sup>10</sup>. Die dabei ausgelösten verschiedenen inflammatorischen Kaskaden sind komplex und greifen ineinander. Als Mediatoren fungieren zahlreiche Zytokine wie der Tumor-Nekrose-Faktor Alpha (TNF $\alpha$ ), die Interleukine 1 und 6 (IL-1 und IL-6) sowie das Komplementsystem<sup>11</sup>. In der Progression der Erkrankung spielen in die Synovialmembran immigrierte Makrophagen eine besondere Rolle, unter anderem indem sie die oben genannten Zytokine produzieren und T-Zellen und Monozyten aktivieren. Auf diese Weise sind sie

maßgeblich an der Inflammation und der Knochendestruktion beteiligt. In Studien zeigte sich, dass die Schwere der Symptomatik sowie das Fortschreiten der radiologisch nachweisbaren Gelenkdestruktion mit dem Grad der Infiltration durch Makrophagen korrelieren<sup>12</sup>.

In 50 – 80% der Fälle der RA treten als Antikörper der Rheumafaktor oder der anti-cyklische citrullinierte Peptid-Antikörper (Anti Citrullinated Peptide Antibodies – ACPA) auf. Der Begriff Rheumafaktor beschreibt Immunglobulin (Ig) A- und IgM-Antikörper, die gegen das Fc-Fragment körpereigener Immunglobuline vom Typ IgG gerichtet sind<sup>7,13</sup>.

Das zentrale Geschehen spielt sich an der Synovialmembran ab, wo sich die Inflammation nach mehrheitlicher Meinung auch zuerst zeigt. Die beim Gesunden einschichtige, sich aus zwei Typen von Synovialzellen zusammensetzende Membrana synovialis (Lining Layer der Synovialis) fällt durch Zellhyperplasie und Verdickung auf; statt einer finden sich bis zu zehn Zellschichten. Auch die normalerweise zellarme, aus lockerem Bindegewebe bestehende Membrana fibrosa (Sublining) der Gelenkkapsel erscheint bei der RA deutlich verdickt. Es kommt zu Neoangiogenese und zur Infiltration von Entzündungszellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort, B- und T-Zellen formatieren sich hier diffus oder in follikulären Strukturen<sup>1,14,15</sup>. Im Folgenden bildet sich eine ebenfalls für die RA typische Erscheinung: das Pannusgewebe. Dieses Granulationsgewebe entsteht durch funktionell veränderte, fibroblastenähnliche Synoviozyten, deren Proliferationshemmung auf Grund von gestörten Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten aufgehoben ist. Durch massive Produktion von Matrix-Metallo-Proteasen und Kathepsinen fördert dieses Gewebe die Knorpeldestruktion und Knochenerosion erheblich. In späteren Phasen der Krankheit verschwindet der Zellreichtum des Pannus und wird ersetzt durch fibröses Gewebe, bestehend aus Kollagen und wenigen Blutgefäßen<sup>16</sup>.

### **1.1.3 Klinik**

Sowohl kleine als auch große Gelenke können von der RA betroffen sein. Klassischerweise tritt der Befall symmetrisch auf. Typische Manifestationsorte der Inflammation sind die Metacarpophalangealgelenke, die proximalen Interphalangealgelenke, das zweite bis fünfte Metatarsophalangealgelenk, die Handgelenke sowie die Schultern, Ellenbogen, Hüften, Knie und Knöchel. Die Symptome äußern sich als Empfindlichkeit, Schwellung und/oder Schmerz in den betroffenen Gelenken<sup>17</sup>. Des Weiteren geht die Erkrankung häufig einher mit einer Morgensteifigkeit von über 60 Minuten<sup>18</sup> und einem Fatigue-Syndrom<sup>19</sup>. Diese Symptome und die fortschreitenden Funktionseinbußen der erkrankten Gelenke bedeuten für viele Patienten nicht nur eine körperliche, sondern auch eine psychische Belastung und nicht zuletzt eine

Einschränkung bis hin zum Verlust der beruflichen Tätigkeit verbunden mit finanziellen Einbußen<sup>20</sup>.

## **1.2 Bildgebende Diagnostik der rheumatoiden Arthritis**

Die frühestmögliche Diagnosestellung besitzt für die RA immense Bedeutung, da eine frühe Therapie das Fortschreiten der Erkrankung verzögert und das klinische Outcome der Patienten maßgeblich verbessern kann<sup>18,21-24</sup>. Nach den American College of Rheumatology (ACR) Kriterien zur Klassifikation der RA von 2010 ist das Mittel der Wahl hierzu zwar die klinische Untersuchung, jedoch können bildgebende Verfahren unterstützend hinzugezogen werden<sup>17</sup>. Nach den aktuellen Empfehlungen der EULAR (The European League Against Rheumatism) sind Magnetresonanztomographie (MRT) und Ultraschall (US) bei der Detektion entzündlicher Gelenkprozesse der klinischen Untersuchung überlegen und bildgebende Verfahren wie Röntgen, US und MRT sollten zur Darstellung von Gelenkschäden/Inflammation genutzt werden<sup>25</sup>.

### **1.2.1 Etablierte Verfahren**

Die traditionell angefertigten Röntgenaufnahmen sind zum Zwecke der Diagnosestellung im Frühstadium ungeeignet, da sie nur bereits manifeste Erosionen an Knorpel und Knochen darstellen können, zur Dokumentation des Krankheitsverlaufs finden sie aber breite Verwendung<sup>26</sup>.

Das am häufigsten angewendete Verfahren ist die Sonographie<sup>27</sup>, mit welcher entzündliche Veränderungen des synovialen Gewebes dargestellt werden können. Der Kostenfaktor ist hierbei gering und es besteht eine gute ambulante Verfügbarkeit<sup>28-30</sup>. Nachteile dieser Methode sind die langwierige Übungsphase, die für eine kompetente Anwendung notwendig ist, und die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Untersuchern<sup>29,31,32</sup>. Auch ist die Möglichkeit zur Quantifizierung der Entzündungsaktivität eingeschränkt<sup>28</sup>.

Als Goldstandard zur Detektion der Synovialitis gilt die MRT<sup>26</sup>. Sie bietet als einziges Diagnostikum die Option der Darstellung eines Knochenmarködems, welches der stärkste prognostische Faktor einer progressiven radiologischen Verschlechterung ist<sup>28,30,33</sup>. Auch hier können subklinische entzündliche Vorgänge aufgedeckt werden. Einschränkungen der Anwendung ergeben sich allerdings durch die teils schlechte Verfügbarkeit, die hohen Kosten und die Kontraindikationen (Metallimplantationen, Klaustrophobie)<sup>28</sup>.

### 1.3.2 Nahinfrarot-Fluoreszenzintensitätsmessung (NIR-FOI)

Weissleder und Pittet bezeichnen die fluoreszenzoptische Technik als das möglicherweise am stärksten wachsende bildgebende Verfahren in klinischen Studien und klinischer Praxis<sup>34</sup>. Als vergleichsweise junges Verfahren findet die Messung der Nahinfrarot-Fluoreszenzintensität (NIR-FOI) nach Injektion von Indocyaningrün (ICG) bereits unter anderem (z.T. im Rahmen von Studien) Anwendung in der Ophthalmologie<sup>35</sup>, in der Gefäßchirurgie beim Aneurysma Clipping<sup>36</sup>, in der Traumatologie zur Überprüfung der Gewebedurchblutung<sup>37</sup>, in der Onkologie im Rahmen der (intraoperativen) Tumordarstellung<sup>38-40</sup> und in der Kardiologie zur Visualisierung der Koronarien und Myokardperfusion<sup>41</sup>. Im rheumatologischen Bereich wurde NIR-FOI im Tierexperiment erfolgreich zum Nachweis von Arthritis angewendet<sup>42-44</sup> und in klinischen Studien gezeigt, dass diese Technik auf den Menschen übertragbar ist<sup>26,45,46</sup>.



Abb. 1: Fluoreszenzoptische Darstellung der Hände bei einem Patienten mit Arthritis mittels Xiralite im Rheumascan®.Quelle: Werner, 2012<sup>26</sup>

#### 1.3.2.1 NIR-FOI im Rheumascan mit dem unspezifischen Kontrastmittel ICG

Der Rheumascan arbeitet mit dem seit 2009 zugelassenen System Xiralite (Xiralite X4; mivenion GmbH, Berlin, Germany). Ausgestattet mit einer speziellen Kamera bietet dieses System die Möglichkeit, Aufnahmen im Nahinfrarot-Bereich zu produzieren und entsprechende Fluoreszenzsignale darzustellen. Um über die Eigenfluoreszenz hinaus Informationen zu gewinnen und gewünschte Strukturen deutlicher sichtbar zu machen, findet der Rheumascan nach intravenöser (i.v.) Injektion eines Kontrastmittels (KM) statt. Hierfür zugelassen ist unter anderem ICG, ein fluoreszierender Farbstoff, dessen Emissionsmaximum im für das Gerät erfassbaren Wellenlängenspektrum liegt und der standardmäßig Einsatz im Xiralite-System findet<sup>26,47</sup>.

Es handelt sich bei ICG um einen unspezifischen Farbstoff, der einem passiven Transport über die Blutbahn unterliegt. Areale gestörter Mikrozirkulation, wie sie bei entzündlichen Vorgängen vorliegen, lassen sich daher gut mit ICG detektieren<sup>48,49</sup>.

Die Bildgebung per NIR-FOI gilt als einfache, schnelle und sichere Methode. Die Ergebnisse sind unabhängig vom Untersuchenden und finden unter gut reproduzierbaren Bedingungen statt. Der Kostenfaktor ist hierbei gering.<sup>26,48-51</sup> Des Weiteren ist der Patient keinerlei Strahlenbelastung ausgesetzt, was den Einsatz für Verlaufskontrollen ermöglichen würde.

Bezüglich der Sensitivität und Spezifität zur Detektion synovialer Entzündung der NIR-FOI mit ICG verglichen mit der MRT kommen verschiedene aktuelle klinische Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die ermittelte Sensitivität variiert zwischen 40 und 76%, bzw. 86% bei früher und sehr früher Arthritis im Vergleich zur MRT, die Spezifität zwischen 54 und 85%<sup>26,47,52</sup>.

Zur Verbesserung der Konkurrenzfähigkeit der NIR-FOI mit der MRT rückt die Optimierung des KM in den Fokus. Die Steigerung der Sensitivität und Spezifität bei der Detektion der arthritischen Prozesse soll erreicht werden durch Konjugation des KM an ein Inflammationstarget, sodass es im Entzündungsareal akkumuliert, unabhängig von der Mikrozirkulationssituation. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit dendritisches Polyglycerolsulfat (dPGS) und dendritisches Polyestersulfat (dPES) konjugiert an ICG als KM in der NIR-FOI untersucht.

### **1.3.2.2 NIR-FOI mit ICG-gebundenem dendritischem Polyglycerolsulfat und Polyestersulfat**

DPGS dient als Überbegriff für eine Gruppe vollsynthetischer polysulfatierter Polymere auf Basis von hochverzweigtem Polyglycerol (siehe Tab. 3). Dabei unterscheiden sich die einzelnen Polymere in Sulfatierungsgrad und Molekulargewicht.

Ursprünglich wurden sie mit dem Ziel entwickelt, einen vollsynthetischen Ersatzstoff für Heparin zur Hemmung der Blutgerinnung zu finden. Dabei zeigte sich, dass dPGS einen deutlich geringeren antikoagulatorischen Effekt besitzt als unfraktioniertes Heparin, jedoch das Komplementsystem um ein Vielfaches stärker inhibiert<sup>53</sup>.

Heparin interagiert mit zahlreichen Proteinen, die an Inflamationsprozessen beteiligt sind. Dazu gehören Komplementfaktoren, Akute-Phase-Proteine, Zytokine, Transkriptionsfaktoren (Nuclear Factor Kappa B; NF-κB) sowie P- und L-Selektine<sup>54-57</sup>. Studien geben Hinweise darauf, dass die antientzündliche Wirkung des Heparins zu großen Teilen auf die Blockierung von P- und L-Selektinen zurückzuführen ist<sup>58</sup>. P-Selektine werden auf Thrombozyten und aktivierten Endothelzellen exprimiert und sind maßgeblich beteiligt an der lockeren Bindung zwischen Leukozyten und Endothel beim „rolling“ während der Extravasion der Leukozyten ins Gewebe. L-Selektine, Oberflächenmoleküle der Leukozyten, befähigen diese zum „secondary rolling“, bei dem die Zellen nach Bindung ans Endothel weitere Leukozyten binden und

mitnehmen können. L-Selektine sind außerdem wichtige Mediatoren der Einwanderung von Leukozyten in lymphatische Gewebe<sup>56,59</sup>.

Ähnliche Bindungspartner besitzt auch das dPGS. Studien konnten demonstrieren, dass dPGS an die Komplementfaktoren C3 und C5 und auch an L- und P-Selektine bindet (zur Wirkungsweise siehe Abb. 2)<sup>60</sup>. Auch Makrophagen immigrieren selektiv vermittelt ins Gewebe. Da der Grad der Infiltration durch Makrophagen mit dem Fortschreiten der Erkrankung korreliert<sup>12</sup>, birgt die Inhibition der Akkumulation dieser Zellen großes therapeutisches Potenzial. Die Ausprägung der Affinität von dPGS zu den Selektinen ist proportional zu Molekülgröße und -Sulfatierungsgrad<sup>60,61</sup>, wobei die optimale Konstellation bei einem dPGS von 18kDa und einem Sulfatierungsgrad von ca. 90% angenommen wird<sup>62</sup>.

Tab. 1: Affinitäten von dPGS zu verschiedenen autoimmunologisch relevanten Zytokinen, Chemokinen und Faktoren des Komplementsystems ermittelt via Biacore Assay. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Jens Dornedde (Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité).

<b>Bindungspartner mit hoher Affinität</b>	<b>Dissoziationskonstante (nM)</b>	<b>Bindungspartner mit geringer Affinität</b>	<b>Dissoziationskonstante (nM)</b>
P-Selectin	$3 \times 10^{-3}$	VEGF	100
TGF-beta 1	$4 \times 10^{-3}$	C3a	$1,5 \times 10^3$
L-Selectin	$12 \times 10^{-3}$	C3	$6 \times 10^3$
C5a	$23 \times 10^{-3}$	C5	$12 \times 10^3$
AP-1	$97 \times 10^{-3}$		
IL-17F	2		
NFκB	3		
IL-23	3		

Neuere, noch unveröffentlichte in vitro-Untersuchungen von Dornedde et al. zeigen Affinitäten zu vielen weiteren entzündungsrelevanten Molekülen (siehe Tab. 1). Hierzu gehört das proinflammatorische Zytokin IL-17F, welches in vitro einen hemmenden Einfluss auf die Knorpelsynthese zeigte<sup>63</sup>. Das dem IL-17 F eng verwandte IL17 bildet mit IL-23 einen Signalweg, dessen Störung zur Ausbildung autoimmuner Erkrankungen wie RA führen kann<sup>64</sup>. Transforming Growth Factor beta (TGF-beta) ist unter anderem beteiligt an der Hyperplasie der Synovialmembran und aktiviert verschiedene Leukozytenpopulationen<sup>65</sup>. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) fördert die Angiogenese im Rahmen des Entzündungsgeschehens. Die Hemmung der Neovaskularisation führte in Studien zur Hemmung der Inflammation<sup>65</sup>. Neben der Bindung an Oberflächenmoleküle findet auch eine Aufnahme von dPGS ins Zellinnere von Makrophagen und endothelialen Zellen statt<sup>66-68</sup>, was die Bindung an intrazelluläre Moleküle

ermöglicht. Zu solchen zählen AP-1 und NFκB, bei denen es sich um Transkriptionsfaktoren handelt, die die Genexpression zahlreicher proinflammatorischer Zytokine und Matrixmetalloproteinasen regulieren und sich im CIA-Modell in erhöhter Konzentration bereits Tage vor der klinischen Symptomatik im Gelenk nachweisen lassen<sup>69</sup>.

Durch die beschriebenen Eigenschaften dient dPGS gekoppelt an ICG als hilfreiches Substrat zur Darstellung entzündlich veränderter Körperregionen. Dabei scheint vor allem die Affinität zu den für die Leukozytenextravasation unerlässlichen Selektinen relevant. In experimentellen Studien zum Monitoring von Asthma und Arthritis im Tiermodell wurde bestätigt, dass dPGS-ICG ein geeignetes spezifisches KM zur Darstellung inflammatorischer Prozesse ist und die Möglichkeiten des NIR-FOIs im Vergleich zu Messungen mit reinem, unspezifischen ICG erweitern kann<sup>66,68</sup>. DPGS-ICG könnte daher ein interessantes Tool in der Diagnostik und Therapie entsprechender Krankheitsbilder darstellen. Unbekannt ist allerdings bislang, ob die Methode auch genutzt werden kann, um verschiedene Schweregrade der Entzündung zu differenzieren und wie sich das KM pharmakokinetisch verhält. Aufgrund der Größe und Konstitution des Polyethers ist es denkbar, dass das Molekül dem biochemischen Abbau nicht zugänglich ist. Eine Elimination wäre dann nur über eine Ausscheidung des kompletten Moleküls möglich.

Mit dem Ziel, eine dem dPGS verwandte Substanz mit verbesserter Pharmakokinetik zu entwickeln, wurde dendritisches bis(hydroxymethyl)propionic acid polyester-sulfat (dPES) hergestellt. Hierbei diente ein dendritisches Polyester-Gerüst als Basis. Die zahlreichen Estergruppen sollen einen verbesserten Abbau des Moleküls ermöglichen, beispielsweise durch Spaltung mittels hepatischer Esterasen. DPES soll die gleichen oben aufgeführten physikalischen Eigenschaften wie dPGS aufweisen, aber der Biotransformation unterliegen und eine optimierte Ausscheidung des Stoffes ermöglichen.

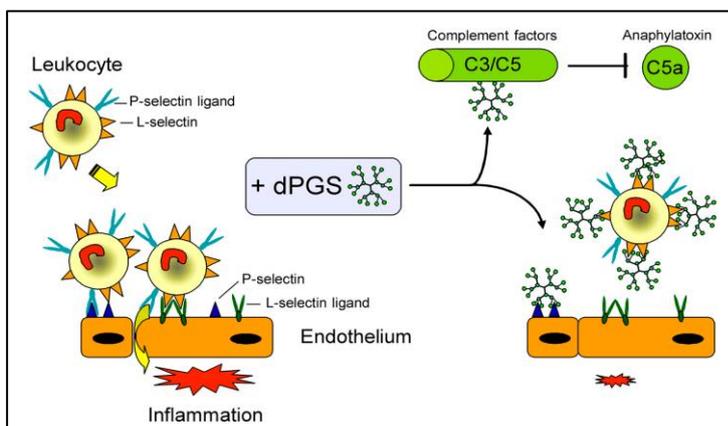


Abb. 2: Blockade von P- und L-Selectin und Inhibition der Komplementkaskade durch dPGS. Quelle: Dervedde, 2010<sup>60</sup>

Die Herstellung des dPES erfolgt ebenfalls vollsynthetisch. Strukturell bestehen bezüglich Größe, dendritischem Aufbau und hohem Sulfatierungsgrad große Ähnlichkeiten zum dPGS (siehe Tab. 3). Bis dato existieren keine veröffentlichten Studien zum dPES.

### **1.4 Therapie der rheumatoiden Arthritis**

In den vergangenen Jahrzehnten fand neben den diagnostischen auch eine enorme Weiterentwicklung der therapeutischen Möglichkeiten der RA statt. Während zunächst mit Salicylaten und Analgetika hauptsächlich rein symptomatisch behandelt wurde, konnte man später durch den Einsatz von Glucokortikoiden bereits den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen. Ein Therapieansatz, den man bis heute weiterentwickelt hat und stark verbessern konnte<sup>70</sup>. Die zentralen Komponenten der aktuellen Behandlungsempfehlungen sind die klassischen (synthetischen) Disease-Modifying Antirheumatic Drugs (DMARDs), wie Methotrexat (MTX), Leflunomid, Sulfasalazin, Antimalariamittel und Glucokortikoide sowie die Biologicals – neuere DMARDs, die an bestimmte Zytokine oder Oberflächenmoleküle binden und diese inhibieren, wie TNF $\alpha$ - und Interleukin-Inhibitoren<sup>18</sup>. Nach den ACR-Empfehlungen sollte bei Patienten mit RA zunächst eine Monotherapie mit synthetischen DMARDs durchgeführt werden, so lange keine schlechten prognostischen Faktoren vorliegen. Andernfalls sei eine Kombinationstherapie mit synthetischen DMARDs oder die Anwendung eines Biologicals mit oder ohne MTX erforderlich<sup>71</sup>. Die EULAR-Kriterien empfehlen eine Erstlinientherapie mit MTX als Monopräparat, raten allgemein eher zur Monotherapie mit synthetischen DMARDs als zu Kombinationen und schlagen den Gebrauch von Biologicals bei ungenügender Wirkung anderer DMARDs plus schlechten prognostischen Faktoren vor<sup>72</sup>. Einigkeit besteht darin, dass die Therapie der RA so früh wie möglich eingeleitet werden muss<sup>18,21-24,71-74</sup> und als Therapieziel die Remission nach dem sogenannten „treat-to-target“-Prinzip verfolgt werden sollte<sup>71,72,75,76</sup>. Unter diesen Voraussetzungen können gute Ergebnisse erzielt werden einschließlich der medikamentenfreien Remission<sup>7,18,24,76-79</sup>. Auch eine Reduktion der RA-assoziierten Mortalität wird diskutiert<sup>80,81</sup>. Trotz der insgesamt guten Erfolge mit biologischen und synthetischen DMARDs schlägt die Therapie bei bis zu 30-40% der Patienten nicht an<sup>1</sup> oder wird auf Grund von unerwünschten Nebenwirkungen abgebrochen<sup>13,82-84</sup>. Auch wurde berichtet, dass die Biologicals abseits von Studien im klinischen Alltag weniger effektiv waren als angenommen<sup>85</sup>. Dies lässt sich möglicherweise zurückführen auf die Begrenzung der Wirkung auf nur ein hochspezifisches Target.

Kritisch wird auch immer wieder der hohe Kostenfaktor der Therapie mit Biologicals diskutiert<sup>7,86-88</sup>.

Die Entwicklung neuer Therapeutika mit gleichzeitiger Wirkung auf verschiedene in der Pathologie der RA beteiligten Moleküle könnte zu einer verbesserten Effektivität führen.

#### **1.4.1 DPGS und dPES als potenzielle Therapeutika bei rheumatoider Arthritis**

Auf Grund der Bindung an mehrere für die Inflammation relevante Moleküle entfaltet dPGS eine antiinflammatorische Wirkung. Dies konnte bereits in einem Tiermodell zur Kontaktdermatitis *in vivo* gezeigt werden<sup>60</sup>.

In der auf Nahinfrarotlicht basierenden Bildgebung konnte gezeigt werden, dass sich dPGS im Arthritis-Modell im Gelenk am Ort der entzündlichen Prozesse anreichert<sup>66</sup>.

Dass dPGS-ICG sich bei der RA am Hot Spot der autoimmunologischen Vorgänge nachweisen lässt, unterstützt die These, dass dPGS eine effektive Substanz in der Therapie der RA sein könnte. Erhärtet wird diese Annahme durch die Tatsache, dass Heparin, das bei der synthetischen Entwicklung des dPGS als Vorbildmolekül diente, ebenfalls eine positive Wirkung bei der Behandlung der RA zeigte.<sup>89</sup>

Diese Hypothese soll sowohl für das dPGS als auch für das dPES anhand des an Ratten durchgeführten Collagen-Induced Arthritis Modells (CIA-Modell) überprüft werden.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Aktuelle Empfehlungen fordern Diagnostik und die Einleitung der Therapie bei RA innerhalb der ersten drei Monate nach Erkrankungsbeginn und anschließend ein kontinuierliches Monitoring der Krankheitsaktivität durch die Quantifizierung der Gelenkentzündung<sup>18</sup>. Hierzu ist der Gebrauch adäquater bildgebender Verfahren sinnvoll. Es finden vor allem US und MRT Anwendung, die die Möglichkeit bieten, prä-klinische inflammatorische Veränderungen des Gelenks aufzudecken, prognostische Vorhersagen zu treffen (MRT) und die zur Remissionsprüfung genutzt werden können<sup>25,30,33,90</sup>.

Ein optimales Imaging-Verfahren für die Diagnostik der RA erfordert die bereits genannten Vorteile der MRT und des US, sollte aber zusätzlich durch einfache und sichere Handhabung nutzerfreundlich und untersucherunabhängig sein und eine kostengünstige Anwendung ermöglichen.

Die beschriebene NIR-FOI erbrachte unter Anwendung von ICG als KM bereits vielversprechende Ergebnisse in dieser Richtung und zeigte sich in Tierversuchen als relevantes diagnostisches Tool<sup>43,51</sup>. Das Verfahren soll nun unter Verwendung der Kontrastmittel dPGS- und dPES-ICG mit Blick auf die für den klinischen Gebrauch erforderlichen Eigenschaften im Tierversuch bewertet und der diagnostische Nutzen bei der RA geprüft werden. Dabei sollen auch Aspekte der Pharmakokinetik untersucht werden.

Die therapeutischen Möglichkeiten für Patienten mit RA haben sich in den letzten Jahren enorm verbessert. Die zur Verfügung stehenden Medikamente können in vielen Fällen bei frühem Einsatz die Prognose positiv beeinflussen und teilweise sogar eine Remission herbeiführen<sup>7,18,73</sup>. Ein nicht unerheblicher Teil der Patienten profitiert jedoch nicht von diesen Entwicklungen, da bei ihnen die Therapie nicht anschlägt oder unerwünschte Nebenwirkungen auftreten<sup>82,83</sup>. Als problematisch stellen sich auch die hohen Kosten dar, die mit einer modernen Therapie mit Biologicals verbunden sind<sup>86-88</sup>. Das Spektrum an zur Verfügung stehenden, effektiven und nicht zuletzt kostengünstigen Medikamenten zur Behandlung der RA zu erweitern, ist daher Gegenstand aktueller Forschung.

DPGS ist durch die oben beschriebenen Eigenschaften in der Lage, eine entzündungshemmende Wirkung zu entfalten. Ebenso wurde gezeigt, dass dPGS-ICG sich im Tierversuch in arthritischen Gelenken anreicherte<sup>66</sup>. Es lässt sich hieraus ableiten, dass dPGS einer inflammatorischen Gelenkerkrankung therapeutisch entgegenwirken könnte. Während beispielsweise Biologika wie TNF- $\alpha$ -Inhibitoren, über monospezifische Inhibition wirken und damit bei circa 30 Prozent der Patienten nicht den gewünschten therapeutischen Effekt zeigen<sup>91</sup>,

## Zielsetzung der Arbeit

besitzen die hochsulfatierten Makromoleküle ein breites Spektrum an Bindungspartnern. Durch die multispezifische Hemmung verschiedener Faktoren der Inflammationskaskade, könnte eine große Patientenpopulation von den Substanzen profitieren.

Um die Eignung der hochsulfatierten Makromoleküle in Diagnostik und Therapie der RA zu untersuchen, soll die vorliegende Arbeit folgende Versuche umfassen:

DPGS und dPES sollen konjugiert mit ICG als KM in der NIR-FOI als bildgebendes Verfahren in einem Tiermodell der RA untersucht werden. Zu diesem Zweck soll bei Ratten mit CIA nach KM-Applikation eine NIR-FOI durchgeführt werden und die Anreicherung der KM in Inflammationsarealen und Organen bestimmt werden.

Die therapeutische Effektivität von dPGS und dPES bei RA soll ebenfalls anhand des CIA-Modells der Ratte untersucht werden. Hierzu soll die Schwere der rheumatischen Symptomatik zwischen behandelten und unbehandelten Tieren anhand eines klinischen Scores verglichen werden und die Synovialflüssigkeit bezüglich eingewanderter Entzündungszellen geprüft werden.

Es sollen Informationen zum pharmakodynamischen und –kinetischen Verhalten der Makromoleküle gesammelt werden. In diesem Zusammenhang sollen die qualitative und semiquantitative Bestimmung von dPGS und dPES in histologischen Organschnitten von CIA-Ratten, die mit den Substanzen therapiert wurden, sowie die Messung der Blutgerinnungszeit erfolgen. Material von Tieren, die mit Heparin behandelt wurden, soll hierbei als Vergleichsparameter dienen.

Um die Eliminationsfähigkeit der Substanzen zu untersuchen, soll die Konzentration der Makromoleküle nach Inkubation in U937-Zellen im zeitlichen Verlauf untersucht werden.

### 3. Material und Methoden

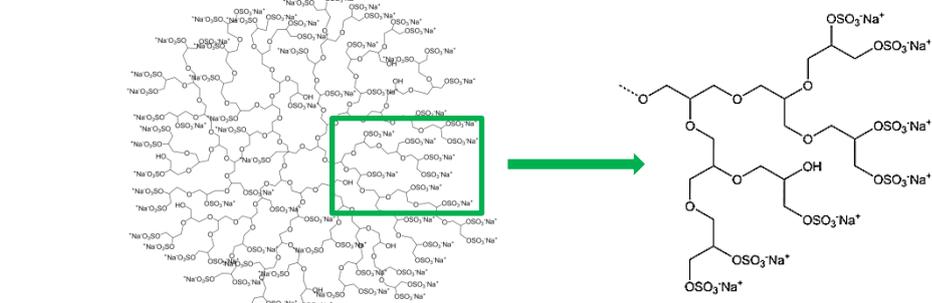
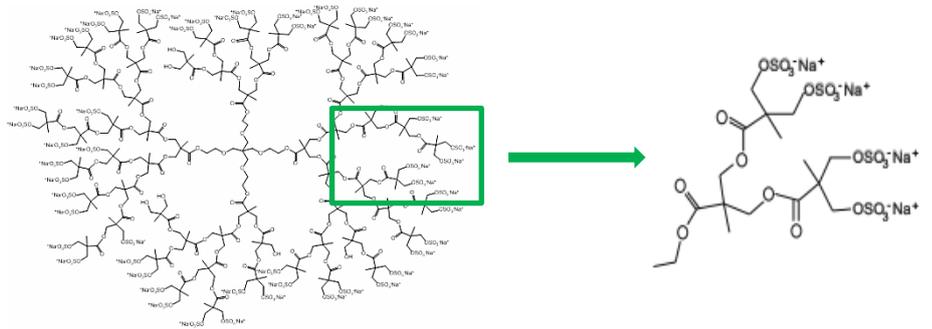
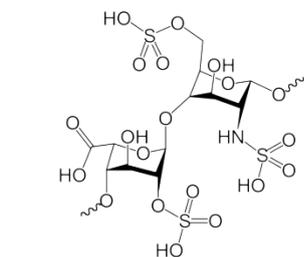
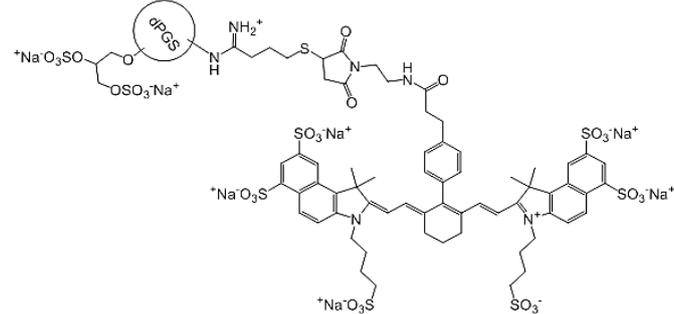
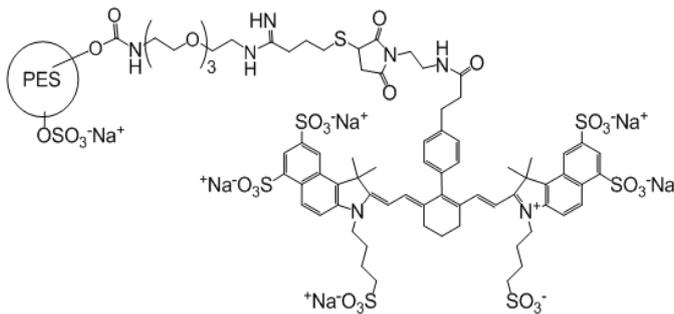
#### 3.1 Experimentell verwendete Makromoleküle

Die polysulfatierten Makromoleküle (mit Ausnahme des Heparins) und Farbstoffkonjugate, die in den im Folgenden erläuterten Experimenten *in vivo* und *in vitro* Anwendung fanden (siehe Tab. 2 und 3), wurden synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Kai Licha, Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin/mivenion GmbH und Herrn Dr. Jens Dervedde/AG Dervedde, Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité – Universitätsmedizin Berlin. Die Synthese der dendritischen Polyglycerolsulfate erfolgte mittels Polymerisierungsreaktion von Glycerol und anschließender Sulfatierung der freien Hydroxylgruppen<sup>53</sup>. Analog erfolgte die Synthese der dendritischen Polyestersulfate durch Polymerisierung von Esterverbindungen. Die Molekulargewichte und Sulfatierungsgrade stellen somit (ähnlich wie bei Heparin) Mittelwerte dar. Die Konjugation mit dem NIR-Fluoreszenzfarbstoff ICG (Pulsion Medical Systems) ist in Licha et al.<sup>66</sup> beschrieben. Unfraktioniertes Heparin wurde bezogen von ratiopharm.

Tab. 2: Eigenschaften der diagnostisch und therapeutisch eingesetzten Substanzen. Die Synthese erfolgte am Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin/mivenion GmbH und dem Institut für Laboratoriumsmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin durch Dr. Licha und die AG Dervedde und wurde von diesen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Heparin wurde bezogen von ratiopharm.

