

Aus dem Institut  
für Molekulare Kardiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor/Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

**<sup>19</sup>F-MR-Bildgebung zur nicht-invasiven  
Darstellung entzündlicher Prozesse bei  
Organabstoßung und Arthritis**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Lisa Galbarz  
2014

---

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf, Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

Korreferent: apl. Prof. Dr. med. Dirk Blondin

*Für Fabian*

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

1. Flügel U, Su S, Kreideweiß I, Ding Z, **Galbarz L**, Fu J, Jacoby C, Witzke O, Schrader J. (2011).  
Noninvasive Detection of Graft Rejection by *In Vivo*  $^{19}\text{F}$  MRI in the Early Stage. American Journal of Transplantation, 11, pp. 235-244. (Im Folgenden Originalarbeit 1 genannt)
2. Flügel U, Burghoff S, van Lent P, Temme S, **Galbarz L**, Ding Z, El-Tayeb A, Huels S, Bönner F, Borg N, Jacoby C, Müller C, van den Berg W, Schrader J. (2012).  
Selective Activation of Adenosine  $A_{2A}$  Receptors on Immune Cells by a CD73-Dependent Prodrug Suppresses Joint Inflammation in Experimental Rheumatoid Arthritis. Science Translational Medicine, 4 (146). (Im Folgenden Originalarbeit 2 genannt)

## Zusammenfassung

Eine Entzündung ist eine häufig vorkommende Reaktion des Organismus, die beim Ablauf vieler Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielt. Eine rechtzeitige Diagnose der Entzündung ist dabei von immenser Bedeutung, da hieraus wichtige Konsequenzen für Therapie und Verlaufsprognose der Erkrankung gezogen werden können.

Mit den heute in der klinischen Routine verfügbaren Kontrastmitteln ist es jedoch bis *dato* nicht möglich, eine Immunreaktion bzw. Immunzellen direkt darzustellen. Somit kann keine spezifische Entzündungsdarstellung erfolgen, sondern lediglich indirekt über eine Visualisierung der begleitenden Hyperämie bzw. des entstandenen Ödems auf eine Entzündung geschlossen werden. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine alternative Magnetresonanz-Bildgebungstechnik in Bezug auf den  $^{19}\text{F}$ -Kern angewendet. Hierzu erfolgte die selektive und effiziente Beladung von zirkulierenden Zellen des Monozyten-/ Makrophagensystems mit einem fluorhaltigen Kontrastmittel. Durch Einwanderung dieser Zellen in betroffene Gewebe, reichert sich das Kontrastmittel anschließend spezifisch in Entzündungsherden an. Auf diese Weise können entzündliche Prozesse durch einen positiven Kontrast mittels *Magnetresonanztomographie* (MRT) erfasst werden.

Diese Methode wurde zunächst zur Diagnostik einer Organabstoßung eingesetzt, die im klinischen Alltag noch immer auf die Entnahme von Gewebebiopsien angewiesen ist. Biopsien sind allerdings nicht nur invasiv, sondern aufgrund ihres Stichprobencharakters äußerst anfällig für Fehldiagnosen. Nach initialen Untersuchungen zur Herztransplantatabstoßung wurde zusätzlich der Vergleich zweier Versuchsgruppen vorgenommen. Während eine Gruppe mit dem Immunsuppressivum Rapamycin behandelt wurde diente die andere als unbehandelte Kontrollgruppe. Anschließend erfolgte die quantitative Auswertung des jeweils in beiden Gruppen detektierten  $^{19}\text{F}$ -Signals und im folgenden Schritt die Validierung der *in-vivo-Befunde* durch histologische Untersuchungen.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die  $^{19}\text{F}$ -Methode ebenfalls zur Darstellung einer experimentell induzierten Arthritis (RA) im Frühstadium geeignet ist. Bei der Therapie der Rheumatoiden Arthritis (RA) ist eine frühzeitige Intervention für die Verhütung irreversibler Gelenkschäden entscheidend. Repetitive MR-Messungen konnten den Beginn der Arthritis anhand der Intensität des  $^{19}\text{F}$ -Signals nach Kontrastmittelapplikation bereits deutlich vor Auftreten der klinischen Symptome nachweisen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass  $\text{A}_{2\text{A}}$ -Rezeptoragonisten erfolgversprechende Substanzen zur Behandlung von RA darstellen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Auflistung der Publikationen</b> .....	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>V</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>X</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Entzündungsreaktion.....	3
1.1.1 Definition.....	3
1.1.2 Ätiologie.....	3
1.1.3 Symptome nach Celsus und Galen.....	3
1.1.4 Ablauf einer akuten Entzündungsreaktion.....	3
1.2 Makrophagenfunktion bei Entzündungen.....	4
1.3 Adenosin als antiinflammatorisches Molekül.....	5
1.4 Die Herztransplantation (HTx) .....	8
1.5 Rheumatoide Arthritis (RA).....	9
<b>2 Materialien und Methoden</b> .....	<b>12</b>
2.1 Herstellung einer Perfluorkronenether (PFC)-Emulsion .....	12
2.1.1 Pufferherstellung.....	12
2.1.2 Herstellung der Nanoemulsion .....	13
2.2 Versuchstiere .....	14
2.2.1 HTx-Modell .....	15
2.2.2 Arthritismodell.....	15
2.3 Induktion der Krankheitsmodelle.....	16
2.3.1 Durchführung der Herztransplantationen .....	16
2.3.2 Induktion des Arthritismodells .....	18
2.3.3 Anwendung verschiedener Therapieansätze im Arthritismodell .....	19
2.4 MR-Messungen .....	21
2.4.1 MR-Messungen zur Verfolgung der immunsuppressiven Therapie nach HTx	23
2.4.1.1 Zeitlicher Ablauf der MR-Messungen .....	24
2.4.1.2 Auswertung der MR-Messungen.....	25
2.4.2 Detektion inflammatorischer Prozesse bei RA mittels MRT .....	25
2.4.2.1 Auswertung der Fluor-MR-Signale .....	27
2.5 Visuelles <i>Scoring</i> .....	28
2.6 <i>Post-mortem</i> Analysen .....	29
2.6.1 <i>Post-mortem</i> Analyse der Herztransplantate.....	29
2.6.1.1 Vorbereitung der Organe .....	29
2.6.1.2 Immunhistochemische und histologische Aufbereitung .....	30
2.6.1.2.1 Herstellung der Phosphatpuffer-Stammlösung .....	30
2.6.1.2.2 Herstellung des Fixativs .....	30
2.6.1.2.3 Herstellung des Fixativs nach Zamboni.....	30
2.6.1.2.4 Immunhistochemische Färbung .....	31

---

2.6.1.3 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung .....	32
2.6.2 <i>Post-mortem</i> Analyse der Hinterbeine bei <i>CIA</i> .....	32
2.7 Statistische Analyse .....	32
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
3.1 Immunsuppressive Therapie nach HTx .....	33
3.1.1 Darstellung der anatomischen Verhältnisse .....	33
3.1.2 Beurteilung der Transplantatabstoßung anhand der PFC-Infiltration in Allo- grafts mittels <sup>19</sup> F-MRT.....	34
3.1.3 Überwachung der Transplantatfunktion anhand der <i>Palpations-scores</i> .....	36
3.1.4 Beurteilung der PFC-Anreicherung in <i>Allografts</i> durch <sup>19</sup> F-MR-Messungen ...	37
3.1.5 Darstellung des Behandlungserfolgs einer Rapamycin-Therapie mittels <sup>19</sup> F- MRT .. .....	38
3.2 Detektion von rheumatoider Arthritis mittels MRT .....	41
3.2.1 Darstellung der anatomischen Verhältnisse durch Aquisition von Protonenbildern und Nachweis der RA mithilfe von <sup>19</sup> F .....	41
3.2.2 Vergleich der MR-Methode mit der klassischen <i>Scoring-Methode</i> .....	44
3.2.3 Anwendung verschiedener Therapieschemata im Arthritismodell .....	47
3.2.3.1 Therapiebeginn parallel zur <i>Boosterinjektion</i> .....	47
3.2.3.2 Therapiebeginn nach Krankheitsausbruch .....	49
3.2.4 Validierung der MR-Methode anhand der histologischen Ergebnisse .....	51
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>53</b>
4.1 Herztransplantation .....	53
4.2 Arthritis .....	55
4.2.1 Diagnose .....	55
4.2.2 Therapie .....	558
4.3 Allgemeine Aspekte .....	59
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>62</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Exemplarische Darstellung der Vorgehensweise.....	2
Abb. 1.2	Cyclohexylethylthio(Chet)-AMP als Substrat von CD73 .....	6
Abb. 1.3	Spaltung des phosphorylierten <i>Prodrugs</i> durch CD73 sowie anschließende Bindung an den A <sub>2A</sub> -Rezeptor .....	7
Abb. 2.1	Emulgierung des Perfluor-15-kronen-5-ethers. ....	12
Abb. 2.2	Schematische Darstellung des Anschlusses der Gefäße des Herztransplantats an das Gefäßsystem der Empfängermaus.....	17
Abb. 2.3	Protokoll der ersten Versuchsreihe mit Behandlungsbeginn parallel zur Induktion der Arthritis .....	20
Abb. 2.4	Protokoll der zweiten Versuchsreihe mit Behandlungsbeginn 14 Tage nach Induktion der Arthritis .....	21
Abb. 2.5	<i>Monitoring-Software</i> zur Überwachung des Tieres während der Narkose. ....	22
Abb. 2.6	Positionierung der Maus mitsamt dem Probenkopf (links) im Spektrometer ...	23
Abb. 2.7	Platzierung der Maus im Probenkopf für die MR-Messungen.....	25
Abb. 2.8	Auswertung der MR-Datensätze mit dem <i>Schwellen-Tool</i> .....	27
Abb. 2.9	Auswertung der detektierten Signale unter Berücksichtigung der zuvor festgelegten Schwellen .....	28
Abb. 2.10	Protokoll Visuelles <i>Scoring</i> .....	29
Abb. 3.1	Transversale Aufnahme eines <i>allogenen</i> Herztransplantats (C57B10.A - C57BL/6) im Abdomen der Empfängermaus.....	33
Abb. 3.2	Lokalisation der MR-Schnittebenen durch das Herztransplantat im Abdomen der Empfängermaus .....	34
Abb. 3.3	Protonen- und Fluorbilder zum Vergleich der Abstoßungsreaktion bei <i>Iso</i> - beziehungsweise <i>Allografts</i> .....	35
Abb. 3.4	MR-Signal- und <i>Palpationsscoreverläufe</i> bei <i>Iso</i> - beziehungsweise <i>Allografts</i> . ....	36
Abb. 3.5	Gegenüberstellung der histologische Ergebnisse der <i>Allo</i> - und <i>Isografts</i> aus HE-Färbung und Immunhistochemie.....	38
Abb. 3.6	PFC-Anreicherung als Korrelat der Abstoßungsreaktion 6 beziehungsweise 11 Tage nach Therapiebeginn.....	39
Abb. 3.7	Effekt der immunsuppressiven Therapie mit Rapamycin.....	40
Abb. 3.8	Immunhistochemische <i>post-mortem</i> Analyse der Transplantatherzen.....	41
Abb. 3.9	<sup>1</sup> H-MR-Bilder vom Hinterbein der Maus zur Darstellung der anatomischen Verhältnisse .....	42
Abb. 3.10	MR-Aufnahmen der Hinterpfoten in Frontal- und Sagittalebene .....	43
Abb. 3.11	Exemplarische Darstellung isotroper, hochaufgelöster <sup>1</sup> H-/ <sup>19</sup> F-3D-Datensätze.....	44
Abb. 3.12	Korrelation von visuell erhobenem <i>Score</i> und <sup>19</sup> F-MR-Signal an den Hinterpfoten .....	45

---

Abb. 3.13 Darstellung der makroskopischen <i>Scorewerte</i> nach Arthritisinduktion ( <i>CIA</i> -Modell), Peter van Lent, PhD) .....	45
Abb. 3.14 Vergleich der Früherkennung von Arthritis mittels visuellem <i>Score</i> und MRT im Zeitverlauf .....	46
Abb. 3.15 Quantifizierung der Ergebnisse aus den MR-Messungen bei Therapie parallel zur <i>Boosterinjektion</i> .....	48
Abb. 3.16 Quantitative Auswertung der MR-Signale bei Therapiebeginn parallel zur <i>Boosterinjektion</i> .....	48
Abb. 3.17 Ergebnisse der <sup>19</sup> F-MR-Messungen bei Therapiebeginn 14 Tage nach <i>Boosterinjektion</i> .....	50
Abb. 3.18 Darstellung der visuell erhobenen <i>Scorewerte</i> in den unterschiedlich behandelten Versuchsgruppen .....	50
Abb. 3.19 Histologische Analyse arthritischer Kniegelenke .....	51

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Substanzen zur Herstellung von Pufferlösung .....	13
Tab. 2.2	Substanzen zur Herstellung von PFC-Emulsionen .....	14
Tab. 2.3	Anzahl der Versuchstiere pro Versuchsreihe .....	15
Tab. 2.4	Protokoll zur Kollagen-induzierten Arthritis (CIA).....	18

# Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AMP</b>	Adenosinmonophosphat
<b>BSG</b>	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
<b>cAMP</b>	cyclisches Adenosinmonophosphat
<b>CCP</b>	Cyclische citrullinierte Peptide
<b>CD73</b>	<i>Cluster of Differentiation 73</i> (5'-ecto-Nukleotidase)
<b>CFA</b>	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
<b>Chet</b>	Cyclo-hexyl-ethyl-thio
<b>Chet-Ado</b>	Chet-Adenosin
<b>Chet-AMP</b>	Chet-Adenosinmonophosphat
<b>CIA</b>	<i>Collagen-induced Arthritis</i> (Kollagen-induzierte Arthritis)
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>CT</b>	Computertomographie
<b>dGEMRIC</b>	<i>delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage</i>
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
<b>FITC</b>	Fluoreszeinisothiocyanat
<b>FOV</b>	<i>Field of view</i>
<b>g</b>	Gramm
<b>GMP</b>	Guanosinmonophosphat
<b>HE-Färbung</b>	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
<b>HTx</b>	Herztransplantation
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukin-1 $\beta$
<b>iNOS</b>	Induzierbare NO-Synthase
<b>IRI</b>	<i>Ischemia Reperfusion Injury</i> (Ischämisches Reperfusionssyndrom)
<b>M</b>	Molarität (Mol pro Liter)
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MHC</b>	<i>Major-histocompatibility-complex</i>
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter

---

<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>MSME</b>	<i>Multi-slice-multi-echo</i>
<b>MSPIO</b>	<i>Micrometer-sized particles of iron oxide</i>
<b>mT/m</b>	<i>Methods-time measurement</i> (Arbeitsablauf-Zeitanalyse)
<b>MTP</b>	Metatarsophalangealgelenk
<b>MPH-SPECT</b>	<i>Multi-spinhole</i> SPECT
<b>N</b>	Normalität
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Dinatriumhydrogenphosphat
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells</i>
<b>NGS</b>	<i>Normal goat serum</i> (Ziegenserum)
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killerzellen
<b>nl</b>	Nanoliter
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> ; Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PET</b>	Positronen-Emissions-Tomographie
<b>PFC</b>	Perfluorcarbonether
<b>pH-Wert</b>	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
<b>RA</b>	Rheumatoide Arthritis
<b>RARE</b>	<i>Rapid-acquisition-with-relaxation-enhancement</i>
<b>RF</b>	Rheumafaktor
<b>ROI</b>	<i>Region of interest</i>
<b>SPECT</b>	<i>Single-Photon Emission Computed Tomography</i>
<b>SPIO</b>	<i>Small particles of iron oxide</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-like-Receptor</i>
<b>TNF-α</b>	Tumornekrosefaktor-α
<b>UMP</b>	Uridinmonophosphat
<b>USPIO</b>	<i>Ultra small particles of iron oxide</i>
<b>VCI</b>	<i>Vena cava inferior</i>
<b>Vol%</b>	Volumenprozent
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
<b>w/v</b>	Gewicht pro Volumen
<b>wt/wt</b>	Gewicht pro Gewicht (Gewichtsprozent)
<b><sup>1</sup>H</b>	Wasseratom
<b><sup>19</sup>F</b>	Fluoratom
<b>µg</b>	Mikrogramm

---

<b>µg/µl</b>	Mikrogramm pro Mikroliter
<b>µs</b>	Mikrosekunde
<b>°</b>	Grad
<b>°C</b>	Grad Celsius

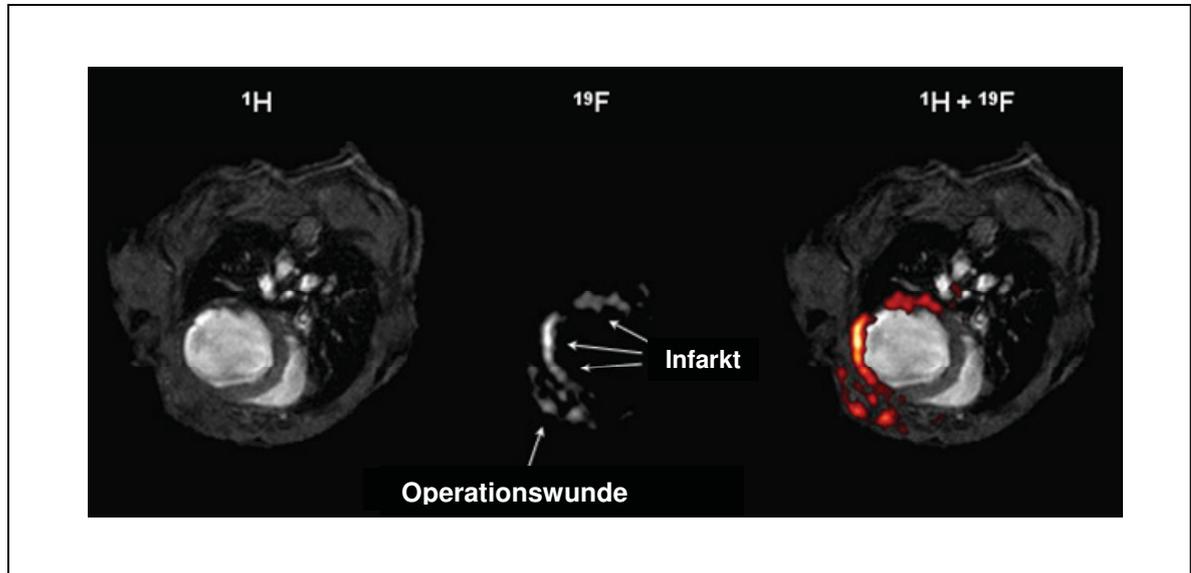
# 1 Einleitung

Zahlreiche Erkrankungen verschiedenster Genese gehen mit Entzündungsreaktionen einher. Dabei sind diverse Organsysteme betroffen, deren weitere Funktionsfähigkeit vor allem von einer rechtzeitigen Diagnose und der zeitnahen Einleitung einer adäquaten Therapie abhängt. Eine schnelle, exakte Diagnostik entzündlicher Prozesse in inneren Organen stellt sich allerdings häufig als äußerst problematisch dar: Bis heute existiert keine Methode, die die Frühphase einer Entzündung – möglichst noch vor Auftreten der allgemeinen Entzündungszeichen (klinisches Bild, Laborparameter) – zuverlässig aufdecken kann.

Die bislang in der klinischen Routine etablierten, modernen bildgebenden Verfahren (Echokardiographie, Sonographie, Kapillarmikroskopie, MRT, CT) nutzen lediglich die Hyperämie beziehungsweise Hyperperfusion und das Ödem im Rahmen einer Entzündungsreaktion aus, um eine ablaufende Entzündung nachzuweisen. Demgegenüber zeigte sich in den letzten Jahren, dass die Markierung von infiltrierenden, immunkompetenten Zellen mit Kontrastmitteln einen erfolgversprechenden Ansatz zur Lösung dieses Problems darstellen kann. In den meisten zellulären MRT-Studien wurde dazu *bis dato* auf die Verwendung von Eisenoxid-Partikeln (*USPIOs*, *SPIOs*, oder *MSPIOs*) als Kontrastmittel zurückgegriffen, welche vom Monozyten-Makrophagen-System phagozytiert werden (1,2). Auf T2-gewichteten MR-Bildern erscheinen die beladenen Zellen durch Signalauslöschung in Form von dunklen Arealen (1). Auf diese Weise können Regionen mit erniedrigter bis fehlender MR-Signal-Intensität mit dem Schauplatz einer Infiltration von Immunzellen assoziiert werden – ein Vorgehen, welches unter anderem auch bei der Abstoßung von transplantierten Organen angewandt wurde (3-6). Dennoch ist nicht immer eindeutig zu differenzieren, ob die Signalreduktion in anatomischen Protonen-Bildern des MRT durch die Nanopartikel zustande kommt oder unspezifische Ursachen hat. Diese Tatsache macht die Interpretation der Bilder häufig problematisch und erschwert eine zuverlässige Diagnostik erheblich.

Aus diesem Grund wurde im Institut für Molekulare Kardiologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ein neues Verfahren zum Nachweis entzündlicher Prozesse über einen eindeutig positiven Kontrast mittels Fluor-MRT entwickelt (Abbildung 1.1). Das hierfür genutzte, natürlich vorkommende Fluorisotop  $^{19}\text{F}$  ist MR-empfindlich und weist dabei ähnliche Eigenschaften wie der  $^1\text{H}$ -Kern auf, der zur Aufnahme anatomischer Bilder genutzt wird. Fluor ( $^{19}\text{F}$ ) kommt als eventuell störendes Hintergrundsignal im Körper nicht vor. So sind die beobachteten Signale von den injizierten  $^{19}\text{F}$ -haltigen Präparaten hoch-

spezifisch und können zuverlässig quantifiziert werden. Das Übereinanderlegen der aufgenommenen  $^{19}\text{F}$ -Bilder und der morphologisch entsprechenden  $^1\text{H}$ -Bilder ermöglicht eine exakte anatomische Lokalisation der detektierten  $^{19}\text{F}$ -Signale innerhalb des Körpers.



**Abb. 1.1 Exemplarische Darstellung der Vorgehensweise.**

Links: Protonenbild eines infarzierten Herzens; Mitte: Detektion der PFC-Moleküle anhand einer  $^{19}\text{F}$ -Aufnahme; Rechts: Lokalisation der Fluorsignale im Myokard durch kombinierte Betrachtung beider Bilder ( $\text{FOV } 3 \times 3 \text{ cm}^2$ , Schichtdicke 1 mm); Mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe NMR, Institut für Molekulare Kardiologie, HHU Düsseldorf.

Als Kontrastmittel werden biochemisch inerte, emulgierte Perfluorocarbone (PFCs) genutzt, welche (ähnlich den *SPIOs*) vor allem von Monozyten und Makrophagen phagozytiert werden (7,8). In ersten Versuchen wurden diese Substanzen bereits erfolgreich zur Visualisierung der Infiltration von immunkompetenten Zellen im Rahmen einer Pneumonie beziehungsweise bei kardialer oder cerebraler Ischämie eingesetzt (Abbildung 1.1) (7,9).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Entzündungsdiagnostik durch Fluor ( $^{19}\text{F}$ )-MR-Messungen auf weitere klinisch relevante Krankheitsbilder angewendet werden kann. Zum einen sollte der Behandlungserfolg einer immunsuppressiven Therapie mit Rapamycin bei herztransplantierten Mäusen durch regelmäßige MR-Aufnahmen nach der Operation verfolgt werden. Zum anderen sollte durch repetitive MR-Messungen bei Mäusen mit induzierter Arthritis die frühzeitige Detektion der Entzündungsherde bei rheumatoider Arthritis, noch vor Einsetzen klinischer Symptome, realisiert werden.

## 1.1 Die Entzündungsreaktion

### 1.1.1 Definition

„Unter einer Entzündung versteht man eine vitale Reaktion auf einen – zumindest in der Anfangsphase – lokalen Gewebeschaden oder auf die zugrunde liegende Noxe. Als Noxe bezeichnet man Faktoren, die eine Gewebeschädigung hervorrufen können.“ (10)

### 1.1.2 Ätiologie

Es sind beispielsweise mikrobielle Erreger, Traumata sowie ischämische, thermische, radiogene, aktinogene und chemische Noxen als Ursache einer Entzündung denkbar (11).

### 1.1.3 Symptome nach Celsus und Galen

*Rubor* (Rötung durch Vasodilatation), *Tumor* (Gewebeschwellung durch entzündliches Exsudat), *Calor* (Erwärmung aufgrund der vermehrten Gewebedurchblutung) sowie *Dolor* (Schmerz durch Nervenreizung) sind charakteristische Symptome einer unter Abschnitt 1.1.1 definierten Entzündungsreaktion nach Celsus und Galen. Die *Functio laesa* (gestörte Gewebefunktion) wurde von Virchow als ein weiteres Merkmal ergänzt (11).

### 1.1.4 Ablauf einer akuten Entzündungsreaktion

Zunächst kommt es durch die schädigende Einwirkung einer Noxe auf das Gewebe zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Diese Mediatoren regulieren eine Reihe „kaskadenartig ablaufender vaskulärer und zellulärer Reaktionen“ (12), die das schädigende Agens eliminieren und die normale *Gewebeintegrität* (*Restitutio ad integrum*) wieder herstellen sollen. Zu diesem Zweck bewirken die vasoaktiven Mediatoren eine Gefäßerweiterung und eine daraus resultierende vermehrte Gewebedurchblutung sowie eine Permeabilitätssteigerung der Gefäßwände. Die Folge ist die Ausbildung eines entzündlichen Ödems. Dominiert wird die zelluläre Reaktion vor allem von Leukozyten (Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Monozyten beziehungsweise Makrophagen), die aus der Blutbahn in das geschädigte Gewebe einwandern. Hierbei sind 4 aufeinander folgende Schritte der zellulären Reaktion abzugrenzen: Margination mit anschließender Interaktion

mit dem Endothel, wodurch Emigration und Chemotaxis ermöglicht werden sowie die Phagozytose stattfindet (11).

Dabei erfolgt zu Beginn ein Wechsel aus dem zentralen, schnell fließenden Teil des Blutstroms in den randnahen, langsam fließenden Bereich. In Folge dessen entsteht eine endothelial-leukozytäre Interaktion, die eine Emigration in das Gewebe ermöglicht. Anschließend kommt es zur Chemotaxis gefolgt von weiteren Effektorfunktionen der Entzündungszellen, wie beispielsweise Phagozytose (11).

Darüber hinaus übernehmen Thrombozyten eine wichtige Funktion durch die Bildung chemotaktischer sowie Wachstumsfaktoren. Der ideale Ablauf einer akuten Entzündungsreaktion hat die Heilung zur Folge (11).

## 1.2 Makrophagenfunktion bei Entzündungen

Makrophagen sind Teil des mononukleären, phagozytären Systems, welches eine wichtige Rolle bei Abwehrreaktionen im Rahmen des angeborenen Immunsystems spielt. Da das angeborene Immunsystem seinerseits Auswirkungen auf das adaptive Immunsystem hat und zudem mit diesem interagiert (13,14), beeinflussen Makrophagen letztendlich beide Systeme. Makrophagen sind in vielen Organen, wie zum Beispiel in Herz, Leber, Niere und Lunge anzutreffen. Dort übernehmen die Gewebsmakrophagen Kontroll- und Überwachungsfunktionen, wie Phagozytose, Antigenpräsentation an T-Zellen, Produktion und Sekretion von Zytokinen sowie die Gewebereparatur (15).