<b>Substanz</b>	<b>Verwendung in folgenden Versuchen</b>	<b>Mittleres Molekulargewicht</b>	<b>Sulfatierungsgrad</b>
<b>dPGS</b>	V1, V3, V4	ca. 13 kDa	90%
<b>dPES</b>	V1, V3, V4	Ca. 13 kDa	95%
<b>Heparin</b>	V3	ca. 16 kDa	~ 2,7 Sulfatgruppen pro Disaccharid <sup>92</sup>
<b>dPGS-ICG</b>	V1, V3	ca. 13 kDa	90%
<b>dPES-ICG</b>	V2, V4	ca. 15 kDa	96%

Tab. 3: Strukturen (idealisiert) der diagnostisch und therapeutisch eingesetzten Substanzen. Die Synthese erfolgte am Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin/mivenion GmbH und dem Institut für Laboratoriumsmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin durch Dr. Licha und die AG Denedde. Heparin wurde bezogen von ratiopharm.

Substanz	Grundstrukturen und Molekülausschnitte
dPGS	
dPES	
Heparin	
dPGS-ICG	
dPES-ICG	

### 3.2 Therapeutische Anwendung der Makromoleküle im CIA-Modell der Ratte

Für alle folgenden Untersuchungen wurde das seit längerem etablierte Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis (Collagen-Induced Arthritis, CIA) (Trentham 1977<sup>93</sup>) an weiblichen Ratten der Gattung Lewis angewendet. Die 8 Wochen alten Tiere besaßen ein durchschnittliches Körpergewicht von  $150 \pm 20$ g.

Die in dieser Arbeit verwendeten Daten entstammen vier unabhängigen Tierversuchen mit jeweils 15 Tieren (außer Versuch 2) (siehe Tab. 4 und 5). Diese wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales nach § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt (Genehmigungsnummer: G0427, 01.07.2010). Außerdem wurde stets unter Beachtung der „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ (herausgegeben von der Forschungskommission der Charité Universitätsmedizin Berlin) gearbeitet.

Nach einer Eingewöhnungsphase von einer Woche erhielten die Tiere am Rücken im Bereich zwischen den Hinterläufen eine subkutane (s.c.) Injektion mit 0,5mg bovinem Kollagen Typ II (Sigma), emulgiert in inkomplettem Freund's Adjuvans (Sigma F5506) (siehe Abb. 3). Zum Zwecke der Boosterung erfolgte eine zweite Injektion sieben bis acht Tage später. Eine Ausnahme bildeten die Tiere des Versuchs V4, bei denen sowohl die erste Kollageninjektion als auch die Boosterung mit 1mg Kollagen erfolgten.

Tab. 4: Übersicht über die Interventionen bei Ratten mit CIA, die verwendeten Kontrastmittel (KM) in den Tierversuchen und die Anzahl an Tieren (n).

Versuch	Intervention					KM in der NIR-FOI		Gesamtzahl
	NaCl	dPGS	dPES	Heparin	non	dPGS-ICG	dPES-ICG	
V1	n=5	n=4	n=2	–	n=4	n=8	–	n=15
V2	–	–	–	–	n=13	–	n=6	n=13
V3	n=4	n=4	n=4	n=3	–	n=7	–	n=15
V4	n=5	n=5	n=5	–	–	–	n=6	n=15

Am Tag der Kollagenboosterung wurde mit der täglichen Behandlung der Ratten begonnen. In V1 startete die Therapie bereits am Tag der ersten Kollageninjektion (siehe Tab. 5). Die Tiere erhielten s.c. entweder 30 mg/kg KG dPGS, dPES, oder NaCl. Unfraktioniertes Heparin wurde adaptiert an die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) nach folgendem Schema s.c. verabreicht: An Tag eins und zwei: 30 mg/kg KG/Tag (entspricht 4800 I.E./kg KG/Tag), ab Tag drei: 4,5-7,5 mg/kg KG/Tag (entspricht 24 – 40 I.E/kg KG/Tag).

Tiere, die NaCl-Injektionen erhalten hatten, dienten als kranke Kontrolltiere, Tiere, die von den Kollageninjektionen ausgeschlossen blieben, bildeten die Gruppe der gesunden Kontrolltiere.

Zur Schmerztherapie wurde entsprechend den Empfehlungen zur Schmerztherapie bei Versuchstieren der GV Solas das Trinkwasser mit 2,5mg Tramadol pro 100ml aufbereitet. Es wurde zusätzlich mit wenigen Tropfen Erdbeer- oder Himbeersirup sowie einem Löffel Traubenzucker auf 500ml versetzt, um die Trinkbereitschaft zu erhöhen. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung (in der Eingewöhnungsphase Standardfutter #1320 Rats/Mice, Maintenance Diet [Altromin], nach der ersten Kollageninjektion Zuchtfutter #1310 Rats/Mice, Breeding Diet [Altromin]). Die Tierversuche wurden am Institut für Radiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Tab. 5: Übersicht über die Tierversuche mit Anwendung von polysulfatierten Makromolekülen in Diagnostik (NIR-FOI) und Therapie der CIA bei Ratten. Tag 1 entspricht dem Tag der ersten Kollageninjektion. KM: Kontrastmittel, V: Versuch.

Versuch	Kollagenmenge	Kollagenboosterung	Intervention	Therapiebeginn	KM in der NIR-FOI
V1	0,5 mg	Tag 8	dPGS, dPES	mit der ersten Kollageninjektion	dPGS-ICG
V2	0,5 mg	Tag 9	keine Therapie	∅	dPES-ICG
V3	0,5 mg	Tag 8	dPGS, dPES Heparin	mit der Kollagenboosterung	dPGS-ICG
V4	1 mg	Tag 8	dPGS, dPES	mit der Kollagenboosterung	dPES-ICG

### 3.2.1 Erhebung des klinischen rheumatischen Scores

An Tag 13 bzw. 14 (Tag eins = Zeitpunkt der ersten Kollageninjektion) traten die ersten Symptome auf und wurden an Tag 15 anhand eines Rheumascores mit den Rubriken Tumor, Rubor, Dolor und Functio laesa (Funktionsbeeinträchtigung) quantifiziert. Je nach Ausprägung dieser Symptome wurden in jeder Kategorie 0-3 Punkte vergeben und daraus der Mittelwert errechnet (siehe Tab. 6). Die Intensitäten von Rubor und Tumor wurden subjektiv durch Inspektion und Palpation der Fußgelenke bestimmt, die Bewegungseinschränkung (Functio laesa) wurde auf ähnliche Weise durch passive Funktionsprüfung des hinteren Sprunggelenks (SG), in welchem sich die Inflammation zuerst und am stärksten niederschlug, ermittelt. Die Schwere des Kriteriums Dolor wurde als rein inspektorischer Parameter durch Beurteilung des Gangbildes bewertet. Die Bestimmung der Rheumascores wurde für alle Versuche von Frau Dr. med. vet. Ines Gemeinhardt aus dem Institut für Radiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin vorgenommen.

Tab. 6: Kriterien der Score-Bildung zur Beurteilung der Inflammationsintensität in den hinteren Articulationes pedis bei Ratten mit CIA. Die klassischen Entzündungszeichen (mit Functio laesa statt Color) wurden je nach Schweregrad mit 0 bis 3 Punkten bewertet. SG: Sprunggelenk. MFG: Mittelfußgelenke.

<b>Kardinalzeichen der Inflammation</b>				
<b>Ausprägung</b>	<b>Tumor</b>	<b>Rubor</b>	<b>Dolor (Gangbild)</b>	<b>Functio laesa</b>
<b>0</b>	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden	Unverändert	Vollständig streckbar
<b>1</b>	Leichte Schwellung im SG	Leichte Rötung	Leichtes Hinken	Leichte Einschränkung
<b>2</b>	Mittelgradige Schwellung in SG und MFG	Mittlere Rötung	Schweres Hinken	Mittlere Einschränkung
<b>3</b>	Hochgradige Schwellung in SG und MFG (ballonartig)	Starke Rötung	Keine Belastung des Fußes	Streckung kaum möglich
<b>Endscore = Gesamtpunktzahl / 4. Das gerundete Ergebnis trägt einen Wert zwischen 0 und 3.</b>				

### 3.3 Nahinfrarotbildgebung mit dPGS-ICG und dPES-ICG als Kontrastmittel

Am 15. Tag der Versuche (sieben bis acht Tage nach der Kollagenboosterung) erfolgte die NIR-Bildgebung im Rheumascan® mit Hilfe der Software Xiraview 3.6 i. Für die Aufnahmen wurde eine Kamera des Typs Luca DL-658M-OEM (Andor Technology) oder UK1158m\00 (EHDImaging) verwendet. Es wurde ein Objektiv mit einer Brennweite von  $f = 16\text{mm}$  gewählt.

Als KM wurden die Konjugate dPGS-ICG und dPES-ICG verwendet. Von allen Tieren wurden vor der Injektion des Kontrastmittels sowie 10 Minuten, 30 Minuten, einer, drei und 24 Stunden nach der Injektion NIR-Aufnahmen angefertigt. Hierbei wurden in den verschiedenen Versuchen unterschiedliche KM-Mengen verwendet (siehe Tab. 7).

Tab. 7: Versuchsparameter der Imaging-Versuche V1 bis V4. KM: Kontrastmittel. KG: Körpergewicht.

Versuch	Kamera	Kontrastmittel	Anzahl der Versuchstiere	Kontrastmitteleigenschaften			Injizierte KM-Menge
				Beladungsgrad (Farbstoffmoleküle/Makromolekül)	mittleres Molekulargewicht	Sulfatierung	
V1	UK1158	dPGS-ICG	9	0,99	13kDa	90%	2mg/kg KG
V2	UK1158	dPES-ICG	6	1,23	15kDa	96%	2mg/kg KG
V3	Luca	dPGS-ICG	7	0,99	13kDa	90%	2mg/kg KG
V4	Luca	dPES-ICG	6	1,23	15kDa	96%	1,4mg/kg KG

Zur Narkoseeinleitung wurden die Tiere zunächst in einer Induktionsbox mit drei Prozent Isofluran (Forene®) plaziert, während des Imagings erhielten sie inhalativ 1,5%iges Isofluran über eine Maul-Nasen-Maske mit Anschluss zum Verdampfer. Es wurden jeweils Aufnahmen in folgenden drei Positionen gemacht: Rücken-, Bauch- und Hocklage (siehe Abb. 3). Auf diese

Weise ließen sich aus unterschiedlichen Winkeln Daten zu den fluoreszierenden Bereichen gewinnen. Die SG beispielsweise konnten so von lateral, medial und dorsal betrachtet werden.

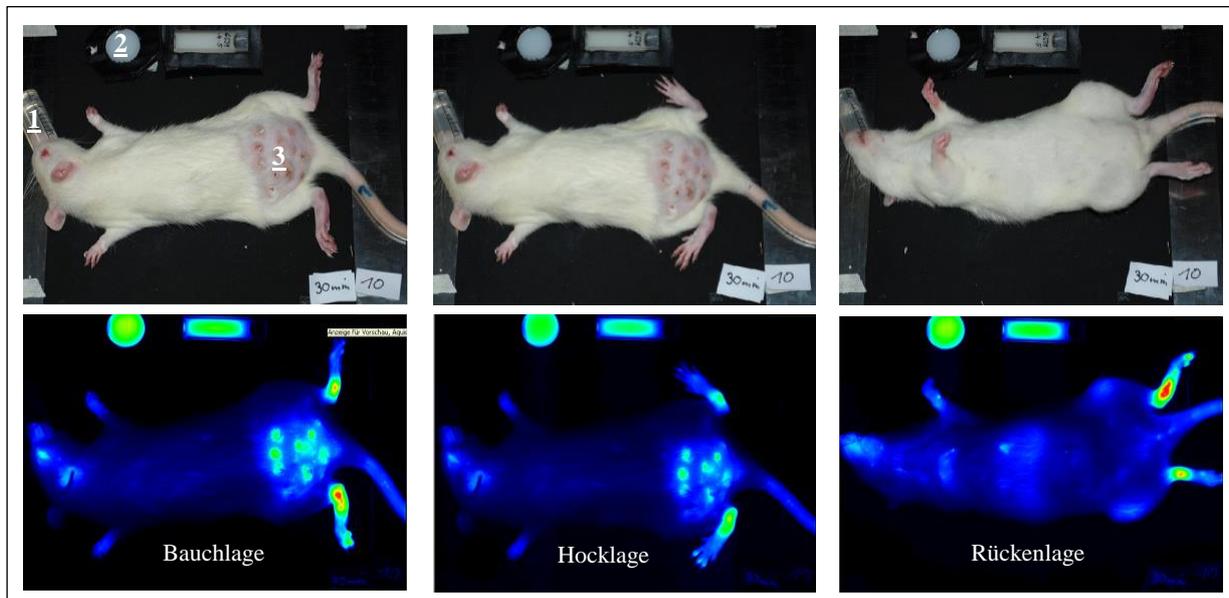


Abb. 3: Darstellung der drei Positionen beim NIR-FOI, oben fotografiert mit Lichtbildkamera, unten die entsprechenden Fluoreszenzbilder 30 Minuten nach Injektion von dPGS-ICG. 1: Maul-Nasen-Maske für die Inhalationsnarkose, 2: runder Standardfluoreszenzkörper (rechts daneben ein eckiger Standardfluoreszenzkörper), 3: Kollageninjektionsstellen.

### 3.4 Versuchsende – Präparation der Organe

Im Anschluss an die 24-Stunden-Aufnahme wurden die Versuche beendet. In Narkose (Isofluran 4-5% inhalativ) wurde zunächst das Abdomen der Ratten eröffnet, um aus der Aorta abdominalis Blut zur Blutbild- und Gerinnungsbestimmung (INR und aPPT) zu entnehmen (BD Neoflon 24G Venenverweilkatheder). Im Anschluss erfolgte eine Thorakotomie mit Trennung des Herzens von allen zu- und abführenden Gefäßen. Die inneren Organe wurden entnommen und auf Fluoreszenz im Rheumascan® untersucht (s.u.). Diejenigen Organabschnitte, die die höchste Fluoreszenzintensität aufwiesen, wurden in Paraformaldehyd (Roth®) fixiert und 7 Tage später in Paraffin eingebettet. Aus den SG wurde nach Einstich in den Gelenkspalt Synovialflüssigkeit gewonnen und auf Objektträgern (R. Langenbrinck oder Thermo Scientific) ausgestrichen.

### 3.5 Auswertung der Nahinfrarot-Aufnahmen mit dem Programm Xiralite

Die aus der NIR-Bildgebung stammenden Aufnahmen wurden mithilfe des Programms Xiralite (Mivenion) ausgewertet. Durch das Setzen von Regions of Interest (ROIs) wurden hiermit die Areale festgelegt, deren FI bestimmt werden sollte. Bei der Berechnung der Signalintensitäten durch das Programm diente die genormte Fluoreszenzintensität der Fluoreszenzblöckchen (Standardfluoreszenzkörper, siehe Abb. 3) als Referenz. Zu jedem Aufnahmezeitpunkt und in

jeder Position (Bauch-, Hock-, Rücklage; siehe Abb. 3) wurden außerdem Lichtbildaufnahmen angefertigt. Diese dienten als Kontrolle und konnten zum Abgleich der NIR-Aufnahmen hinzugezogen werden. Insbesondere bei den Ausgangsaufnahmen vor KM-Injektion, bei denen die Fluoreszenzsignale sehr schwach waren, konnte so die richtige Lokalisation der ROIs sichergestellt werden.

Die vor KM-Injektion gemessenen FI wurden als unspezifische Eigenfluoreszenz des Gewebes von sämtlichen anderen Werten abgezogen und bilden somit den Nullwert. Da die Kameraeinstellungen, die Menge an injiziertem KM und dessen Farbstoffbeladung für jeden Versuch anders definiert waren (siehe Tab. 7), diente in diesen Fällen der Mittelwert der FI zum Zeitpunkt zehn Minuten als 100%-Marke bzw. als eins. Die übrigen Werte wurden zu diesem in Relation gesetzt. Durch diese relative Betrachtung der Daten entfällt die Bedeutung der unterschiedlichen Messvariablen. Dies ermöglichte die Zusammenfassung von V2 und V3, in denen jeweils dPES-ICG als KM verwendet wurde.

Es wurden die Signalintensitäten folgender Organe/Gelenke über 24 Stunden zu mehreren Zeitpunkten betrachtet:

- Die Sprunggelenke als Hauptlokalisierung der Arthritis,
- die Augen als Parameter für den Verbleib des KM im Blutkreislauf
- sowie die Lebern, die zentralen Organe der Biotransformation.

Für weitere Informationen zur Pharmakokinetik wurden außerdem Leber, Niere, Milz, Regionallymphknoten aus der Poplitealregion, Herz, Lunge, Magen und Darm nach 24 Stunden entnommen und ex vivo deren FI ermittelt.

### **3.6 Quantifizierung der Blutzellen in der Synovialflüssigkeit**

Die Synovialflüssigkeitsausstriche wurden zur Quantifizierung der darin enthaltenen Zellen zunächst gefärbt und anschließend am Mikroskop ausgezählt.

#### **3.6.1 Pappenheimfärbung der Synovialflüssigkeitsausstriche**

Die Synovialflüssigkeitsausstriche wurden mit der panoptischen Färbung nach Pappenheim (Romeis 1989<sup>94</sup>) behandelt, wozu die unfixierten, luftgetrockneten Ausstriche zunächst drei Minuten in May-Grünwald-Färbelösung (Roth®) inkubierten. Die gleiche Menge Aqua dest. mit pH 7 wurde auf jeden Schnitt für eine Minute hinzugegeben. Das Gemisch wurde abgegossen, worauf eine 15-20 minütige Inkubation mit verdünnter Giemsa-Lösung (Roth®) (0,3ml Stammlösung auf 10ml Aqua dest. von pH 7) folgte. Die Schnitte wurden luftgetrocknet.

### 3.6.2 Bestimmung der Zellzahl in den Synovialflüssigkeitsausstrichen

Das Zählen der Immunzellen erfolgte am Mikroskop Leica DMR (Leica). Zur Orientierung wurde der Bereich des Objektträgers, auf dem der Ausstrich aufgetragen war, in fünf Spalten unterteilt. In jeder Spalte wurden an fünf definierten Punkten (A bis E) die im Zählgitter liegenden Zellen ausgezählt (siehe Abb. 4). Pro Ausstrich wurden folglich 25 Zählgitter à  $225 \times 350 \mu\text{m}$  bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Das Verschieben des Objektisches erfolgte dabei ohne Sichtkontrolle durch das Okular, die Orientierung fand anhand der aufgetragenen Hilfslinien statt. Dadurch wurde gesichert, dass die Auswahl des auszählenden Zählgitters unabhängig von der Erwartungshaltung des Zählenden getroffen wurde. Die Zellen wurden unterschieden in Lymphozyten, Neutrophile, Eosinophile, Makrophagen und Erythrozyten. Letztere dienten als Indikator für die artifizielle Einschwemmung von Blut bei der Gelenkpunktion, einer potenziellen Fehlerquelle bei der Quantifizierung der Leukozyten.

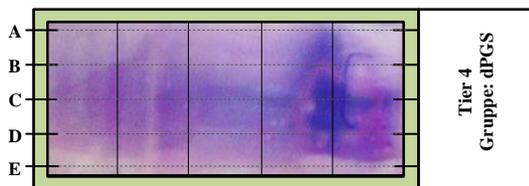


Abb. 4: Schema der Einteilung des Objektträgers zur Zellzählung in Synovialflüssigkeitsausstrichen. An den Punkten A bis E wurde in jeder Spalte je ein Zählgitter ausgezählt.

### 3.7 Histologische Methoden zur Detektion der polysulfatierten Makromoleküle in Organen und Zellen

Zum Nachweis der in den Therapieversuchen eingesetzten Makromoleküle wurden verschiedene histologische Methoden angewandt. Beim untersuchten Material handelte es sich um Schnitte von in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten inneren Organen (FFPEs) sowie Zellen, an denen qualitative und semiquantitative Betrachtungen zu Verteilung und Menge der Moleküle vorgenommen wurden.

#### 3.7.1 Alcianblaufärbung

Zum Nachweis der therapeutisch eingesetzten Substanzen dPGS und dPES wurden für verschiedene Untersuchungen jeweils modifizierte Färbungen mit Alcianblau (Alcianblau 8 GS, Ingrain Blue 1, Roth) (AB) durchgeführt. Dieser kationische Farbstoff bindet im sauren Milieu ( $\text{pH} \leq 1$ ) nahezu ausschließlich an polysulfatierte Moleküle<sup>95,96</sup>, wobei eine weitgehende Selektivität für Glukosaminoglykane (GAG) und hoch hydratisierte Muzine besteht<sup>97</sup>. Vorversuche zeigten, dass auch dPGS und dPES durch AB anzufärben waren. Für die folgenden Versuche wurde ein modifiziertes Protokoll nach Lev und Spicer angewendet<sup>95</sup>.

### **3.7.1.1 Färbung von Paraffinschnitten**

Die auf Objektträgern fixierten FFPEs wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (mit Roticlear und Ethanol 100%, 96%, 80% und 70% von Roth) und anschließend dreimal in Aqua dest. gewaschen.

Im Folgenden wurden die Schnitte mit Hyaluronidase ex ovine testes (Roth®) inkubiert. Diese entfernt durch enzymatischen Verdau zahlreicher GAG die meisten alternativen Bindungspartner des AB, sodass blau gefärbte Areale als Nachweis für dPGS, dPES und Heparin dienen können. 6,25mg der Hyaluronidase wurden in 12,25ml Sørensen-Puffer (pH~6,98) verdünnt. Die Schnitte wurden, üppig vom Puffer bedeckt, für 90 Minuten im 37°C-Schrank in einer Feuchtkammer gelagert.

Nach anschließendem gründlichen Waschen in destilliertem Wasser lagerten die Schnitte für 10 Minuten in 0,5M HCl-Lösung mit einem  $\text{pH} \leq 0,5$ .

Mit 0,5 M HCl-Lösung (Roth) wurde eine 1%ige AB-Lösung auf einer Heizrührplatte bei ca. 80°C unter stetigem Rühren hergestellt. Diese wurde filtriert und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt.

In einer dunklen Kammer inkubierten die Schnitte für 30 Minuten in der AB-Lösung und wurden dann dreimal kurz in 0,5 M HCl gewaschen, sodass überschüssiges AB sich löste. Anschließend wurden die Schnitte mit gefilterter Kernechtrotaluminiumsulfatlösung (Roth) für 15 Minuten bei Raumtemperatur bedeckt. Zuletzt durchliefen die Schnitte von Aqua dest. ausgehend die Alkoholreihe in aufsteigender Reihenfolge für die gleiche Dauer wie zur Entparaffinierung. Nach dreimaliger Verweildauer für je 10 Minuten in Roticlear wurden die Paraffinschnitte mit Roti®-Histokit (Roth) eingedeckt.

### **3.7.1.2 Färbung von U937-Zellen**

Auf Deckgläschen fixierte U937-Zellen inkubierten nach dreimaligem Waschen mit Phosphate-Buffered Saline-Lösung (PBS) in 0,5 M HCl-Lösung und durchliefen die darauf folgenden Färbeschritte wie die Paraffinschnitte (siehe oben; die Inkubationszeit in AB betrug hier 40 Minuten). In der aufsteigenden Alkoholreihe verweilten die Zellen jeweils nur einige Sekunden, verblieben im 100%igen Alkohol für eine Minute und lagerten einmalig für 15 Minuten in Roticlear. Es folgte eine Eindeckung mit Fluorescent Mounting Medium (Dako).

### **3.7.2 Qualitative Bestimmung der Akkumulation der polysulfatierten Makromoleküle in Organen**

4µm dicke Schnitte der in Paraffin eingebetteten Organe Dickdarm, Herz, Leber, Lunge, Magen, Milz, Niere und der Regionallymphknoten der SG aus der Poplitealregion aus V3 wurden am Mikrotom Leica RM2125 (Leica) hergestellt und auf Objektträger (Thermo Scientific) überführt. Die Objektträger verweilten über Nacht in einem 37°C-Schrank (Incucell) und lagerten anschließend bei Raumtemperatur. Nach bis zu fünf Wochen wurden die Schnitte weiterverarbeitet.

Es wurde eine AB-Färbung wie oben beschrieben durchgeführt.

#### **3.7.2.1 Die Erstellung und Beurteilung mikroskopischer Aufnahmen der gefärbten Paraffinschnitte**

Die gefärbten Präparate wurden bei 400facher Vergrößerung am Mikroskop Leica DMR untersucht und mit Hilfe der Kamera moticam 2500 (Motic®) und des Programms Motic Images Plus2.0 fotografiert (siehe Abb. 5). Dabei wurde detailliert betrachtet, in welchen Teilen der Organe sich das AB angereichert hatte.

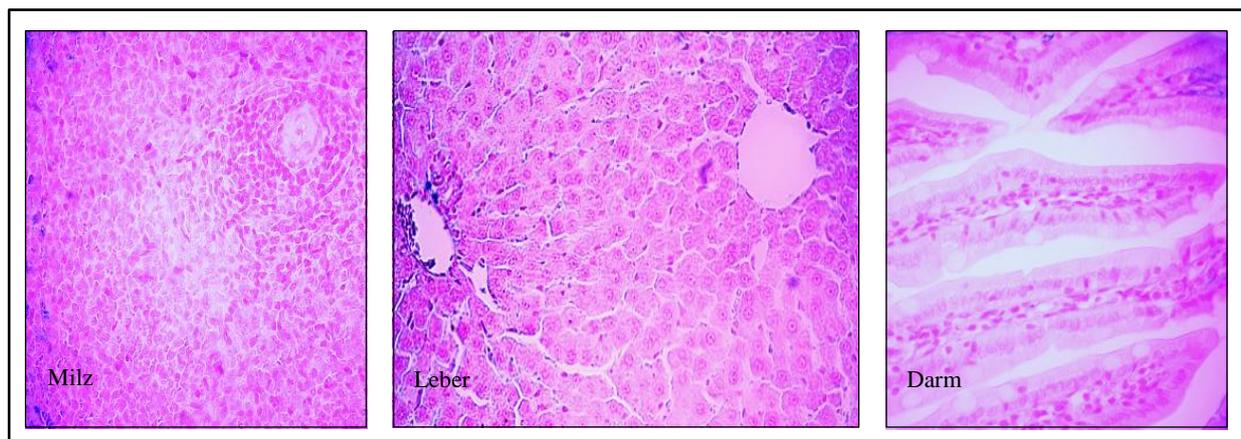


Abb. 5: Ausschnitte aus Milz, Leber und Darm AB/Kernechtrot-gefärbter Paraffingewebeschnitte von Ratten mit CIA, die über 15 Tage mit 30mg/kg KG dPGS behandelt wurden. Vergr. Leber: 200fach. Vergr. Darm und Milz: 400fach.

### **3.7.3 Semiquantifizierung der polysulfatierten Makromoleküle in Paraffinschnitten ausgewählter Organe**

#### **3.7.3.1 Erstellung von histologischen Schnitten verschiedener Organe**

Es wurden 16µm dicke Schnitte der in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Lebern, Nieren und Milzen der Ratten aus Versuch V3 hergestellt. Nach dem Schneiden eines Blockes wurde die Klinge verschoben, womit eine mögliche Kontamination mit DNA des vorherigen Präparats verhindert wurde. Ebenso wurden das Mikrotom und die umgebende Arbeitsfläche vor

dem Schneiden eines neuen Blocks mit DNA-Away (Molecular BioProducts) gründlich gereinigt. Nach jedem Schnitt wurden mit einem feinen Pinsel alle sichtbaren Paraffin- und Gewebestückchen sorgfältig vom Mikrotom entfernt. Es wurde stets mit Handschuhen (Roth®) gearbeitet.

Von zwei aufeinander folgenden Schnitten wurde einer in ein autoklaviertes 1500µl Eppendorf-Gefäß (Roth®) gelegt. Die hierzu verwendeten Pinsel wurden vor Kontakt mit dem Schnitt zunächst in Aqua dest. gespült und getrocknet, dann zweimal in Milli Q-Wasser und schließlich in Nuklease freiem, steril filtriertem, autoklaviertem Wasser (Roth®) gewaschen. Der zweite Schnitt wurde auf einen Objektträger (Thermo Scientific) gegeben. Alle Schnitte wurden möglichst in Serie ohne Verwurf angefertigt, sodass deckungsgleiche Schnitte produziert wurden. Die Objektträger verweilten über Nacht in einem 37°C-Schrank. Bis zur Weiterverarbeitung (siehe unten) innerhalb von zwei bis fünf Monaten wurden die gewonnenen Schnitte bei 8°C gelagert.

### **3.7.3.2 Modifizierte Alcianblaufärbung und Entfärbung mit Guanidin-HCl**

Zur Quantifizierung der verwendeten Moleküle wurde eine Methode entwickelt, die sowohl den Nachweis der Substanzen als auch eine Mengenbestimmung möglich machte.

Zu diesem Zweck wurde eine Färbung mit AB wie oben beschrieben durchgeführt. Nach der 30minütigen Inkubation in der AB-Lösung folgten fünf gründliche Waschschriffe in destilliertem Wasser.

Ein Teil der für die Färbung verwendeten AB-Lösung wurde zur Anfertigung einer Eichkurve mit 0,5M HCl-Lösung zehnfach verdünnt und als Verdünnungsreihe mit 6 M Guanidin-HCl-Lösung (aus Guanidin-Hydrochlorid, Roth) dreifach in einer 96-Well-Platte (Roth) bei 620nm im Plate Reader (anthos htII) gemessen (75µl Lösung pro Well). Jede Eichkurve wurde mit Hilfe einer Trendlinie korrigiert.

Um die Menge an im Schnitt befindlichem AB zu quantifizieren, musste der Farbstoff wieder aus dem Gewebe herausgelöst werden.

In Anlehnung an Greco<sup>98</sup> wurden die Schnitte hierzu mit 300µl 6M Guanidin-HCl-Lösung für 20 Stunden in einer dunklen feuchten Kammer inkubiert.

Pro Schnitt wurden drei Guanidin-HCl-Proben à 75 µl in 96-Well-Platten pipettiert und bei 620nm im Plate Reader gemessen. Anschließend wurde aus den drei Extinktionswerten der Mittelwert berechnet.

Dieses Verfahren wurde für Leber, Milz und Niere jedes Tiers insgesamt fünf Mal in unabhängigen Durchgängen angewendet.

### 3.7.3.3 Berechnung der Alcianblaukonzentration der Proben

Anhand der Formeln der Trendlinien der Eichkurven konnten aus den Extinktionswerten der Proben deren Konzentrationen errechnet werden. Hierzu wurde die Internetseite WolframAlpha<sup>TM99</sup> verwendet.

### 3.7.3.4 Bestimmung der DNA-Konzentration der Paraffinschnitte

Die Entparaffinierung der Proben wurde in Anlehnung an Shi<sup>100</sup> durchgeführt, zur DNA-Extraktion wurde das „Heat Treatment Protocol“ aus „Evaluation of DNA Extraction Methods and Real Time PCR Optimization on Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissues“ von Dedhia<sup>101</sup> in modifizierter Form angewendet, welches, verglichen mit anderen Methoden, die höchste DNA-Ausbeute aus Paraffinschnitten bietet.

Es wurde stets mit sterilen Pipettenspitzen, autoklavierten Eppendorf-Gefäßen und desinfizierten Einmal-Handschuhen (Roth) gearbeitet. Alle verwendeten Lösungen waren steril.

Die Eppendorfgefäße mit den Paraffinschnitten wurden mit 1000µl Roticlear® befüllt, gevortext (Vortexer, Snijders), und fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurde so viel Roticlear® wie möglich abpipettiert, ohne Gewebe zu entfernen. Auf gleiche Weise wurde mit 100%igem und 75%igem Ethanol verfahren. Es folgten zwei siebenminütige Waschschrte mit PBS (Fluka Analytical). Vor jedem Abpipettieren von Lösung wurden die Proben bei 13000rpm für zwei Minuten zentrifugiert (Biofuge fresco von Heraeus), um den Gewebeverlust zu minimieren.

Die Proben wurden bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler bei 300rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf) in der Sterilbank (SterilGARD III Advance° von The Baker Company) getrocknet. Bei Bedarf wurde die Temperatur gegen Ende für bis zu zwei Stunden auf 56°C hochreguliert. Den getrockneten Proben wurden 300µl Digestionspuffer (50mM Tris HCl (pH 8,5), 1mM EDTA, 0,5% Tween) und 6 µl Proteinase K (10mg/ml) zugefügt. Die Proteinase wurde dem Puffer erst direkt vor dem Gebrauch zugegeben. Die Proben inkubierten für zwei Stunden bei 56°C auf dem Schüttler bei 450rpm. Es folgte eine Erhitzungsphase von 95°C für zehn Minuten zur Inaktivierung der Proteinase und schließlich die Zentrifugation bei 13000rpm für fünf Minuten.

250µl des Überstands wurden in ein neues, steriles Eppendorfgefäß überführt und mit 250µl DEPC-behandeltem Wasser (Wasser für die Molekularbiologie, Roth®) verdünnt, gevortext und bis zur Messung bei -20°C eingefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die DNA-enthaltende Lösung in Quarzglasküvetten mit der Schichttiefe 10mm (Assistent) überführt und im Photometer bei 260nm quantifiziert (eppendorf BioPhotometer). Die Küvetten wurden nach jeder Probenmessung dreimal mit Milli Q-Wasser ausgespült und sorgfältig getrocknet. Jede

Probe wurde aufgeteilt und in zwei Küvetten je zweimal gemessen. Als Reinheitsindikator der DNA wurde der Quotient 260nm/280nm bestimmt.

Dieses Verfahren wurde für Schnitte der Leber, Milz und Niere aller Tiere insgesamt fünf Mal in unabhängigen Durchgängen angewendet, sodass die DNA-Konzentration eines 16µm-Schnitts pro Organ 20 Mal bestimmt wurde. Proben, bei denen Gewebeverluste beim Pipettieren entstanden, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Aus den bis zu 20 Messwerten wurde der Mittelwert gebildet.

### 3.7.3.5 Flächenbestimmung der histologischen Schnitte

Aus je zwei Färbedurchläufen pro Organ wurden die Schnitte im Anschluss an die Färbung gewaschen und getrocknet. Die Objektträger wurden mit Millimeterpapier beklebt. Die äußere Begrenzung des Schnitts wurde auf das Millimeterpapier durchgepaust. Die Stiftführung erfolgte dabei entlang den vorgegebenen geraden Linien des Papiers (siehe Abb. 6). Die in der Umrandung liegende Fläche wurde durch Auszählen der Quadratmillimeterkästchen ermittelt und tabellarisch festgehalten. Für jedes Organ wurde aus den zwei ausgezählten Flächen der Mittelwert errechnet.