Während Makrophagen im normalen Gewebe in der Regel nur in geringer Anzahl vorhanden sind, liegen sie bei einer lokalen Entzündungsreaktion in erhöhter Menge vor. Eingewanderte Blut-Monozyten differenzieren sich in entzündeten Regionen durch die lokalen Bedingungen zu Gewebsmakrophagen (16). Die darauf folgende Makrophagenaktivierung ist auf unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen. Zur klassischen Aktivierung werden 2 Stimuli benötigt. Einerseits Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (17), ein Produkt von NK-Zellen und aktivierten T-Zellen, andererseits die Bindung Antigen-assoziiertes Oberflächenmoleküle an beispielsweise *Toll-like-Rezeptoren (TLRs)*. Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (zum Beispiel *TLRs*) sind in der Lage endogene Moleküle wie Hitzeschock-Proteine und modifizierte Lipoproteine, die von geschädigten Zellen als Ausdruck eines Ischämie-Reperfusionssyndroms (*Ischemia reperfusion injury = IRI*) z. B. nach erfolgter Herztransplantation freigesetzt werden, zu erkennen (18,19). Auf diese Weise bewirkt das *IRI* eine Makrophagen-Aktivierung sowie eine Entzündungsreaktion. Ungepräg-

te, aktivierte Makrophagen phagozytieren und verarbeiten eingedrungene Bakterien, um sie anschließend in Verbindung mit *MHC-Klasse-II-Molekülen* auf ihrer Oberfläche darzustellen. Diese *MHC-Komplexe* werden von den Makrophagen geprägten T-Zellen präsentiert, um so deren Aktivierung im lokalen Umfeld einzuleiten (20).

T-Helferzellen (TH1-Zellen) lösen über die Freisetzung von IL-12 und die Induktion einer zytotoxischen Wirkung, die auf die Produktion von induzierbarer NO-Synthase (iNOS) sowie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) zurückzuführen ist, eine Entzündungsreaktion aus. Dadurch wird eine adaptive Immunantwort angeregt und das immunologische Gedächtnis geprägt.

Relevant für das Gebiet der Transplantation ist die Erkenntnis, *dass Makrophagen und T-Lymphozyten als dominierende Zelltypen in Infiltraten, welche die allergischen Reaktionen vom Spättyp ähneln, akut abgestoßener Allografts* vorkommen (21). Vieles deutet darauf hin, dass diese Vorgänge essentiell für die adaptive Immunantwort im Sinne einer akuten Abstoßungsreaktion eines *Allografts* ist (14). In immunhistochemischen Analysen von Gewebeproben aus transplantierten Herzen wurde bereits 3 Stunden nach Organreperfusion eine Infiltration von NK-Zellen und Makrophagen des Empfängers in das *allogene* Spenderherz festgestellt (22).

Da die Transplantatfunktion von der Infiltration mit NK-Zellen im Rahmen einer Abstoßungsreaktion unbeeinträchtigt bleibt, wird der Funktionsverlust des Transplantats dem Zeitmuster der Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen in das Spenderorgan zugeschrieben (22). In der vorliegenden Arbeit konzentriert sich daher die Auswertung mittels immunhistochemischer Verfahren vor allem auf die Quantifizierung der Makrophagen in den Allografts.

### 1.3 Adenosin als antiinflammatorisches Molekül

Adenosin ist ein natürlich vorkommendes Nukleosid, das über seine Bindung an G-Protein-gekoppelte Adenosin-Rezeptoren eine wichtige Funktion bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen einnimmt (23). Bis heute sind 4 Adenosin-Rezeptor-Subtypen beschrieben worden: Während der  $A_1$ - und der  $A_3$ -Rezeptor über das  $G_i$ -Protein inhibitorisch auf die Adenylatzyklase wirken, stimulieren  $A_{2A}$ - und  $A_{2B}$ -Rezeptoren das Enzym über das  $G_s$ -Protein. Zudem wurden Wirkmechanismen dieser Rezeptoren auf andere *second-messenger*-Systeme, wie Kalzium- oder Kaliumkanäle sowie Phospholipase C, beschrieben (23,24). Adenosin- $A_{2A}$ -Rezeptoren kommen hauptsächlich in Zellen des Im-

munsystems, zum Beispiel in Milz, Thymus, Leukozyten, glatten Muskelzellen, im Endothel sowie in Thrombozyten, vor (25). Sie vermitteln die immunsuppressive und hypotensive Wirkung von Adenosin (26) über ein  $G_s$ -Protein, welches bei Stimulation des Rezeptors die Adenylatzyklase aktiviert, diese erhöht wiederum die Bildung von cyclischem AMP (cAMP) erhöht (27). Als Folge liegt cAMP in hoher Konzentration in der Zelle vor. Diese Erhöhung des cAMP-Spiegels nimmt Einfluss auf verschiedene antiinflammatorische Stoffwechselwege und mündet am Ende über die Regulierung von *NF- $\kappa$ B* (*nuclear factor- $\kappa$ B*) in einer Hemmung der TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Produktion, was eine Symptombesserung bei Gelenkentzündungen zur Folge hat (28). Deshalb können  $A_{2A}$ -Rezeptor-Agonisten zum einen aufgrund ihrer antiinflammatorischen und immunsuppressiven Wirkung therapeutischen Nutzen haben (29), auf der anderen Seite weisen sie jedoch eine sehr potente vasodilatatorische Wirkung auf, welche zu starkem Blutdruckabfall führt. Dieser vasodilatatorische Effekt wird in der Kardiologie beim pharmakologischen Stresstest genutzt (30). Darüber hinaus stellen Adenosin-Rezeptor-Agonisten eine Behandlungsoption bei Psychosen oder *Chorea major* dar (31).

Die starke hypotensive Wirkung des Adenosins limitiert eine systemische Applikation (31,32). Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung eines phosphorylierten Vorläufermoleküls des  $A_{2A}$ -Rezeptor-Agonisten (Chet-Adenosin-monophosphat als *Prodrug* von Chet-Adenosin, vgl. Abbildung 1.1), eine Separation des antiinflammatorischen beziehungsweise immunsuppressiven Effektes von der vasodilatatorischen Wirkung durch Spaltung und Freisetzung des Agonisten im entzündeten Gebiet erreicht werden.

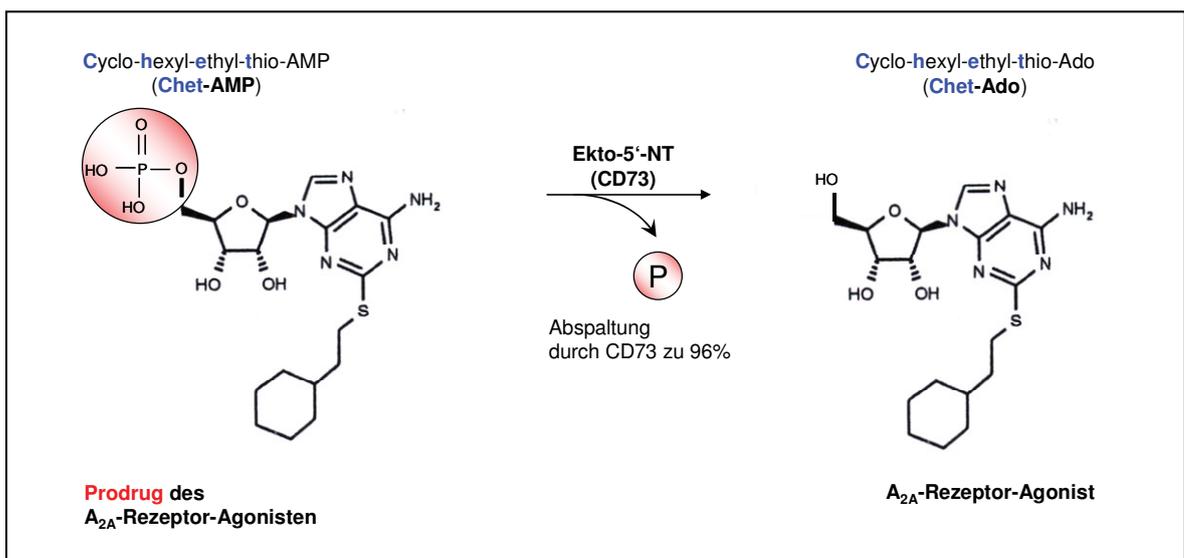
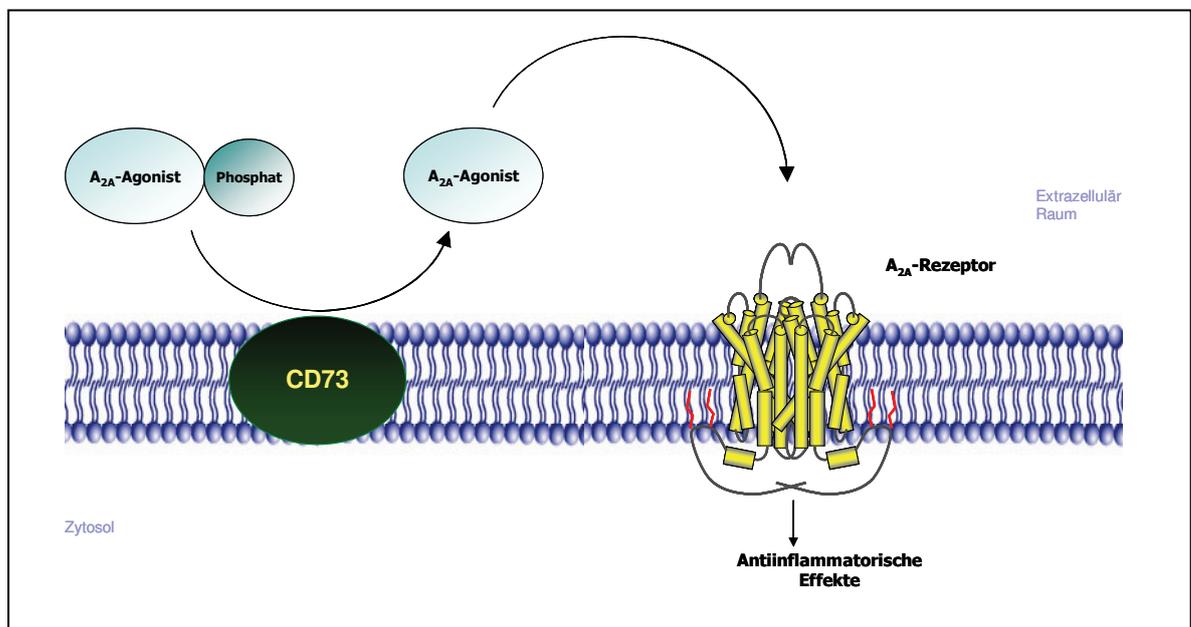


Abb. 1.2 Cyclohexylethylthio(Chet)-AMP als Substrat von CD73

Wie der obigen Abbildung 1.2 zu entnehmen ist, wird die Dephosphorylierung des extrazellulären AMP zu Adenosin durch das Enzym Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) katalysiert. Dies stellt den letzten Schritt im natürlichen Abbauweg von extrazellulärem ATP zu Adenosin dar. Dabei haftet CD73 über einen Glycosylphosphatidinositol-Anker an der Plasmamembran und katalysiert die Hydrolyse von Nucleosid-5-Monophosphaten (wie AMP, GMP und UMP) zu den entsprechenden Nucleosiden (33). CD73 ist insbesondere auf der Oberfläche von Endothelzellen großer und kleiner Arterien zu finden, aber auch bei einer Vielzahl von Leukozytensubpopulationen. Eine Hypoxämie induziert die Bildung von CD73 (34). Zudem wird das Enzym grundsätzlich bei entzündlichen Vorgängen hochreguliert. Daher ist davon auszugehen, dass Chet-AMP bei systemischer Gabe hauptsächlich in entzündeten Geweben, wie in Abbildung 1.3 zu sehen, dephosphoryliert wird.



**Abb. 1.3** Spaltung des phosphorylierten Prodrugs durch CD73 sowie anschließende Bindung an den A<sub>2A</sub>-Rezeptor

Auf diese Weise würde die antiinflammatorische Wirkung des Adenosins in diesen Bereichen lokal begrenzt zum Tragen kommen, ohne dass es zur Entwicklung eines gravierenden systemischen Blutdruckabfalls kommen würde.

## 1.4 Die Herztransplantation (HTx)

Dr. Christiaan Barnard setzte die Herztransplantation 1967 in Kapstadt zum ersten Mal als Behandlungsmethode der therapieresistenten, terminalen Herzinsuffizienz ein (35). Seitdem stieg die postoperative Überlebensrate dank stetiger Optimierungen der organerhaltenden und immunsuppressiven Therapie kontinuierlich an. Die 5-Jahresüberlebensrate von Herztransplantationen beträgt heute ungefähr 70% (36).

Wichtige Faktoren, die die Prognose des Patienten beeinflussen, sind dabei die Transplantatabstoßung, Nebenwirkungen immunsuppressiver Medikamente sowie genetische Disposition und kardiovaskuläre Risikofaktoren des Patienten. Dabei stellt in der Frühphase unter anderem die Abstoßungsreaktion eine schwere Komplikation nach *allogener* Organtransplantation dar. Um eine Abstoßungsreaktion nach der Operation detektieren zu können, muss *bis dato* auf eine Gewebsbiopsie des Spenderherzens zurückgegriffen werden (37,38). Diese Methode stellt momentan den Gold-Standard dar.

Aufgrund der Invasivität dieses Eingriffs birgt die Biopsie jedoch ein recht hohes Risiko für Komplikationen. Zudem ist diese Methode in ihrer Aussagekraft bezüglich des Ablaufs einer Abstoßungsreaktion begrenzt, da nur eine relativ kleine Gewebemenge entnommen werden kann. So kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass an einer anderen Stelle, als dort wo der Gewebszylinder entnommen wurde, eine Abstoßungsreaktion vorliegt. Da die Abstoßungsreaktion in vielen verschiedenen Facetten auftreten kann, fällt die Biopsie häufig falsch negativ aus.

Darüber hinaus wurden Diskrepanzen zwischen der bioptischen Diagnostik und der tatsächlich stattfindenden Abstoßung festgestellt (39,40). Daher wurden in der Vergangenheit zahlreiche Versuche unternommen, die immunsuppressive Therapie zur Verhinderung einer Abstoßungsreaktion unabhängig von den histologischen Ergebnissen der Biopsie durchzuführen und die Therapie dafür mehr an der Transplantatfunktion, die durch nicht-invasive Erhebung physiologischer Parameter (41-44) und die Messung von Serumproteinen (45,46) bestimmt werden kann, auszurichten. Bis heute bietet jedoch keine dieser Methoden die Möglichkeit einer zuverlässigen Detektion der Abstoßungsreaktion, weil schleichend beginnende Funktionsveränderungen, ausgelöst durch eine akute Abstoßungsreaktion, nur schlecht durch konventionelle bildgebende Verfahren dargestellt werden können. Diese erfassen erst spätere Stadien der Abstoßung, allerdings kann es dann für eine therapeutische Intervention bereits zu spät sein (47,48). Auch die Standardlaborparameter weisen eine zu geringe Sensitivität und Spezifität für die Diagnose der Trans-

plantatabstoßung auf. Deshalb sind sie zum Nachweis einer Abstoßungsreaktion im Frühstadium unbrauchbar.

Wie in Kapitel 1.2 bereits erwähnt, werden alle Organe, die von einer akuten Abstoßungsreaktion betroffen sind, bereits im frühen Stadium des Abstoßungsprozesses von Zellen des Immunsystems infiltriert. Aktivierte Makrophagen stellen zu diesem Zeitpunkt einen Großteil der eingewanderten Zellen dar und werden zunehmend als entscheidender Verstärker der Organabstoßung angesehen (49,50). Da Makrophagen im frühen Infiltrat von abgestoßenen Transplantaten akkumulieren, ist eine spezifische Verfolgung dieser Zellen ein ideales Ziel für eine molekulare Bildgebung. Auf diese Weise kann die Erfassung einer Abstoßungsreaktion in der Frühphase ermöglicht werden.

Nach vorausgegangenen, ersten Untersuchungen zur Verfolgung der Herztransplantatabstoßung mittels Fluor ( $^{19}\text{F}$ )-MRT wird nun in der gegenwärtigen Arbeit der Versuch unternommen, den Behandlungserfolg einer immunsuppressiven Therapie mit Rapamycin nach einer Herztransplantation zu dokumentieren. Um ein geeignetes Versuchsmodell zu generieren, erfolgt die Transplantation des Spenderherzens in das Abdomen einer Empfängermaus. Der Erfolg der sich anschließenden immunsuppressiven Therapie wird durch den Vergleich zweier Versuchsgruppen überwacht, von denen eine Gruppe mit Rapamycin behandelt wird und die andere als unbehandelte Kontrollgruppe fungiert. Danach erfolgt die quantitative Auswertung des jeweils in beiden Gruppen detektierten  $^{19}\text{F}$ -Signals.

## 1.5 Rheumatoide Arthritis (RA)

In Deutschland beträgt die Prävalenz der Rheumatoiden Arthritis 0,5–1% (51). Häufig führt diese chronisch entzündliche Systemerkrankung zu Gelenkdestruktion, Invalidität und aufgrund starker Schmerzen zu erheblichem Verlust von Lebensqualität. Die dadurch notwendigen Ausgaben im Gesundheitssystem sowie der Verlust der Arbeitsfähigkeit verursachen enorm hohe sozioökonomische Kosten. So betragen die durchschnittlichen jährlichen Kosten etwa 5.000 € pro Fall. Ein weiterer erheblicher Kostenfaktor entsteht durch die Erkrankung vieler Patienten vor Eintritt in das Rentenalter (51). Während des ersten Jahres der Erkrankung sind 75% der Patienten mindestens ein Mal arbeitsunfähig. Innerhalb von 2-3 Jahren nach Diagnosestellung werden darüber hinaus circa 20-30% der Patienten dauerhaft erwerbsunfähig (53).

Das bisher übliche Behandlungsschema einer langsam eskalierenden Therapie ist in den letzten Jahren in Frage gestellt worden. Es gibt vermehrt Hinweise darauf, dass insbe-

sondere die frühe Einleitung einer Behandlung mit Basistherapeutika, vor der manifesten Erkrankung, entscheidend für die weitere Prognose ist (54,55). Das aktuelle Motto lautet: „*Hit hard and early*“. Auf diese Weise soll eine messbare Verbesserung nach 4 Wochen erreicht werden und die Arbeitsfähigkeit möglichst lange erhalten bleiben. Bis heute existiert kein einzelner, beweisender diagnostischer Test für die RA, der die frühere Einleitung therapeutischer Maßnahmen rechtfertigen könnte. Vielmehr müssen bei der Diagnostik die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen zur Erhärtung der klinischen Verdachtsdiagnose abgewartet und berücksichtigt werden. Das führt häufig dazu, dass die Frühphase der Erkrankung verpasst wird, obwohl eine Therapie die Prognose während dieser Zeit am effektivsten beeinflussen kann (54,55).

Bei der klinischen Untersuchung zeigt sich häufig eine symmetrische Schwellung und Schmerzhaftigkeit der Hand-, Fingergrund- und Fingermittelgelenke. Dieser Befund wird meist von einer Steifigkeit der Gelenke vor allem am Morgen begleitet, welche mindestens 60 Minuten andauert. Weiter richtungweisend für die Verdachtsdiagnose RA ist das Bestehen der Symptome seit mindestens 6 Wochen und der Befall von mehr als 2 Gelenken (52).

Um die klinische Verdachtsdiagnose zu untermauern, können Entzündungsparameter, wie ein erhöhter CRP-Wert oder eine beschleunigte BSG hilfreich sein. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass eine Erhöhung dieser Werte nicht beweisend für eine RA ist, weil diese als eher unspezifische Entzündungsmarker einzustufen sind. Ferner ist zu bedenken, dass beim Vorliegen von Werten im Normbereich eine RA nicht ausgeschlossen werden kann. IgM-Rheumafaktoren (IgM-RF) sind bei ca. 65-80% der Patienten positiv und können eine Verdachtsdiagnose ebenfalls erhärten (52). Als spezifischerer Marker zur Erkennung einer RA im Frühstadium eignet sich der Antikörper gegen cyclische citrullinierte Peptide (CCP), der auch RF-negative Verlaufsformen erfasst. Die Sensitivität beläuft sich hierbei auf etwa 68% (56).

Als wegweisendes bildgebendes Verfahren wird die native röntgenologische Untersuchung von Händen und Füßen durchgeführt. Diese Untersuchung eignet sich aber nur zur Darstellung multipler erosiver Veränderungen der Gelenke, die den typischen Befund eines fortgeschrittenen Stadiums der RA darstellen. Das Frühstadium der RA wird somit nicht erfasst (52). Bei einer Beschwerdedauer von durchschnittlich 8 Wochen haben lediglich 13% der Patienten, bei denen sich später die Diagnose RA bestätigt, röntgenologisch nachweisbare Erosionen (57). Als ergänzendes, diagnostisches Mittel zur Darstellung von Gelenkergüssen, synovialer Proliferation und Tendovaginitiden findet die Sonographie

Anwendung. Aber auch diese Methode kann keinen eindeutigen Beweis einer RA erbringen. Bei besonderen Indikationen kommt die Szintigraphie zum Einsatz, die jedoch lediglich einen unspezifischen Nachweis erbringen und die Verteilung von Zonen gesteigerten Knochenstoffwechsels darstellen kann (52).

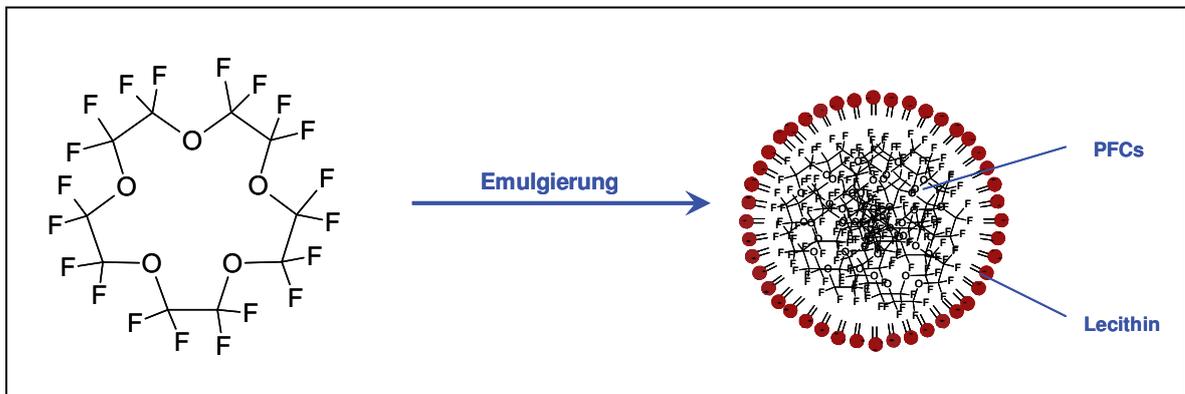
Die Magnetresonanztomographie (MRT) liefert im Gegensatz zu den oben genannten Methoden eine hochsensitive und hochauflösende Bildgebung der Struktur und Funktion von Knochen, Gelenken, Sehnen und Muskeln. Momentan ist sie aber noch nicht in der klinischen Routinediagnostik für RA etabliert. Da bei der RA bereits im Frühstadium, noch vor dem Auftreten klinischer Symptome, immunkompetente Zellen in die entzündeten Areale einwandern, soll im Rahmen dieser Arbeit über die Beladung monozytärer Zellen mit biochemisch inerten PFCs, die frühzeitige und eindeutige Detektion infiltrierender Immunzellen und damit die Initialisierung des inflammatorischen Prozesses bei RA im Mausmodell mittels MRT dargestellt werden. Zur Induktion der Arthritis wird ein etabliertes Arthritismodell bei DBA/J1-Mäusen angewendet. Das Auftreten klinischer Symptome (Schwellung, Rötung, Überwärmung) wird parallel zu MR-Untersuchungen durch visuelle Inspektion der Hinterpfoten standardisiert anhand eines *Scores* dokumentiert. Zum Vergleich beider Methoden werden die MR-Ergebnisse den visuellen Scores gegenübergestellt.

Darüber hinaus wird in der vorliegenden Arbeit die antiinflammatorische Wirkung des extrazellulär gebildeten Adenosins bei Entwicklung einer RA untersucht. Dazu erfolgt die Applikation des selektiven, phosphorylierten  $A_{2A}$ -Agonisten Chet-Adenosin, beziehungsweise dessen inaktiven Vorläufermoleküls Chet-AMP. Im Folgenden soll dann der Krankheitsverlauf unter dem jeweiligen Behandlungsregime durch die Detektion von Entzündungskorrelaten mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT dokumentiert werden. Zu diesem Zweck werden verschiedene Therapieansätze auf das Arthritismodell angewendet. Dabei werden Chet-Ado und Chet-AMP eingesetzt, die in einer Versuchsreihe zeitgleich zur Arthritisinduktion und in der folgenden Untersuchungsreihe erst 14 Tage nach Induktion der Arthritis (im Sinne einer konventionellen Therapie) verabreicht werden.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Herstellung einer Perfluorkronenether (PFC)-Emulsion

Mittels Hochdruckhomogenisation wurde eine sterile, isotone Nanoemulsion (siehe Abbildung 2.1) mit einer Partikelgröße von etwa 130 nm hergestellt, um die wasserunlöslichen PFC-Moleküle für Injektionszwecke im Tiermodell nutzen zu können.



**Abb. 2.1 Emulgierung des Perfluor-15-kronen-5-ethers**

Strukturformel des Perfluor-15-kronen-5-ether (15C5) (links), mizellenartige Struktur der emulgierten PFCs nach Emulgierung (rechts); Mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe NMR, Institut für Molekulare Kardiologie, HHU Düsseldorf.

Als hydrophile Phase wurde hierzu ein wässriger, isotoner und isohydrischer Puffer verwendet. Der Puffer enthielt 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES,  $\geq 99,5\%$ , Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) als Puffersubstanz, Glycerin (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) als isotonisierenden Zusatz und Wasser für Injektionszwecke.

#### 2.1.1 Pufferherstellung

Zur Herstellung des Puffers wurde HEPES in ein Becherglas eingewogen und unter Rühren (Magnetrührer, „Rührfisch“) in etwa 100 ml Wasser für Injektionszwecke gelöst. Glycerin wurde hinzugefügt und ebenfalls gelöst. Die erhaltene Lösung wurde in einen Messkolben mit einem Fassungsvermögen von 1 Liter gegeben und mit Wasser für Injektions-

zwecke bis knapp unterhalb des Eichstriches aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Bestimmung des pH-Wertes der Lösung und die Einstellung auf einen pH-Wert von 7,4 mit NaOH-Lösung. Hierzu wurde die NaOH-Lösung bei paralleler pH-Wert-Messung tropfenweise unter Rühren hinzugegeben. Nachdem der pH-Wert von 7,4 erreicht wurde, erfolgte das Auffüllen des Messkolbens mit Wasser für Injektionszwecke auf 1 Liter (bis zum Eichstrich).

Zusammensetzung und Einwaagen zur Herstellung von 1 l Puffer können Tabelle 2.1 entnommen werden:

**Tab. 2.1 Substanzen zur Herstellung von Pufferlösung**

Substanz	Konzentration	Einwaage
HEPES (M 238,31)	10 mM	2,38 g
Glycerol	2,5 % (wt/wt)	25 g
NaOH	10 N	Tropfenweise unter Rühren hinzugeben bis pH 7,4 erreicht ist
Wasser f. Injektionszwecke		Auf 1 l auffüllen

### 2.1.2 Herstellung der Nanoemulsion

Die Nanoemulsion wurde aus 10% wt/wt Perfluor-15-kronen-5-ether (Perfluorierte Verbindung, Chempur, Karlsruhe), dem Emulgator Lipoid® E80 (Lecithin aus Eigelb, Lipoid GmbH, Ludwigshafen) und dem zuvor produzierten, isotonen Puffer hergestellt. Hierfür wurde der Emulgator in ein geeignetes Becherglas eingewogen und nach Zugabe des isotonen Puffers mit einem Magnetrührer für 30 Minuten bei Raumtemperatur dispergiert (abgedeckt mit Parafilm). Anschließend wurde der Magnetrührer entfernt und der Perfluorkronenether hinzugegeben.

Die Mischung wurde mit einem Hochleistungsdispergierer (T18 basic ULTRA TURRAX, IKA Werke GmbH & Co KG, Staufen) auf Stufe 2-4 für 2 Minuten vorhomogenisiert. Mit einem kontinuierlichen Hochdruckhomogenisator (Emulsiflex® C5, Avestin, Mannheim) wurde die erhaltene Rohemulsion zu einer Nanoemulsion weiterverarbeitet. Die Homogenisierung erfolgte bei einem Eingangsdruck von 5 bar und einem Homogenisierungsdruck von 1000 bar. Nachdem die Emulsion einen Zyklus durchlaufen hatte, wurde sie mit einem Becherglas aufgefangen, um sie einem weiteren Zyklus zuzuführen. Insgesamt wurde die Emulsion in circa 16 Minuten 10 Zyklen zugeführt.