Abb. 6: Schritte zur Bestimmung der Größe eines Paraffinschnitts: Die Umrisse eines Leberparaffinschnitts (oben) wurden auf Millimeterpapier (Mitte) übertragen und die so gewonnene Fläche eingeteilt in kleinere Rechtecke (unten), um das Auszählen der Quadratmillimeterkästchen zu erleichtern. Schwarz ausgemalte Kästchen entsprechen Aussparungen im Paraffinschnitt und wurden nicht mitgezählt.

### 3.7.3.6 Auswertung der Daten zur Alcianblaukonzentration

Die AB-Konzentration jedes Schnittes wurde auf den Mittelwert der DNA-Konzentration der Schnitte und der Schnittflächengröße des betroffenen Organs bezogen. Die mittlere AB-Konzentration pro DNA-Konzentration, bzw. pro Schnittflächengröße der Organe der unbehandelten Tiere (NaCl-Gruppe) erhielt jeweils den Wert 1. Die Ergebnisse der anderen Behandlungsgruppen wurden auf diesen Wert bezogen.

### **3.7.4 Semiquantitative Konzentrationsmessung von dPGS und dPES in U937-Zellen in vitro**

Zur Untersuchung des Ausschleusungsverhaltens einer leukozytenverwandten Zelllinie wurden drei unabhängige Versuchsreihen mit der humanen hämatopoetischen Zelllinie U937 durchgeführt. Die Versuche fanden bis zur Fixation der Zellen unter sterilen Bedingungen in der Sterilbank statt. Alle verwendeten Materialien und Lösungen waren steril verpackt oder wurden autoklaviert. Es wurde mit desinfizierten Einmalhandschuhen gearbeitet. U937-Zellen, zur Verfügung gestellt von Dr. Jens Dornedde, Institut für Laboratoriumsmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin, wurden standardmäßig kultiviert in RPMI 1640-Medium (Pan Biotech) und zweimal wöchentlich im Verhältnis eins zu zehn geteilt.

#### **3.7.4.1 Vermehrung und Differenzierung der U937-Zellen in Richtung Makrophagen**

Die U937-Zellen wurden auf Deckgläschen (Roth®) in 24-Well-Platten (Zellkulturtestplatte 24 von TPP) ausgesät, pro Well  $5 \times 10^5$  Zellen. Über vier Tage erfolgte ein täglicher Mediumwechsel mit RPMI 1640-Medium (PAN<sup>TM</sup>Biotech), versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 200mM Glutamin, 1% Penicillinase-Streptokinase-Lösung und 0,1% PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) (PAN<sup>TM</sup>Biotech). Die Zellen lagerten im 37°C-Schrank (Incucell; MMM Medcenter).

#### **3.7.4.2 Inkubation mit dPGS und dPES**

Am vierten Tag wurde den Zellen nach Mediumwechsel entweder  $10^{-6}$  M dPGS oder dPES zugegeben. Eine Zellreihe erhielt kein Substrat und diente als Kontrolle. 48 Stunden inkubierten die Zellen mit den Substanzen. Im Pilotversuch, der die Aufnahme der Makromoleküle durch die Zellen bestätigen sollte, wurden die Zellen nach dieser Inkubation gewaschen, fixiert und wie unten beschrieben weiter behandelt. In den späteren drei Versuchen verblieben die Zellen weiterhin in Kultur. Dabei erfolgte ein täglicher Mediumwechsel (siehe oben), um die Wiederaufnahme von potenziell bereits austransportierten Molekülen zu verhindern. Nach 48 Stunden, sechs Tagen und zehn Tagen wurden die Zellen den Wells entnommen und fixiert.

#### **3.7.4.3 Fixierung und Färbung der Zellen**

Zur Fixierung wurden die Deckgläschen in eine neue 24-Well-Platte übertragen, dreimal mit PBS gewaschen und auf Eis 10 Minuten lang mit kaltem 4%igem Paraformaldehyd (PFA) (Roth®) behandelt. Es folgte eine AB-Färbung wie oben beschrieben.

#### **3.7.4.4 Fotografische Aufnahmen der gefärbten Zellen**

Bei 400facher Vergrößerung wurden die gefärbten Zellen mikroskopiert und fotografiert. Für sämtliche Fotos wurden dieselben Kamera- und Programmeinstellungen, wie Farbzunahme, Helligkeit und Belichtungszeit gewählt. Von jedem Deckgläschen wurden sieben Aufnahmen angefertigt, deren Lokalisation nach dem Zufallsprinzip getroffen wurde.

#### **3.7.4.5 Bearbeitung und Auswertung der Bilder**

Die angefertigten Bilder wurden zunächst mit dem Bildbearbeitungsprogramm GIMP2 in 8 bit-Aufnahmen umgewandelt. Mittels des Programms ImageJ wurde der Threshold der Bilder auf den Bereich 195-255 eingestellt, sodass nur die Grauwerte, die der Färbung des AB entsprachen, sichtbar blieben. Die Pixelanzahl dieser Grauwerte wurde dann mit ImageJ berechnet. So konnte die mittlere Anzahl an durch AB hervorgerufenen Pixel in einem Foto für das jeweilige hochsulfatierte Makromolekül und die Kontrollgruppe bestimmt werden.

### **3.8 Statistische Auswertung der erhobenen Daten**

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten wurden mit Hilfe des Statistik-Programms PASW Statistics 18 ausgewertet. Signifikanzen wurden nach dem Student T-Test unter gepaarten und ungepaarten Bedingungen berechnet mit einem Konfidenzintervall von 95%. Hierbei wurde die Signifikanz eines Ergebnisses angenommen bei einem p-Wert von  $p \leq 0,05$  und erhielt in den Grafiken die Kennzeichnung \*. P-Werte mit  $p \leq 0,01$  (\*\*) wurden als sehr signifikant, Werte von  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) als hochsignifikant eingestuft. Die Anzahl der Versuchstiere oder Einzelversuche wurde bezeichnet mit n.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 CIA-Modell der Ratte – Ausprägung der Inflammation

Die Thesen der vorliegenden Arbeit wurden überwiegend anhand des CIA-Modells der Ratte, einem etablierten Tiermodell zur Erforschung der RA, überprüft. In vier unabhängigen Experimenten wurde bei Ratten der Gattung Lewis auf Grundlage dieses Modells eine Arthritis induziert. Dabei zeigte sich, dass nicht alle unbehandelten Ratten Symptome aufwiesen. Während einige Tiere bereits nach kurzer Zeit schwer erkrankten, blieben andere bis zum Ende der Versuche völlig unauffällig. Beispielsweise in V3 manifestierte sich die CIA nur bei einem einzelnen Tier (ein Hinterbein mit Score 3, das andere mit Score 0), die anderen Tiere zeigten keine Symptome (siehe Abb. 7).

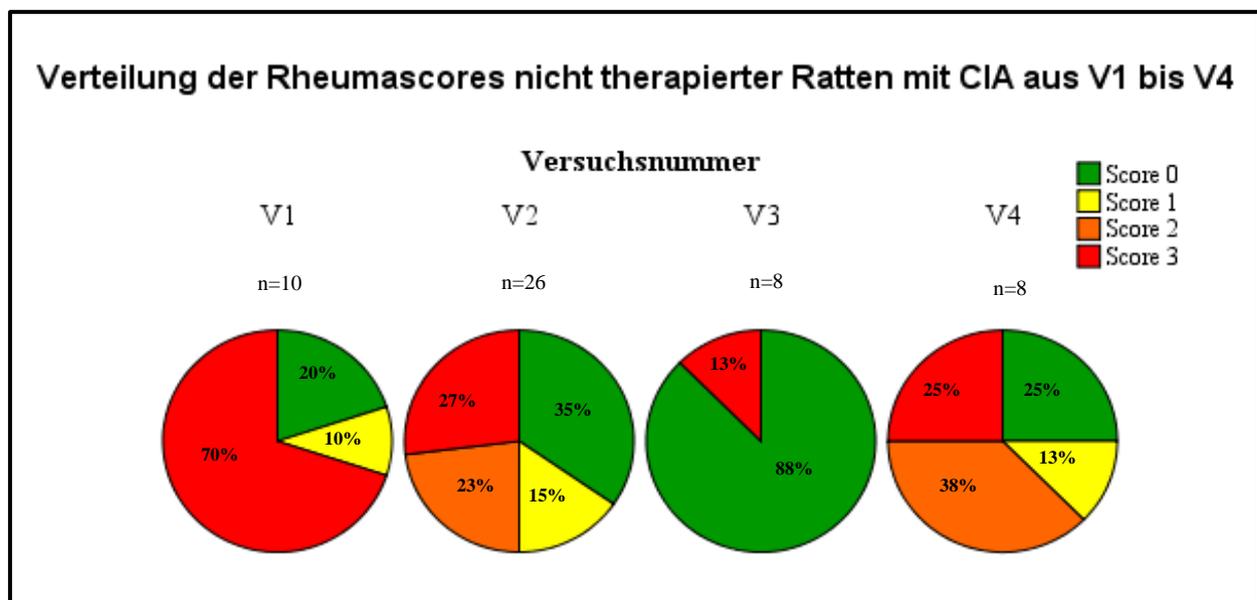


Abb. 7: Variable Ausprägung arthritischer Symptome im CIA-Modell.

Darstellung der Rheumascores von nicht therapierten Ratten mit CIA. Die Rheumascores wurden nach 15 Tagen mittels Beurteilung der klassischen Entzündungszeichen an den hinteren Sprung- und Mittelfußgelenken vergeben. In V3 traten die niedrigsten Scores im Vgl. zu allen anderen Versuchen auf ( $p \leq 0,05$ , Signifikanz nicht eingezeichnet). n: Anzahl der beurteilten hinteren Extremitäten. V1 bis 4: Versuch 1 bis 4.

### 4.2 Nahinfrarotbildgebung mit dPGS-ICG und dPES-ICG als Kontrastmittel

Die NIR-FOI kann mit entsprechenden KM zur Darstellung entzündlicher Prozesse im Körper genutzt werden. DPGS-ICG wurde hierzu im Rahmen von experimentellen Studien bereits erfolgreich angewendet<sup>66,68</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung von dPGS-ICG und dPES-ICG als KM in der NIR-FOI bei Arthritis untersucht und ihre Eigenschaften miteinander verglichen. Als Modell diente das CIA-Modell der Ratte.

#### 4.2.1 Inflammationsdetektion in der Nahinfrarotbildgebung mit dPGS- und dPES-ICG

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die KM inflammationsspezifisch anreichern und wie sie sich in den Organen verteilen, um Informationen zur Pharmakokinetik zu erhalten.

##### 4.2.1.1 Ergebnisse der Fluoreszenzintensitätsmessungen der Sprunggelenke

###### 4.2.1.1.1 Differenzierung zwischen Score 0-Tieren und gesunden Tieren

Im Sinne einer Sensitivitätsprüfung der hochsulfatierten Makromoleküle als KM sollte gezeigt werden, ob ihre Anwendung auch die Detektion minimaler, präklinischer Inflammationsvorgänge ermöglicht. Hierzu wurde die FI nach Injektion von dPGS-ICG in klinisch unauffälligen Gelenken (Score 0) von CIA-Ratten und in Gelenken gesunder Ratten gemessen. Die verwendeten Daten stammen aus Versuch V1 (siehe Tab. 5). Die SG der klinisch symptomlosen CIA-Ratten (Score 0) zeigten zu jedem gemessenen Zeitpunkt stärkere Fluoreszenzsignale als die SG von tatsächlich gesunden Tieren (siehe Abb. 8). Drei Stunden und 24 Stunden nach Injektion von dPGS-ICG lag die FI der SG der CIA-Tiere beim zweifachen der Werte der gesunden Tiere. Dabei stellte sich der Unterschied hochsignifikant dar ( $p \leq 0,001$ ).

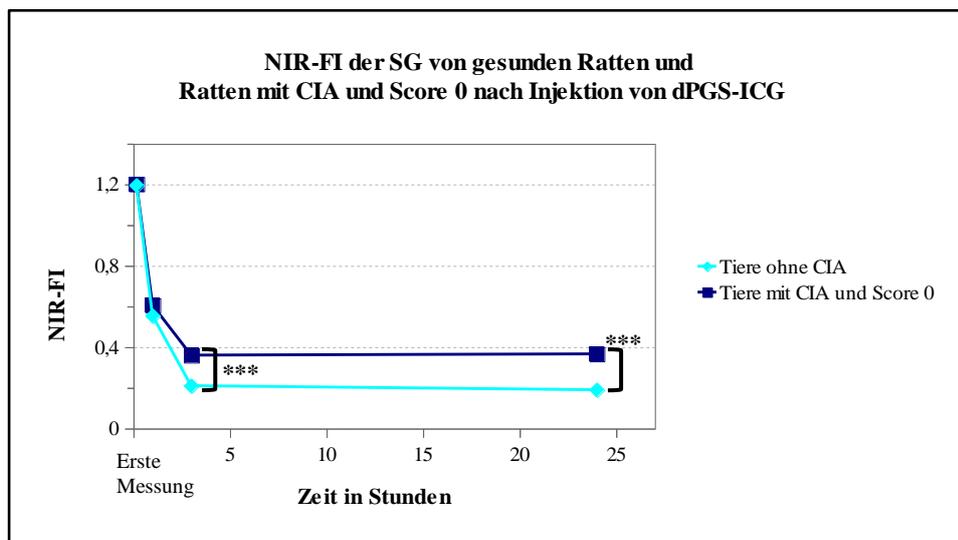


Abb. 8: SG von CIA-Tieren mit Score 0 fluoreszieren nach dPGS-ICG-Gabe stärker als SG gesunder Tiere.

Die NIR-FI von 12 SG mit Score 0 von Ratten mit CIA und 4 SG von Ratten ohne CIA wurden nach i.v. Injektion von 2mg/kg KG dPGS-ICG wiederholt bestimmt. Die NIR-FI der SG mit Score 0 unterschieden sich von denen ohne CIA ab dem Zeitpunkt 3 Stunden hochsignifikant (\*\*\*) =  $p \leq 0,001$ ). Die erste NIR-FI Messung erfolgte kurz nach Injektion des KM.

###### 4.2.1.1.2 Darstellung verschiedener Inflamationsgrade mit dPGS- und dPES-ICG

In den folgenden Experimenten sollte analysiert werden, ob die KM eine Unterscheidung verschiedener Entzündungsgrade per NIR-FOI ermöglichen. Die Untersuchung erfolgte unter der Annahme, dass die Höhe des Rheumascors mit der Intensität der Gelenkinflammation

## Ergebnisse

korreliert. Dafür wurden die Daten aus V2, V3 und V4 verwendet (siehe Tab. 5). Nach KM-Injektion von dPGS-ICG zeigten sich deutliche Unterschiede der FI in Abhängigkeit der Rheumascotes (Abb. 9). So fluoreszierten die SG der Tiere mit einem Score von zwei schon in den ersten zehn Minuten und auch noch 24 Stunden nach KM-Gabe signifikant stärker als SG von Tieren mit Score null ( $p \leq 0,001$ ). Dabei lag die Signalstärke der Score zwei-Gelenke bis zu vier Mal höher als die der Score null – Gelenke (siehe Abb. 10).

Auch die SG der Tiere mit Score eins wiesen ab dreißig Minuten nach KM-Gabe ein signifikant höheres Fluoreszenzsignal (bis zu dreifacher Intensität) auf als diejenigen mit Score null.

Auch mit dem dPES-ICG-Konjugat konnten ab dem Zeitpunkt 30 Minuten hoch signifikante Unterschiede zwischen Score null- und Score zwei-Gelenken nachgewiesen werden ( $p \leq 0,001$ ). Zwischen Gelenken mit Score null und eins bestand nach 24 Stunden ein signifikanter Unterschied bezüglich der FI ( $p \leq 0,05$ ). DPES-ICG ermöglichte eine deutliche Differenzierung zwischen den einzelnen Rheumascotes. Unter Verwendung von dPES-ICG korrelierten die FI weniger eindeutig mit den klinischen Scores (siehe Abb. 10). So wiesen die SG von Tieren mit Score zwei ähnliche FI-Werte auf wie die SG von Tieren mit Score drei.

Es bestanden weder unter Anwendung von dPGS-ICG noch von dPES-ICG als KM signifikante Unterschiede zwischen den FI-Werten der Score eins- und Score zwei-Gelenke.

Die Intensitätsergebnisse bei Score zwei lagen für dPGS-ICG zu allen Zeitpunkten signifikant höher als für dPES-ICG ( $p \leq 0,01$  bis  $p \leq 0,001$ ).

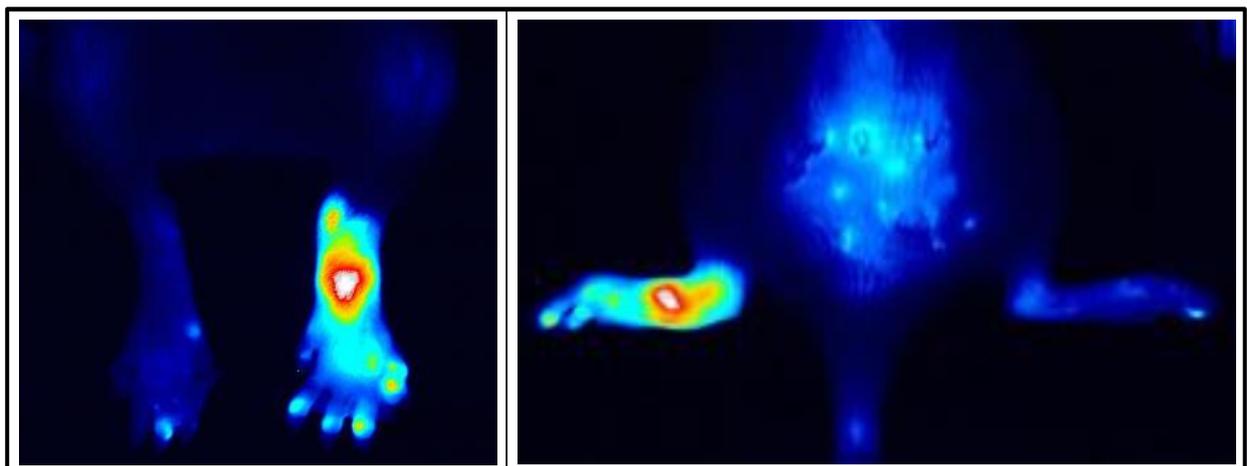


Abb. 9: Hintere Extremitäten einer CIA-Ratte in Rückenlage (li), bzw. Bauchlage (re) nach Injektion von 2mg/kg KG dPGS-ICG. Linkes SG: Score 3, rechtes SG: Score 0.

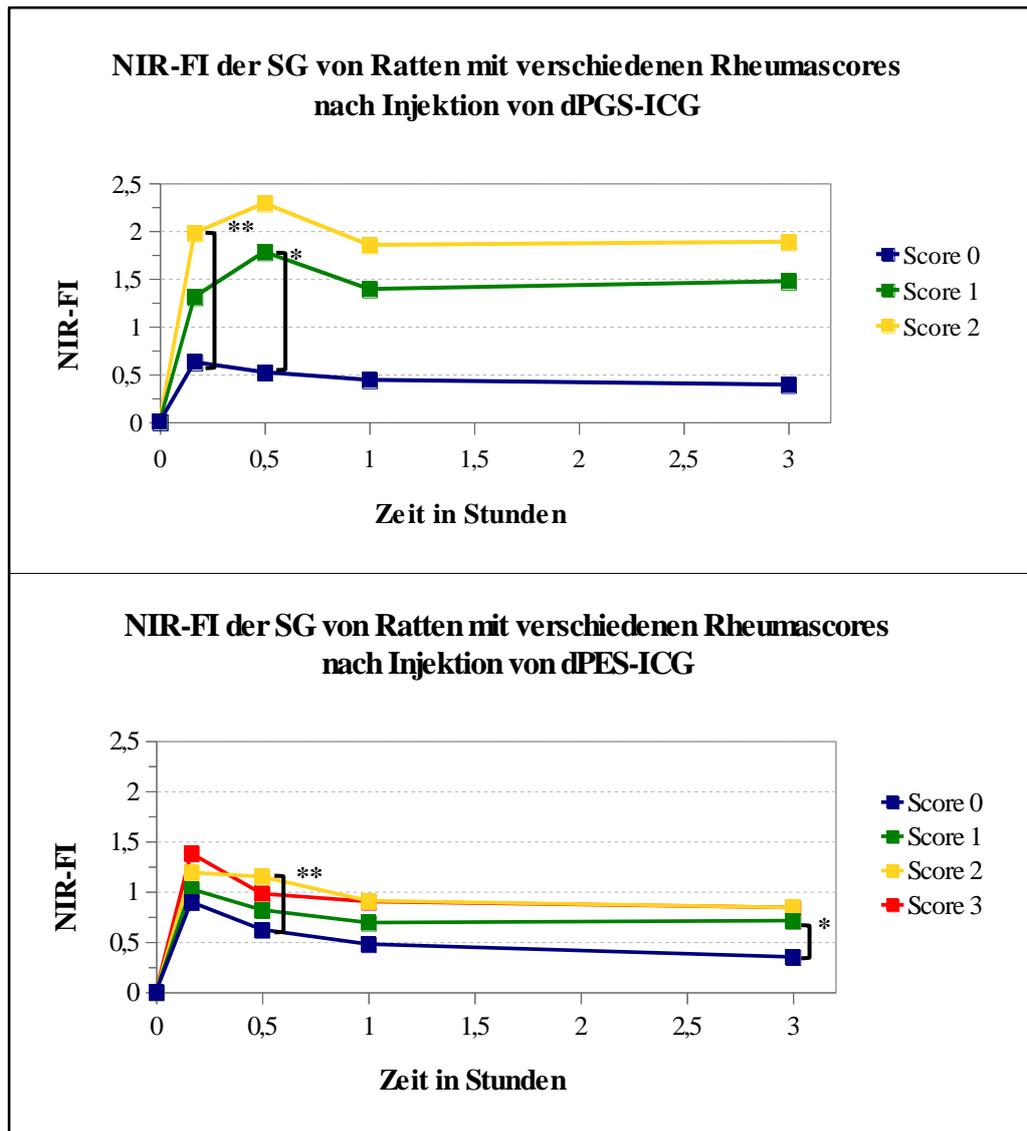


Abb. 10: DPGS- und dPES-ICG ermöglichen die Differenzierung verschiedener Rheumascores in der NIR-FOI.

Die NIR-FI der SG von 7 bzw. 12 Ratten mit CIA wurden vor und nach i.v.-Injektion von dPGS-ICG bzw. dPES-ICG wiederholt bestimmt. Die dargestellten NIR-FI-Werte sind korrigiert durch Subtraktion der durchschnittlichen NIR-FI vor der KM-Injektion und Division durch die durchschnittliche NIR-FI zum Zeitpunkt 10 Minuten. Die NIR-FI der SG mit Score 0 unterscheiden sich von denen mit Score 1 ab dem Zeitpunkt 30 Minuten bzw. 3 Stunden signifikant ( $* = p \leq 0,05$ ) und von denen mit Score 2 ab dem Zeitpunkt 10 bzw. 30 Minuten hochsignifikant ( $*** = p \leq 0,001$ ).

#### 4.2.1.1.3 Die FI von Sprunggelenken mit Rheumascore zwei als Fokus einer mittelschweren autoimmunen Entzündungsreaktion im Vergleich zur FI der Augen

Um die Spezifität der KM zu beurteilen, wurde die Anreicherung in den entzündeten SG mit der in den Augen verglichen. Hierzu wurden die Daten aus V3 und V4 verwendet. Wegen der starken Durchblutung der Augen kann unter der Annahme, dass ein KM in diesem Bereich keine Bindungen eingeht, davon ausgegangen werden, dass die dort gemessene FI die Zirkulation des KM im Blut widerspiegelt<sup>66</sup>. Es wurden die Daten aus Versuch V3 und V4 verwendet (siehe Tab. 5).

## Ergebnisse

Die Maximalwerte der FI wurden in den Augen und den SG mit Score zwei nach zehn Minuten gemessen.

Die NIR-FI der Augen betrug unter dPGS-ICG nach 10 Minuten das 24fache vom Ausgangswert und unter dPES-ICG das Neunfache. Nach dPGS-ICG-Gabe lag sie nach 30 Minuten noch bei 84% der FI zum Zeitpunkt zehn Minuten, nach drei Stunden noch bei 53% und nach 24h noch bei 45%. Die FI nach dPGS-ICG-Injektion halbierte sich folglich nach etwa drei Stunden.

Die FI unter dPES-ICG-Injektion sank deutlich zügiger ab: Nach 30 Minuten betrug sie nur noch etwas mehr als die Hälfte (55%) des maximalen gemessenen Wertes, nach drei Stunden ein Drittel und nach 24 Stunden ein Viertel (siehe Abb. 11).

Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der FI der Augen und der der SG. Da die ermittelte FI allerdings abhängig ist von der Dicke und vom Aufbau der Gewebeschichten über der Fluoreszenzquelle, muss davon ausgegangen werden, dass die FI tiefer gelegener Organe und Strukturen durch das darüber liegende Gewebe nur abgeschwächt darstellbar sind und die unmittelbare FI gar nicht messbar ist. Daher können Absolutwerte der Signalintensitäten verschiedener Organe nicht unmittelbar verglichen werden. Es wurde daher im Folgenden und auch in den anschließenden Kapiteln auf die Darstellung von Signifikanzen verzichtet, wenn in vivo ein Vergleich unterschiedlicher Organe angestellt wurde.

Trotz der genannten Einschränkung konnte festgestellt werden, dass die FI der Score-2-SG nach KM-Applikation deutlich höher lagen als die der Augen. Besonders stark fiel diese FI-Differenz nach dPGS-ICG-Injektion auf. Die FI der SG stieg nach 10 Minuten sogar weiter an, während die der Augen zu diesem Zeitpunkt bereits wieder absank. Es bestand ein Plateau der FI der SG zwischen einer und 24 Stunden nach Injektion von dPGS-ICG.

Auch nach dPES-ICG-Gabe zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der FI der Augen und der Score-zwei-SG, die Divergenz fiel jedoch weniger stark aus als unter Verwendung von dPGS-ICG. Ab dem Zeitpunkt 30 Minuten nahmen die FI-Werte der SG anschließend parallel zu den Werten der Augen ab. Hier entwickelte sich kein Plateau der FI der SG. Nach 24 Stunden lag die Signalintensität noch bei ca. der Hälfte des Zehnminutenwertes (siehe Abb.11).

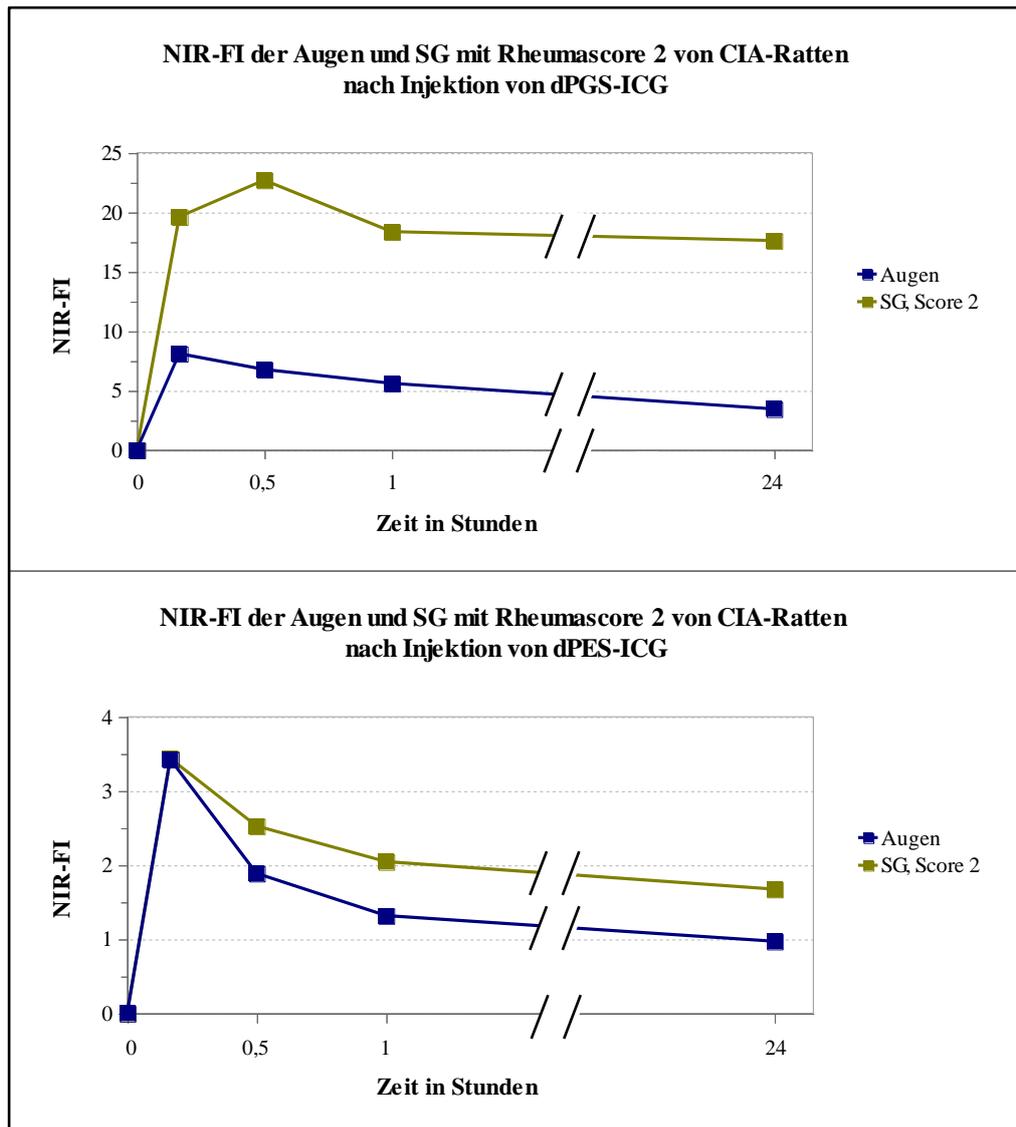


Abb. 11: Nach Injektion von dPGS-ICG oder dPES-ICG fluoreszierten entzündete SG stärker als die Augen.

Die NIR-FI von Score-2-SG von je 2 und der Augen von 7, bzw. 6 Ratten mit CIA wurden vor und nach i.v.-Injektion von 2mg/kg KG dPGS-ICG bzw. 1,4mg/kg KG dPES-ICG wiederholt bestimmt. Die dargestellten Absolutwerte der FI-Messungen nach dPGS- oder dPES-ICG-Injektion können nicht direkt verglichen werden. Ein Vergleich der Kinetiken ist aber möglich.

#### 4.2.1.1.4 Vergleich der FI von Lebern und Sprunggelenke unabhängig vom Rheumascor mit der FI der Augen

Die FI der Leber als wichtiges Stoffwechselorgan sollte untersucht werden. Die Kinetik wurde mit der der Augen und der SG verglichen. Dabei wurden die SG von 14 Tieren unabhängig von deren Rheumascores betrachtet (siehe Tab. 8). Hierzu wurden die Daten aus V3 und V4 verwendet (siehe Tab. 5).

	V3	V4
KM	dPGS-ICG	dPES-ICG
Anzahl SG mit Score 0	10	6
Anzahl SG mit Score 1	2	2
Anzahl SG mit Score 2	2	2
Anzahl SG mit Score 3	0	2

Tab. 8: Verteilung der Rheuma-Scores bei Ratten mit CIA. KM: Kontrastmittel. SG: Sprunggelenk. V3, V4: Versuch 3 bzw. 4.

Die FI der Lebern stellte sich sowohl für das KM dPGS-ICG als auch für dPES-ICG geringer dar als die FI der Augen (siehe Abb. 12). Das Intensitätsmaximum der Leberfluoreszenz nach KM-Gabe lag bei dreißig Minuten. Drei Stunden nach dPGS-ICG-Gabe betrug die Signalintensität noch 80 Prozent des Maximums und nach 24 Stunden noch rund 70 Prozent. Damit lag sie einen Tag nach Injektion noch beim Fünffachen der Lebereigenfluoreszenz (nicht gezeigt).

Drei Stunden nach dPES-Injektion lag die FI noch bei 76 Prozent des Maximalwerts und sank nach 24 Stunden ebenfalls auf 70 Prozent. Die FI nach 24 Stunden entsprach etwa dem Vierfachen der Lebereigenfluoreszenz (nicht gezeigt). Im zeitlichen Verlauf glichen sich die FI der Lebern und der Augen an.

Trotz der vielen Score-0-SG in der dPGS-ICG-Gruppe (siehe Tab. 8) lag die FI der SG nach Injektion von dPGS-ICG höher als die der Augen. Innerhalb der ersten Stunde reduzierte sich die FI um 22 Prozent (bezogen auf die gemessene Maximal-FI zum Zeitpunkt 10 Minuten) und blieb anschließend bis 24 Stunden nach der KM-Applikation nahezu konstant.

Die Signalintensität der SG war nach dPES-ICG-Gabe zunächst niedriger als die der Augen und erreichte nach einer Stunde sehr ähnliche Werte wie Letzere. Sie sank am stärksten zwischen 10 und 30 Minuten post injectionem und halbierte sich bereits nach etwa drei Stunden. Innerhalb der anschließenden 21 Stunden reduzierte sie sich noch einmal um 20 Prozent.