Schließlich wurde die Nanoemulsion in *Vials* (Befüllung zu 2/3) abgefüllt, verschlossen und bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 2 bar über 15 Minuten autoklaviert. Um eine durchschnittliche Partikelgröße von 130 nm zu gewährleisten, erfolgte abschließend eine Größenbestimmung der Partikel mittels dynamischer Lichtstreuung (Zetatrac®, Partikel Metrix, Meerbusch). Bis zur Verwendung wurde die Nanoemulsion bei 6 °C aufbewahrt.

Zusammensetzung und Einwaagen zur Herstellung von 50 g der Nanoemulsion können Tabelle 2.2 entnommen werden:

**Tab. 2.2 Substanzen zur Herstellung von PFC-Emulsionen**

Substanz	Konzentration	Einwaage
Perfluorkronenether	10%	5 g
Lipoid® E80	4%	2 g
Puffer	86%	43 g

## 2.2 Versuchstiere

Alle Tiere erhielten Standard-Futter und Leitungswasser *ad libitum*. Für die gesamten Untersuchungen wurden ausschließlich männliche Tiere gewählt, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch hormonelle Schwankungen auszuschließen. Alle Tierexperimente wurden unter Einhaltung der Tierschutzverordnung durchgeführt und durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV, Aktenzeichen 50.05-230-77/06, Genehmigung vom 06.12.2006, Antragsteller Dr. Ulrich Flügel; Aktenzeichen 8.87-50.10.34.08.296, Genehmigung vom 09.12.2008, Antragsteller Dr. Ulrich Flügel) genehmigt. Die Anzahl der Versuchstiere pro Versuchsreihe kann Tabelle 2.3 entnommen werden.

Tab. 2.3 Anzahl der Versuchstiere pro Versuchsreihe

Modell	Versuchsreihe		Anzahl Tiere
Herztrans- plantation	Allograft		5
	Isograft		5
	Rapamycin		10
	Kontollgruppe		10
Arthritis	Collagen-induced Arthritis		5
	Kontrollgruppe		5
	Behandlungsbeginn parallel zur Arthritisinduktion	DMSO	8
		Chet-Adenosin (5 µg/µl)	8
		Chet-AMP (5 µg/µl)	8
	Behandlungsbeginn 14 Tage nach Arthritisinduktion	DMSO	6
		Chet-Adenosin (1,5 µg/µl)	6
		Chet-AMP (1,5 µg/µl)	6
Chet-AMP (0,75 µg/µl)		6	

### 2.2.1 HTx-Modell

Für die Experimente wurden Mäuse im Alter von 10 bis 12 Wochen und einem Gewicht von 20 bis 25 g aus der Tierversuchsanlage (TVA) der Heinrich-Heine-Universität (HHU) Düsseldorf eingesetzt. Im Rahmen des verwendeten *allogenen* Transplantationsmodells wurden die Spenderherzen von C57B10.A (H-2<sup>a</sup>)-Mäusen in das Abdomen von C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>)-Mäusen transplantiert.

### 2.2.2 Arthritismodell

Zur Durchführung der Untersuchungen wurden 8 Wochen alte DBA/J1-Mäuse ebenfalls aus der Tierversuchsanlage der HHU Düsseldorf verwendet.

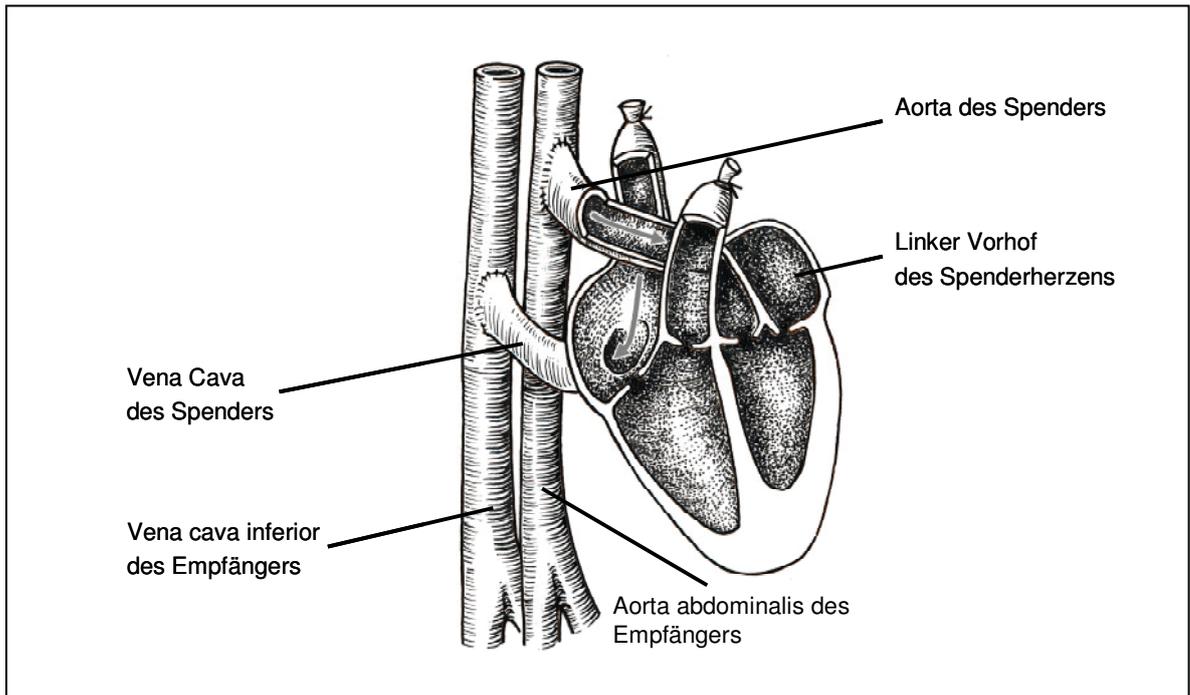
## 2.3 Induktion der Krankheitsmodelle

### 2.3.1 Durchführung der Herztransplantationen

Die Herztransplantationen wurden von Mitarbeitern des Nephrologischen Instituts des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Zur Entnahme des Donorherzens wurden die Mäuse mittels einer Lösung, bestehend aus 2% Xylazin und 10% Ketamin, in eine tiefe Narkose versetzt. Um einen Herzstillstand zu erreichen, wurde nach einer u-förmigen Thorakotomie eine kardioplege Lösung eingesetzt. Die Aorta ascendens und die Vena cava inferior (VCI) wurden jeweils von den umgebenden Geweben *abpräpariert* und durchtrennt, wohingegen *Vena cava superior*, *Arteria pulmonalis* und *Venae pulmonalis en bloc* abgebunden und abgesetzt wurden.

Für die Transplantationsoperation des Empfängers wurde eine transversale *Laparatomie* zwischen dem mittleren und unteren Drittel des Abdomens vorgenommen. Die Inzision reichte von einer Flanke bis zur anderen. Anschließend wurde die *Aorta abdominalis* und die *VCI* etwa 3 mm unterhalb des Abgangs der Nierengefäße für die Anastomose freipräpariert. Nach Abklemmen von *Aorta abdominalis* und *VCI* für die Anlage der Anastomose wurde eine *longitudinale Venotomie* beziehungsweise *longitudinale Arteriotomie* durchgeführt. Daraufhin erfolgte die Anlage einer End-zu-Seit-Anastomose zwischen Spender-*Aorta* und Empfänger-*Aorta* sowie zwischen Spender-*VCI* und Empfänger-*VCI* und die anschließende Fixierung durch Einzelknopfnähte (Abbildung 2.2). Das Abdomen wurde nach der Anastomosierung wieder verschlossen.

Das Blut fließt folglich aus der *Aorta* des Empfängers durch die *Spender-Aorta* über die *Koronararterien* in den rechten Vorhof, weil die Aortenklappe aufgrund der hohen Druckverhältnisse in der *Spender-Aorta* verschlossen ist. Vom rechten Vorhof gelangt das Blut über die *Spender-VCI* in die *Empfänger-VCI*. Diese retrograde Perfusion des Herzens bedingt eine vollständige funktionelle Ausschaltung des linken Vorhofs und der beiden Ventrikel. Dennoch kontrahieren beide Ventrikel weiter synchron – Ein relevanter Beitrag zur Aufrechterhaltung des Blutkreislaufs bleibt jedoch aufgrund des fehlenden Auswurfs der Ventrikel aus.



**Abb. 2.2 Schematische Darstellung des Anschlusses der Gefäße des Herztransplantats an das Gefäßsystem der Empfängermaus.**

Modifiziert nach Christine Opfermann-Rüngeler, siehe auch Originalarbeit 1.

Zur Rehydratation des Tieres nach der Transplantationsoperation wurde 1 ml NaCl-Lösung (0,9%) *subkutan* in die Rückengegend des Tieres *appliziert*. Bis das Tier wieder bei vollständigem Bewusstsein war, wurde es unter eine Wärmelampe gelegt und visuell überwacht. Der Herzschlag wurde in der darauf folgenden Zeit einmal täglich durch die Bauchdecke palpiert und Werten zwischen 0 und 3 zugeordnet [34], wobei ein Scorewert von 3 bei starkem Herzschlag vergeben wurde, ein mittelstarker Herzschlag mit einem Wert von 2 und eine geringe Kontraktion mit 1 bewertet wurde. Eine fehlende Kontraktion des Transplantatherzens wurde mit 0 Punkten angegeben.

Für die Experimente unter immunsuppressiver Therapie erhielten die Tiere 0,4 mg/kg KG Rapamycin (Pfizer, Berlin) als intraperitoneale Injektion. Die immunsuppressive Behandlung wurde 48 Stunden vor der Transplantation begonnen und alle 2 Tage wiederholt. Die PFC-Injektionen (500 µl) in die Schwanzvene wurden an Tag 6 und Tag 10 *post OP* verabreicht, gefolgt von der entsprechenden MR-Untersuchung an Tag 7 und Tag 11 *post OP*.

### 2.3.2 Induktion des Arthritismodells

Die Induktion der Arthritis wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Peter van Lent, PhD (*Department of Experimental Rheumatology and Advanced Therapeutics, Radboud University Medical Centre, Nijmegen*) durchgeführt. Dort ist das bedeutendste Arthritismodell „*Collagen-induced Arthritis*“ (*CIA*) seit langem in der Maus etabliert. Dieses experimentelle Modell hat sich unter anderem bei der Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung der RA durch einen extrem hohen Vorhersagewert bewährt.

Das Vorgehen bei der Arthritisinduktion erfolgte nach untenstehendem Protokoll (Tabelle 2.3), analog dem in der niederländischen Arbeitsgruppe üblichen Behandlungsregime: Zunächst wurde Kollagen Typ II (aus dem Rind) in 0,05 M Essigsäure bis zu einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst und in gleichem Volumen Freund-Adjuvans (*CFA*) mit einer Konzentration von 2 mg/ml des *Mycobacterium tuberculosis* vom Erregerstamm H37Ra (Difco, Detroit) emulgiert. Anschließend wurden die DBA/J1-Mäuse durch subkutane Injektion (in die Schwanzbasis) von 100 µl dieser Emulsion präimmunisiert. Nach 21 Tagen erfolgte die Applikation von 100 µl einer nichtreizenden Lösung von Kollagen Typ II in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) intraperitoneal, was nach etwa 7 weiteren Tagen zur systemischen Entwicklung der *CIA* führte. Die so induzierte Arthritis klingt nach circa 4 weiteren Wochen wieder ab. Deshalb wurde der Beobachtungszeitraum nach der 2. Kollagen-Injektion an Tag 21 auf maximal 3 Wochen angesetzt.

**Tab. 2.4 Protokoll zur Kollagen-induzierten Arthritis (*CIA*).** Arbeitsgruppe von Peter van Lent, PhD (*Dept. of Experimental Rheumatology and Advanced Therapeutics, Radboud University Medical Centre, Nijmegen*).

Tag	Vorgehen
0	Einmalige, subkutane Injektion von 100 µl komplettem Freund-Adjuvans ( <i>CFA</i> )/ Kollagen Typ II in die Schwanzbasis
21	Einmalige, intraperitoneale Injektion von 100 µl Kollagen Typ II/Medium
28	Ungefähr an Tag 28 entwickelt sich die systemische Arthritis mit Schwellung der Vorder- und Hinterpfoten
	<b>Beobachtungsperiode</b>

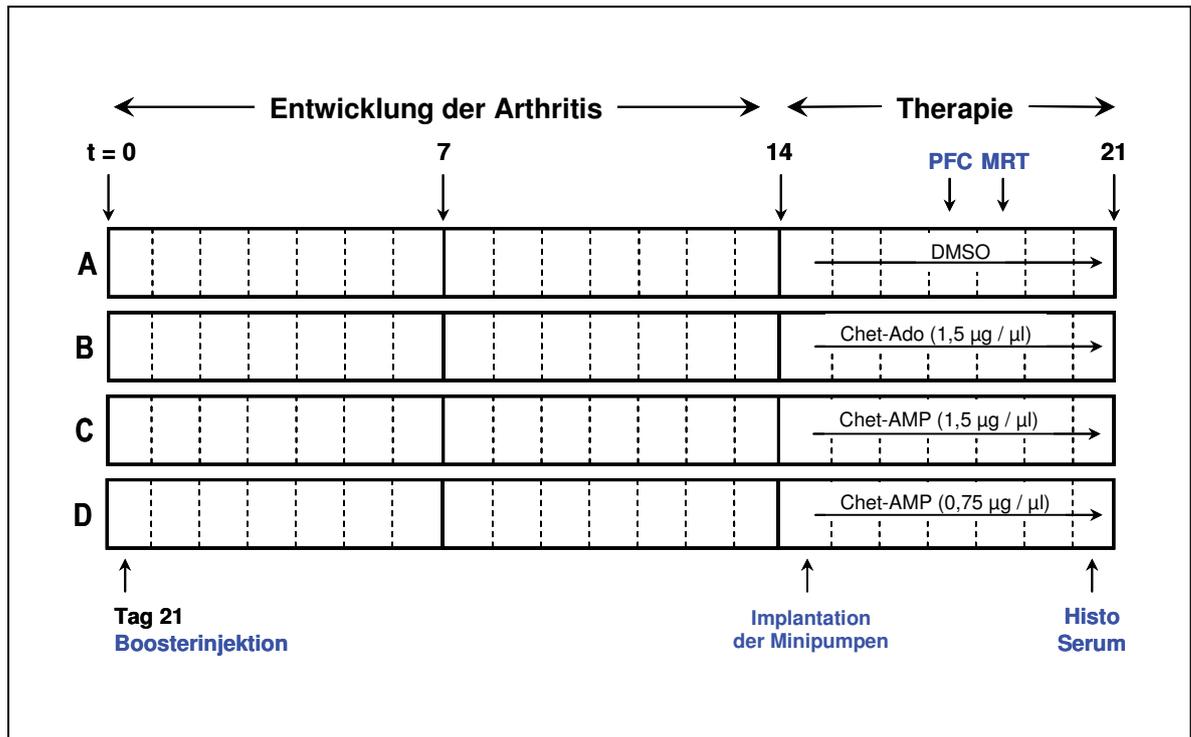
### 2.3.3 Anwendung verschiedener Therapieansätze im Arthritismodell

In der vorliegenden Arbeit sollte über die reine Detektion der Inflammation im Frühstadium der Arthritis hinaus auch der Behandlungserfolg verschiedener Therapieansätze verfolgt werden. Zu diesem Zweck wurden die Versuchstiere verschiedenen Gruppen zugeordnet, die jeweils unterschiedliche Substanzen zur Behandlung erhielten.

Die eingesetzten Substanzen waren Chet-Adenosin ( $A_{2A}$ -Rezeptor-Agonist) und Chet-AMP, ein inaktives Prodrug des  $A_{2A}$ -Rezeptor-Agonisten, jeweils in einer Konzentration von  $\leq 2\mu\text{g}/\mu\text{l}$  gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) / Wasser 1:1. In der Kontrollgruppe wurden ausschließlich das organische Lösungsmittel DMSO und Wasser verwendet. Die Applikation der verschiedenen Substanzen erfolgte durch osmotische Minipumpen (1007D; Alzet, Charles River), die den Mäusen durch Dr. Zhaoping Ding (Institut für Molekulare Kardiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) ins Unterhautfettgewebe der Nackengegend implantiert wurden. Als Anschluss an das Gefäßsystem diente ein kleiner, flexibler Verbindungsschlauch aus Silikon welcher zu einem in der *Vena jugularis externa* platzierten Katheter (PE10) führte. Auf diese Weise konnte eine kontinuierliche intravenöse Freisetzung der enthaltenen Substanzen gewährleistet werden. Die Minipumpen hatten ein Fassungsvermögen von 100 beziehungsweise 200  $\mu\text{l}$  und leerten sich mit einer stetigen Abgabemenge von circa 0,5  $\mu\text{l}$  pro Stunde. Demzufolge war eine Behandlungsdauer von etwa 8 beziehungsweise 16 Tagen möglich.

In der ersten Versuchssreihe wurden die Substanzen zeitlich parallel zur Induktion der Arthritis verabreicht, so dass die Tiere bereits zum Zeitpunkt des Erkrankungsbeginns eine Behandlung erhielten. Nach 7 Tagen erfolgte dann eine Injektion der PFC-Emulsion (500  $\mu\text{l}$ ) und am darauf folgenden Tag sowie an Tag 11 jeweils die MR-Untersuchung (siehe Abbildung 2.3).





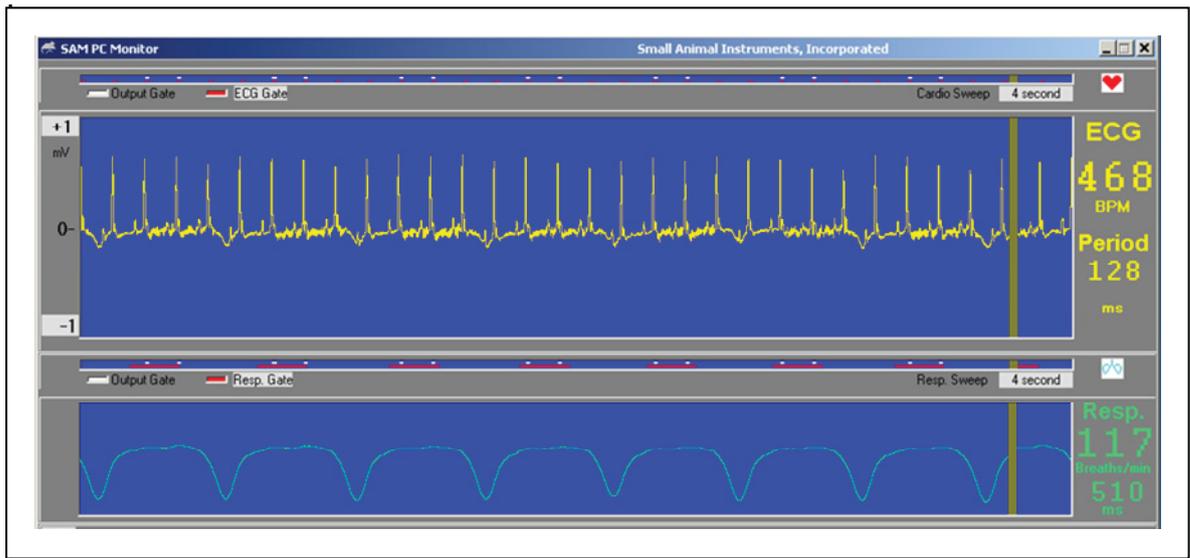
**Abb. 2.4** Protokoll der 2. Versuchsreihe mit Behandlungsbeginn 14 Tage nach Induktion der Arthritis. Nach weiteren 3 Tagen erfolgte die PFC-Injektion, einen Tag später die MR-Messung.

## 2.4 MR-Messungen

Die Durchführung der MR-Untersuchungen erfolgte an einem vertikalen DRX Wide Bore NMR Spektrometer (Bruker, Rheinstetten) mit einer magnetischen Feldstärke von 9,4 Tesla. Die anatomischen  $^1\text{H}$ -Messungen wurden bei einer Frequenz von 400,13 MHz und die  $^{19}\text{F}$ -Messungen bei einer Frequenz von 376,46 MHz mit einer *Microimaging-Einheit* (Mini 0,5) durchgeführt. Die *Microimaging-Einheit* (Bruker, Rheinstetten) war mit einem aktiv abgeschirmten Gradientensystem (Innendurchmesser 57 mm, 200 mT/m maximale Gradientenstärke, 110  $\mu\text{s}$  *rise time* bei 100 % Gradientenwechsel) und einem auf  $^1\text{H}$  sowie  $^{19}\text{F}$  abstimmbaren *Birdcage-Resonator* (Innendurchmesser: 30 mm) ausgestattet. Die Bilder wurden mit Hilfe der *Paravision-4-Software* (Bruker, Rheinstetten) dargestellt und analysiert.

Um einem größeren Abfall der Körpertemperatur der anästhesierten Maus vorzubeugen, wurde der Arbeitsplatz mit einer Rotlichtlampe angewärmt. Die Einleitung der Narkose erfolgte über eine Atemmaske mit initial 2,5 Vol% Isofluran aus einem Vaporisator (Isoflurane Vapor, Drägerwerk AG, Lübeck) in einem Stickstoff/Sauerstoff-Gasgemisch (70:30), welches mit Wasser gesättigt war. Die Flussrate betrug 75 ml/min. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde der Isoflurangehalt des Gasgemisches auf 1,5 Vol% reduziert.

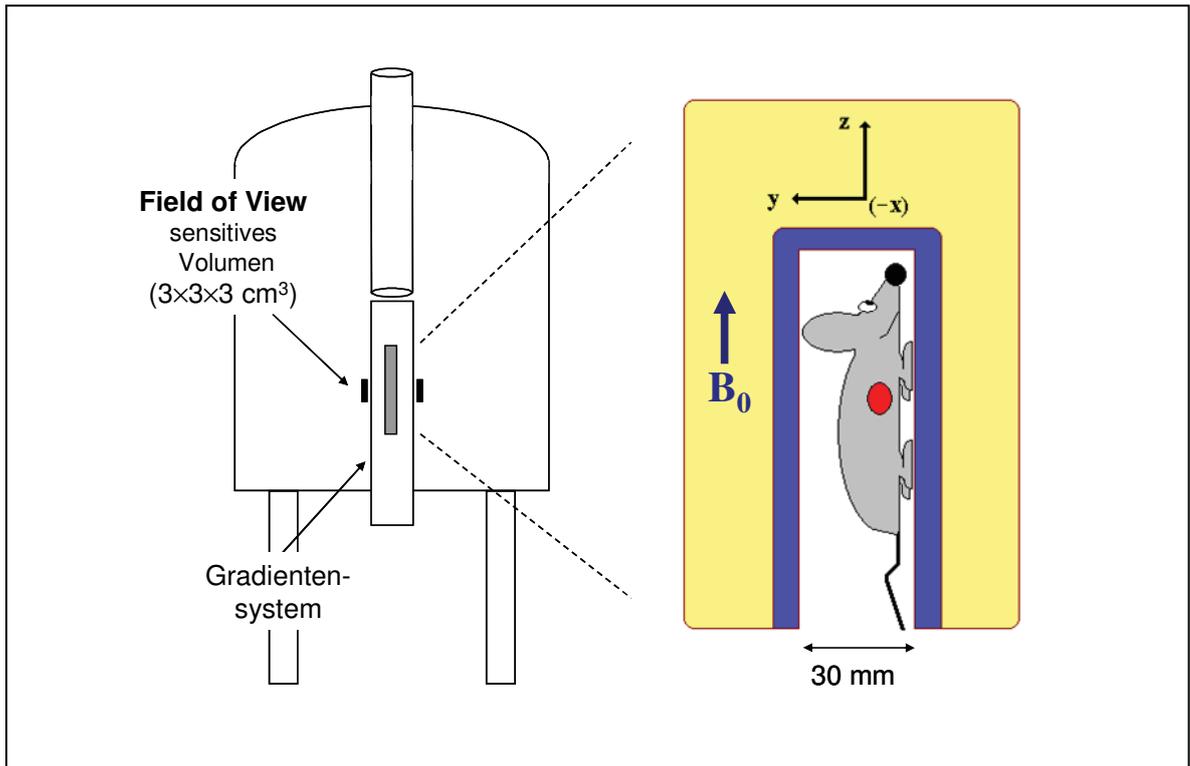
Anschließend wurde die Maus zur Vermeidung von Bewegungsartefakten vorsichtig mit Klebestreifen im Probenkopf fixiert. Zur Überwachung der Atmung während der Messungen wurde unter dem Brustkorb des Tieres eine Drucksonde positioniert. Bei den Untersuchungen am Herzen wurden zusätzlich Herzfrequenz und EKG abgeleitet und mit Hilfe einer *Monitoring-Software* (PC-Sam) während der gesamten Messung überwacht (Abbildung 2.5).



**Abb. 2.5** *Monitoring-Software* zur Überwachung des Tieres während der Narkose.

Monitoring von Atemfrequenz und -exkursionen sowie Herzfrequenzmessung und Darstellung der EKG-Ableitung, Screenshot.

Die Umgebungstemperatur der Maus wurde während der Messungen über ein externes Temperatursystem konstant auf 37 °C eingestellt. Für alle Untersuchungen wurde der Probenkopf mitsamt der darin befestigten Maus vertikal in das Spektrometer eingebracht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Maus immer auf exakt gleicher Höhe positioniert wurde (Abbildung 2.6).



**Abb. 2.6** Positionierung der Maus mitsamt dem Probenkopf (links) im Spektrometer.

Mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe NMR, Institut für Molekulare Kardiologie, HHU Düsseldorf.

Zur Sicherstellung einer effizienten Beladung zirkulierender Monozyten und Makrophagen mit den PFCs wurde die Bildgebung jeweils mindestens 24 Stunden nach Kontrastmittel-Applikation durchgeführt [12;13].

### 2.4.1 MR-Messungen zur Verfolgung der immunsuppressiven Therapie nach HTx

Um Bewegungsartefakte durch die Herzaktion zu vermeiden, müssen die *Imaging-Sequenzen* an das EKG gekoppelt werden. Hierfür wurde an den Hinterpfoten der Maus je eine EKG-Elektrode (KLEAR-TRACE-Elektroden, CAS Medical Systems, Inc., USA) befestigt, welche im klinischen Alltag bei Neugeborenen verwendet werden. Auf diese Weise wurde eine selektive Ableitung der Herzaktion des Spenderherzens, ohne jegliches vom Empfängerherz ausgehendes Störsignal, ermöglicht.

Nach Positionierung der Maus im Spektrometer erfolgte zur anatomischen Orientierung die Aquisition von  $^1\text{H}$ -Bildern des Transplantatherzens. Diese wurden später dazu verwendet, um die Signale auf den entsprechenden Fluor-Bildern anatomischen Arealen zuzuordnen zu können. Zur ersten räumlichen Orientierung wurden mithilfe einer Gradientenechosequenz 3 orthogonale Schnittbilder (in der Sagittal-, Transversal- und Frontalebene)

angefertigt. Bei korrekter Positionierung wurden die  $^1\text{H}$ -Bilder zur Darstellung der anatomischen Strukturen erstellt. Dazu wurde eine EKG- und atmungsgetriggerte *fast-gradient-echo-cine-Sequenz* (Flussgewichtet, TE 3 ms, TR abhängig von der Herzfrequenz 100-150 ms) genutzt. Hierbei betrug das *Field of View (FOV)*  $30 \times 30 \text{ mm}^2$ , die Matrix  $256 \times 256$  und die Schichtdicke 1 beziehungsweise 2 mm.