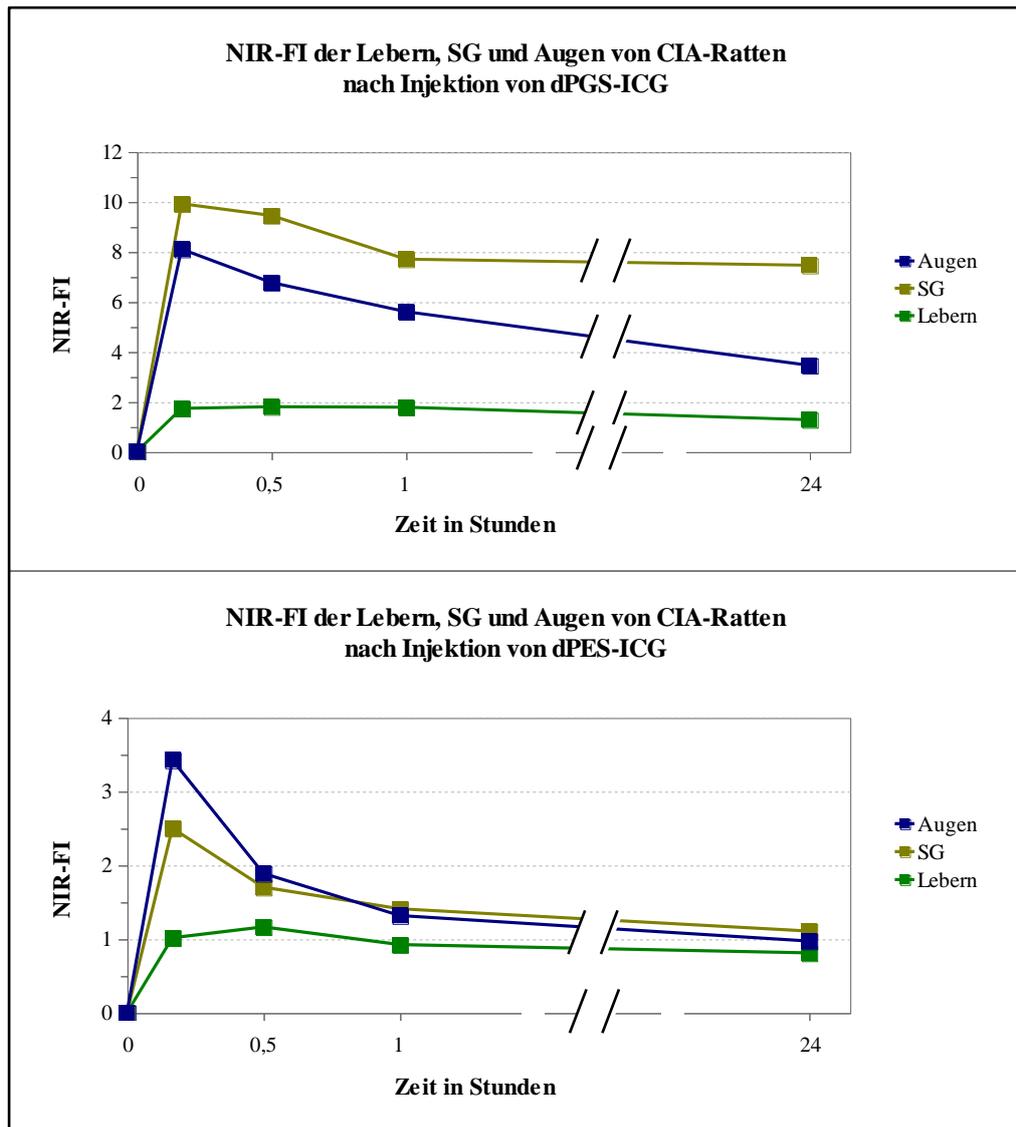


Abb. 12: Die FI der Lebern bleibt nach dPGS- oder dPES-ICG-Injektion über 24 Stunden nahezu konstant.

Die NIR-FI der Lebern, Augen und SG von 7, bzw. 6 Ratten mit CIA wurden vor und nach i.v. Injektion von 2mg/kg KG dPGS-ICG bzw. 1,4mg/kg KG dPES-ICG wiederholt bestimmt. Die dargestellten Absolutwerte der FI-Messungen nach dPGS- oder dPES-ICG-Injektion können nicht direkt verglichen werden. Ein Vergleich der Kinetiken ist aber möglich

#### 4.2.2 NIR-FOI innerer Organe ex vivo unter Verwendung von dPGS- und dPES-ICG als Kontrastmittel

Nach Beendigung des in vivo Imagings wurden die inneren Organe der Tiere entnommen und mittels NIR-FOI untersucht (siehe Abb. 13). Die Darstellung der Signalintensitäten der Organe sollte Aufschluss über die Verteilung der KM im Körper geben und Hinweise auf pharmakokinetische Aspekte liefern.

Im Folgenden sind die FI der Leber als Hauptorgan der Biotransformation, der Niere als Ausscheidungsorgan, der Milz als lymphatisches und damit für Inflammationen relevantes Organ, der Regionallymphknoten der Fußgelenke als spezifische lymphatische Organe und des

## Ergebnisse

Herzens, welches die niedrigste FI aufwies, dargestellt (siehe Abb. 14). Ebenfalls sehr geringe Signalstärken wiesen Lunge, Magen und Darm auf. Das mit Abstand stärkste Signal wurde in der Leber detektiert, es unterschied sich signifikant ( $p \leq 0,01$ ) von allen anderen Organen. Nach dPGS-ICG-Gabe betrug die mittlere FI der Nieren und Milzen je ca. 40 Prozent der Leber-FI. Nach dPES-ICG-Gabe lag die mittlere FI der Nieren bei ca. 20 Prozent der Leber-FI, die Milzen wiesen im Mittel 60 Prozent der Leber-FI auf. Damit zeigte sich auch, dass die beiden KM sich insbesondere hinsichtlich der Akkumulation in Milz und Niere unterschieden: Während die Werte der beiden Organe unter dPGS-ICG nahezu gleich waren, besaß die Milz nach dPES-ICG-Gabe eine 2,5fach höhere FI als die Niere ( $p \leq 0,001$ ).

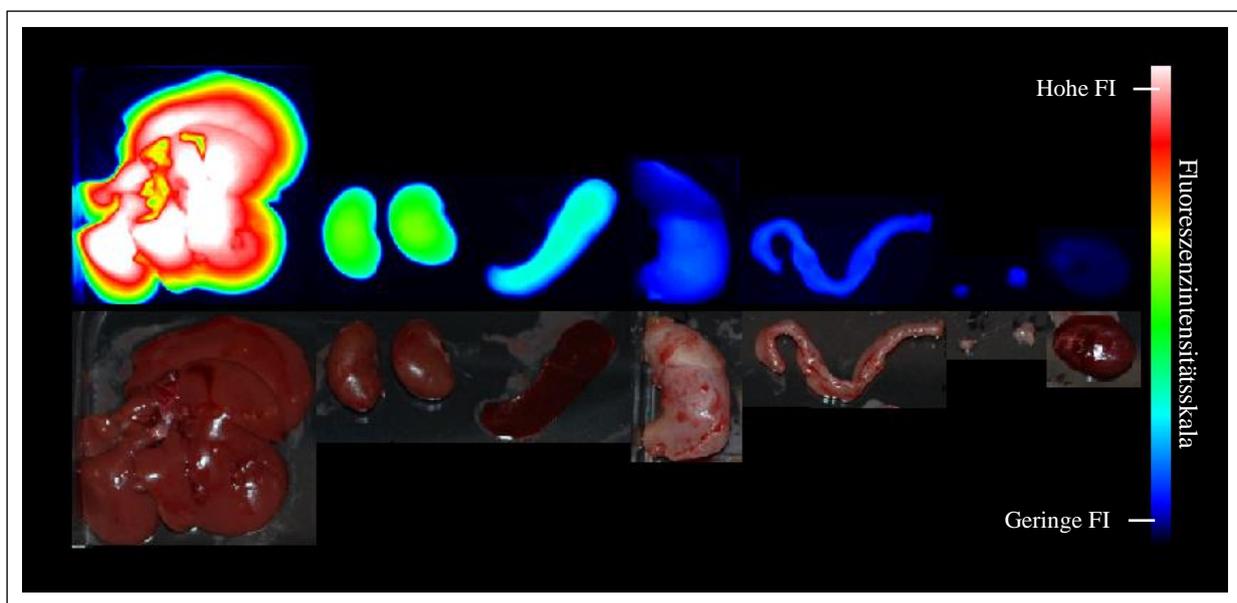


Abb. 13: **Innere Organe einer Ratte ex vivo 25 Stunden nach Injektion von dPGS-ICG.** Von links nach rechts: Leber, Nieren, Milz, Magen, Dünndarm, Lymphknoten, Herz. Obere Reihe: Fluoreszenzaufnahmen im Rheumascan, untere Reihe: Aufnahmen mit Lichtbildkamera. Balken rechts zeigt die Bandbreite der Fluoreszenzintensitäten (FI).

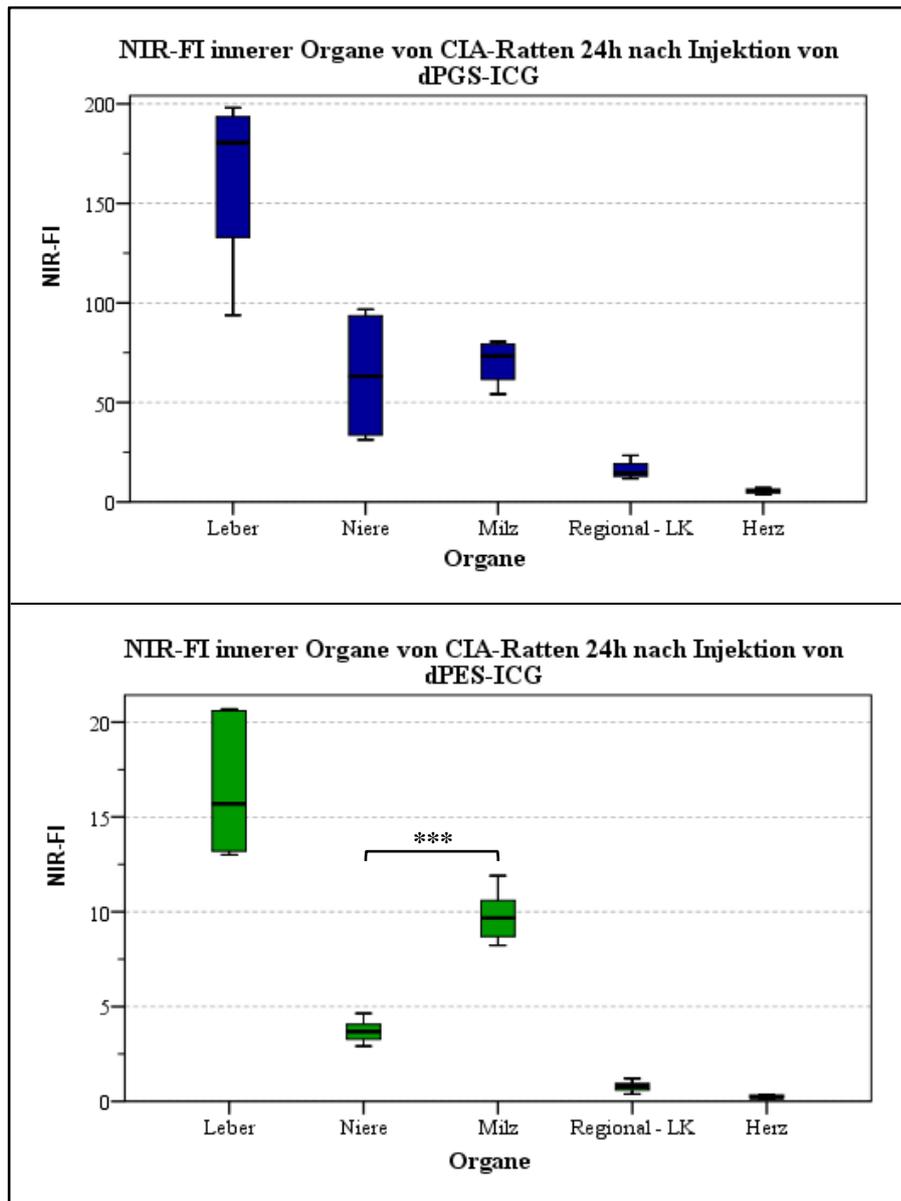


Abb. 14: Leber, Niere und Milz wiesen nach Injektion von dPGS- oder dPES-ICG ex vivo eine hohe NIR-FI auf.

24 Stunden nach i.v. Injektion von 2mg/kg KG dPGS-ICG bzw. 1,4mg/kg KG dPES-ICG wurden 5 bzw. 6 Ratten mit CIA euthanasiert und ihre Organe zur NIR-FI-Bestimmung entnommen. Die NIR-FI-Werte der dPGS- und dPES-ICG-Tiere können nicht direkt verglichen werden. Ein Vergleich des Verhältnisses der FI zwischen den Organen ist aber möglich. \*\*\* =  $p \leq 0,001$ . LK: Lymphknoten

### 4.3 Effekte der therapeutischen Anwendung von dPGS und dPES

Um Informationen zur Eignung von dPGS und dPES in der Therapie der RA zu erhalten, wurden Ratten mit CIA über mehrere Tage mit den hochsulfatierten Makromolekülen behandelt und hinsichtlich der Rheumascorcs und dem Entzündungsniveau der Synovialflüssigkeiten mit kranken, nicht therapierten sowie gesunden Tieren verglichen. Dabei wurden V1 und V4 gegenübergestellt. In V1 wurde die Therapie bereits mit der ersten Injektion des CIA-Triggers Kollagen begonnen, die applizierte Kollagenmenge betrug 0,5 mg/kg KG. V1 diente somit als

Modell für eine präventive Therapie bei mäßigem Entzündungstrigger. In V4 startete die Therapie erst am Tag der Kollagen-Boosterung, d.h. sieben Tage nach der ersten Kollageninjektion, wobei jeweils die doppelte Menge Kollagen im Vergleich zu V1 verabreicht wurde (1 mg/kg KG) (siehe Tab. 5). Daher konnte V4 als Modell für eine Therapie bei bereits bestehender Inflammation mit starkem Entzündungstrigger verwendet werden.

Des Weiteren wurden Untersuchungen an den Organen der Tiere durchgeführt, um Hinweise auf das pharmakokinetische Verhalten der Stoffe zu erlangen.

#### 4.3.1 Entwicklung des Körpergewichts der Ratten im Verlauf der Therapie

Als Parameter für die Verträglichkeit der therapeutisch angewendeten Substanzen wurde in V4 das Körpergewicht der Ratten vor Versuchsbeginn, d.h. vor der ersten Kollageninjektion und täglich während der Therapie mit dPGS und dPES gemessen. Es zeigte sich, dass das Gewicht im Verlauf des Experiments zunahm (siehe Abb. 15). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Therapiegruppen festgestellt. Das Gewicht der Tiere aus der dPGS- und dPES-Gruppe nahm von Tag eins (vor Versuchsbeginn) bis Tag 16 hochsignifikant zu (um durchschnittlich 30g, bzw. 27g) ( $p \leq 0,001$ ), das der Tiere aus der NaCl-Gruppe sehr signifikant (um durchschnittlich 26g) ( $p \leq 0,01$ ).

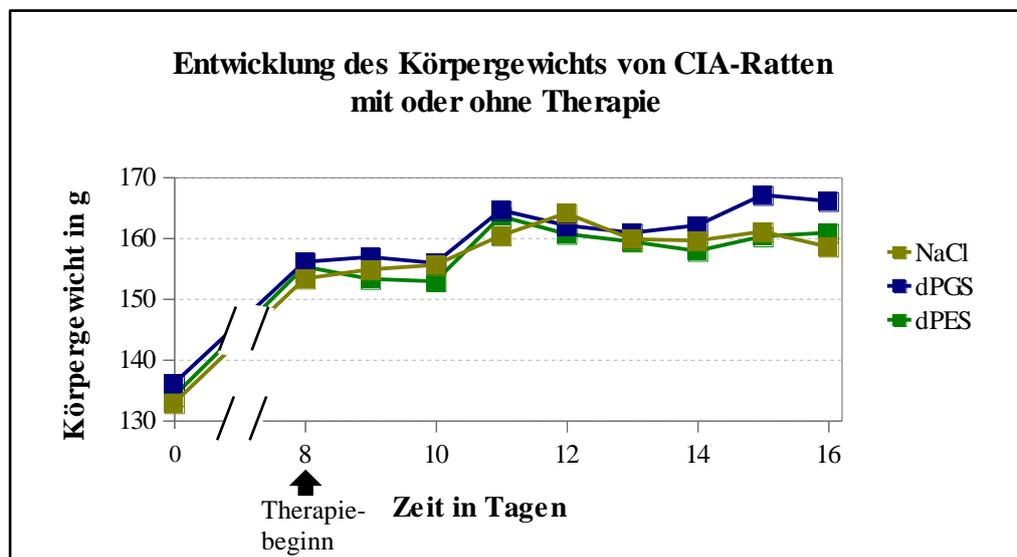


Abb. 15: Das Körpergewicht der Ratten mit CIA nahm im Verlauf des Versuchs zu.

Das Körpergewicht von Ratten mit CIA wurde unter Therapie mit dPGS, dPES oder NaCl (je 30mg/kg KG/Tag) täglich gemessen. NaCl: 4 Tiere, dPGS: 5 Tiere, dPES: 5 Tiere. Injektion von 1mg Kollagen am 1. und 8. Tag. Die erste Gewichtsmessung (Tag 0) erfolgte vor der Kollageninjektion. Therapiebeginn an Tag 8. An Tag 1 waren die Tiere 8 Wochen alt.

### 4.3.2 Vergleich der Rheumascores von behandelten und unbehandelten CIA-Ratten

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, herauszufinden, ob sich die Gabe von dPGS und dPES positiv auf das klinische Bild der CIA auswirkt. Die Versuche V1 und V4 wurden verglichen (siehe Tab. 5). Die Therapie der Tiere in V1 startete mit der ersten Kollageninjektion, dieser Versuch diente als Modell für eine präventive Therapie. In V4 wurden die Tiere erst von der Kollagenboosterung an behandelt, d.h. nach Einsetzen der inflammatorischen Vorgänge. Die Rheumascores lagen in V4 niedriger als in V1 außer in der dPES-Gruppe, die Unterschiede blieben jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus. Während die unbehandelten Tiere mit CIA in V1 im Durchschnitt einen Score von 2,2 aufwiesen, betrug er in derselben Gruppe in V4 1,6. Die Scores der dPGS-Gruppen unterschieden sich nur geringfügig (0,75 vs. 0,6). Die dPES-Tiere in V4 hatten im Mittel einen Score von 0,1, während keines der dPES-Tiere in V1 Entzündungszeichen aufwies (siehe Abb. 16).

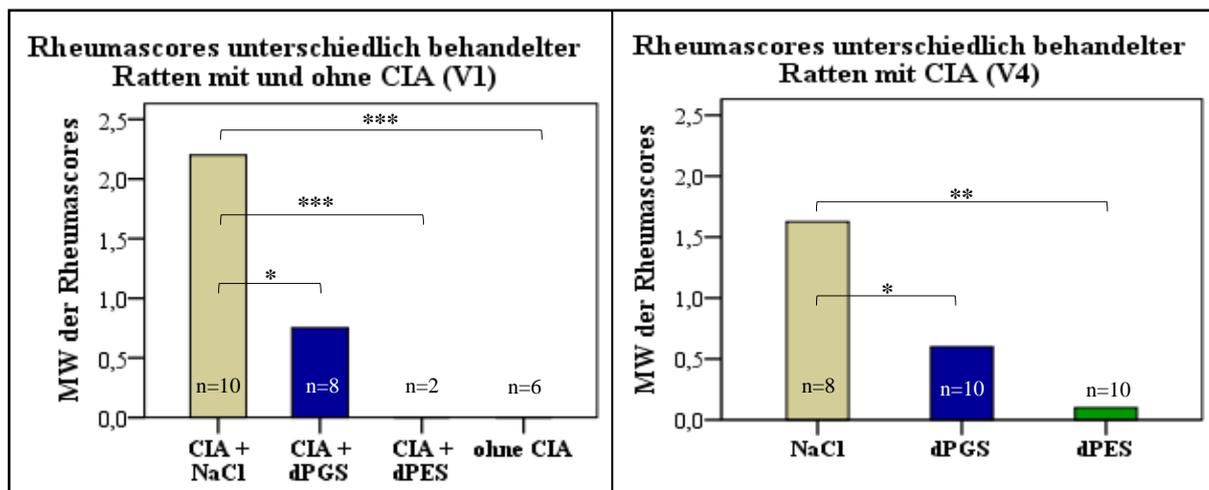


Abb. 16: Die Rheumascores der behandelten Tiere waren signifikant geringer als die der unbehandelten.

Ratten mit CIA wurden entweder ab der ersten Kollageninjektion für 15 Tage (V1) oder ab der Kollagenboosterung für 8 Tage (V4) mit 30mg/kg KG/Tag NaCl, dPGS oder dPES behandelt. Kollageninjektionen bei V1 mit 0,5mg/kg KG Kollagen II, bei V4 mit 1mg/kg KG. Die Rheumascores wurden nach 15 Tagen anhand klassischer Entzündungszeichen an den hinteren Sprung- und Mittelfußgelenken erhoben. \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$ . n: Anzahl der beurteilten Hinterbeine. V1 und 4: Versuch 1 und 4.

In V1 lagen die Scores der dPES-Gruppe und der gesunden Gruppe jeweils bei null mit einem hoch signifikanten Unterschied im Vergleich zur unbehandelten CIA-Gruppe. Die Scores der dPGS-Gruppe waren signifikant geringer als die der unbehandelten Gruppe. Auch in V4 lagen die Scores der therapierten Tiere signifikant unter denen der nicht behandelten Tiere (siehe Abb. 16).

#### **4.3.3 Leukozytenzahlen in Synovialflüssigkeitsausstrichen von CIA-Ratten nach dPGS- oder dPES-Behandlung im Vergleich mit nicht therapierten und gesunden Ratten**

In Ergänzung zu den klinischen Rheumacores sollte ein Zusammenhang zwischen Therapie und Grad der Entzündung über eine objektive Methode ermittelt werden. Dazu wurde die Synovialflüssigkeit aus den SG der Ratten untersucht und die Anzahl an Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und Monozyten bestimmt. Erythrozyten dienten als Marker von Blut im Gelenk, welches bei der Probenentnahme möglicherweise hatte eintreten und damit zur Beeinflussung der Ergebnisse durch unspezifisch und artifiziell angereicherte Leukozyten hätte führen können. Wieder diente V1 als Model der präventiven Behandlung und V4 als Model für einen Therapiebeginn *nach* Einsetzen der inflammatorischen Vorgänge (siehe Tab. 5).

Die mittlere Menge an Erythrozyten in den Ausstrichen variierte zwischen zwei (dPGS-Tiere aus V1) und 82 (dPES-Tiere aus V4) pro Zählgitter. Die Verteilung von Erythrozyten auf Leukozyten im Blut von Ratten entspricht wie beim Menschen einem Verhältnis von 1000:1<sup>102</sup>, sodass die Aussagekraft der Ergebnisse durch die Einblutung als vernachlässigbar gering betrachtet werden kann.

In den unbehandelten Gruppen mit CIA konnten in den Ausstrichen von V4 signifikant mehr Leukozyten nachgewiesen werden als bei V1 ( $p \leq 0,05$ ). Die Gesamtzellzahl der mit dPGS behandelten Tiere unterschied sich zwischen V1 und V4 nicht (im Mittel je sechs Zellen pro Spalte).

Innerhalb des Versuchs V1 ließen sich hochsignifikante Unterschiede zwischen der nicht behandelten kranken Tiergruppe und den beiden anderen Gruppen feststellen (siehe Abb. 17); die unbehandelte Gruppe enthielt mit durchschnittlich 29 Zellen pro Spalte deutlich mehr Zellen als die mit dPGS behandelte (sechs Zellen) und die gesunde Gruppe (keine Zellen). Die Ausstriche der dPGS-Gruppe und der gesunden Gruppe unterschieden sich nicht signifikant.

Auch in V4 enthielten die Ausstriche der dPGS- und auch der dPES-Gruppe hochsignifikant weniger Entzündungszellen als die der nicht behandelten Gruppe. Im Mittel betrug die Anzahl an Zellen in der NaCl-Gruppe 52 je Spalte. Bei den dPES-Tieren wurden durchschnittlich acht Zellen gezählt, in der dPGS-Gruppe sechs Zellen.

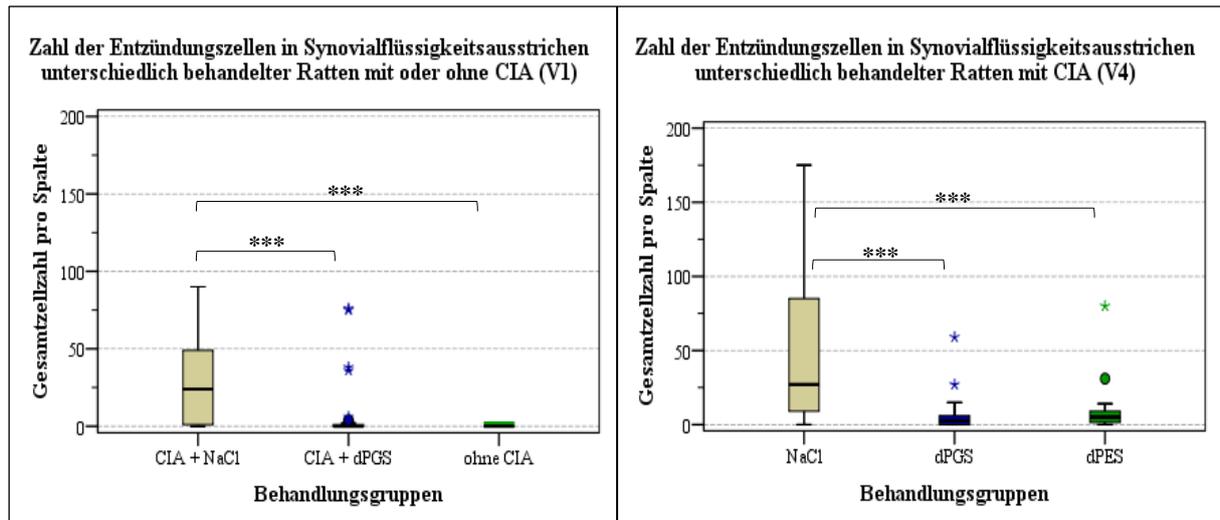


Abb. 17: In den Synovialflüssigkeitsausstrichen der behandelten Tiere ist die Gesamtzellzahl signifikant niedriger als bei den unbehandelten Tieren.

Ratten mit CIA wurden entweder ab der ersten Kollageninjektion für 15 Tage (V1) oder ab der Kollagenboosterung für 8 Tage (V4) mit 30mg/kg KG/Tag NaCl, dPGS oder dPES behandelt. Kollagenboosterung bei V1 mit 0,5mg/kg KG Kollagen II, bei V4 mit 1mg/kg KG. Die Entzündungszellen in Synovialflüssigkeitsausstrichen wurden nach Abschluss der Behandlung gezählt. V1: NaCl: 5 Tiere, dPGS: 4 Tiere, Kontrollgruppe ohne CIA: 3 Tiere. V4: NaCl: 4 Tiere, dPGS: 4 Tiere, dPES: 4 Tiere. \*\*\* =  $p \leq 0,001$ . Kreise: Ausreißer. Sonstige Sternchen: extreme Werte. Ein Ausreißer mit 298 Zellen im Zählgitter in der NaCl-Gruppe aus V4 ist nicht dargestellt. V1 und 4: Versuch 1 und 4.

Im Detail ließ sich feststellen, dass bei den Tieren der dPGS- und der gesunden Kontrollgruppe aus V1 hoch signifikant weniger Lymphozyten und neutrophile Granulozyten in den Ausstrichen nachweisbar waren als bei denen der unbehandelten Gruppe. Die Zahl der Eosinophilen ging in allen drei Therapiegruppen im Mittel gegen null. Zwischen der dPGS- und der gesunden Gruppe ergaben sich für alle Zellpopulation annähernd gleiche Ergebnisse (siehe Abb. 18).

In V4 war die Anzahl sämtlicher Zellpopulationen in der mit dPGS behandelten Gruppe deutlich niedriger als in der unbehandelten Gruppe ( $p \leq 0,001$ ). Auch die Zahl der Eosinophilen und Neutrophilen der dPES-Gruppe lagen stark unter denen der NaCl-Gruppe ( $p \leq 0,001$ ). Es wurden signifikant weniger Lymphozyten in der dPGS-Gruppe gezählt als in der dPES-Gruppe.

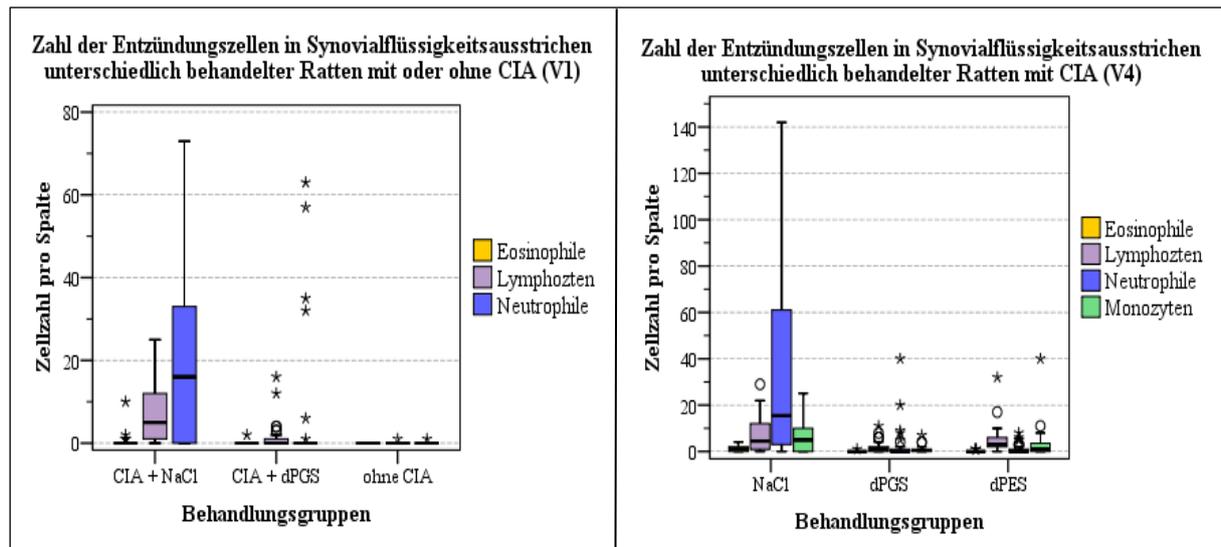


Abb. 18: **Weniger Eosinophile, Lymphozyten, Neutrophile und Monozyten in Synovialflüssigkeitsausstrichen der behandelten Tiere.**

V1 (Versuch 1): Therapie ab der ersten Kollageninjektion (0,5mg/kg KG Kollagen II) für insgesamt 15 Tage. V4 (Versuch 4): Therapie ab der Kollagenboosterung (1mg/kg KG Kollagen II) für insgesamt 8 Tage. Therapie in V1 und V4 mit 30mg/kg KG/Tag NaCl, dPGS oder dPES. Die Entzündungszellen in Synovialflüssigkeitsausstrichen wurden nach Abschluss der Behandlung gezählt. V1: NaCl: 5 Tiere, dPGS: 4 Tiere, Kontrollgruppe ohne CIA: 3 Tiere. V4: NaCl: 4 Tiere, dPGS: 4 Tiere, dPES: 4 Tiere. Ein erhöhter Einzelwert mit 241 Neutrophilen in der NaCl-Gruppe aus V4 und Signifikanzen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Kreise: erhöhte Einzelwerte. Sternchen: extreme Einzelwerte.

#### 4.3.4 Histologischer Nachweis der Akkumulation von dPGS und dPES in Organen von Ratten

Die folgenden Ergebnisse beruhen auf histologischen Gewebe- und Zellfärbungen mit Alcianblau, welches zur Darstellung von dPGS, dPES und Heparin diente. Verwendet wurden V1 und V3 (siehe Tab. 5).

##### 4.3.4.1 Qualitativer Nachweis und detaillierte Betrachtung der Verteilung der Moleküle nach 15-tägiger Behandlung

Um Informationen über die Pharmakokinetik der therapeutisch verwendeten Makromoleküle zu erhalten, wurden Paraffinschnitte von Dünndarm, Niere, Milz, Lunge, Leber und Regionallymphknoten der SG mit AB gefärbt. Hierbei handelt es sich um einen kationischen Farbstoff, der bevorzugt an elektronegative Sulfatgruppen bindet. Eine zuvor durchgeführte Inkubation mit Hyaluronidase verringerte durch enzymatischen Verdau anderer polysulfatierter Moleküle eine ungewollte Anfärbung dieser Strukturen. Verwendet wurde V1. Von den untersuchten Organen ergaben sich vor allem für Darm, Niere, Milz und Leber klare Unterschiede zwischen den einzelnen Therapiegruppen. Es zeigte sich eine deutliche Anreicherung des dPGS in bestimmten Strukturen, welche in den nicht behandelten Gruppen

## Ergebnisse

fehlte oder deutlich schwächer ausgeprägt war. Die Präparate der dPES-Gruppe waren schwächer angefärbt als die der dPGS-Gruppe. Lunge und Lymphknoten zeigten in allen Therapiegruppen eine ähnliche Verteilung der Färbung.

### 4.3.4.1.1 Alcianblaufärbung in histologischen Schnitten des Dünndarms

Zunächst wurde die Anreicherung der Makromoleküle im Dünndarm, dem über die Gallenflüssigkeit zahlreiche im Körper zirkulierende Stoffe zur Ausscheidung und Reabsorption zugeführt werden, untersucht. Es ließen sich einige Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen. Während sich in den unbehandelten Gruppen lediglich einige Areale des apikalen Rands des Bürstensaums (siehe Abb. 20) und Fasern der Submukosa schwach blau darstellten, waren in der mit dPGS behandelten Gruppe neben diesen Bereichen ebenfalls zahlreiche einzelne Zellen in der Lamina propria, der Submukosa und in der Übergangszone zwischen Ring- und Längsmuskulatur der Muskularis deutlich blau gefärbt, meist in enger Relation zu Blutgefäßen (Abb. 19). Diese Färbungen fehlten in den Schnitten der mit dPES behandelten Tiere fast vollständig. Das Gewebe glich eher dem der unbehandelten Tiere. In den Lymphknoten des im Darm befindlichen MALT (Mucosa Associated Lymphatic Tissue) ließ sich keine Anfärbung nachweisen (siehe Abb. 21).