Nach Erstellung der anatomischen  $^1\text{H}$ -Aufnahmen, folgte die Abstimmung des Resonators auf  $^{19}\text{F}$ , um anatomisch korrelierende Bilder mit den  $^{19}\text{F}$ -Signalen zu erhalten. Die Bilder beider Atomkerne wurden im gleichen *FOV* aufgenommen, um eine exakte räumliche Übereinstimmung zu erreichen. Bei der Anfertigung der  $^{19}\text{F}$ -Aufnahmen kam eine so genannte *Rapid-acquisition-with-relaxation-enhancement (RARE)-Sequenz* (T2w, TE 4,5 ms, TR 4500 ms) mit mehreren Schichten zum Einsatz: *RARE*-Faktor: 64; Matrix:  $128 \times 128$ ; Schichtdicke: 2 mm; Mittelung: 256; Messdauer: 19,12 Minuten [15;22]. Die hier genutzte Pulssequenz (*RARE*) führt zu einem Signalverlust „fließender“ *Spins* und somit zur Unterdrückung des Signals von „zirkulierendem“ Fluor. Folglich können die durch diese Methode detektierten Fluorsignale eindeutig akkumulierten PFCs im Gewebe zugeordnet werden.

#### 2.4.1.1 Zeitlicher Ablauf der MR-Messungen

Um eine vorhersehbare progressive Abstoßungsreaktion herbeizuführen, wurden C57BL/6 Empfänger-Mäusen, wie bereits in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, *Allografts* von C57B10.A-Mäusen transplantiert, die in einem Zeitraum von etwa 14 Tagen abgestoßen werden [26;57]. Um sicherzugehen, dass inflammatorische Prozesse aus dem vorangegangenen operativen Eingriff sich nicht mit der stattfindenden Immunreaktion überlagern, wurden in einer parallelen Versuchsreihe Kontrollexperimente mit genetisch identischen *Isografts* im gleichen Zeitfenster durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich untersucht, ob diese Methode auch zur Darstellung der Wirksamkeit einer immunsuppressiven Therapie genutzt werden kann. Dazu erhielten die Mäuse erstmals 48 Stunden vor der *Allotransplantation* eine intraperitoneale Rapamycin-Injektion (0,4 mg/kg Körpergewicht; alle 2 Tage). Eine intravenöse Injektion von jeweils 500  $\mu\text{l}$  einer 10%igen Perfluor-15-kronen-5-ether-Emulsion in die Schwanzvene erfolgte 5 sowie 10 Tage nach der Transplantation, gefolgt von MR-Messungen jeweils an Tag 6 und Tag 11.

### 2.4.1.2 Auswertung der MR-Messungen

Um die Fluorsignale beim Übereinanderlegen der Bilder beider Atomkerne farblich von den  $^1\text{H}$ -Kernen abzugrenzen, wurde eine Bearbeitung der  $^{19}\text{F}$ -Bilder mit dem „hot iron“-color-lookup-table-Tool (Paravision, Bruker, Rheinstetten) vorgenommen. Durch diese Methode wurden die Fluorsignale auf den übereinander gelegten Bildern je nach Signalintensität in abgestuften Rottönen abgebildet. Zur Ausblendung der Hintergrundsignale auf den Fluoraufnahmen wurde ein konstanter Schwellenwert für die Berücksichtigung der Signale festgelegt. Die Validierung des Korrelationsprozesses erfolgte anhand von entsprechenden Protonen- und Fluorbildern geometrisch definierter PFC-Phantome. Diese enthielten zu 90% Wasser und zu 10% Perfluor-15-kronen-ether.

### 2.4.2 Detektion inflammatorischer Prozesse bei RA mittels MRT

Auch in dieser Versuchsreihe wurden die Tiere für die MR-Messungen, wie oben beschrieben, in Narkose versetzt und vorsichtig mit Klebestreifen im Probenkopf befestigt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Hinterpfoten möglichst zentral im *FOV* befanden (siehe Abbildung 2.7).



Abb. 2.7 Platzierung der Maus im Probenkopf für die MR-Messungen.

Nach Positionierung der Maus im Spektrometer erfolgte zunächst die räumliche Orientierung anhand einer Gradientenechosequenz mit 3 orthogonalen Schichten (in Sagittal-, Transversal- und Frontalebene). War die Maus mittig im *FOV* positioniert, wurden die anatomischen Referenzbilder ( $^1\text{H}$ -Bilder) mittels *multi-slice-multi-echo*-Sequenz (*MSME*) (8 Schichten, 8 Echos, TE 5 ms, TR 3500 ms) aufgenommen. Das *FOV* betrug  $4 \times 4 \text{ cm}^2$ , die Matrix  $256 \times 256$ , die Schichtdicke 1 mm und die Messzeit 11,12 Minuten.

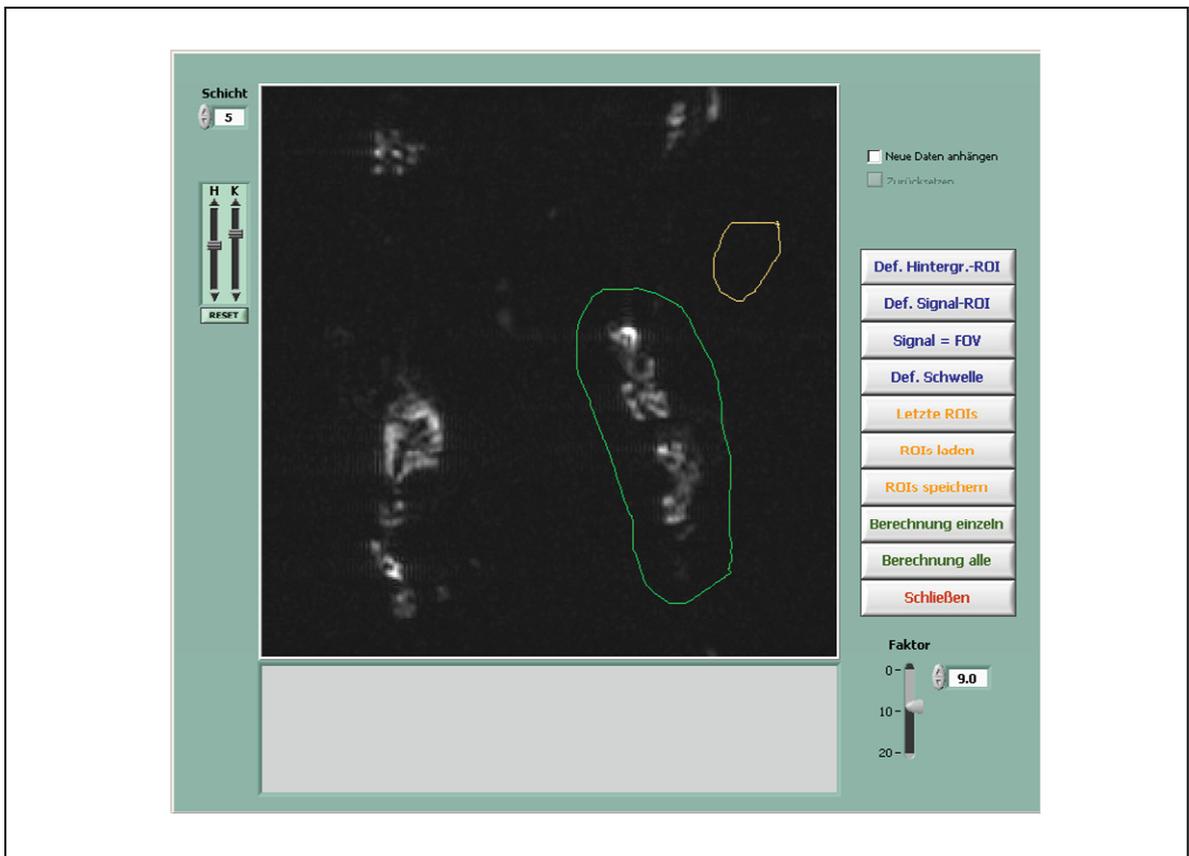
Zur Aufnahme der anatomisch entsprechenden Bilder mit den  $^{19}\text{F}$ -Signalen erfolgte anschließend die Abstimmung des Resonators auf  $^{19}\text{F}$ . Auch hier wurden die Bilder beider Atomkerne wieder im gleichen *FOV* aufgenommen, um eine exakte räumliche Übereinstimmung zu gewährleisten. Zur Erstellung der  $^{19}\text{F}$ -Aufnahmen wurde eine *RARE*-Sequenz in mehreren Schichten (T2w, 8 Schichten, TE 7,4 ms, TR 4500 ms) genutzt. Dabei betrug der *RARE*-Faktor 64, die Matrix  $128 \times 128$ , die Averages 256 und die Schichtdicke: 1 mm. Die Messdauer belief sich auf 19,12 Minuten.

Darüber hinaus wurden *post mortem* hochaufgelöste, isotrope 3D-Datensätze angefertigt. Hierzu erfolgte die Abtrennung der Hinterbeine der Maus (n= 5 Mäuse) und die anschließende Fixierung mittels phosphatgepuffertem, 4 %igem Paraformaldehyd in einem konischen Zentrifugenröhrchen (15 ml). Dieses wurde sorgfältig im Zentrum des Resonators positioniert. Zur Aquisition der Bilder wurde eine *Microimaging*-Einheit (Micro 2,5) mit einem aktiv abgeschirmten Gradientenset (40mm) sowie ein 25-mm *Birdcage Resonator* genutzt. Für  $^1\text{H}$  sowie für  $^{19}\text{F}$  wurde das *FOV* auf  $15 \times 15 \times 7,5 \text{ mm}^3$  festgelegt, die Matrix betrug  $128 \times 128 \times 64$ , was nach *Zerofilling* eine Voxelgröße von 0,2 nl ergab. Für die  $^1\text{H}$ -Aufnahmen wurde eine 3D-Spinecho-Sequenz (TE 11,6 ms, TR 2500 ms) genutzt. Die Messzeit betrug 11 Stunden und 22 Minuten. Die  $^{19}\text{F}$ -Bilder wurden mit einer *3D-RARE-Sequenz* (TE 11,6 ms, TR 1500 ms) erstellt. Der *RARE*-Faktor betrug 64 bei einer Messzeit von 2 Stunden und 33 Minuten. Für die weitere Bearbeitung wurden rekonstruierte  $^1\text{H}$ - sowie  $^{19}\text{F}$ -Stacks in die 3D-*Visualisierungssoftware* Amira (Mercury Computer Systems, Mérignac) importiert. Die  $^1\text{H}$ -Signale wurden mit Hilfe des Segmentierungseditors von Amira den entsprechenden anatomischen Strukturen (Femur, Patella, Fibula, Tibia und umgebendes Weichteilgewebe) zugeordnet. Die Überlagerung der anatomisch entsprechenden  $^{19}\text{F}$ -Signale erfolgte mit dem Voltex-Modul von Amira.

### 2.4.2.1 Auswertung der Fluor-MR-Signale

Um die während der MR-Messungen detektierten Fluorsignale im Bereich der Gelenke nach objektiven Kriterien quantitativ auswerten zu können, wurde ein im Institut für Molekulare Kardiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf entwickeltes *Schwellen-Tool*, basierend auf der *LabVIEW-Software* (National Instruments, Austin), genutzt.

Für jedes Bild der Vielschichtaufnahme wurden alle Intensitäten oberhalb eines Schwellwertes bestimmt und anschließend die Gesamtintensität durch Addition dieser Werte berechnet. Zur Schwellwertermittlung mußte im ersten Schritt ein Areal (Region of Interest (ROI)); gelb in Abb. 2.8) definiert werden, aus dem Mittelwert und Standardabweichung des Hintergrundsignals bestimmt wurden.

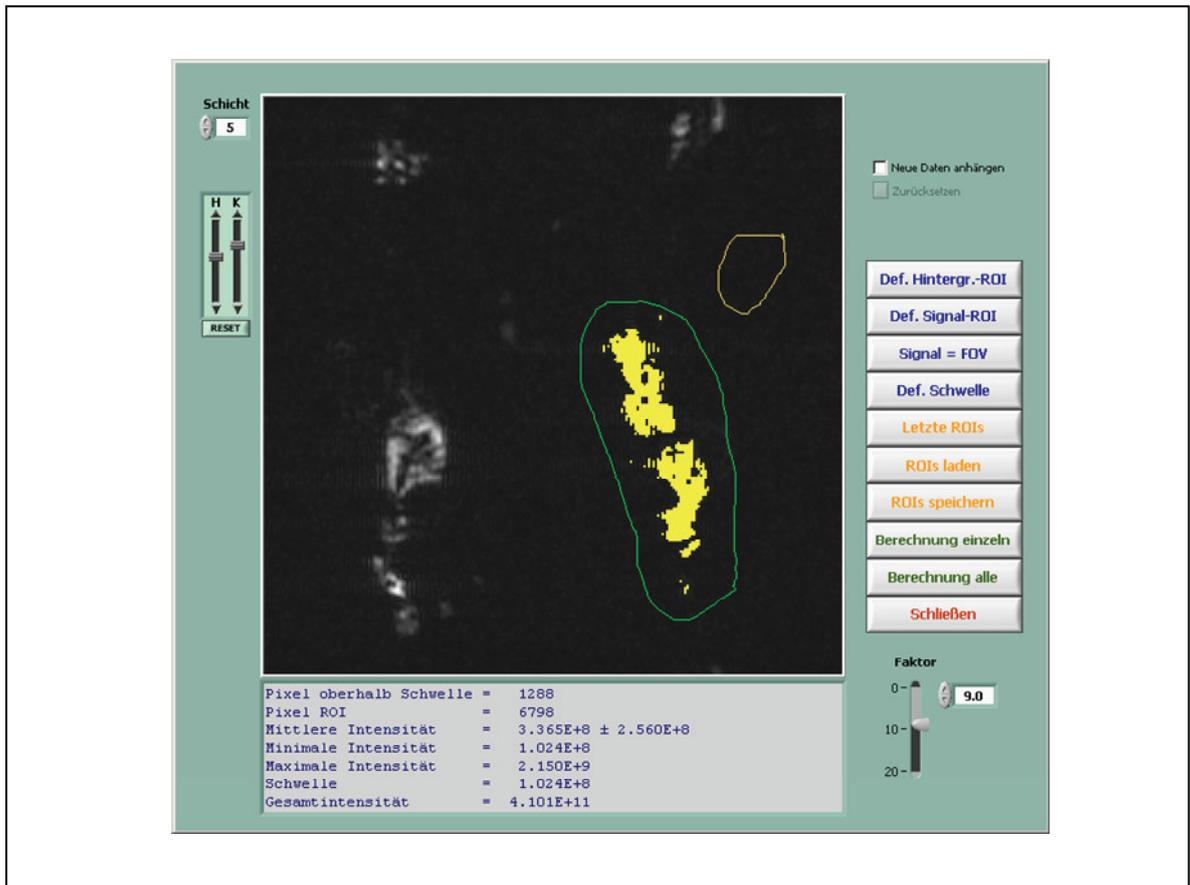


**Abb. 2.8** Auswertung der MR-Datensätze mit dem *Schwellen-Tool*.

Screenshot.