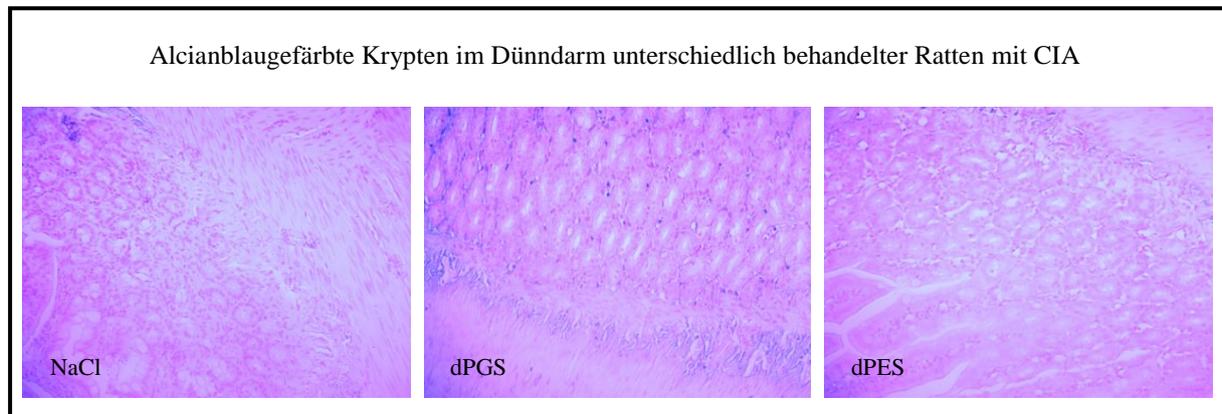


Abb. 19: Aufnahmen des Dünndarms im Bereich der Krypten, Submukosa und Muskularis. AB/Kernechtrot-gefärbte Paraffingewebeschnitte von Ratten mit CIA. Behandlung mit 30mg/kg KG/Tag NaCl, dPGS oder dPES für 15 Tage. Vergrößerung 400fach.

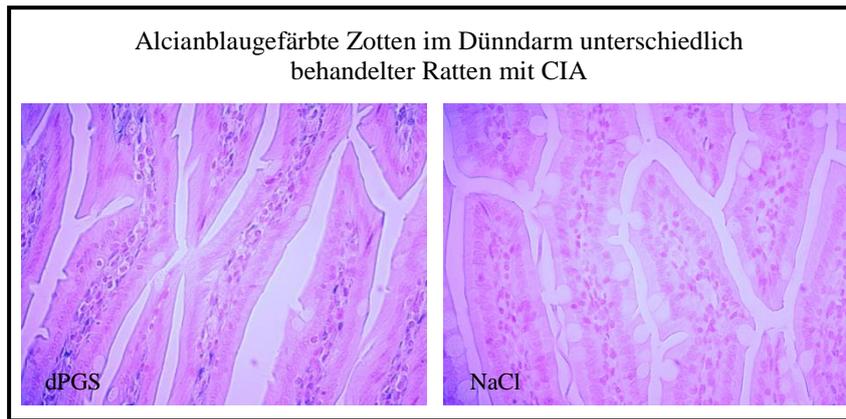


Abb. 20: Aufnahmen des Dünndarms im Bereich der Zotten. AB/Kernechtrot-gefärbte Paraffingewebeschnitte von Ratten mit CIA. Behandlung mit 30mg/kg KG/Tag NaCl oder dPGS für 15 Tage. Vergrößerung 400fach.

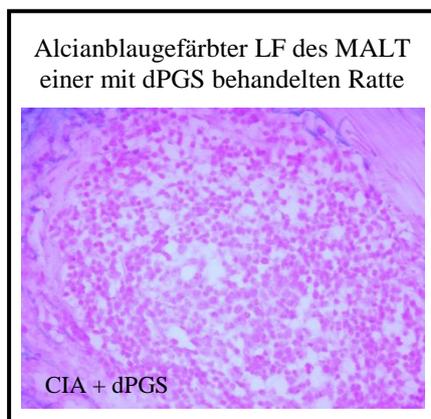


Abb. 21: Lymphfollikel (LF) aus dem Dünndarmgewebe. AB/Kernechtrot-gefärbter Paraffingewebeschnitt einer Ratte mit CIA, behandelt mit 30mg/kg KG/Tag dPGS für 15 Tage. Vergrößerung 400fach.

#### 4.3.4.1.2 Alcianblaufärbung histologischer Nierenschnitte

Die Niere, der als Ausscheidungsorgan besondere Bedeutung in der Pharmakokinetik zukommt, wurde ebenfalls nach der Färbung von histologischen Schnitten mit AB untersucht. Hier bestand vor allem in der Nierenrindenregion der dPGS-Gruppe eine starke Anreicherung des ABs im Zytoplasma der Zellen der proximalen Tubuli (siehe Abb. 22). Die parietalen Blätter der Bowman-Kapsel ebenso wie die Basallaminae der Tubuli und Endothelien wiesen in allen Gruppen eine schwache Färbung auf, am deutlichsten erschien diese bei der dPGS-Gruppe. Die Präparate der dPES-Gruppe waren wie die Schnitte in der Kontrollgruppe nur sehr schwach angefärbt.

Auch im Markbereich fand sich die schwache Blaufärbung der Basallaminae der Tubuli und der Endothelien wieder, einzelne kleine Zellkerne, möglicherweise zu Makrophagen gehörend, waren tief blau gefärbt. Im inneren Mark und Teilen des äußeren Marks zeigten sich in der dPGS-Gruppe viele blaugefärbte Tubuli, die auf Grund der Lokalisation am ehesten den Intermediärtubuli zuzuordnen waren. Auch in allen anderen Gruppen konnte in diesen Zonen

eine Färbung nachgewiesen werden, die aber zu schwach war, um genauere Einschätzungen zu den tatsächlich gefärbten Strukturen zuzulassen.

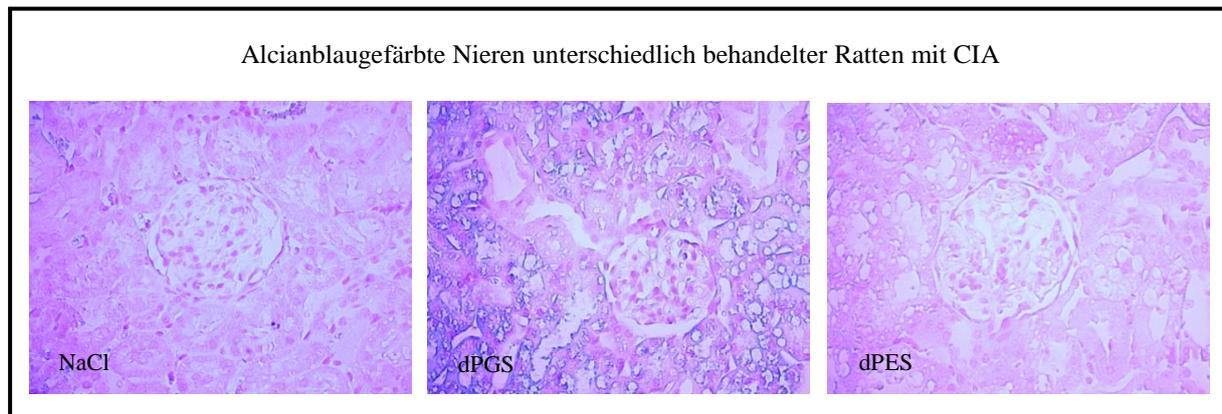


Abb. 22: Aufnahmen aus der Nierenrinde. AB/Kernechtrot-gefärbte Paraffingewebeschnitte von Ratten mit CIA. Behandlung mit 30mg/kg KG/Tag NaCl, dPGS oder dPES für 15 Tage. Vergrößerung 400fach.

#### 4.3.4.1.3 Alcianblaufärbung histologischer Milzschnitte

Als lymphatisches Organ wurde auch die Milz detailliert betrachtet. Hierbei zeigten sich nur in den behandelten Gruppen durch AB gefärbte Areale. Die weiße Pulpa blieb dabei nahezu vollständig ausgespart, auch das Endothel der Zentralarterien wies keine Färbung auf. Das Endothel der kleinen Blutgefäße in der roten Pulpa hingegen war in der dPGS- und dPES-Gruppe größtenteils deutlich blau gefärbt (siehe Abb. 23). Durch die der Schnittdicke geschuldeten Überlagerung von Zytoplasma und Zellkern ließ sich nicht feststellen, ob auch Zellkerne durch das AB angefärbt waren, der Farbstoff ließ sich aber eindeutig im Zytoplasma einiger Zellen der roten Pulpa lokalisieren. Bei diesen handelte es sich um größere Zellen, eventuell Makrophagen.

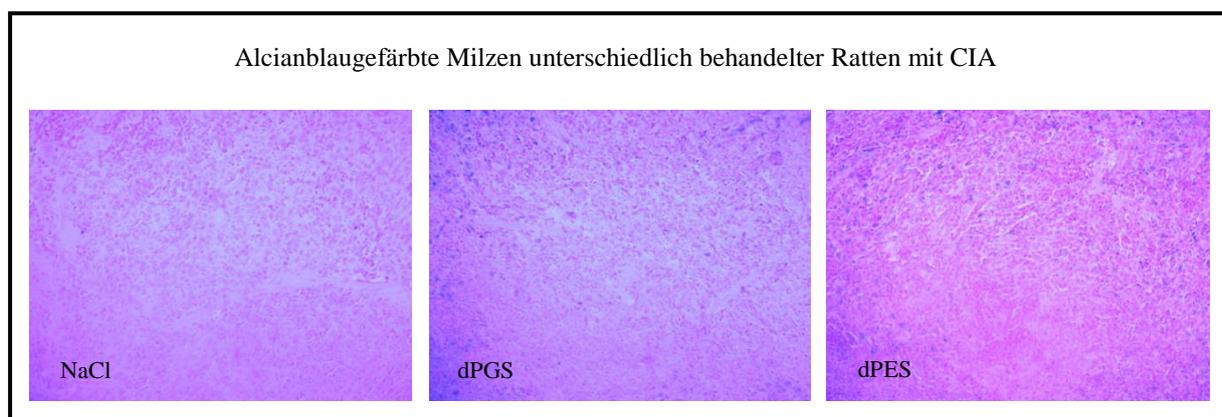


Abb. 23: Aufnahmen aus der roten und weißen Milzpulpa. AB/Kernechtrot-gefärbte Paraffingewebeschnitte von Ratten mit CIA. Behandlung mit 30mg/kg KG/Tag NaCl, dPGS oder dPES für 15 Tage. Vergrößerung 400fach.

#### 4.3.4.1.4 Alcianblaufärbung histologischer Leberschnitte

Der qualitative Nachweis der therapeutisch eingesetzten Substanzen wurde auch in der Leber, dem zentralen Organ der Biotransformation, vorgenommen. Die Lebern der mit dPGS behandelten Tiere wiesen eine intensive Färbung sämtlicher Endothelien bzw. der basalen Seiten der Hepatozyten auf (siehe Abb. 24). Zellen, bei denen es sich vermutlich um Kupffer-Zellen handelte und einzelne Hepatozyten, häufig diploid, wiesen sowohl gefärbtes Zytoplasma als auch einen gefärbten Zellkern auf. Auch in der dPES-Gruppe ließen sich blau gefärbte Zellen in den Sinusoiden nachweisen, wobei hier weniger deutlich wurde, ob es sich dabei um Kupffer-, Endothel- oder Ito-Zellen handelte. Gefärbte Hepatozyten konnten in dieser Gruppe nicht sicher nachgewiesen werden. Zellen mit tiefblauem Zytoplasma, wahrscheinlich Mastzellen, fanden sich im Bindegewebe um die Glisson-Triaden in den Schnitten sämtlicher Gruppen, andere blaue Areale waren in der Kontroll- und der unbehandelten Gruppe nicht vorhanden.

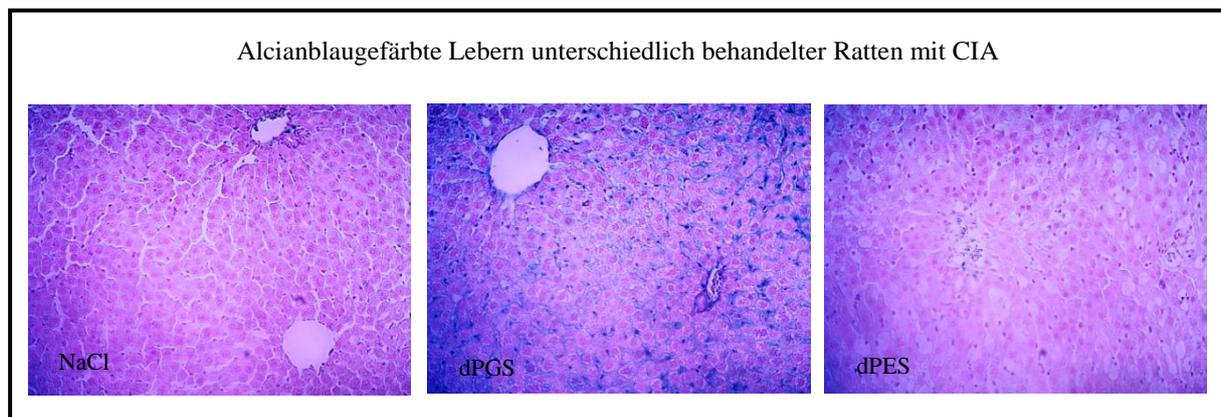


Abb. 24: Aufnahmen der Lebern mit Zentralvene und Glisson-Trias. AB/Kernechtrot-gefärbte Paraffingewebeschnitte von Ratten mit CIA. Behandlung mit 30mg/kg KG/Tag NaCl, dPGS oder dPES für 15 Tage. Vergrößerung 400fach.

#### 4.3.4.1.5 Alcianblaufärbung histologischer Schnitte der Popliteallymphknoten

Um die Möglichkeit des dPGS- und dPES-Transports aus den entzündeten Gelenken der Extremitäten in das nachgeschaltete lymphatische Organ, den Regionallymphknoten, zu überprüfen, wurden auch die Popliteallymphknoten mittels AB-Färbung untersucht. Die Lymphknotenpräparate aller Gruppen wurden im Übergangsbereich zwischen kortikaler und parakortikaler Zone sowie in den Marksträngen von ca. 20 - 25 µm im Durchmesser zählenden Zellen durchzogen, die ein kräftig blau gefärbtes Zytoplasma aufwiesen, ähnlich den beschriebenen Zellen im Bindegewebe um die Glisson-Triaden der Leber, bei denen es sich wahrscheinlich um Mastzellen handelte. Es ließ sich außerdem eine Blaufärbung der Basallaminae der hochendothelialen Venulen ausmachen (siehe Abb. 25). Die einzelnen Gruppen zeigten dabei keine Unterschiede.

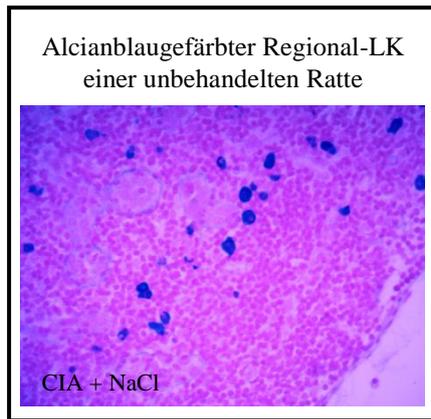


Abb. 25: Aufnahme aus dem Regionallymphknoten (Regional-LK) des Sprunggelenks. AB/Kernechtrot-gefärbter Paraffingewebeschnitt einer Ratte mit CIA. NaCl: 30mg/kg KG/Tag für 15 Tage. Vergrößerung 400fach.

#### 4.3.4.2 Semiquantitative Bestimmung der polysulfatierten Makromoleküle in histologischen Schnitten innerer Organe nach achttägiger subkutaner Applikation von dPGS, dPES und Heparin bei Ratten

Ergänzend zur qualitativen Lokalisationsbestimmung der Makromoleküle in den einzelnen Organen wurde ein semiquantitativer Nachweis der Substanzen angestrebt, um zusätzlich Aussagen zur Menge der Moleküle machen zu können. Verwendet wurden die Daten aus V3.

##### 4.3.4.2.1 Quantifizierungsmethode der Alcianblau-Menge in histologischen Schnitten

Nach Inkubation des AB auf den Paraffinschnitten, wurde der Farbstoff mit 6 M Guanidin-HCl-Lösung wieder aus den Gewebeschnitten herausgelöst. Das AB ließ sich auf diese Weise gut entfernen. Nur geringe Mengen blieben nach zwanzigstündiger Einwirkdauer des Guanidin-HCl im Gewebe zurück. Eine längere Inkubation mit Guanidin-HCl verbesserte die AB-Ausbeute nicht. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an Wasser in der feuchten Kammer auf die AB-Konzentration in der Guanidin-HCl-Lösung Einfluss nahm. Die stark hygroskopische Lösung nahm mit steigender Wassermenge an Volumen zu und wurde verdünnt (Daten nicht dargestellt). Um eine Verdunstung der Guanidin-Lösung zu vermeiden, musste der Kammer also eine definierte Menge Wasser zugeführt werden. Diese wurde auf 1,5 ml bei einem Kammervolumen von 4592 cm<sup>3</sup> festgelegt. Die ermittelte Menge an AB in verschiedenen Schnitten desselben Organs variierte mit einer mittleren Standardabweichung von 6,7 µg/ml. Die AB-Konzentration wurde in fünf bis sieben Schnitten pro Organ in unabhängigen Versuchen bestimmt.

##### 4.3.4.2.2 Bestimmung der DNA-Menge und Fläche der histologischen Schnitte

Die ermittelte AB-Konzentration (in ng) sollte vergleichend auf die DNA-Konzentration des Schnittes sowie auf dessen Größe bezogen werden. Dies diente zur Vorbeugung der Fehlerentstehung durch ungleich große Schnitte.

## Ergebnisse

Bei der Bestimmung der DNA-Konzentration zeigte sich eine mittlere Standardabweichung von 24 µg DNA/ml für fünf bis sechs aufeinander folgende Schnitte desselben Organs. Die histologischen Schnitte der Lebern enthielten die größten DNA-Mengen mit durchschnittlich 167 µg und besaßen gleichzeitig die größte Fläche (224 mm<sup>2</sup> im Mittel). Die Milzschnitte enthielten bei einer durchschnittlichen Schnittfläche von 66 mm<sup>2</sup> rund 32 µg DNA. Bei den Nierenschnitten wurden im Mittel 24 µg DNA und eine Durchschnittsfläche von 129 mm<sup>2</sup> ermittelt. So ergaben sich für jedes Organ unterschiedliche DNA-Flächen-Quotienten (siehe Tabelle 9).

Quotient aus DNA pro Fläche von Paraffinschnitten	
Organ	Quotient in µg/mm <sup>2</sup>
Leber	0,75
Milz	0,48
Niere	0,19

Tab. 9: Quotient aus DNA-Konzentration und Organschnittflächengröße von 16µm dicken Paraffinschnitten innerer Organe von Ratten mit CIA.

Der mittlere DNA-Gehalt in µg und die mittlere Schnittflächengröße in mm<sup>2</sup> dienten als Bezugsparameter für die Einzelergebnisse der AB-Konzentrationsbestimmung. Da die Mittelwerte der NaCl-Gruppe als Eins festgelegt wurden und die Daten der anderen Gruppen sich auf diesen Wert beziehen, entfallen die Einheiten der Ergebnisse. Sie können semiquantitativ als ein x-faches der AB- pro DNA-Konzentration oder pro Schnittfläche der Kontrollgruppe bewertet werden.

### 4.3.4.2.3 Konzentration des Alcianblau in Paraffinschnitten von Rattenlebern

Auch hier wurde die Leber als wichtiges Stoffwechselorgan untersucht. Es zeigte sich, dass die mit dPGS behandelten Tiere besonders stark angefärbte Lebern aufwiesen, wobei nicht nur bei dieser Behandlungsgruppe, sondern auch in der dPES-Gruppe hochsignifikant höhere AB-Konzentrationen ermittelt wurden als in der Kontroll-Gruppe. Die Lebern der dPGS-Gruppe enthielten durchschnittlich 2,3-mal so viel AB/DNA und 2,5-mal so viel AB/Fläche wie die der unbehandelten Gruppe. Die Lebern der dPES-Gruppe enthielten ca. 2-mal so viel AB. Damit unterschieden sich die dPGS- und dPES-Mengen im Mittel um 13 bzw. 16 Prozent. Die AB-Konzentration in den Schnitten der mit Heparin behandelten Ratten lag bei sehr ähnlichen Werten wie die der Kontrollgruppe (siehe Abb. 26).

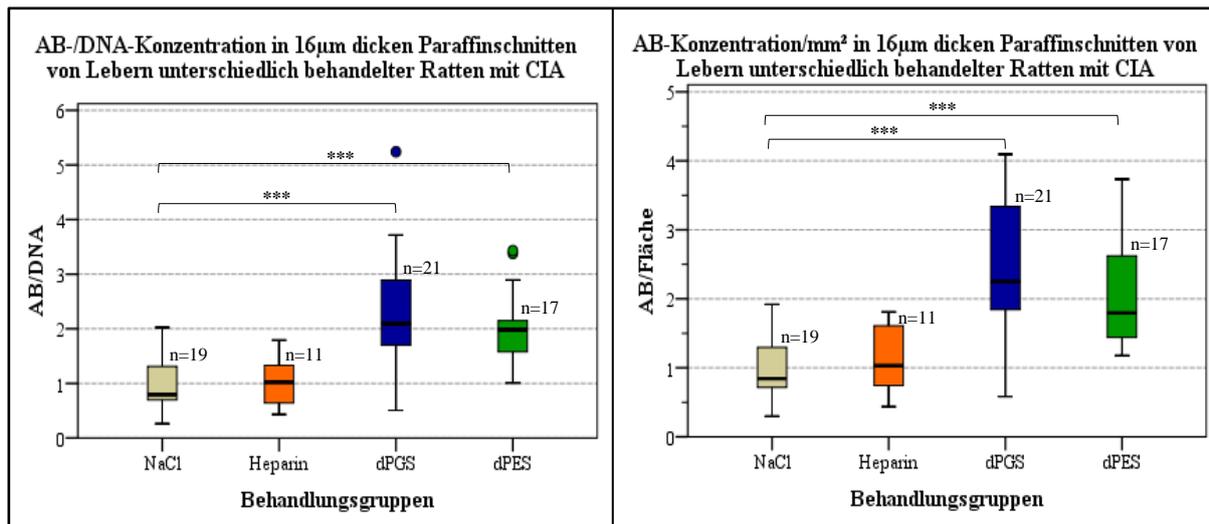


Abb. 26: **Signifikant mehr AB in Rattenlebern nach Behandlung mit dPGS oder dPES im Vgl. zur Kontrollgruppe.**

15 Ratten mit CIA wurden über neun Tage mit s.c.-Injektionen à 30mg/kg KG/Tag (außer Heparin) behandelt. NaCl: 4 Tiere, Heparin: 3 Tiere (Tag 1- 2: 4800 I.E./ KG/Tag ( $\cong$  30mg/kg KG/Tag), Tag 3- 9: 24- 40 I.E/KG/Tag ( $\cong$  4,5- 7,5mg/kg KG/Tag)), dPGS: 4 Tiere, dPES: 4 Tiere. Der Mittelwert der AB- pro DNA-Konzentrationen in den Leberschnitten der Kontrolltiere (NaCl) wurde festgelegt als 1. Darauf beziehen sich alle anderen Werte. n: Anzahl an ausgewerteten Paraffinschnitten. \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . Kreise: erhöhte Einzelwerte.

#### 4.3.4.2.4 Konzentration des Alcianblaus in Paraffinschnitten von Rattenmilzen

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass der Milz als sekundäres lymphatisches Organ eine besondere Rolle bei entzündlichen Geschehen zukommt, wurde die AB-Menge in diesem Organ bestimmt. Die Milzen der mit dPGS behandelten Tiere enthielten im Mittel 2,4- bzw. 2,7-mal so viel AB/DNA bzw. AB/Fläche wie die Kontrollgruppe und somit die höchste Menge an Farbstoff. Darin unterschieden sie sich hoch signifikant von der Kontrollgruppe und signifikant von der dPES-Gruppe, in der die Milzen nur wenig stärker gefärbt waren als bei den Tieren der Kontrollgruppe. Die mit Heparin behandelten Ratten wiesen auch in den Milzen eine sehr ähnliche AB-Konzentration wie die unbehandelten Tiere auf (siehe Abb. 27).

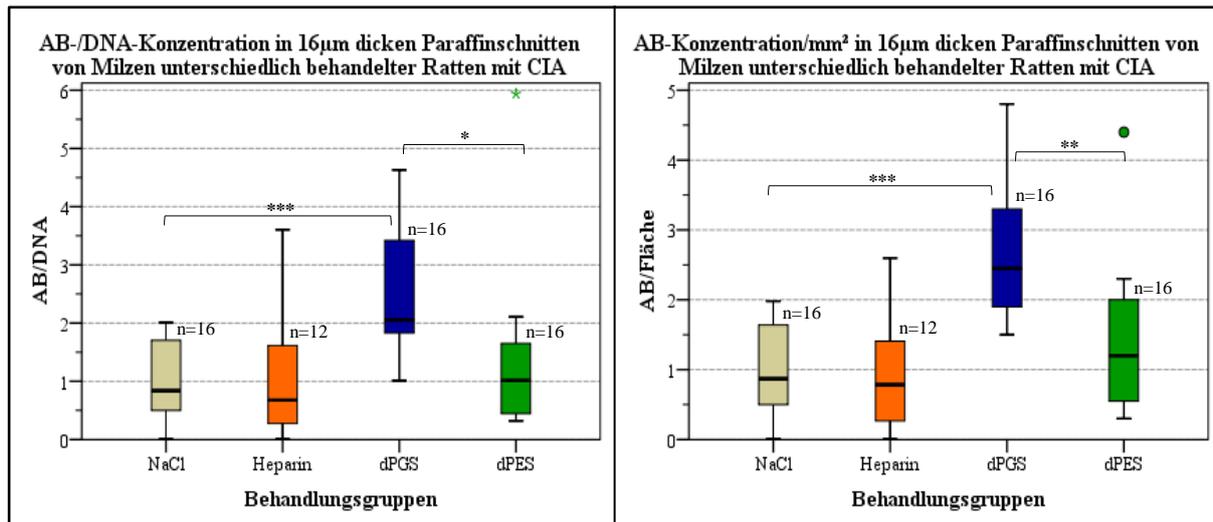


Abb. 27: **Signifikant mehr AB in Rattenmilzen nach Behandlung mit dPGS im Vgl. zur Kontroll- und dPES-Gruppe.** 15 Ratten mit CIA wurden über neun Tage mit s.c.-Injektionen à 30mg/kg KG/Tag (außer Heparin) behandelt. NaCl: 4 Tiere, Heparin: 3 Tiere (Tag 1- 2: 4800 I.E./ KG/Tag ( $\cong$  30mg/kg KG/Tag), Tag 3- 9: 24- 40 I.E./KG/Tag ( $\cong$  4,5- 7,5mg/kg KG/Tag)), dPGS: 4 Tiere, dPES: 4 Tiere. Der Mittelwert der AB-Konzentrationen pro DNA-Menge oder mm<sup>2</sup> in den Milzschnitten der Kontrolltiere (NaCl) wurde festgelegt als 1. Darauf beziehen sich alle anderen Werte. n: Anzahl an ausgewerteten Paraffinschnitten. \*\*\*: p $\leq$ 0,001, \*\*: p $\leq$ 0,01, \*: p $\leq$ 0,05. Kreis: Ausreißer. Buntes Sternchen: Extremwert.

#### 4.3.4.2.5 Konzentration des Alcianblaus in Paraffinschnitten von Rattennieren

Da die Niere als Ausscheidungsorgan einen hohen Stellenwert bei pharmakokinetischen Betrachtungen besitzt, wurde die Konzentration an AB auch in diesem Organ bestimmt.

Alle Behandlungsgruppen enthielten signifikant mehr AB in den Nieren als die Kontrollgruppe (siehe Abb. 28). Dabei erreichte die AB-Konzentration bezogen auf die DNA-Konzentration den höchsten Mittelwert in der dPES-Gruppe (2,2). Bezogen auf die Fläche hoben sich die Nieren der dPGS-Gruppe am stärksten von der Kontrollgruppe ab (mit einem Mittelwert von 1,9). Die Mittelwerte der Heparin-Gruppe lagen bei je 1,6.

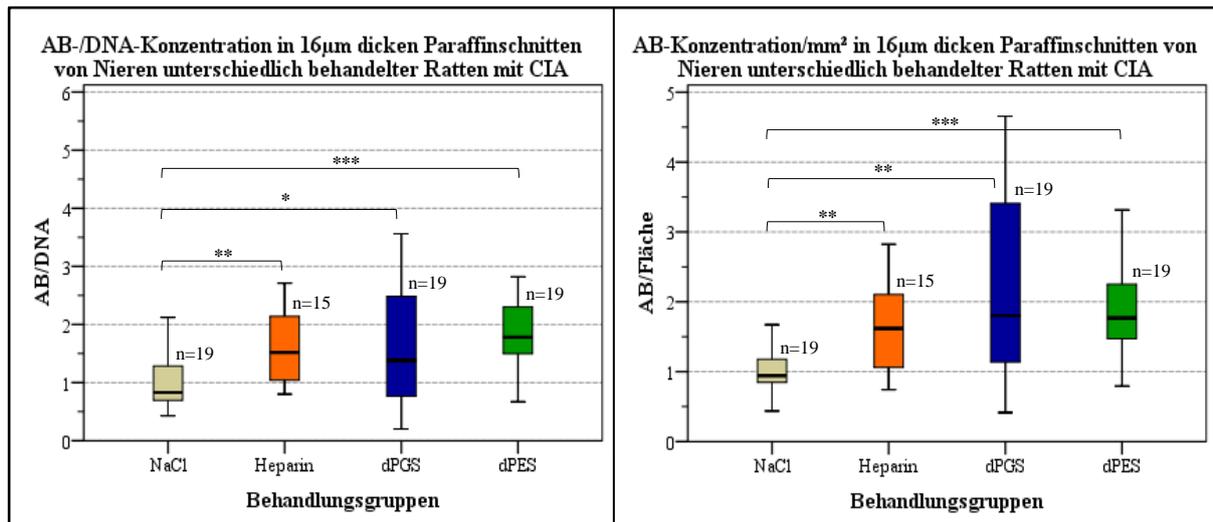


Abb. 28: Signifikant mehr AB in Rattennieren nach Behandlung mit Heparin, dPGS oder dPES im Vgl. zur Kontrollgruppe.

15 Ratten mit CIA wurden über neun Tage mit s.c.-Injektionen à 30mg/kg KG/Tag (außer Heparin) behandelt. NaCl: 4 Tiere, Heparin: 3 Tiere (Tag 1- 2: 4800 I.E./ KG/Tag ( $\cong$  30mg/kg KG/Tag), Tag 3- 9: 24- 40 I.E/KG/Tag ( $\cong$  4,5- 7,5mg/kg KG/Tag)), dPGS: 4 Tiere, d PES: 4 Tiere. Der Mittelwert der AB-Konzentrationen pro DNA-Menge oder mm<sup>2</sup> in den Nierenschnitten der Kontrolltiere (NaCl) wurde festgelegt als 1. Darauf beziehen sich alle anderen Werte. n: Anzahl an ausgewerteten Paraffinschnitten. \*\*\*: p $\leq$ 0,001, \*\*: p $\leq$ 0,01, \*: p $\leq$ 0,05.

#### 4.3.4.2.6 Überblick über die mittleren Alcianblau -Konzentrationen in den histologischen Organschnitten aller Behandlungsgruppen

Die Übersichtsabbildung (Abb. 29) soll der Veranschaulichung der mittleren AB-Konzentrationen dienen. Sie macht deutlich, dass sich in den verschiedenen Organen unterschiedlich hohe Konzentrationen der jeweiligen Therapeutika nachweisen ließen.

Bei der Betrachtung der Behandlungsgruppen, zeigte sich, dass die Werte in AB/DNA und AB/Fläche gut miteinander überein stimmten. Mit Fokus auf die Organe fiel vor allem bei den Nieren eine Differenz auf: Während sie bezogen auf die DNA-Konzentration in allen Behandlungsgruppen nah beieinander lagen und am höchsten in der dPES-Gruppe ausfielen, ließ sich in Bezug auf die Fläche eine größere Differenz zwischen den Behandlungsgruppen erkennen, und die höchste durchschnittliche AB-Konzentration bestand in dieser Ansicht in der dPGS-Gruppe. Die Organe der Tiere, die Heparin erhalten hatten, färbten sich jeweils am schwächsten an.

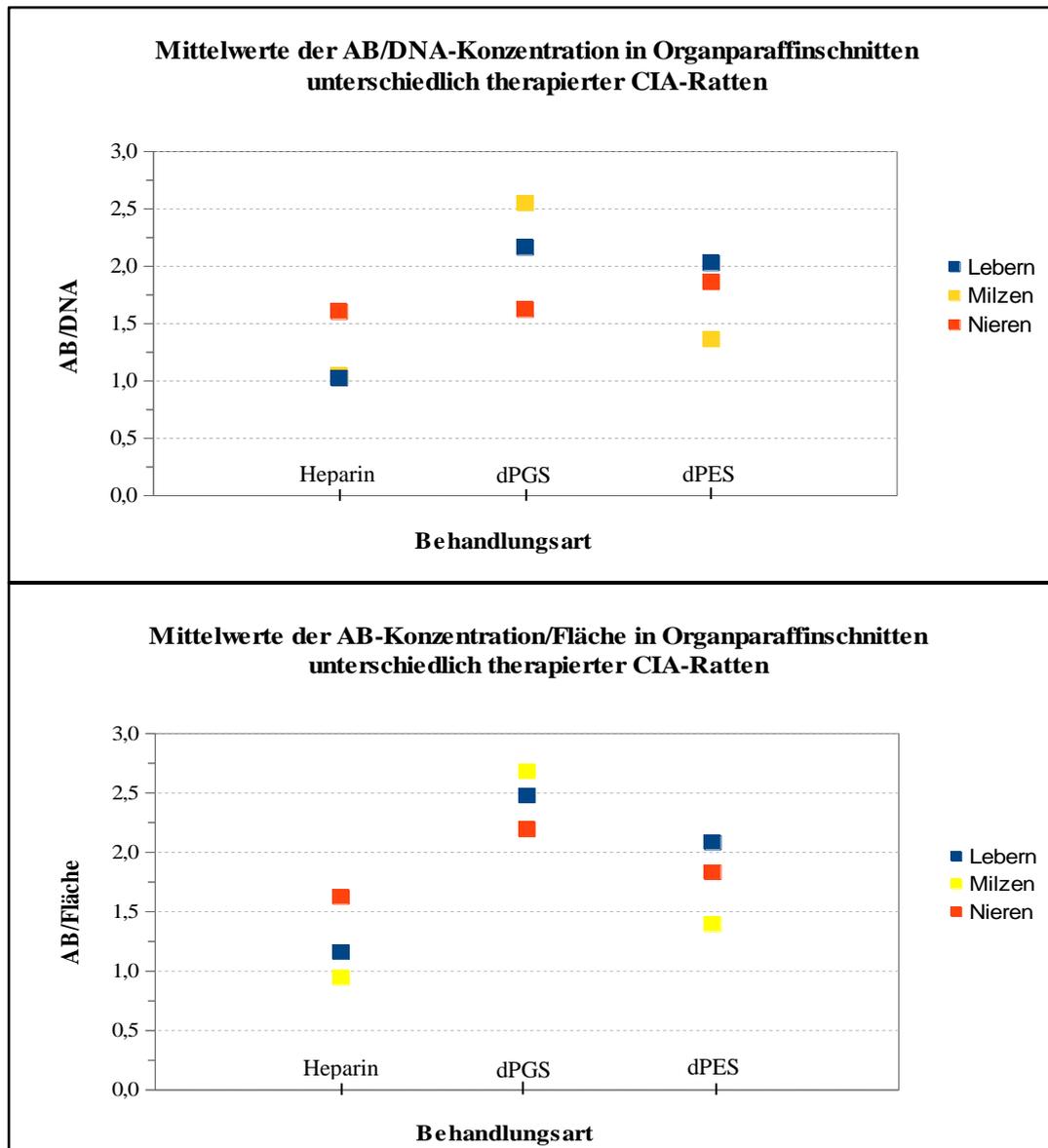


Abb. 29: Die Verteilung von AB in den Organen unterscheidet sich je nach Therapeutikum.

15 Ratten mit CIA wurden über neun Tage mit s.c.-Injektionen à 30mg/kg KG/Tag (außer Heparin) behandelt. NaCl: 4 Tiere, Heparin: 3 Tiere (Tag 1- 2: 4800 I.E./ KG/Tag ( $\cong$  30mg/kg KG/Tag), Tag 3- 9: 24- 40 I.E/KG/Tag ( $\cong$  4,5- 7,5mg/kg KG/Tag)), dPGS: 4 Tiere, dPES: 4 Tiere. In 16 $\mu$ m dicken, AB-gefärbten Paraffinschnitten der Lebern, Milzen und Nieren wurde die AB/DNA-Konzentration in ng/ $\mu$ g sowie die AB-Konzentration/Fläche in ng/mm<sup>2</sup> ermittelt. Der Mittelwert der AB/DNA- bzw. AB/Fläche-Werte in den Organschnitten der unbehandelten Kontrolltiere (nicht dargestellt) wurde festgelegt als 1. Darauf beziehen sich alle anderen Werte. Die Abbildung stellt nur die Mittelwerte dar.

#### 4.3.5 Blutgerinnung von Ratten nach Behandlung mit dPGS, dPES oder Heparin

DPGS, welches ursprünglich mit dem Ziel entwickelt worden war, ein vollsynthetisches Heparinanalogen herzustellen, weist strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Antikoagulant auf. In einer Studie von Türk et al.<sup>53</sup> konnte gezeigt werden, dass in vitro die gerinnungshemmende Wirkung des dPGS deutlich geringer ausfiel als die von Heparin. Um die antikoagulatorische

Wirkung von dPGS und dPES in vivo zu testen, wurden INR und aPTT von mit den Substanzen behandelten Ratten ermittelt. Verwendet wurde V3 (siehe Tab. 5).

DPGS und dPES bewirkten eine signifikante Verlängerung der aPTT im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei zeigte dPES einen stärkeren Effekt als dPGS, der Unterschied blieb jedoch unter dem Signifikanzniveau. Die größte gerinnungshemmende Wirkung erzielte Heparin (siehe Abb. 30). Dabei ist zu beachten, dass pro Tag im Schnitt nur etwa 11 mg/kg KG Heparin verabreicht wurden, vs. 30 mg/kg KG dPGS und dPES.

Die INR wurde durch dPES ähnlich stark beeinflusst wie durch Heparin. Auch dPGS erhöhte den INR-Wert im Vergleich zur NaCl-Gruppe. Dabei ist zu beachten, dass die antikoagulatorische Wirkung von Heparin klinisch mit der aPTT bestimmt wird. Die Aussagekraft des INR-Wertes ist dagegen begrenzt.

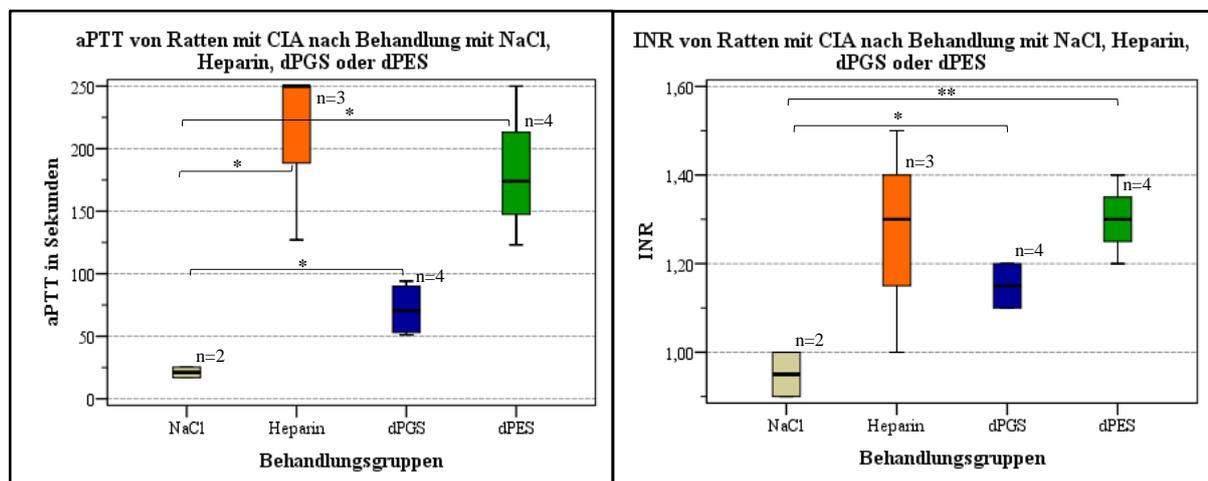


Abb. 30: DPGS und dPES erhöhen die aPTT und die INR.

Die aPTT und die INR von 13 Ratten mit CIA wurden nach neun Tagen s.c. Behandlung mit verschiedenen Substanzen bestimmt. NaCl, dPGS, dPES: 30mg/kg KG/Tag, Heparin: Tag 1- 2: 4800 I.E./ KG/Tag ( $\cong$  30mg/kg KG/Tag), Tag 3- 9: 24- 40 I.E./KG/Tag ( $\cong$  4,5- 7,5mg/kg KG/Tag). n: Anzahl an Versuchstieren der jeweiligen Behandlungsgruppe. \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ .

#### 4.4 In vitro-Inkubation von U937-Zellen mit dPGS und dPES – Entwicklung der intrazellulären Anreicherung über 10 Tage

Um genauere Erkenntnisse zur Bioabbaubarkeit von dPGS und dPES zu erhalten, wurden U937-Zellen, die durch mehrtägige Inkubation mit modifiziertem RPMI-1640 zu makrophagenähnlichen Zellen differenziert wurden, auf ihre Fähigkeit untersucht, dPGS und dPES abzubauen bzw. auszutransportieren. Dazu wurden die Makromoleküle den Zellen für zwei Tage zugegeben. Anschließend erfolgten mehrere Waschschriffe. Nach definierten Zeitpunkten (s.u.) wurden die Zellen fixiert und mit AB gefärbt (siehe Abb. 31). Die AB-Menge wurde durch Quantifizierung blauer Pixel in standardisiert angefertigten Fotos bestimmt. Nach

## Ergebnisse

48 Stunden Inkubation zeigte sich, dass die Fotos der Zellen, denen dPGS zugegeben worden war, 2,8 mal mehr blaue Pixel und die der Zellen, die dPES erhalten hatten, 2,4 mal mehr blaue Pixel enthielten als die Fotos der Kontrollzellen (Daten nicht gezeigt). Innerhalb von zehn Tagen verschwanden die Makromoleküle gänzlich wieder aus den Zellen. Während zwei Tage nach Absetzen der Substanzen 290 blaue Pixel pro Foto bei den mit dPGS inkubierten Zellen und 172 bei den dPES-Zellen nachweisbar waren, waren es weitere acht Tage später in beiden Gruppen weniger blaue Pixel als in der Kontrollgruppe, in der die Zellen unbehandelt geblieben waren.

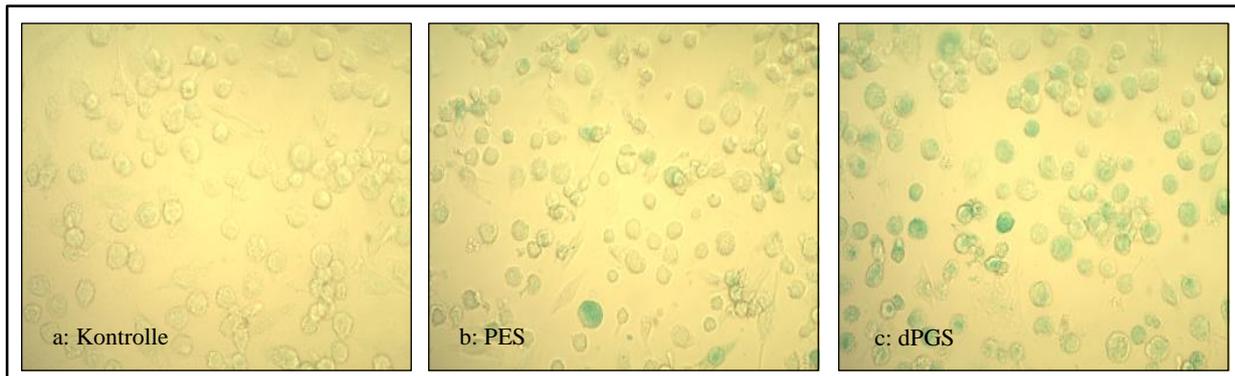


Abb. 31: Fixierte und AB-gefärbte U937-Zellen sechs Tage nach Inkubation mit polysulfatierten Makromolekülen. Die Zellen reiften vier Tage in modifiziertem RPMI-1640 Medium, dem anschließend für 48 Stunden  $10^{-6}$ M dPES (b) oder dPGS (c) oder keine Substanz (a) hinzugefügt wurde. Vergr. 400fach.

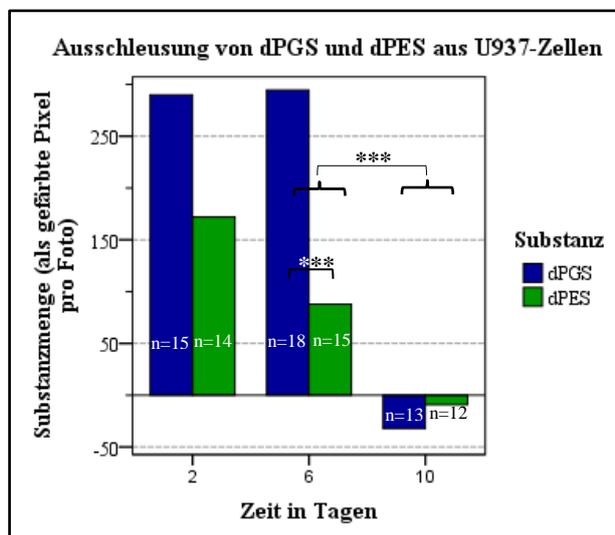


Abb. 32: Weniger dPES als dPGS nachweisbar in U937-Zellen.

U937-Zellen auf Deckgläschen in 24-Well-Platten inkubierten nach viertägiger Reifung in modifiziertem RPMI 1640-Medium mit 0,1% PMA für 48 Stunden mit  $10^{-6}$  M dPGS oder dPES oder in reinem Medium. Täglicher Mediumwechsel. Nach Fixierung wurden die Zellen mit AB gefärbt und Fotos angefertigt. Diese wurden mit ImageJ und GIMP2 bearbeitet und die Anzahl an blauen Pixeln bestimmt. Die Pixelanzahl der unbehandelten Zellen wurde von den anderen Gruppen subtrahiert. n: Anzahl an ausgewerteten Fotos. \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .

## Ergebnisse

Dabei blieb die Menge an Pixeln in der dPGS-Gruppe bis Tag sechs nahezu konstant und sank erst dann ab. In der dPES-Gruppe hingegen waren bereits nach sechs Tagen nur noch circa halb so viele blaue Pixel pro Foto vorhanden wie zwei Tage nach Substanzentzug. Von Tag sechs zu Tag zehn sank in beiden Gruppen die Anzahl an blauen Pixeln hoch signifikant ab. Die Pixelzahl unterschied sich zwischen der dPGS-Gruppe und der dPES-Gruppe nach sechs Tagen hochsignifikant (siehe Abb. 32). Es fand folglich ein Abbau oder eine Ausschleusung der Substanzen aus den makrophagenähnlichen Zellen statt. Die intrazelluläre Konzentration von dPES erreichte dabei zu einem früheren Zeitpunkt ein niedrigeres Niveau als die von dPGS.

## 5. Diskussion

### 5.1 Hintergrund der Arbeit

Die rheumatoide Arthritis betrifft ca. 1% der Bevölkerung<sup>6,7</sup> und ist damit eine weit verbreitete, vermutlich autoimmun verursachte Erkrankung. Sie befällt die Gelenke, in denen entzündliche Vorgänge, sofern keine medizinische Intervention erfolgt, zunächst die Synovia, später den gesamten Gelenkraum mit angrenzenden Strukturen und letztlich auch den Knochen destruieren<sup>1,14,16</sup>. Viele Patienten leiden unter starken Schmerzen, Bewegungseinschränkungen und deformierten Gelenken<sup>17</sup>. Auch systemische Symptome wie das Fatigue-Syndrom können auftreten<sup>19</sup>.

Die Pathophysiologie der RA ist komplex und bis heute nicht vollständig geklärt. Makrophagen, Monozyten, T- und B-Zellen ebenso wie Granulozyten und dendritische Zellen tragen zur Genese und Progredienz der Erkrankung bei<sup>12,103,104</sup>.

Auch die Ätiologie der RA ist nur zu Teilen bekannt. Aktuell wird von einer multifaktoriellen Entstehung der Krankheit ausgegangen<sup>105</sup>, welche unter anderem genetische Faktoren<sup>106</sup>, virale<sup>107</sup> oder bakterielle Trigger<sup>108,109</sup> und psychosomatische Aspekte<sup>110</sup> umfasst. Interindividuelle Unterschiede in der Ätiologie und möglicherweise auch in der Pathophysiologie der RA könnten einen Grund dafür darstellen, dass monovalente Wirkstoffe wie TNF- $\alpha$ -Inhibitoren häufig nur bei Subpopulationen (langfristig) wirksam und nebenwirkungsarm sind<sup>91</sup>. Um die personalisierte Medizin an dieser Stelle zu optimieren, wäre ein Monitoring der Therapie mithilfe der NIR-FOI denkbar. Unter Anwendung eines entzündungsspezifischen KM wie dPGS- oder dPES-ICG könnten Aussagen bezüglich des Einflusses der gewählten Therapie auf die Krankheitsaktivität getroffen werden und darauf basierend eine Anpassung der individuellen Behandlung vorgenommen werden.

Es handelt sich bei dPGS um ein hochsulfatiertes dendritisches Molekül, welches an die für die Leukozytenemigration wichtigen L- und P-Selektine bindet<sup>60</sup>. Für die ihm strukturell eng verwandte Substanz dPES werden dieselben Eigenschaften angenommen.

Auch unabhängig vom Therapiemonitoring könnte die NIR-FOI mit dPGS- und dPES-ICG Vorteile in der Diagnostik der RA bringen. Diese sollte so früh wie möglich im Krankheitsverlauf erfolgen, um optimalerweise ein Eingreifen *vor* der Entstehung manifester Gelenksveränderungen zu ermöglichen<sup>18,21</sup>.

Das häufig angewandte Röntgen genügt dieser Anforderung nicht, da es eine RA erst nachweisen kann, wenn sich bereits Erosionen an den betroffenen Stellen zeigen<sup>26</sup>.

Mit der MRT und dem US ist die Detektion der primären Entzündung der Synovialis in vielen Fällen möglich. An zahlreichen Standorten ist ein MRT jedoch nicht verfügbar und die Untersuchung ist aufwändig und teuer<sup>26,28,29</sup>. US-Untersuchungen bringen vor allem den Nachteil mit sich, dass die Befundung stark vom durchführenden Arzt abhängt, sodass die Ergebnisse schwer zu reproduzieren sind<sup>29,31,32</sup>. In einer Studie von Licha et al. konnte bereits gezeigt werden, dass mit Hilfe von dPGS-ICG in der NIR-FOI Entzündungsreaktionen in Gelenken von Ratten mit CIA detektiert werden können<sup>60</sup>. Des Weiteren handelt es sich um eine schnelle und einfache Methode, bei der die Ergebnisse untersucherunabhängig sind.

Die Eignung des dPGS-ICG und des ihm verwandten Moleküls dPES-ICG, entzündliche Episoden im Rahmen einer Arthritis schweregradabhängig darzustellen, wurde in dieser Arbeit genauer untersucht.

Gleichzeitig können dPGS und dPES als multispezifische Therapeutika die personalisierte Medizin ergänzen, bzw. als Alternative dienen, da sie durch die Inhibition verschiedener entzündungsrelevanter Moleküle ein hohes Wirkpotenzial für eine breite Patientenpopulation besitzen könnten. Es wurde bereits gezeigt, dass dPGS bei Mäusen mit induzierter Kontaktdermatitis einen positiven therapeutischen Effekt erzielte<sup>60</sup>.

Aus diesen Gründen wurden dPGS und dPES auf ihre therapeutische Potenz im CIA-Tiermodell überprüft. Im Rahmen der therapeutischen Anwendung der beiden hochsulfatierten Makromoleküle erfolgten auch erste Untersuchungen zu pharmakokinetischen Aspekten. Diesbezüglich sollte herausgefunden werden, ob sich dPES durch die Estergruppen besser abbauen lässt.

### **5.2 CIA-Modell in der Ratte – Einschränkungen**

Dem Großteil der vorgestellten Versuche lag das 1977 von Trentham etablierte CIA-Modell der Ratte zu Grunde<sup>93</sup>. Da es die Basis der in vivo Experimente darstellt, sollen seine Eigenschaften und Einschränkungen besprochen werden, die sich naturgemäß auf die Ergebnisse der Versuche auswirkten.

Es zeigte sich, dass die unbehandelten Tiere, denen statt eines Medikaments isotone Kochsalzlösung gespritzt wurde, anders als anzunehmen, nicht alle im selben Maße erkrankten. Es wurde festgestellt, dass die Anzahl der erkrankten Tiere und deren Symptomausprägung zwischen den einzelnen Versuchen trotz gleicher experimenteller Ausgangsbedingungen stark variierte (eine Ausnahme bildet V4, bei dem bewusst eine höhere Kollagenmenge zur Arthritis-Induktion gewählt wurde). Die Tiere entsprachen sich auch in Stamm, Zucht, Geschlecht und

Alter. Dass nicht alle Ratten an den Kollageninjektionen erkranken, gilt als typische Eigenschaft dieses Tiermodells<sup>66</sup>. Dieses interindividuell schwankende Wirkungspotenzial des Kollagens lässt möglicherweise auf genetisch bedingte Variabilität der Empfänglichkeit des Immunsystems für diesen Inflammationstrigger schließen. Diese unterschiedliche Empfänglichkeit für den Inflammationsreiz und der individuelle Krankheitsverlauf simuliert die Vielfältigkeit der humanen RA.

### **5.3 DPGS- und dPES-ICG als Kontrastmittel in der NIR-FOI**

Um die Eignung der KM dPGS- und dPES-ICG in der bildgebenden Darstellung der Arthritis zu untersuchen, wurden Ratten mit und ohne CIA per NIR-FOI untersucht. Hierzu wurde die FI der SG bestimmt.

ICG ist ein zugelassener fluoreszierender Nahinfrarotfarbstoff. Er unterliegt einem passiven Transport im Blut und ist folglich in Arealen erhöhter kapillarer Durchblutung und Permeabilität, wie sie im Rahmen inflammatorischer Prozesse vorhanden sind, deutlich nachweisbar. Darauf beruht die Eignung des ICG zur Detektion entzündeter Gewebe. ICG wird aktuell unter anderem als KM in der NIR-FOI im Rheumascan® verwendet, der seit 2009 zugelassen ist<sup>48</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurden Konjugate aus ICG und dPGS, bzw. dPES verwendet, um die fluoreszierende Eigenschaft des ICG zu kombinieren mit der entzündungsspezifischen Anreicherung der Makromoleküle. Dadurch sollte das NIR-Imaging der RA optimiert werden.

Für dPGS-ICG zeigte sich bereits in Versuchen von Licha et al. eine Anreicherung in entzündeten Gelenken von Ratten mit CIA<sup>66</sup>. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit lag das konjugierte dPGS allerdings in einer stärker sulfatierten Form vor (siehe Tab. 2), sodass von einer abweichenden Pharmakokinetik ausgegangen werden muss. Für dPES-ICG existieren bislang keine Veröffentlichungen. DPES wurde als Alternative zu dPGS entwickelt, die besser bioabbaubar sein sollte. Zu diesem Zweck wurden bei der Synthese statt dem hochsulfatierten dendritischen Polyglycerol-Grundgerüst Estergruppen verwendet. Um Informationen über die pharmakokinetischen Unterschiede zwischen beiden Substanzen zu erhalten, wurden die FI der Augen und verschiedener innerer Organe in und ex vivo ermittelt. Die erste Messung der FI post iniectionem der KM erfolgte nach zehn Minuten. Es zeigte sich, dass alle Organe und die Sprunggelenke ein Fluoreszenzmaximum bei zehn Minuten aufwiesen. Hierzu muss kritisch angemerkt werden, dass der Verlauf der FI im Zeitraum vor der ersten Messung unbekannt ist. Um Aufschluss über diesen zu erhalten, wäre eine kontinuierliche Aufzeichnung der Fluoreszenz im Sinne eines Films am ehesten geeignet. Damit ließe sich nachweisen, zu welchem Zeitpunkt die FI tatsächlich das Maximum erreicht.

### 5.3.1 Darstellung der Arthritis

Die SG der CIA-Ratten eigneten sich besonders gut zur Darstellung der CIA in der NIR-FOI, da sich zeigte, dass sich die Entzündung hier zuerst manifestierte und die SG in allen für die Aufnahmen gewählten Positionen gut beurteilbar waren.

Um die Sensitivität von dPGS-ICG zu testen, wurde die FI gesunder Ratten mit der FI von CIA-Ratten, bei denen bis dato keine klinischen Symptome aufgetreten waren (Score 0) verglichen. Die CIA-Tiere wiesen eine nahezu doppelt so hohe FI zu den Messzeitpunkten drei Stunden und 24 Stunden nach KM-Injektion auf wie die gesunden Tiere ( $p \leq 0,001$ ). Dieses Ergebnis weist einerseits darauf hin, dass auch bei symptomlosen Ratten nach Kollageninjektion eine leichte Entzündungsreaktion vorhanden ist, andererseits zeigt es, dass dPGS-ICG bereits subklinische Inflammationsvorgänge im Gelenk nachweist, was für eine hohe Sensitivität spricht. Zu zeigen, dass die NIR-FOI mit dPGS-ICG eine hohe Sensitivität für entzündliche Gelenkprozesse besitzt, war ein Ziel dieser Arbeit.

Auch für reines ICG in der NIR-FOI ergaben sich in einer Studie von Werner et al. diskrete Hinweise auf eine mögliche Detektion subklinischer Arthritis<sup>47</sup>. Eingeschlossen wurden dabei Patienten mit einer Krankheitsdauer von höchstens 24 Monaten. Daher wurden hier zwar möglicherweise subklinische Veränderungen nachgewiesen, jedoch zu einem Zeitpunkt, zu dem bereits mindestens eine manifeste Phase der Erkrankung abgelaufen sein musste. Schon sehr früh im Krankheitsverlauf kommt es beispielsweise zur Neovaskularisation<sup>26</sup>. Daher ist es kaum zu unterscheiden, ob durch die Bildgebung hier akute, präklinische Prozesse erfasst wurden oder chronische Veränderungen, die durch bereits abgelaufene arthritische Schübe entstanden sind.

In diesem Punkt unterscheidet sich die genannte Studie von der hier vorliegenden Untersuchung: Für dPGS-ICG konnte gezeigt werden, dass es die Arthritis bereits vor der ersten Krankheitsmanifestation detektiert.

Beim Vergleich von dPGS- und dPES-ICG in weiteren Versuchen korrelierte die Höhe der FI beider KM gut mit der Score-Höhe, mit Ausnahme der Score 3-Tiere nach dPES-ICG-Gabe. Die FI unterschieden sich score-abhängig signifikant voneinander, sodass sich unterschiedliche Inflammationsgrade gut differenzieren ließen. Nach dPGS-ICG-Gabe lag die FI der SG mit Score 2 zu jedem Zeitpunkt über der FI der Augen, was für eine spezifische Anreicherung des KM im arthritischen Gelenk spricht. Das Signifikanzniveau wurde dabei früher erreicht als nach dPES-ICG-Injektion. Selbst bei einem überwiegenden Anteil von Score-0-Tieren in der dPGS-ICG-Gruppe erreichte die FI der Gelenke nach 30 Minuten ein Plateau auf hohem Niveau. Eine derart ausgeprägte Akkumulation im Bereich der Gelenke ließ sich für dPES-ICG nicht reproduzieren. Die schnelle und eindeutige Beurteilung der Inflammationsintensität bedeutet

einen geringeren zeitlichen Aufwand der Untersuchung und eine sichere Beurteilung der Befundschwere und würde für Arzt und Patienten einen Vorteil bedeuten.

DPGS-ICG scheint diesen Anforderungen zu entsprechen und liefert überzeugende Ergebnisse beim Nachweis präklinischer arthritischer Prozesse. DPES-ICG lässt grundsätzlich ebenfalls die Zuordnung von Entzündungsintensität zu FI zu, die Akkumulation des dPES-ICG in den Gelenken ist allerdings weniger ausgeprägt, was zu einer erschwerten Interpretation der Messergebnisse führen könnte.

### **5.3.2 Pharmakokinetische Aspekte der Kontrastmittel dPGS- und dPES-ICG**

Als Anhaltspunkte der Pharmakokinetik der KM wurden die FI der Augen und der Leber *in vivo* und die FI verschiedener innerer Organe nach Präparation *ex vivo* betrachtet.

#### **5.3.2.1 Fluoreszenzintensität der Augen**

Der höchste FI-Wert der Augen wurde sowohl nach dPGS- als auch nach dPES-ICG-Injektion nach zehn Minuten gemessen. Im zeitlichen Verlauf nahmen die FI-Werte kontinuierlich ab. Dabei sanken sie nach dPES-ICG-Injektion deutlich rascher. Die FI der Augen halbierte sich nach 40 Minuten (dPES-ICG), bzw. drei Stunden (dPGS-ICG) und nahm dann im zeitlichen Verlauf immer langsamer ab. Betrachtet man die FI der stark durchbluteten Augen als Indikator für die FI im Blutkreislauf, so lässt sich zusammenfassen, dass dPES-ICG deutlich schneller aus dem Blut eliminiert wurde als dPGS-ICG. Dies spricht dafür, dass Abbaumechanismen für dPES-ICG existieren und eine erfolgreiche Biotransformation des dPES-ICG zu einer beschleunigten Elimination führt. Beide KM verblieben allerdings länger als 24 Stunden im Kreislauf. Die Kinetik der FI bei Anwendung von dPGS-ICG als KM weist darauf hin, dass dPGS-ICG sogar mindestens weitere 24 Stunden nachweisbar wäre.

Der lange Verbleib im Blutkreislauf könnte auf die Bindung der hochsulfatierten Moleküle an Leukozyten-L-Selektin<sup>60</sup> zurückzuführen sein. Auch eine Bindung an positiv geladene Proteine, Lipide und andere im Blut zirkulierende Moleküle wäre denkbar.

#### **5.3.2.2 Fluoreszenzintensität der Leber**

Im Rahmen der Biotransformation in den Hepatozyten werden körpereigene und körperfremde Moleküle biochemisch verändert und ausscheidungsfähig gemacht. Mit Hinblick auf diese zentrale pharmakokinetische Rolle der Leber wurde die FI der Rattenlebern ebenso bestimmt wie die der Augen und SG. Die Leber wies bei der *in vivo* NIR-FOI als einziges inneres Organ ein detektierbares Fluoreszenzsignal auf.

Dies spricht dafür, dass dPGS-ICG und dPES-ICG von in der Leber lokalisierten Zellen aufgenommen werden und dort möglicherweise der biochemischen Transformation unterliegen. Das polysulfatierte Heparin akkumuliert ebenfalls wenige Minuten nach intravenöser Applikation in der Leber, wo es über die Endothelzellen der Lebersinusoiden aufgenommen, in Hepatozyten transportiert und dort abgebaut oder über die Gallenflüssigkeit ausgeschieden wird<sup>111,112</sup>.

Da sich nach dPES-ICG-Injektion die FI der Lebern nach 24 Stunden nur um 20 Prozent verringerte, während sich die der Augen innerhalb von 24 Stunden um über 70 Prozent reduzierte, im zeitlichen Verlauf aber immer langsamer absank, scheinen Zellen der Leber das dPES-ICG kontinuierlich aus dem Blut aufzunehmen und abzubauen oder auszuscheiden, wobei die verantwortlichen Enzyme offenbar nach 30 bis 60 Minuten gesättigt sind. Für dPGS-ICG kommt dasselbe Prinzip in Frage. Falls es einem Abbau oder einer Ausscheidung durch die Leber unterliegt, laufen diese Prozesse jedoch viel langsamer ab, als es bei dPES-ICG der Fall ist.

### **5.3.2.3 Fluoreszenzintensität verschiedener Organe ex vivo**

Die inneren Organe der Ratten wurden präpariert und 25 Stunden nach KM-Applikation ex vivo mittels NIR-FOI untersucht.

Die höchsten FI wiesen die Lebern auf, gefolgt von Nieren und Milzen. Die anderen Organe, darunter die Regionallymphknoten der SG zeigten eine wesentlich geringere FI.

Während Nieren und Milzen nach dPGS-ICG-Gabe nahezu die gleiche FI hatten, leuchteten die Milzen nach dPES-ICG-Gabe hochsignifikant stärker als die Nieren.

Die Verteilung der FI spricht dafür, dass die KM sich primär in der Leber, aber auch in Nieren und Milz für einen gewissen Zeitraum anreichern. Der Leberbefund steht in logischem Zusammenhang mit den Ergebnissen der in vivo NIR-FOI. Die erhöhte FI der Niere könnte hinweisend auf eine zumindest teilweise Elimination der KM über den Harn sein.

In Bezug auf die Milz ist ein Zusammenhang zwischen Akkumulation und Immundefizienz der Milz denkbar. Beispielsweise könnten die Makromoleküle an die hier vorhandenen Makrophagen binden. Dieser Effekt ist bei dPES-ICG als KM deutlich stärker ausgeprägt als bei dPGS-ICG.

Die Anreicherungsmuster der mit ICG gekoppelten hochsulfatierten Makromoleküle korrelieren sehr gut mit einer Studie von Bunting et al. zu Heparin, bei der radioaktiv markiertes Heparin Ratten injiziert wurde und die anschließende Verteilung des Heparins im Körper bestimmt wurde. Hierbei bestand die höchste Konzentration ebenfalls in der Leber, gefolgt von Niere und

Milz<sup>113</sup>. Auch andere Studien, in denen verschiedenen Spezies (Mensch, Kaninchen, Ratte) radioaktiv markiertes Heparin gespritzt wurde, kamen zu dem Ergebnis, dass der weitaus größte Anteil des Heparins in der Leber nachweisbar war, wobei auch Nieren und Milz relevante, wenn auch deutlich geringere Anteile aufnahmen<sup>114,115</sup>.

### **5.3.2.4 Zusammenfassung der pharmakokinetischen Erkenntnisse zu dPGS- und dPES-ICG**

Die Signalintensität der Augen diente in der vorliegenden Arbeit in Anlehnung an andere Veröffentlichungen<sup>66</sup> bei der NIR-FOI als Parameter zur Bestimmung der Signalintensität des Blutes und somit der Pharmakokinetik der KM im Kreislauf.

Die gemessene Maximal-FI der Augen halbierte sich nach dPES-ICG-Gabe nach ca. drei Stunden. Nach dPGS-ICG-Injektion betrug die FI der Augen nach 24 Stunden noch 75 Prozent der maximalen FI. Auch in entzündeten Arealen fiel die FI nach dPES-ICG-Applikation in kürzerer Zeit ab.

Es konnte also gezeigt werden, dass dPES-ICG schneller eliminiert wird als dPGS-ICG. Da sich Ladung und Molekülgröße der beiden Substanzen entsprechen, kommen als Ursache für diese unterschiedliche Pharmakokinetik am ehesten die Estergruppen im Gerüst des dPES in Frage, durch die es sich von dPGS unterscheidet. Diese scheinen entsprechend der eingangs genannten These zu einem verbesserten Bioabbau zu führen; vermutlich als direkter Angriffsort von Esterasen. Hierzu kommen unter anderem ubiquitär existierende Carbonsäureesterasen in Frage. Diese lassen sich unterteilen in Typ 1 und Typ 2. Die Carbonsäureesterase 1 kommt in erster Linie in der Leber vor, ist in geringerem Umfang aber auch gastrointestinal, in der Niere und anderen Organen und in Monozyten bzw. Makrophagen zu finden. Die Carbonsäureesterase 2 befindet sich vorrangig im Gastrointestinaltrakt sowie in kleineren Mengen in der Leber<sup>116</sup>. Insbesondere die Leber kommt folglich als Abbauort des dPES in Frage. Dazu passt die Kinetik der FI des KM, die in vivo in der Leber bestimmt wurde. Ebenso wird diese These durch die Ergebnisse des semiquantitativen Nachweises der Makromoleküle gestützt, die unten diskutiert werden.

Über den Nieren konnte beim in vivo-Imaging während der NIR-FOI mit beiden KM kein Signal festgestellt werden. Ex vivo betrug die Signalintensität der Nieren nach dPES-ICG-Gabe nur 22 Prozent der FI der Leber, nach dPGS-ICG-Gabe 39 Prozent. Dies kann als weiteres Indiz für eine überwiegend hepatische Elimination gewertet werden. Die Rolle der Niere bei der Ausscheidung ist als geringer einzuschätzen. Dies kann bei Nierenfunktionseinschränkungen vorteilhaft sein. Von iodierten KM, die nahezu vollständig durch glomeruläre Filtration eliminiert werden, ist bekannt, dass sie die Nierenfunktion stark beschädigen und bis zum akuten Nierenversagen

führen können<sup>117</sup>. Mit dieser ernsten Komplikation ist bei Verwendung von dPGS- oder dPES-ICG nicht zu rechnen.

### **5.3.3 Fazit zum Potenzial der diagnostischen Anwendung von dPGS- und dPES-ICG als Kontrastmittel in der NIR-FOI zur Darstellung der rheumatoiden Arthritis**

Die NIR-FOI bei Ratten mit CIA zeigte sich als einfaches und schnelles bildgebendes Verfahren. Tiere und Personal wurden während der Experimente keinerlei Strahlung ausgesetzt, die Untersuchung war ohne spezielle Sicherheitsvorkehrungen durchführbar. Es ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse der NIR-FOI mit dPGS- und dPES-ICG leicht und sicher reproduzierbar sind, da sie nicht von der Fertigkeit des Untersuchenden abhängen.

Mit dPGS-ICG gelangen die Detektion bereits subklinischer Entzündungsvorgänge und eine eindeutige Differenzierung verschiedener Schweregrade der Arthritis. Beide KM zeigten eine ausgeprägte Akkumulation in den entzündeten Gelenken, dPGS-ICG reicherte sich hier noch stärker an als dPES-ICG (bezogen auf die FI der Augen als jeweiliger Vergleichsparameter). Beide KM ermöglichten die Differenzierung verschiedener Scores, mit dPES-ICG wurden signifikante Unterschiede aber teils erst nach mehreren Stunden gemessen. Zukünftig sollte untersucht werden, ob eine Dosisanpassung die Differenzierung verbessern kann. Weiterhin steht eine Untersuchung zum Nachweis subklinischer Entzündung mit dPES-ICG noch aus.

Aufgrund der Fähigkeit der hier verwendeten KM in der NIR-FOI schon früheste entzündliche Veränderungen zu entdecken, besteht das Potenzial, das Verfahren als schnelle, simple und sichere Bildgebung in der Erstdiagnostik der RA anzuwenden und wegen der guten Ergebnisse zur Differenzierung verschiedener Inflammationsschweregrade ebenso zur Verlaufskontrolle einer bereits bekannten RA zu nutzen. Daher sollte die NIR-FOI mit dPGS-ICG und dPES-ICG als mögliche Alternative zu bisherigen diagnostischen Verfahren für Arthritiden in Betracht gezogen werden.

Ob dPGS- und dPES-ICG als KM gegenüber reinem ICG Vorteile aufweisen, ist zum jetzigen Zeitpunkt schwer einzuschätzen, da eine direkte Gegenüberstellung dieser KM aktuell noch aussteht. Im Gegensatz zu reinem ICG scheinen dPGS- und dPES-ICG in entzündetem Gewebe zu akkumulieren. Da ICG zu ca. 98% an Plasmaproteine gebunden vorliegt und mit einer Halbwertszeit von zehn Minuten einer schnellen Ausscheidung über die Leber unterliegt, ist nicht davon auszugehen, dass sich dieser Farbstoff extravasal anreichert<sup>26</sup>. Die Anreicherung im entzündeten Gewebe könnte allerdings einen Vorteil gerade bei früher und gering ausgeprägter Arthritis darstellen. Um diese Thesen zu prüfen, sollte ein direkter Vergleich von ICG und dPGS- bzw. dPES-ICG in Zukunft erfolgen.

Bezüglich der pharmakokinetischen Eigenschaften zeigt dPES-ICG den Vorteil, dass es besser abgebaut und schneller eliminiert werden kann. Nebenwirkungen wurden bei keinem der KM im Rahmen der durchgeführten Experimente beobachtet.

Kommende Versuche sollten größere Tierzahlen einschließen und nach dem Vorbild von Werner<sup>26</sup> die NIR-FOI mit dPGS- und dPES-ICG mit den herkömmlichen diagnostischen Methoden wie MRT und US vergleichen.

Abschließend muss noch einmal unterstrichen werden, dass dPGS- und dPES-ICG in unabhängigen Versuchen angewendet wurden und in unterschiedlichen Konzentrationen verabreicht wurden (dPGS-ICG: 2 mg/kg KG, dPES-ICG: 1,4 mg/kg KG). Auch die Beladung der Moleküle mit ICG unterschied sich. Konzentrationsabhängige Effekte können daher nicht direkt miteinander verglichen werden. Sollte die Elimination der Stoffe im Bereich der verabreichten Mengen konzentrationsabhängig sein, wären die getroffenen Aussagen zur jeweiligen Verweildauer im Körper zu relativieren.

### **5.4 Die therapeutische Anwendung von dPGS und dPES bei CIA**

In mehreren unabhängigen Versuchen wurden dPGS und dPES Ratten mit CIA in einer Dosis von 30mg/kg KG über acht bis 15 Tage s.c. verabreicht. Die behandelten Tiere wurden mit Hinblick auf Rheumascores und Zellularität der Synovialflüssigkeiten mit nicht therapierten Kontrolltieren verglichen (Bioconjuc Chem; Manuskript in Vorbereitung). Auch die Akkumulation der hochsulfatierten Makromoleküle in verschiedenen Geweben wurde untersucht. Des Weiteren fand wegen der strukturellen Ähnlichkeit der Moleküle zu Heparin eine Analyse der Gerinnungsfähigkeit nach Therapie statt.

#### **5.4.1 Klinisches Outcome**

Die Therapie der Ratten mit dPGS und dPES erfolgte mit 30 mg/kg KG in einer sehr hohen Dosis. Die Tiere zeigten sich zu jedem Zeitpunkt agil und nahmen über den Versuchszeitraum stetig an Gewicht zu. Die Gewichtskontrollen als Parameter des Allgemeinzustandes der Tiere ergaben eine gute Verträglichkeit der Substanzen auch bei hoher Dosierung.

Weiterhin zeigte sich, dass die Therapie die klinischen Symptome der Tiere deutlich reduzierte (Manuskript in Vorbereitung).

Um den Effekt von dPGS und dPES auf die klinische Symptomatik zu ermitteln, wurde die Ausprägung der Arthritis anhand eines festgelegten Schemas bestimmt, welches sich an den klassischen Entzündungszeichen orientierte (siehe Tab. 6). Durch dieses Verfahren ließen sich schnell und nahezu ohne Belastung für die Tiere arthritische Scores erheben. Die Bestimmung

wurde für alle Versuche von *einem* festgelegten Untersucher vorgenommen. Dadurch wurde eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ermöglicht, die Subjektivität der Befunde blieb jedoch weiterhin bestehen. Andere Methoden wie die Bestimmung von Laborparametern im Verlauf oder die digitale Messung des Gelenkumfangs hatten sich im Vorfeld als zu belastend für die Tiere oder als ungenau erwiesen.

Es stellte sich heraus, dass die erhobenen Scores in den behandelten Gruppen signifikant niedriger ausfielen als in den unbehandelten. Dabei lagen die Mittelwerte der dPES-Ratten noch unter denen der dPGS-Ratten und befanden sich somit nahezu auf dem Niveau der gesunden Kontrolltiere. Bemerkenswert dabei war auch, dass die ausgeprägte Wirksamkeit der beiden Moleküle gleichermaßen in Versuchsgruppe V1 als auch in Gruppe V4 auftrat. Die Tiere aus V4 hatten eine doppelte Dosis an Kollagen erhalten und die Therapie wurde erst nach der Boosterung (statt wie in V1 ab der ersten Kollageninjektion) begonnen und nur für acht statt 15 Tage durchgeführt.

Dies weist darauf hin, dass dPGS und dPES auch bei verzögerter Anwendung ihre volle Wirkung entfalten können und dies auch unter Verstärkung des autoimmunen Triggers. Sie sind damit sowohl in sehr frühen als auch in weiter fortgeschrittenen Krankheitsstadien hochwirksam. Einschränkend muss hier die unvollkommene Zuverlässigkeit des angewandten Modells erwähnt werden.

### **5.4.2 Auswirkung der Therapie auf die Leukozytenzahlen in Synovialflüssigkeitsausstrichen**

Zur weiteren Evaluation der Wirksamkeit der hochsulfatierten Makromoleküle wurde zum Abschluss der Behandlung Synovialflüssigkeit aus den SG der CIA-Ratten gewonnen. Es wurden Ausstriche angefertigt, welche nach erfolgter Färbung ausgezählt wurden.

In den Ausstrichen der mit dPGS und dPES behandelten Ratten befanden sich hochsignifikant weniger Zellen als in den Ausstrichen der nicht therapierten Tiere (Manuskript in Vorbereitung). Ähnlich wie bei den Arthritis-Scores fiel auch hier auf, dass der Effekt der Behandlung in V4 nahezu genauso ausgeprägt war wie in V1.

In den Ausstrichen der nicht behandelten Tiere aus V4 befanden sich fast zwei Mal so viele Leukozyten wie in den Ausstrichen der unbehandelten Tiere aus V1. In V4 war die doppelte Menge an Kollagen verabreicht worden. Dies zeigt, dass die Ausprägung der Inflammation von der Kollagenmenge abhängt. Die Leukozytenzahlen in den mit dPGS und dPES behandelten Gruppen waren sehr niedrig und unterschieden sich in V4 und V1 kaum. Darin stimmen die Ergebnisse der Ausstrichauszählung gut mit denen der Score-Erhebung überein und zeigen, dass

dPGS und dPES auch bei einem starken Entzündungsreiz selbst bei Einsatz in einem späten Stadium der Krankheitsentwicklung hochpotent sind und die Inflammation wirksam unterbinden. Die mit Abstand größte Zellpopulation in den Ausstrichen unbehandelter CIA-Ratten bestand aus Neutrophilen, gefolgt von Lymphozyten und Monozyten. Vor allem die Ergebnisse aus V4 decken sich gut mit denen von Erlandsson Harris et al.<sup>118</sup>, in deren Untersuchung im CIA-Modell der Ratte die gleichen Prozentsätze an Granulozyten und Monozyten in Synovialflüssigkeitsausstrichen bestimmt wurden wie in der vorliegenden Arbeit. Mit 8% Lymphozyten trägt diese Population in der Studie von Erlandsson Harris jedoch einen deutlich kleineren Anteil an der Zellzusammensetzung als es hier der Fall war<sup>118</sup>. Erlandsson Harris et al. analysierten allerdings ausschließlich Ausstriche von Tieren mit maximal erreichbarem Score und gewannen die Synovialflüssigkeit aus dem Kniegelenk, was die Abweichung erklären könnte.

Auch in humaner Synovialflüssigkeit beträgt der Anteil an Neutrophilen bei RA zwischen 50 und 90 %<sup>119</sup>. Hier wird die Nähe des Tiermodells zur humanen RA deutlich. Während Neutrophile in der Synovialmembran selbst kaum vorhanden sind, befanden sich in der Synovialflüssigkeit im Schnitt 11000 bis 19000 Leukozyten<sup>120</sup>. Nach einer Studie von Keefer et al. sind Eosinophile in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA selten zu finden<sup>121</sup>, was sich ebenfalls mit den hier vorgestellten Resultaten deckt.

Interessant wäre für zukünftige Untersuchungen, ob die Resultate der Behandlung auch dann signifikant ausfallen, wenn die Therapie erst einige Zeit nach Einsetzen der Symptome begonnen wird, um eine realitätsnahe Ausgangssituation zu schaffen.

### **5.4.3 Nachweis und Verteilung von dPGS und dPES in histologischen Schnitten innerer Organe**

Um beurteilen zu können, ob die therapeutisch verwendeten hochsulfatierten Makromoleküle im Gewebe akkumulieren, wurden Paraffinschnitte verschiedener Organe angefertigt und mit AB, welches an die Makomoleküle bindet, gefärbt.

Abwandlungen dieser Methoden ermöglichten den qualitativen und semiquantitativen Nachweis von dPGS und dPES.

#### **5.4.3.1 Qualitative Analyse**

Die qualitative Untersuchung zeigte, dass der blaue Farbstoff vor allem in Organen der mit dPGS behandelten Tiere stärker bindet. Oft konnte die Färbung bestimmten Strukturen zugeordnet werden, teilweise fiel sie dafür zu schwach aus. Auch in den Organen der mit dPES therapierten

Tiere konnte in einigen Fällen eine deutliche Färbung festgestellt werden, häufig jedoch nicht stärker als in den Organen der Kontrolltiere.

Dies traf zu auf die Dünndarm- und Nierenschnitte, in denen nach Behandlung mit dPES optisch kein deutlicher Unterschied zur NaCl-Gruppe festzustellen war.

Hierzu ist anzumerken, dass die Hyaluronidase alternative Bindungspartner verdauen sollte, sodass in den NaCl-Schnitten keinerlei Blaufärbung nachzuweisen wäre. Tatsächlich zeigten aber auch diese Schnitte schwach blau gefärbte Areale. Dies ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass die Hyaluronidase als Endo- $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase  $\beta$ -1-4 glycosidische Bindungen spaltet, wie sie in Hyaluronsäure, Chondroitin und Chondroitinsulfat vorkommen<sup>122</sup>. Die Hauptspaltprodukte des Enzyms entsprechen Tetra- und Hexasacchariden<sup>123</sup>. Einige sulfatierte GAG werden jedoch nur partiell oder gar nicht durch die Hyaluronidase abgebaut. Dazu gehören Moleküle wie Dermatan sulfat, Heparan sulfat und Heparin<sup>124,125</sup>. Die beiden Letzteren gelten sogar als Inhibitoren der Hyaluronidase<sup>126,127</sup>. Auch nach Inkubation mit Hyaluronidase bleiben in den Paraffinschnitten also alternative Bindungspartner neben dPGS, dPES und Heparin für AB erhalten.

Nach dPGS-Behandlung war die Färbung vor allem in der Leber und der Niere prominent, etwas weniger ausgeprägt auch in der Milz, was für eine vermehrte Akkumulation der sulfatierten Makromoleküle in diesen Organen spricht. Das AB ließ sich meist intrazellulär nachweisen und schien teilweise auch den Zellkern gefärbt zu haben, sodass davon ausgegangen werden kann, dass einige Zelltypen dPGS aufnehmen und möglicherweise auch in den Nukleus transportieren. Zu den gefärbten Zellen der Niere zählten vor allem Zellen der proximalen Tubuli im Rindbereich. Von den proximalen Tubuli ist bekannt, dass sie mit verschiedenen Organic Anion Transportern (OAT), welche Affinitäten zu einer Vielzahl von negativ geladenen Molekülen besitzen, ausgestattet sind. Speziell OAT1 wird an der basolateralen Membran exprimiert und nimmt Moleküle mit negativer Ladung auf<sup>128</sup>. Es ist daher durchaus denkbar, dass hier auch ein Transport von dPGS und dPES, möglicherweise in degradiert Form, stattfindet.

In der Milz zeigten sich die Begrenzungen der Sinusoide und Zellen im Extravasalraum in der dPGS- und in der dPES-Gruppe gefärbt. Bei den einzelnen gefärbten Zellen handelte es sich überwiegend um große Zellen mit einem ebenfalls großen Nukleus, welche morphologisch als Makrophagen identifiziert werden konnten. Wegen ihrer typischen Fähigkeit zur Phagozytose scheint es wahrscheinlich, dass sie auch die hochsulfatierten Makromoleküle aufnehmen können. Die Aufnahme durch humane Monozyten wurde bereits in einem Paper von Licha et al<sup>66</sup> beschrieben.

Auch in der Leber könnte die Aufnahme durch organische Anionen Transporter Proteine erfolgt sein. An den basalen Seiten der Hepatozyten werden spezifische Transporter wie Organic Anion Transporter Protein B1 (OATP1B1) und OATP1B3 exprimiert, für welche auch der Transport von größeren makromolekularen Polyanionen beschrieben ist<sup>129</sup>. Dafür spricht die Färbung der Zellen an der Begrenzung zum Lebersinus, wo sich neben den Endothelzellen auch die basale Seite der Hepatozyten befindet. Weiterhin fielen in der Leber vor allem in der dPGS-Gruppe einzelne Hepatozyten und Zellen in den Lebersinusoiden (vermutlich Kupffer'sche Zellen) auf, deren Zytoplasma blau gefärbt war. Der intrazelluläre AB-Nachweis konnte in der dPES-Gruppe nur für die Endothelzellen, bzw. die basalen Hepatozytenmembranen gezeigt werden. Die Färbung der Kupfferzellen erschien hier weniger eindeutig.

Auch im Dünndarm zeigte sich vor allem nach dPGS-Behandlung eine Färbung einzelner Zellen, vermutlich Makrophagen.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass dPES einem schnelleren Abbau bzw. einer zügigeren Ausscheidung unterliegt als dPGS. Dafür sprechen auch die Daten der NIR-FOI-Versuche, die zeigen, dass das durch dPES-ICG ausgelöste Nahinfrarotsignal im Blutkreislauf innerhalb von Minuten an Intensität verliert. Ein alternativer Erklärungsansatz für die unterschiedliche Präsenz der Färbung wäre, dass dPES in geringerem Maße als dPGS von Zellen endozytiert oder transportiert wird und daher in kleineren Mengen in den Organen nachweisbar ist. Es muss dabei kritisch beleuchtet werden, dass es keinen Nachweis darüber gibt, ob sich dPES und dPGS durch AB in gleichem Maße anfärben lassen. Hier gilt, dass die Bindung des AB ist abhängig ist von der Ladung des Bindungspartners. Da dPGS und dPES die gleiche Anzahl an Sulfatgruppen besitzt (ca. 60 pro Molekül), bestehen deshalb für beide Moleküle die gleichen Grundvoraussetzungen für eine Anfärbbarkeit mit AB.

In den Regionallymphknoten befanden sich einzelne, teils auch nah beieinander liegende große Zellen, die eine tief blaue Färbung aufwiesen, wie sie sonst in keinem anderen Gewebe auftrat. Größe, Intensität der Färbung und Lokalisation der Zellen sprechen dafür, dass es sich um Mastzellen handelte, deren heparinreiche Granula einen optimalen Bindungspartner für AB darstellen. Mit Ausnahme dieser Zellen und der hochendothelialen Venulen der Lymphknoten ließen sich jedoch weder in den Regionallymphknoten der SG noch in Lymphknoten des MALT blau gefärbte Zellen oder Strukturen nachweisen. Gleiches gilt für die weiße Milzpulpa.

Da dPGS und dPES nach Bindung an Endothelzellen oder Leukozyten deren Extravasion hemmen, gelangen diese nicht in den Interzellulärraum und folglich nicht in die Lymphbahn, was die Ursache für ein Fehlen AB-positiver Leukozyten, speziell Makrophagen, in den Lymphknoten/-follikeln darstellen könnte. Dies hebt die Wirksamkeit von dPGS und dPES auf

molekularer Ebene hervor. Wenn bereits aktivierte Leukozyten davon abgehalten werden, in lymphatische Gewebe einzuwandern, ließe sich dort die Aktivierung weiterer Leukozyten sowie deren Proliferation und Differenzierung verhindern. Diese indirekte Inhibition der Leukozyten würde also einen weiteren erheblichen therapeutischen Nutzen bedeuten.

### **5.4.3.2 Methodik und Ergebnisse der semiquantitativen Bestimmung der Substanzen**

Die beschriebene Methodik wurde in der vorliegenden Arbeit neu etabliert. Im Verlauf entwickelte sie sich zu einer komplexen Kombination verschiedener Schritte, die dazu dienen sollte, möglichst aussagekräftige und sichere Ergebnisse zu erhalten.

Als besonders aufwändig und fehleranfällig zeigte sich die Bestimmung der DNA-Konzentration. Die Gewinnung der Paraffinschnitte erfolgte am Mikrotom. Trotz sorgfältiger Handhabung der Schnitte, Reinigung der Utensilien und des Arbeitsplatzes mit DNAase und Verwendung sterilen Wassers muss davon ausgegangen werden, dass die Schnitte vor und während des Transfers ins Eppendorf-Gefäß in geringem Maße mit DNA kontaminiert wurden.

Die anschließende Entparaffinierung der Organschnitte in den Eppendorf-Gefäßen war wegen der vielen Schritte zeitaufwändig. Zusätzlich erwies es sich trotz Zentrifugation als schwierig, den Überstand, in dem sich das Paraffin gelöst hatte, ohne Verlust von Gewebematerial abzupipettieren. Durch elektrostatische Wechselwirkungen stiegen kleine Teilchen beim Herausholen der Gefäße aus der Zentrifuge auf und gerieten in den Überstand. Außerdem wurden sie auch bei vorsichtigem Pipettieren vom Sog angezogen. Der Verlust kleinster Gewebesteilchen ließ sich daher nicht vermeiden.

Die Bildung von DNA/Flächen-Quotienten zeigte, dass je nach Organ unterschiedlich viel DNA pro Quadratmillimeter nachzuweisen war. Dieses Ergebnis kann mit der unterschiedlichen geweblichen Zusammensetzung der Organe zusammenhängen. Mehreren Studien zufolge enthalten Hepatozyten im Schnitt mehr DNA pro Nukleus als Zellen der Niere und Milz<sup>130,131</sup>, sodass in einem definierten Gewebevolumen die höchste DNA-Menge in der Leber zu erwarten wäre. Studien von Kirby und Goldspink stimmten dagegen darin überein, dass pro Gramm Lebergewebe (Nassgewicht) ca. 0,2 mg DNA nachweisbar waren. Dabei zeigte Goldspink, dass die Niere ca. ein Drittel mehr DNA enthielt als die Leber und nach Kirby ließ sich in der Milz je nach Methode bis zu neun Mal mehr DNA nachweisen als in der Leber<sup>132,133</sup>. Kirby konnte allerdings zeigen, dass die Ausbeute an DNA je nach gewählter Methode sehr unterschiedlich ausfiel. Den genannten Studien steht das Ergebnis eines anderen Papers entgegen, in dem Norell eine Menge von 2 mg DNA pro Gramm Lebergewebe bestimmte<sup>134</sup>. Tatsächlich untermauert dies, dass die DNA-Quantifizierung als stark methodenabhängig zu bezeichnen ist. Insgesamt

## Diskussion

bestätigen die Erkenntnisse der genannten Studien die in dieser Arbeit ermittelten organspezifischen DNA-Mengen nicht.

Es führten beide in dieser Arbeit angewandten Methoden (AB/DNA und AB/Fläche) zu sehr ähnlichen Resultaten, die sich folglich gegenseitig stützen.

Dass keine der oben genannten Studien eine Quantifizierung an Paraffinschnitten vornahm, könnte eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse darstellen.

Zukünftige Untersuchungen sollten zum Ziel haben, über die semiquantitative Bestimmung hinaus konkret quantitative Angaben zur AB-Konzentration machen zu können. Hierzu wäre ein Bezug der AB-Konzentration auf das Gewebegewicht sinnvoll. Die Schwierigkeit eines solchen Vorhabens liegt in der Herstellungsweise der hochsulfatierten Makromoleküle durch Polymerisation. Die entstehenden Moleküle besitzen kein definiertes Molekulargewicht, sondern eine Molekulargewichtsverteilung ähnlich wie bei Heparin und lassen somit kaum eine eindeutige, quantitative Konzentrationsbestimmung zu.

Es wäre denkbar, in einem Sandwich-Verfahren ähnlich dem ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) eine definierte Menge an dPGS oder dPES über einen Antikörper an eine feste Phase zu binden und anschließend mit AB als zweiten Antikörper zu färben. Ähnlich wie in der verwendeten Methodik könnte nach mehreren Waschschritten das AB mit Guanidin-HCL gelöst und anschließend photometrisch quantifiziert werden. Würde man dieses Experiment noch öfter wiederholen, ließe sich einer AB-Konzentration möglicherweise eine gemittelte Konzentration des Polymerisationsgemisches zuordnen. Die Ergebnisse der vorliegenden Versuche könnten dann genutzt werden, um genauere Angaben zur Konzentration der Therapeutika zu machen.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass sich alle therapeutisch verwendeten sulfatierten Moleküle in jeweils anderen Organen am stärksten wiederfinden.

Die quantitative Analyse wurde an Leber, Niere und Milz durchgeführt. Dies begründet sich in der besonderen Bedeutung dieser Organe bezüglich pharmakokinetischer oder immunologischer Funktionen. Letzteres bezieht sich vor allem auf die Milz. Bei fünf bis zehn Prozent der Patienten mit unkomplizierter RA kann eine Splenomegalie nachgewiesen werden<sup>135</sup>. Ebenso gibt es Hinweise auf eine eingeschränkte Funktion der Milz bei Patienten mit aktiver RA<sup>136</sup>.

Weiterhin hatte sich in den drei genannten Organen in der qualitativen Methode der deutlichste Nachweis der Makromoleküle gezeigt.

Die höchsten AB-Konzentrationen fanden sich in der dPGS-Gruppe in der Milz gefolgt von Leber und Niere, während sich in der dPES-Gruppe die Leber am stärksten anfärbte, danach

Niere und Milz. Die Nieren der mit Heparin behandelten Tiere enthielten am meisten AB, während die AB-Konzentrationen in Milz und Leber sehr nah beieinander lagen.

Die Organe der dPGS- und dPES-Gruppe unterschieden sich in der AB-Konzentration immer mindestens signifikant von der NaCl-Gruppe, während ein signifikanter Unterschied zur Heparin-Gruppe nur bei den Nieren vorlag. Ansonsten lagen die AB-Werte der Heparin- und der NaCl-Gruppe sehr nah beieinander. Mit Blick auf diese Resultate kann angenommen werden, dass Heparin einem schnelleren Abbau durch den Körper unterliegt als die beiden synthetischen Makromoleküle. Da der Abbau der natürlich vorkommenden Verbindung Heparin über Heparinasen in Leber und Niere erfolgt oder die Substanz unverdaut über den Harn eliminiert wird<sup>137</sup>, liegt dieser Schluss nahe.

Dabei muss allerdings beachtet werden, dass dPGS und dPES in einer täglichen Konzentration von 30 mg/kg KG appliziert wurden, während die verabreichte Menge an Heparin im Mittel nur bei 11 mg/kg KG lag (die Dosis musste wegen stark erhöhter INR-Werte im Verlauf des Experiments immer wieder verringert werden). Weiterhin wurde Heparin ebenso wie die anderen Substanzen subkutan appliziert. Es ist bekannt, dass die Bioverfügbarkeit von Heparin bei subkutaner Gabe erheblich eingeschränkt ist<sup>138</sup>. Des Weiteren fällt auf, dass die AB-Konzentrationen der mit den synthetischen Makromolekülen behandelten Tiere (vor allem dPGS) einer breiten Streuung unterlagen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies mit einer interindividuellen Fähigkeit zur biochemischen Verwertung der Moleküle zu tun hat (wie z.B. die heterogene Ausstattung mit Leberenzymen).

### **5.4.4 Auswirkungen auf die Gerinnungszeit**

DPGS war zunächst mit dem Ziel entwickelt worden, ein synthetisches Ersatzmittel für Heparin zu erhalten. Auch wenn dies verworfen wurde, liegt wegen der strukturellen Ähnlichkeit von dPGS und dPES zu Heparin nahe, dass eine Beeinflussung der Blutungsneigung nicht auszuschließen ist. Daher wurde zum Versuchsende die aPTT der Ratten bestimmt. Alle drei Substanzen erhöhten die aPTT im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant. Die aPTT-Werte der Kontrollgruppe stimmten dabei gut überein mit den Ergebnissen einer Studie von Lemini et al, bei denen die Gerinnungszeiten gesunder Wistar-Ratten bestimmt wurden<sup>139</sup>. Heparin zeigte wie erwartet eine deutliche Erhöhung des Wertes. Während die Auswirkungen des dPGS auf die aPTT milde ausfielen, war die aPTT nach Therapie mit dPES verlängert. Ähnliche Resultate ergaben sich aus der Messung des INR. Sowohl dPGS als auch dPES hatten jedoch geringere Auswirkungen auf die aPTT als Heparin, obwohl sie im Schnitt in einer dreifach höheren Dosis verabreicht wurden. Zusätzlich war die Wirksamkeit des Heparins durch die subkutane

Verabreichung vermindert. Es wäre interessant, in diesem Zusammenhang die Dosis-Wirkungs-Beziehung von dPGS und dPES genauer zu untersuchen, um den therapeutisch sicheren Bereich zu ermitteln. In Einzelfällen könnte eine leichte gerinnungshemmende Wirkung einen positiven Effekt widerspiegeln: Die RA geht mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einher, häufig unter Beteiligung der Koronargefäße, die in einer reduzierten Lebenserwartung resultiert<sup>140</sup>. Ein antientzündlich wirkendes Medikament mit einer zusätzlichen gerinnungshemmenden Wirkkomponente könnte hier von Vorteil sein.

### **5.5 Vergleich der Ergebnisse aus dem diagnostischen und dem therapeutischen Ansatz – organische Anreicherung der Makromoleküle mit und ohne Kopplung an ICG**

Die NIR-FOI der inneren Organe ex vivo nach Applikation von dPGS-ICG und dPES-ICG und die AB-Konzentration der Organe nach therapeutischer Anwendung von dPGS und dPES zeigen unterschiedliche Resultate. Die KM reicherten sich mit Abstand am stärksten in der Leber an. Die Signalintensitäten von Milz und Niere nach dPGS-ICG-Gabe waren nahezu gleich, nach dPES-ICG-Gabe fluoreszierte die Milz deutlich stärker als die Niere. Die Reihenfolge der AB-Konzentration in den Organen nach Behandlung mit dPGS oder dPES stellte sich anders dar: Die mit dPGS behandelten Tiere wiesen am meisten AB in der Milz auf, gefolgt von Leber und Niere, die Tiere der dPES-Gruppe besaßen die höchste AB-Menge in der Leber, gefolgt von Niere und Milz.

Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise durch die Anwendungsarten erklären. Während die KM i.v., in Mengen von 1,4 bis 2 mg/kg KG gespritzt wurden und die Auswertung der KM-Verteilung bereits 25 Stunden nach Applikation erfolgte, wurden die Makromoleküle bei therapeutischer Anwendung über neun Tage s.c. verabreicht in Dosen von 30 mg/kg KG. Diese ausgeprägte Abweichung spricht für ein dosis- und applikationsdauerabhängiges Verhalten von dPGS und dPES. Auch die Art der Verabreichung (i.v. vs. s.c.) und die Konjugation mit dem Fluoreszenzfarbstoff ICG müssen als Ursachen für die abweichenden Verteilungsmuster in Betracht gezogen werden.

### **5.6 Fazit zum Potenzial von dPGS und dPES zur therapeutischen Anwendung bei rheumatoider Arthritis**

Aufgrund der in dieser Arbeit demonstrierten guten Verträglichkeit von dPGS und dPES könnten sie sichere Substanzen in der Therapie der Arthritis darstellen.

Die hochsignifikanten Resultate zur positiven Beeinflussung der klinischen Symptomatik, gestützt durch die ebenfalls hochsignifikante Reduktion der Entzündungszellzahlen in den Synovialflüssigkeiten von Ratten mit CIA zeigen, dass dPGS und dPES potente Inhibitoren der rheumatischen Gelenkinflammation darstellen. Entsprechend kann ausgehend von dieser Arbeit eine gute Wirksamkeit angenommen werden. Weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Versuchstieren sowie variierenden Dosierungen wären für die Zukunft wünschenswert. Wichtig wäre mit Hinblick auf eine realitätsnahe Therapiesituation auch die Untersuchung der Wirksamkeit, wenn der Beginn der Behandlung später erfolgt, beispielsweise erst einige Zeit nach Einsetzen erster Symptome.

Die pharmakokinetischen Aspekte der Therapie mit dPGS und dPES sind im Gegensatz zu ihrer Wirksamkeit weniger gut geklärt. Es zeigte sich in den Therapiegruppen im Mittel eine bis zu 2.6-fach stärkere AB-Färbung der Organe als in der Kontrollgruppe. Die Anreicherung der Makromoleküle vor allem in Leber, Niere und Milz ist gesichert. Die konkret im Gewebe vorhandene Menge ist aber unbekannt ebenso wie die biochemischen Prozesse, denen die Moleküle unterliegen. Ob die Makromoleküle nachweisbar sind, weil sie in den entsprechenden Organen metabolisiert werden, oder ob sie als unverdauliches Material abgelagert werden, geht aus der AB-Methode nicht hervor. Versuche mit U937-Zellen (siehe unten) sprechen aber dafür, dass zelluläre Mechanismen zum Abbau und/oder zum Austransport der Moleküle aus den Zellen existieren.

Ungeklärt ist auch der Weg der Ausscheidung. Da die Makromoleküle sowohl in der Leber als auch in der Niere nachgewiesen wurden, könnten parallel eine hepatische und renale Elimination vorliegen. Dies ist jedoch nicht abschließend analysiert. Insgesamt war in den Organen der mit dPGS behandelten Tiere eine höhere AB-Konzentration zu finden als bei den dPES-Tieren (mit Ausnahme der Niere). Die Esterbindungen des dPES-Gerüsts tragen demnach möglicherweise zu dessen besserer Bioabbaubarkeit bei. Um dies genauer zu untersuchen, wurde eine Testreihe an U937-Zellen vorgenommen (s.u.). Eine Aufklärung der pharmakokinetischen Vorgänge, denen dPGS und dPES unterliegen, ist unabdingbar und es sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

### **5.7 Nachweis der Moleküle in U937-Zellen**

Die qualitativen Untersuchungen zur Verteilung der polysulfatierten Makromoleküle im Körper sind deutliche Hinweise auf eine intrazelluläre Anreicherung von dPGS beispielsweise in Zellen der Leber und Niere. Frühere Studien zeigten eine intrazelluläre Anreicherung in kultivierten humanen Monozyten und A549-Zellen<sup>66</sup>. Bislang lagen aber keine Versuche zur intrazellulären

Verweildauer des Polyglycerolsulfats vor. Da die Morphologie der Zellen, welche sich in den histologischen Untersuchungen AB-positiv darstellten, der von Makrophagen entspricht, wurde ein entsprechendes *in vitro* Kulturmodell für weitere Untersuchungen verwendet. Hierzu dienten U937-Zellen nach Differenzierung in Richtung Makrophagen und Inkubation mit dPGS und dPES. Es zeigte sich, dass die Makromoleküle, welche die Zellen innerhalb von zwei Tagen aufgenommen hatten, nach 10 Tagen nicht mehr nachweisbar waren.

Auch Heparin wird von U937-Zellen aufgenommen<sup>141,142</sup>. Unter Berücksichtigung der strukturellen Ähnlichkeit zu Heparin, ist es vorstellbar, dass dPGS und möglicherweise auch dPES die gleichen Transporter zur Verfügung stehen wie Heparin. Für Heparin ist bekannt, dass es über den Hyaluronic Acid Receptor (HARE/Stabilin-2), der auf sinusoidalen Endothelzellen der Leber, der Milz und Lymphknoten lokalisiert ist, endozytiert wird. Über den Rezeptor kann Heparin den Endothelzellen zugeführt und dort abgebaut werden<sup>111,143,144</sup>. Dass der Nachweis von dPGS und dPES in den U937-Zellen nach zehn Tagen nicht mehr möglich war, deutet darauf hin, dass auch diese Substanzen intrazellulär abgebaut werden können oder alternativ wieder aus den Zellen austransportiert werden.

Kürzlich wurde berichtet, dass durch Inhibition des OATP mit Probenecid die Heparin-Aufnahme in endometrioiden Stromazellen *in vitro* gehemmt werden konnte<sup>145</sup>. Dies spricht dafür, dass Heparin ein Substrat der OATP-Familie ist. Für die ebenfalls stark negativ geladenen Polyglycerole dPGS und dPES könnte dies ebenso zutreffen.

Die intrazelluläre Aufnahme von dPGS und dPES könnte auch zu einer intrazellulären Wirkung der Moleküle führen. Neueste, noch unveröffentlichte Studien von Dervede et al. zeigten im Biacore-Assay, dass NF- $\kappa$ B eine hohe Affinität zu dPGS aufweist (siehe Tab. 1). Verschiedene Versuche mit Zellkulturen und Tiermodellen zeigten, dass Heparin über Inhibition der Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern die Reduktion der Produktion verschiedener Zytokine, wie TNF- $\alpha$  bewirkt<sup>146-149</sup>. Bei der RA spielt TNF- $\alpha$  eine bedeutende Rolle, was durch die erfolgreiche Behandlung der RA mit TNF- $\alpha$ -Inhibitoren besonders deutlich wird. Die hohe Affinität des dPGS zu NF- $\kappa$ B mit einer möglicherweise wie bei Heparin daraus resultierenden Inhibition des Transkriptionsfaktors könnte zusätzlich zur Selektin-Blockierung den therapeutischen Effekt im CIA-Modell erklären. Die genauere Untersuchung dieses möglichen Wirkmechanismus sollte Gegenstand zukünftiger Projekte sein.

In den U937-Zellen nahm die mittlere intrazelluläre Konzentration des dPES schneller ab als die des dPGS. Dieses Ergebnis stimmt gut mit den Ergebnissen zur Quantifizierung der Moleküle in den inneren Organen überein (s.o.), dass sich dPES nach längerer Therapie in Milz und Leber in geringeren Mengen nachweisen ließ als dPGS. Die Hypothese, dass die Esterbindungen des

dPES, die dem dPGS fehlen, dieses Esterasen zugänglich machen und so zu einer besseren Bioabbaubarkeit beitragen, wird dadurch gestützt.

Kritisch müssen folgende Punkte angemerkt werden:

Da U937-Zellen keine Primärzellen darstellen, lässt die Untersuchung an ihnen nur ungefähre Schlüsse auf die Situation im Organismus zu und kann daher nur als Hilfsmittel und erste Orientierung gesehen werden. Es sollten weitere Experimente ähnlicher Art beispielsweise an Primärzellen durchgeführt werden.

Während der Versuche mit den U937-Zellen fiel auf, dass deren Morphologie und Anordnung sich über die Versuchsdauer änderten. Diese Reifung der Zellen könnte auch mit einer funktionellen Veränderungen einhergehen. Dies könnte dazu führen, dass die Fähigkeit zum Abbau/Austransport der verabreichten Substanzen in diesen Zellen inkonstant verläuft.

### **5.8 Ausblick**

Die Resultate der vorliegenden Arbeit stellen dPGS- und dPES-ICG als geeignete KM zur Detektion rheumatischer Gelenkentzündungen im CIA-Modell dar. In Bezug auf die Differenzierung zwischen den Rheuma-Scores und die Anreicherung in Inflammationsarealen erwies sich dPGS-ICG als das leicht überlegene KM und zeigte außerdem das Potenzial, im hochsignifikanten Bereich präklinische Entzündungsvorgänge sichtbar zu machen. DPES-ICG wies eine geringere Anreicherung in der Niere und eine schnellere Elimination aus dem Kreislauf auf, was zu einer besseren Verträglichkeit führen könnte.

Auch in der Therapie der CIA konnten mit dPGS und dPES signifikante Resultate erzielt werden. Damit können die untersuchten Makromoleküle als interessante Tools in Diagnostik und Therapie der RA bezeichnet werden. Sie stellen mit der NIR-FOI eine neue diagnostische Technik dar, die zahlreiche Vorteile gegenüber herkömmlichen Methoden besitzt und dienen auf therapeutischer Ebene als Substanzen, die mittels Inhibition der Leukozytenimmigration sowie zusätzlicher alternativer Pathways eine signifikante antiinflammatorische Wirkung entfalten.

Auch erste Einblicke zur Pharmakologie der Substanzen konnten gewonnen werden, zahlreiche Aspekte sind aber noch unbekannt. Es ergaben sich Hinweise darauf, dass dPES sowohl in Konjugation mit ICG als KM als auch als Therapeutikum möglicherweise den körpereigenen Ab- und Umbaumechanismen und so der Elimination leichter zugänglich ist als dPGS(-ICG).

Auf Grund der vielversprechenden Ergebnisse sollten weiterführende Untersuchungen der Substanzen unternommen werden. Die Durchführung zukünftiger Versuche mit einer höheren Tierzahl erscheint sinnvoll und wird durch die vorliegenden Resultate gerechtfertigt.

## Diskussion

Weiterhin sollte eine verlängerte Versuchsdauer in Betracht gezogen werden, um einerseits die Langzeiteffekte der Makromoleküle beurteilen zu können und andererseits eine Variierung des Behandlungsmusters zu ermöglichen. So könnte z.B. verglichen werden, wie effektiv die Wirkung je nach Zeitpunkt des Therapiebeginns ist und in Abhängigkeit von der prätherapeutischen Symptomschwere/Krankheitsdauer.

Pharmakodynamische und -kinetische Gesichtspunkte wie Dosis-Wirkungsbeziehung und Q0-Wert sollten ebenfalls Gegenstand kommender Untersuchungen sein. Auch die Relevanz des bereits nachgewiesenen gerinnungshemmenden Effekts v.a. des dPES sollte dabei evaluiert werden.

Aktuell werden Experimente mit neuartigen polysulfatierten Makomolekülen durchgeführt, die sich im Vergleich zu den hier verwendeten Substanzen durch ein definiertes Molekulargewicht auszeichnen. Dies soll eine Quantifizierung ermöglichen, wodurch sich pharmakologische Betrachtungen vereinfachen und präzisieren lassen würden.

## 6. Literatur

1. Pitzalis C, Kelly S, Humby F. New learnings on the pathophysiology of RA from synovial biopsies. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25:334-44.
2. Young A KG. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. *2007;21:907-27.*
3. Prete M, Racanelli V, Digiglio L, Vacca A, Dammacco F, Perosa F. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. *Autoimmun Rev* 2011;11:123-31.
4. Hoving JL, van Zwieten MC, van der Meer M, Sluiter JK, Frings-Dresen MH. Work participation and arthritis: a systematic overview of challenges, adaptations and opportunities for interventions. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52:1254-64.
5. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996;85:307-10.
6. Pedersen JK, Svendsen AJ, Hørslev-Petersen K. Prevalence of rheumatoid arthritis in the southern part of denmark. *Open Rheumatol J* 2011;5:91-7.
7. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010;376:1094-108.
8. Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2009;21:279-83.
9. Jaraquemada D, Ollier W, Awad J, et al. HLA and rheumatoid arthritis: a combined analysis of 440 British patients. *Ann Rheum Dis* 1986;45:627-36.
10. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:24-33.
11. Dye JR, Ullal AJ, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2013;78:140-8.
12. Kinne RW, Bräuer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000;2:189-202.
13. Agarwal SK. Biologic agents in rheumatoid arthritis: an update for managed care professionals. *J Manag Care Pharm* 2011;17:S14-8.
14. Pobirci O, Bogdan F, Pobirci DD, Roşca E, Petcu CA. The study of synovities with articular inflammatory liquid, through clinical-statistical, histological and immunohistochemical methods. *Rom J Morphol Embryol* 2011;52:333-8.
15. Bodolay E, Koch AE, Kim J, Szegedi G, Szekanecz Z. Angiogenesis and chemokines in rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases. *J Cell Mol Med* 2002;6:357-76.

16. Bucala R. Fibrocytes in rheumatoid pannus: seed and soil? *Arthritis Rheum* 2012;64:3491-3.
17. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010;62:2569-81.
18. Schneider M, Kruger K. Rheumatoid arthritis-early diagnosis and disease management. *Dtsch Arztebl Int* 2013;110:477-84.
19. Huscher D, Sengler C, Gromnica-Ihle E, et al. Clinical presentation, burden of disease and treatment in young-onset and late-onset rheumatoid arthritis: a matched-pairs analysis taking age and disease duration into account. *Clin Exp Rheumatol* 2013;31:256-62.
20. Looper KJ, Mustafa SS, Zelkowitz P, Purden M, Baron M. Work instability and financial loss in early inflammatory arthritis. *Int J Rheum Dis* 2012;15:546-53.
21. Finckh A. Early inflammatory arthritis versus rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2009;21:118-23.
22. Nell VP, Machold KP, Eberl G, Stamm TA, Uffmann M, Smolen JS. Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:906-14.
23. Korpela M, Laasonen L, Hannonen P, et al. Retardation of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis by initial aggressive treatment with disease-modifying antirheumatic drugs: five-year experience from the FIN-RACo study. *Arthritis Rheum* 2004;50:2072-81.
24. Heidari B. Rheumatoid Arthritis: Early diagnosis and treatment outcomes. *Caspian J Intern Med* 2011;2:161-70.
25. Colebatch AN, Edwards CJ, Ostergaard M, et al. EULAR recommendations for the use of imaging of the joints in the clinical management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:804-14.
26. Werner S. Implementierung, Standardisierung und Evaluierung einer neuen ICG-gestützten fluoreszenzoptischen Bildgebungstechnologie mit dem Xiralite-Verfahren zur Entzündungsdiagnostik bei rheumatischen Krankheitsbildern: Charité - Universitätsmedizin Berlin; 2012.
27. Ohrndorf S, Werner SG, Finzel S, Backhaus M. Musculoskeletal ultrasound and other imaging modalities in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25:367-74.
28. Grainger AJ, Rowbotham EL. Rheumatoid arthritis. *Semin Musculoskelet Radiol* 2013;17:69-73.

29. Tan YK, Ostergaard M, Conaghan PG. Imaging tools in rheumatoid arthritis: ultrasound vs magnetic resonance imaging. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51 Suppl 7:vii36-42.
30. Haavardsholm EA, Lie E, Lillegraven S. Should modern imaging be part of remission criteria in rheumatoid arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2012;26:767-85.
31. Scheel AK, Schmidt WA, Hermann KG, et al. Interobserver reliability of rheumatologists performing musculoskeletal ultrasonography: results from a EULAR "Train the trainers" course. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1043-9.
32. Ohrndorf S, Naumann L, Grundey J, et al. Is musculoskeletal ultrasonography an operator-dependent method or a fast and reliably teachable diagnostic tool? Interreader agreements of three ultrasonographers with different training levels. *Int J Rheumatol* 2010;2010:164518.
33. Hetland ML, Ejbjerg B, Horslev-Petersen K, et al. MRI bone oedema is the strongest predictor of subsequent radiographic progression in early rheumatoid arthritis. Results from a 2-year randomised controlled trial (CIMESTRA). *Ann Rheum Dis* 2009;68:384-90.
34. Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 2008;452:580-9.
35. Desmettre T, Devoisselle JM, Mordon S. Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography. *Surv Ophthalmol* 2000;45:15-27.
36. Raabe A, Nakaji P, Beck J, et al. Prospective evaluation of surgical microscope-integrated intraoperative near-infrared indocyanine green videoangiography during aneurysm surgery. *J Neurosurg* 2005;103:982-9.
37. Mothes H, Donicke T, Friedel R, Simon M, Markgraf E, Bach O. Indocyanine-green fluorescence video angiography used clinically to evaluate tissue perfusion in microsurgery. *J Trauma* 2004;57:1018-24.
38. Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, et al. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer* 2009;115:2491-504.
39. Sevick-Muraca EM, Sharma R, Rasmussen JC, et al. Imaging of lymph flow in breast cancer patients after microdose administration of a near-infrared fluorophore: feasibility study. *Radiology* 2008;246:734-41.
40. Gotoh K, Yamada T, Ishikawa O, et al. A novel image-guided surgery of hepatocellular carcinoma by indocyanine green fluorescence imaging navigation. *J Surg Oncol* 2009;100:75-9.
41. Wipper S. Validierung der Fluoreszenzangiographie für die intraoperative Beurteilung und Quantifizierung der Myokardperfusion. [NonPeerReviewed]: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2006.

42. Fischer T, Gemeinhardt I, Wagner S, et al. Assessment of unspecific near-infrared dyes in laser-induced fluorescence imaging of experimental arthritis. *Acad Radiol* 2006;13:4-13.
43. Gompels LL, Lim NH, Vincent T, Paleolog EM. In vivo optical imaging in arthritis--an enlightening future? *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:1436-46.
44. Meier R, Krug C, Golovko D, et al. Indocyanine green-enhanced imaging of antigen-induced arthritis with an integrated optical imaging/radiography system. *Arthritis Rheum* 2010;62:2322-7.
45. Fischer T, Ebert B, Voigt J, et al. Detection of rheumatoid arthritis using non-specific contrast enhanced fluorescence imaging. *Acad Radiol* 2010;17:375-81.
46. Dziekan T, Weissbach C, Voigt J, et al. Detection of rheumatoid arthritis by evaluation of normalized variances of fluorescence time correlation functions. *J Biomed Opt* 2011;16:076015.
47. Werner SG, Langer HE, Schott P, et al. Indocyanine green enhanced fluorescence optical imaging in early and very early arthritis patients: A comparative study with magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum* 2013.
48. Werner S, Langer H-E, Backhaus M, Horneff G. Fluoreszenzoptische Bildgebung mit dem Xiralite-System in der Kinderrheumatologie. *Arthritis und Rheuma* 2012 2012-05-15T09:54:38+02:00:161-6.
49. Kosaka N, Ogawa M, Choyke PL, Kobayashi H. Clinical implications of near-infrared fluorescence imaging in cancer. *Future Oncol* 2009;5:1501-11.
50. Ebert B, Riefke B, Sukowski U, Licha K. Cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging in vivo: acute tolerance, pharmacokinetics, and fluorescence imaging. *J Biomed Opt* 2011;16:066003.
51. Muller J, Wunder A, Licha K. Optical imaging. *Recent Results Cancer Res* 2013;187:221-46.
52. Meier R, Thurmel K, Moog P, et al. Detection of synovitis in the hands of patients with rheumatologic disorders: diagnostic performance of optical imaging in comparison with magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum* 2012;64:2489-98.
53. Turk H, Haag R, Alban S. Dendritic polyglycerol sulfates as new heparin analogues and potent inhibitors of the complement system. *Bioconjug Chem* 2004;15:162-7.
54. Young E. The anti-inflammatory effects of heparin and related compounds. *Thromb Res* 2008;122:743-52.
55. Weiler JM, Edens RE, Linhardt RJ, Kapelanski DP. Heparin and modified heparin inhibit complement activation in vivo. *J Immunol* 1992;148:3210-5.

56. Day JR, Landis RC, Taylor KM. Heparin is much more than just an anticoagulant. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2004;18:93-100.
57. Young E, Podor TJ, Venner T, Hirsh J. Induction of the acute-phase reaction increases heparin-binding proteins in plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1568-74.
58. Wang L, Brown JR, Varki A, Esko JD. Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. *J Clin Invest* 2002;110:127-36.
59. Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol* 2002;14:73-81.
60. Dervedde J, Rausch A, Weinhart M, et al. Dendritic polyglycerol sulfates as multivalent inhibitors of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:19679-84.
61. Weinhart M, Groger D, Enders S, Dervedde J, Haag R. Synthesis of dendritic polyglycerol anions and their efficiency toward L-selectin inhibition. *Biomacromolecules* 2011;12:2502-11.
62. Weinhart M, Groger D, Enders S, et al. The role of dimension in multivalent binding events: structure-activity relationship of dendritic polyglycerol sulfate binding to L-selectin in correlation with size and surface charge density. *Macromol Biosci* 2011;11:1088-98.
63. Chang SH, Dong C. IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation. *Cytokine* 2009;46:7-11.
64. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 2006;27:17-23.
65. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007;7:429-42.
66. Licha K, Welker P, Weinhart M, et al. Fluorescence imaging with multifunctional polyglycerol sulfates: novel polymeric near-IR probes targeting inflammation. *Bioconjug Chem* 2011;22:2453-60.
67. Reichert S, Welker P, Calderon M, et al. Size-dependant cellular uptake of dendritic polyglycerol. *Small* 2011;7:820-9.
68. Biffi S, Dal Monego S, Dullin C, et al. Dendritic polyglycerolsulfate near infrared fluorescent (NIRF) dye conjugate for non-invasively monitoring of inflammation in an allergic asthma mouse model. *PLoS One* 2013;8:e57150.
69. Han Z, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS. AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* 1998;28:197-208.

70. Upchurch KS, Kay J. Evolution of treatment for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51 Suppl 6:vi28-36.
71. Singh JA, Furst DE, Bharat A, et al. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64:625-39.
72. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis* 2010;69:964-75.
73. Möttönen T, Hannonen P, Korpela M, et al. Delay to institution of therapy and induction of remission using single-drug or combination-disease-modifying antirheumatic drug therapy in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:894-8.
74. van der Linden MP, le Cessie S, Raza K, et al. Long-term impact of delay in assessment of patients with early arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:3537-46.
75. Soubrier M, Lukas C, Sibilia J, et al. Disease activity score-driven therapy versus routine care in patients with recent-onset active rheumatoid arthritis: data from the GUEPARD trial and ESPOIR cohort. *Ann Rheum Dis* 2011;70:611-5.
76. Klarenbeek NB, Guler-Yuksel M, van der Kooij SM, et al. The impact of four dynamic, goal-steered treatment strategies on the 5-year outcomes of rheumatoid arthritis patients in the BeSt study. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1039-46.
77. Kavanaugh A, Fleischmann RM, Emery P, et al. Clinical, functional and radiographic consequences of achieving stable low disease activity and remission with adalimumab plus methotrexate or methotrexate alone in early rheumatoid arthritis: 26-week results from the randomised, controlled OPTIMA study. *Ann Rheum Dis* 2013;72:64-71.
78. Malik F, Ranganathan P. Methotrexate pharmacogenetics in rheumatoid arthritis: a status report. *Pharmacogenomics* 2013;14:305-14.
79. Navarro-Millan I, Curtis JR. Newest clinical trial results with antitumor necrosis factor and nonantitumor necrosis factor biologics for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25:384-90.
80. van Nies JA, de Jong Z, van der Helm-van Mil AH, Knevel R, Le Cessie S, Huizinga TW. Improved treatment strategies reduce the increased mortality risk in early RA patients. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:2210-6.

81. Peltomaa R, Paimela L, Kautiainen H, Leirisalo-Repo M. Mortality in patients with rheumatoid arthritis treated actively from the time of diagnosis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:889-94.
82. Tak PP, Kalden JR. Advances in rheumatology: new targeted therapeutics. *Arthritis Res Ther* 2011;13 Suppl 1:S5.
83. Hyrich KL, Watson KD, Isenberg DA, Symmons DP, Register BSRB. The British Society for Rheumatology Biologics Register: 6 years on. *Rheumatology (Oxford)*. England2008:1441-3.
84. Ruderman EM. Overview of safety of non-biologic and biologic DMARDs. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51 Suppl 6:vi37-43.
85. Ostergaard M, Unkerskov J, Linde L, et al. Low remission rates but long drug survival in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab or etanercept: results from the nationwide Danish DANBIO database. *Scand J Rheumatol*. Norway2007:151-4.
86. Atzeni F, Benucci M, Salli S, Bongiovanni S, Boccassini L, Sarzi-Puttini P. Different effects of biological drugs in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2013;12:575-9.
87. Furneri G, Mantovani LG, Belisari A, et al. Systematic literature review on economic implications and pharmacoeconomic issues of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30:S72-84.
88. Scott IC, Wailoo A, Scott DL. Payers' views on treating-to-target in rheumatoid arthritis: an English perspective. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30:S85-90.
89. Gaffney A, Gaffney P. Rheumatoid arthritis and heparin. *Br J Rheumatol* 1996;35:808-9.
90. Ostergaard M. Can imaging be used for inflammatory arthritis screening? *Semin Musculoskelet Radiol* 2012;16:401-9.
91. Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Gorla R, Marchesoni A, Caporali R. Switching rheumatoid arthritis treatments: an update. *Autoimmun Rev* 2011;10:397-403.
92. Shriver Z, Capila I, Venkataraman G, Sasisekharan R. Heparin and heparan sulfate: analyzing structure and microheterogeneity. *Handb Exp Pharmacol* 2012:159-76.
93. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977;146:857-68.
94. Romeis B. *Mikroskopische Technik*. München: Urban und Schwarzenberg; 1989.
95. Lev R, Spicer SS. Specific Staining of Sulfate Groups with Alcian Blue at Low pH. *J Histochem Cytochem* 1964;12:309.

96. Frazier SB, Roodhouse KA, Hourcade DE, Zhang L. The Quantification of Glycosaminoglycans: A Comparison of HPLC, Carbazole, and Alcian Blue Methods. *Open Glycosci* 2008;1:31-9.
97. Prentø P. Staining of macromolecules: possible mechanisms and examples. *Biotech Histochem* 2009;84:139-58.
98. Greco KV, Iqbal AJ, Rattazzi L, et al. High density micromass cultures of a human chondrocyte cell line: a reliable assay system to reveal the modulatory functions of pharmacological agents. *Biochem Pharmacol* 2011;82:1919-29.
99. WolframAlpha™ computational™ knowledge engine. (Accessed 07.01.-26.09., 2013, at [http://www.wolframalpha.com/.](http://www.wolframalpha.com/))
100. Shi SR, Cote RJ, Wu L, et al. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. *J Histochem Cytochem* 2002;50:1005-11.
101. Dedhia P, Tarale S, Dhongde G, Khadapkar R, Das B. Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Asian Pac J Cancer Prev* 2007;8:55-9.
102. Stammers AD. The blood count and body temperature in normal rats. *J Physiol* 1926;61:329-36.
103. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51 Suppl 5:v3-11.
104. Miossec P. Dynamic interactions between T cells and dendritic cells and their derived cytokines/chemokines in the rheumatoid synovium. *Arthritis Res Ther* 2008;10 Suppl 1:S2.
105. Too CL, Yahya A, Murad S, et al. Smoking interacts with HLA-DRB1 shared epitope in the development of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis: results from the Malaysian Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis (MyEIRA). *Arthritis Res Ther* 2012;14:R89.
106. Clarke A, Vyse TJ. Genetics of rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 2009;11:248.
107. Balandraud N, Roudier J, Roudier C. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2004;3:362-7.
108. Li S, Yu Y, Yue Y, Zhang Z, Su K. Microbial Infection and Rheumatoid Arthritis. *J Clin Cell Immunol* 2013;4.
109. Farquharson D, Butcher JP, Culshaw S. Periodontitis, Porphyromonas, and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Mucosal Immunol* 2012;5:112-20.

110. Malysheva O, Pierer M, Wagner U, Baerwald CG. [Stress and rheumatoid arthritis]. *Z Rheumatol* 2010;69:539-43.
111. Harris EN, Weigel JA, Weigel PH. The Human Hyaluronan Receptor for Endocytosis (HARE/Stabilin-2) Is a Systemic Clearance Receptor for Heparin\*. *J Biol Chem* 2008;283:17341-50.
112. Oie CI, Olsen R, Smedsrod B, Hansen JB. Liver sinusoidal endothelial cells are the principal site for elimination of unfractionated heparin from the circulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G520-8.
113. Bunting RW, Wilkinson RA, Callahan RJ, Strauss HW, Fischman AJ. Indium-111 DTPA-heparin: radiolabeling, pharmacokinetics, and biodistribution following intravenous administration in rat and rabbit. *Thromb Res* 1998;89:23-30.
114. Dawes J, Pepper D. Catabolism of low-dose heparin in man. *Thrombosis Research* 1979;14:845-60.
115. Shanberge JN, Gruhl M, Kitani T, et al. Fractionated tritium-labelled heparin studied in vitro and in vivo. *Thromb Res* 1978;13:767-83.
116. Feng L, Liu ZM, Hou J, et al. A highly selective fluorescent ES IPT probe for the detection of Human carboxylesterase 2 and its biological applications. *Biosens Bioelectron* 2014;65c:9-15.
117. Andreucci M, Faga T, Pisani A, Sabbatini M, Michael A. Acute Kidney Injury by Radiographic Contrast Media: Pathogenesis and Prevention. *Biomed Res Int* 2014;2014:362725.
118. Erlandsson Harris H, Liljeström M, Klareskog L. Characteristics of synovial fluid effusion in collagen-induced arthritis (CIA) in the DA rat; a comparison of histology and antibody reactivities in an experimental chronic arthritis model and rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 1997;107:480-4.
119. Brannan SR, Jerrard DA. Synovial fluid analysis. *J Emerg Med* 2006;30:331-9.
120. Hui AY, McCarty WJ, Masuda K, Firestein GS, Sah RL. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2012;4:15-37.
121. KEEFER CS, MYERS WK, HOLMES WF. CHARACTERISTICS OF THE SYNOVIAL FLUID IN VARIOUS TYPES OF ARTHRITIS: STUDY OF NINETY CASES. *Archives of Internal Medicine* 2015;54:872-87.
122. Jedrzejewski MJ, Stern R. Structures of vertebrate hyaluronidases and their unique enzymatic mechanism of hydrolysis. *Proteins* 2005;61:227-38.

123. Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci* 2007;80:1921-43.
124. Jansson L, Lindahl U. Evidence for the existence of a multichain proteoglycan of heparan sulphate. *Biochem J* 1970;117:699-702.
125. Fransson LA, Roden L. Structure of dermatan sulfate. I. Degradation by testicular hyaluronidase. *J Biol Chem* 1967;242:4161-9.
126. Mio K, Stern R. Inhibitors of the hyaluronidases. *Matrix Biol* 2002;21:31-7.
127. Wolf RA, Glogar D, Chaung LY, et al. Heparin inhibits bovine testicular hyaluronidase activity in myocardium of dogs with coronary artery occlusion. *Am J Cardiol* 1984;53:941-4.
128. Wang L, Sweet DH. Renal organic anion transporters (SLC22 family): expression, regulation, roles in toxicity, and impact on injury and disease. *Aaps j* 2013;15:53-69.
129. Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ. Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacol Rev* 2011;63:157-81.
130. Thomson RY, Heagy FC, Hutchison WC, Davidson JN. The deoxyribonucleic acid content of the rat cell nucleus and its use in expressing the results of tissue analysis, with particular reference to the composition of liver tissue. *Biochem J* 1953;53:460-74.
131. Leuchtenberger C, Vendrely R, Vendrely C. A comparison of the content of desoxyribosenucleic acid (DNA) in isolated animal nuclei by cytochemical and chemical methods. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1951;37:33-8.
132. Goldspink DF, Kelly FJ. Protein turnover and growth in the whole body, liver and kidney of the rat from the foetus to senility. *Biochem J* 1984;217:507-16.
133. Kirby KS, Cook EA. Isolation of deoxyribonucleic acid from mammalian tissues. *Biochem J* 1967;104:254-7.
134. Norell M, von der Decken A. Nuclear proteins and chromatin structure in liver and intestinal epithelial cells of young growing and adult rats. *Mech Ageing Dev* 1990;56:63-75.
135. Fishman D, Isenberg DA. Splenic involvement in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1997;27:141-55.
136. Williams BD, Pussell BA, Lockwood CM, Cotton C. Defective reticuloendothelial system function in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1979;1:1311-4.
137. Frey H-H, Löscher W. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. 3 ed. Stuttgart: Enke Verlag; 2010.
138. Kandrotas RJ. Heparin pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet* 1992;22:359-74.

139. Lemini C, Jaimez R, Franco Y. Gender and inter-species influence on coagulation tests of rats and mice. *Thrombosis Research* 2007;120:415-9.
140. Garcia-Gómez C, Bianchi M, de la Fuente D, et al. Inflammation, lipid metabolism and cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: A qualitative relationship? *World J Orthop* 2014;5:304-11.
141. Kovalszky I, Dudás J, Oláh-Nagy J, et al. Inhibition of DNA topoisomerase I activity by heparan sulfate and modulation by basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Biochem* 1998;183:11-23.
142. Barna G, Sebestyén A, Dunai ZA, Csernus B, Mihalik R. Heparin can liberate high molecular weight DNA from secondary necrotic cells. *Cell Biol Int* 2012;36:1281-6.
143. Pandey MS, Weigel PH. Hyaluronic acid receptor for endocytosis (HARE)-mediated endocytosis of hyaluronan, heparin, dermatan sulfate, and acetylated low density lipoprotein (AcLDL), but not chondroitin sulfate types A, C, D, or E, activates NF-kappaB-regulated gene expression. *J Biol Chem* 2014;289:1756-67.
144. Harris EN, Baggenstoss BA, Weigel PH. Rat and human HARE/stabilin-2 are clearance receptors for high- and low-molecular-weight heparins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G1191-9.
145. Spratte J, Meyer zu Schwabedissen H, Endlich N, Zygmunt M, Fluhr H. Heparin inhibits TNF-alpha signaling in human endometrial stromal cells by interaction with NF-kappaB. *Mol Hum Reprod* 2013;19:227-36.
146. Hochart H, Jenkins PV, Smith OP, White B. Low-molecular weight and unfractionated heparins induce a downregulation of inflammation: decreased levels of proinflammatory cytokines and nuclear factor-kappaB in LPS-stimulated human monocytes. *Br J Haematol* 2006;133:62-7.
147. Thourani VH, Brar SS, Kennedy TP, et al. Nonanticoagulant heparin inhibits NF-kappaB activation and attenuates myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H2084-93.
148. Luan ZG, Naranpurev M, Ma XC. Treatment of Low Molecular Weight Heparin Inhibits Systemic Inflammation and Prevents Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Rats. *Inflammation* 2014.
149. Li X, Li Z, Zheng Z, Liu Y, Ma X. Unfractionated heparin ameliorates lipopolysaccharide-induced lung inflammation by downregulating nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Inflammation* 2013;36:1201-8.

Lebenslauf

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Anna Laube, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Hochsulfatierte Makromoleküle in Diagnostik und Therapie der rheumatoiden Arthritis“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Pia Welker bedanken für die Überlassung des Themas, das Heranführen an die wissenschaftliche Praxis und für ihre allzeitige Bereitschaft, mir mit ihrem kompetenten Rat zur Seite zu stehen.

Weiterhin danke ich Frauke Serowka und Dorothea Mangoldt für ihre Unterstützung und das äußerst angenehme Arbeitsklima.

Nicht zuletzt möchte ich meinen herzlichsten Dank gegenüber meiner Familie ausdrücken, die mir immer beigestanden und mich unermüdlich motiviert hat, diese Arbeit fertigzustellen.