Mit Hilfe der Gleichung  $S = \text{Bkg\_Mean} + F \cdot \text{Bkg\_SD}$  mit einer zuvor optimierten Konstante  $F$  (hier  $F=9$ ) wurde dann die Schwelle  $S$  berechnet (Abb. 2.9). Die Intensitätsauswertung konnte durch eine benutzerdefinierte ROI (grün) auf eine beliebige Region beschränkt

werden. Alle diese Auswertungen wurden semiautomatisch unter visueller Kontrolle durchgeführt.



**Abb. 2.9** Auswertung der detektierten Signale unter Berücksichtigung der zuvor festgelegten Schwellen.

Screenshot.

## 2.5 Visuelles Scoring

Die visuelle Beurteilung der Entzündungssymptome erfolgte einmal täglich standardisiert anhand untenstehender Kriterien. Um die Untersuchung für die Maus möglichst stressarm zu gestalten, wurde das Tier für die Zeit der Inspektion in ein Becherglas gesetzt. Auf diese Weise konnten die Pfoten von allen Seiten beurteilt werden. Für die Zuweisung eines *Scorewertes* wurde das Ausmaß der Entzündungsreaktion an den Zehen sowie den Gelenken der Vorder- und Hinterpfoten beurteilt. Die genauen Kriterien für die einzelnen *Scorewerte* können Abbildung 2.10 entnommen werden. Die Summe der erhobenen *Scorewerte* für alle vier Pfoten liegt dabei zwischen 0 und 8.

0	Keine Entzündungszeichen	
0.25	Entzündung von 1 bis 2 Zehen	
0.5	Entzündung von 3 bis 4 Zehen oder isolierte, leichte Entzündung von Hand-/Fußgelenk	
0.75	Leichte bis mittelgradige Entzündung von Hand-/Fußgelenk	
1	Mittelgradige Entzündung von Hand-/Fußgelenk	
1.25	Mittelgradige Entzündung von Hand-/Fußgelenk und Zehen	
1.5	Mittel- bis hochgradige Entzündung von Hand-/Fußgelenk und Zehen	
1.75	Hochgradige Entzündung von Hand-/Fußgelenk und Zehen	
2	Hochgradige Entzündung von Hand-/Fußgelenk und allen Zehen	

**Abb. 2.10** Protokoll Visuelles Scoring

Die Durchführung der Inspektion von Vorder- und Hinterpfoten erfolgte ab Tag 18, somit 3 Tage vor akuter Induktion der Arthritis und von diesem Zeitpunkt an einmal täglich.

## 2.6 Post-mortem Analysen

### 2.6.1 Post-mortem Analyse der Herztransplantate

#### 2.6.1.1 Vorbereitung der Organe

Nach den MR-Messungen wurden die Spenderherzen aus den Empfänger-mäusen entnommen und unmittelbar unter Temperaturkontrolle schockgefroren. Dabei wurde das Spenderherz mit dem Apex nach oben in ein Aluförmchen in O.C.T. Compound (Tissue-tek, Nr. 4583, Leica #0201.80926) positioniert und in Isopentan (2-Methylbutan, Sigma-Aldrich, #32631) bei -30 bis -40 °C schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Gewebeblöcke bei -20 °C gelagert. Die Gefrierschnitte wurden im Cryomikrotom (Leica CM1850) angefertigt: Schnittdicke: 8 µm; Temperatur: -20 °C; Messerwinkel 0°. Diese wurden direkt auf kalte Objektträger aufgezogen und mit einem Föhn (Kaltstufe) getrocknet. Schließlich wurden die Objektträger bei -20 °C über Trockenperlen aufbewahrt.

## **2.6.1.2 Immunhistochemische und histologische Aufbereitung**

### ***2.6.1.2.1 Herstellung der Phosphatpuffer-Stammlösung***

Für 1 Liter 0,5 M Phosphatpuffer wurden 56,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (wasserfrei) in 800 ml Wasser und 17,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  in 200 ml Wasser getrennt voneinander gelöst. Unter pH-Kontrolle (pH 7,4) wurde die saure ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) in die alkalische ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) Komponente titriert. Dabei wurde bei Zimmertemperatur gearbeitet, da die Pufferkonzentration nah am Löslichkeitsprodukt liegt und sonst leicht ausfällt.

### ***2.6.1.2.2 Herstellung des Fixativs***

Zur Herstellung von 100 ml des Fixativs nach Zamboni wurden 4 g Paraformaldehyd (Merck #1.04005) in circa 50 ml *Aqua bidest* aufgeschwemmt und unter Rühren auf etwa 60 °C erhitzt. Durch Zugabe von 3-4 Tropfen 4 M NaOH wurde die Depolymerisierung (Klärung) erreicht. Eine Übertitrierung wurde vermieden, indem nach Entfernen des Gefäßes von der warmen Platte und Absinken der Temperatur kein weiteres Alkali zugegeben wurde. Die Lösung wurde durch Rühren etwas abgekühlt und mit Phosphatpuffer-Stammlösung gemischt. Zuletzt wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 nachtitriert und auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Endkonzentration des Fixativs betrug 0,1 M Phosphatpuffer und 4% (w/v) Paraformaldehyd.

### ***2.6.1.2.3 Herstellung des Fixativs nach Zamboni***

Zunächst wurde Pikrinsäure (Fluka #74069; geliefert mit Wasser angefeuchtet; circa 98 % Trockensubstanz) in Wasser aufgeschlämmt und unter Rühren bis unter die Kochgrenze erhitzt. Nach dem Abkühlen verbleibt ein kristalliner Bodensatz, weshalb die Flüssigkeit im Anschluss dekantiert wurde. Um 100 ml des Fixativs nach Zamboni zu erhalten, wurden 4 g Paraformaldehyd, wie oben bei der Herstellung des Fixativs beschrieben, erhitzt, depolymerisiert und etwas abgekühlt. In einem weiteren Schritt wurde es mit 15 ml Pikrinsäure und 20 ml Pufferkonzentrat gemischt. Abschließend wurde der pH-Wert nachtitriert und bis auf das Endvolumen von 100 ml aufgefüllt. Die Endkonzentration belief sich auf 0,1 M Phosphatpuffer, 4 % (w/v) Paraformaldehyd und 15% (v/v) Pikrinsäure.

#### **2.6.1.2.4 Immunhistochemische Färbung**

Um Feuchtigkeitsartefakte zu vermeiden, wurde der Objektträgerkasten vor dem Öffnen auf Zimmertemperatur erwärmt. Im Anschluss daran wurden die einzelnen Schnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift (PAP-PEN, Plano, #L4197) umrandet und mit jeweils 100-300 µl Zambonis Fixativ pro Schnitt 10 Minuten lang fixiert. Anschließend wurden die Schnitte 3 Mal in 50 ml phosphatgepufferter Salzlösung insgesamt 30 Minuten gewaschen.

Zur Blockade unspezifischer Antigenbindungsstellen wurden die Schnitte in *Normal Goat Serum* (NGS, Vector, #S-1000), welches unspezifische IgG's enthält, inkubiert. Dabei bestand die Blockierlösung aus 10% NGS in PBS mit 0,1% Saponin. Diese wurde mit circa 100 µl pro Schnitt für eine Stunde bei Zimmertemperatur auf die Schnitte verteilt.

Für den Makrophagen-Nachweis wurde der CD11b-Antikörper (monoklonale IgG2b aus der Ratte gegen ein CD11b-Integrin auf der  $\alpha_m$ -Kette, clone M1/70, BMA/Dianova, Hamburg) im Verhältnis 1:200 mit PBS verdünnt, welches 0,1% Saponin und 2% NGS enthielt. Pro Schnitt wurden 70-100 µl eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug eine Nacht bei einer Temperatur von 4 °C. Anschließend wurden die Schnitte erneut 3 Mal für 10 Minuten in jeweils 50 ml PBS + 0,1% Saponin gewaschen und mit dem zweiten Antikörper (anti-Rat-IgG FITC-konjugiert, Dianova, #112-095-167, aus Ziege) inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Verdünnung 1:400 mit PBS + 0,1% Saponin + 2% NGS. Die Inkubation von 4 Stunden wurde bei Zimmertemperatur in einer Dunkelbox durchgeführt. Daraufhin folgten 3 weitere Waschschrte à 15 Minuten in jeweils 50 ml mit PBS +0,1% Saponin und ein Waschschrte in PBS ohne Detergenz für wiederum 15 Minuten ebenfalls im Dunkeln.

Abschließend wurde ein Tropfen Eindeckmittel (Pro Long Gold antifade reagent with DAPI, Invitrogen, #P-36935, Eugene Oregon) pro Schnitt auf die Objektträger gegeben und ein passendes Deckgläschen darüber gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass es möglichst nicht zum Einschluss von Luftblasen kam. Schließlich wurden die fertig gefärbten Schnitte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX50) betrachtet und mit einer 12-bit CCD Monochrom Kamera, welche durch die *Cell<sup>P</sup>-Software* angesteuert wurde, fotografiert. Die Quantifizierung der *CD11b*-positiven Zellen erfolgte durch die Auszählung von je 9 zufällig ausgewählten Bereichen, die immer zu gleichen Teilen aus dem Epi-, Myo- und Endokard eines transplantierten Herzens gewählt wurden.

### 2.6.1.3 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Für die Übersichtsfärbung wurden die Cryostatschnitte mit jeweils 100-300 µl Fixativ (4% Paraformaldehyd in Phosphatpuffer; pH 7,4; 0,1 M) 10 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Schnitte 3 Mal in einer Hellendahl-Küvette mit PBS je 10 Minuten gewaschen.

Zur Kernfärbung wurden die Schnitte aus destilliertem Wasser etwa 3 Minuten mit saurem Hämalaun nach Meyer (Merck #1.09249) beschichtet, der Farbüberschuss ausgewaschen und die Präparate 10-15 Minuten in Leitungswasser gebläut. Durch diesen Vorgang entsteht ein blau-schwarzer DNA-Farbkomplex. Für die Gegenfärbung wurden die Schnitte 90 Sekunden mit 1% Eosin (Eosin G, Merck #1.15935) in 70%igem Ethanol inkubiert. Die folgende Differenzierung der Farbe in den verschiedenen Geweben erfolgte 10-20 Sekunden in 70%igem Ethanol, wobei die Schnitte im Ethanol geschwenkt wurden.

Zur Entwässerung wurde eine aufsteigende Alkoholreihe am Ende mit 2 Mal 100% Ethanol angewendet und die einzelnen Objektträger im Xylol gesammelt. Nachdem das Xylol einmal gewechselt wurde, konnten die Schnitte aus diesem Intermedium mit Eukitt (Struers GmbH, Willich) eingedeckt werden.

### 2.6.2 *Post-mortem* Analyse der Hinterbeine bei CIA

Nach Abschluss der MR-Messungen und anschließender Decapitation wurden die Hinterbeine der Mäuse vorsichtig abpräpariert und in Paraffin gebettet. Daraufhin wurden sie zur histologischen Analyse an das *Department of Experimental Rheumatology and Advanced Therapeutics* von Peter van Lent, PhD in Nijmegen geschickt.

## 2.7 Statistische Analyse

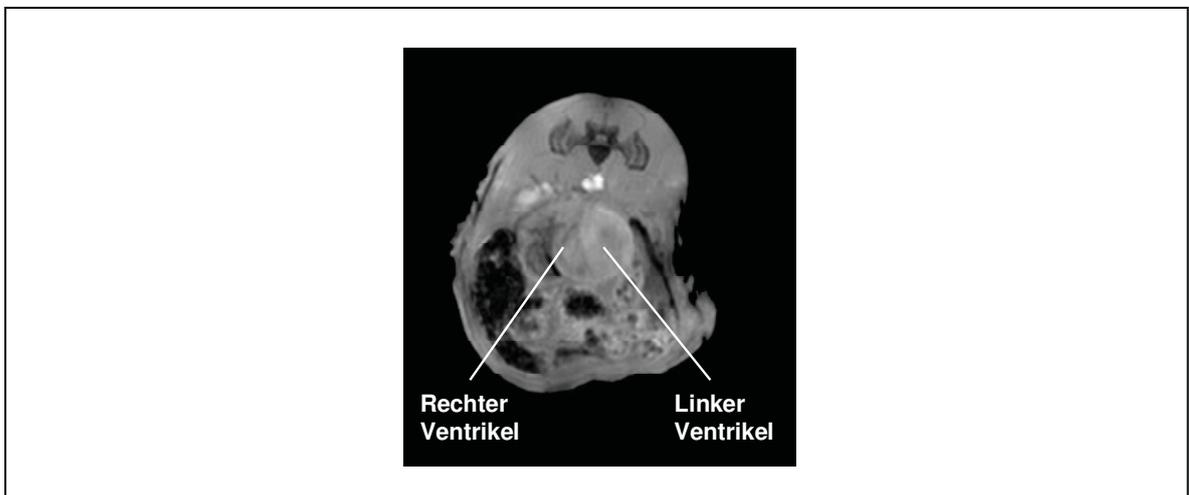
Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Daten des Herztransplantationsmodells wurden durch die ungepaarte Studentische t-Verteilung auf Unterschiede in der Versuchs- und der Kontrollgruppe untersucht. Hingegen wurde beim Arthritismodell eine zweifache Varianzanalyse mit Bonferroni Posttest durchgeführt. Wie allgemein üblich, wurde eine Signifikanz bei einem Wert von  $P < 0,05$  angenommen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Immunsuppressive Therapie nach HTx

#### 3.1.1 Darstellung der anatomischen Verhältnisse

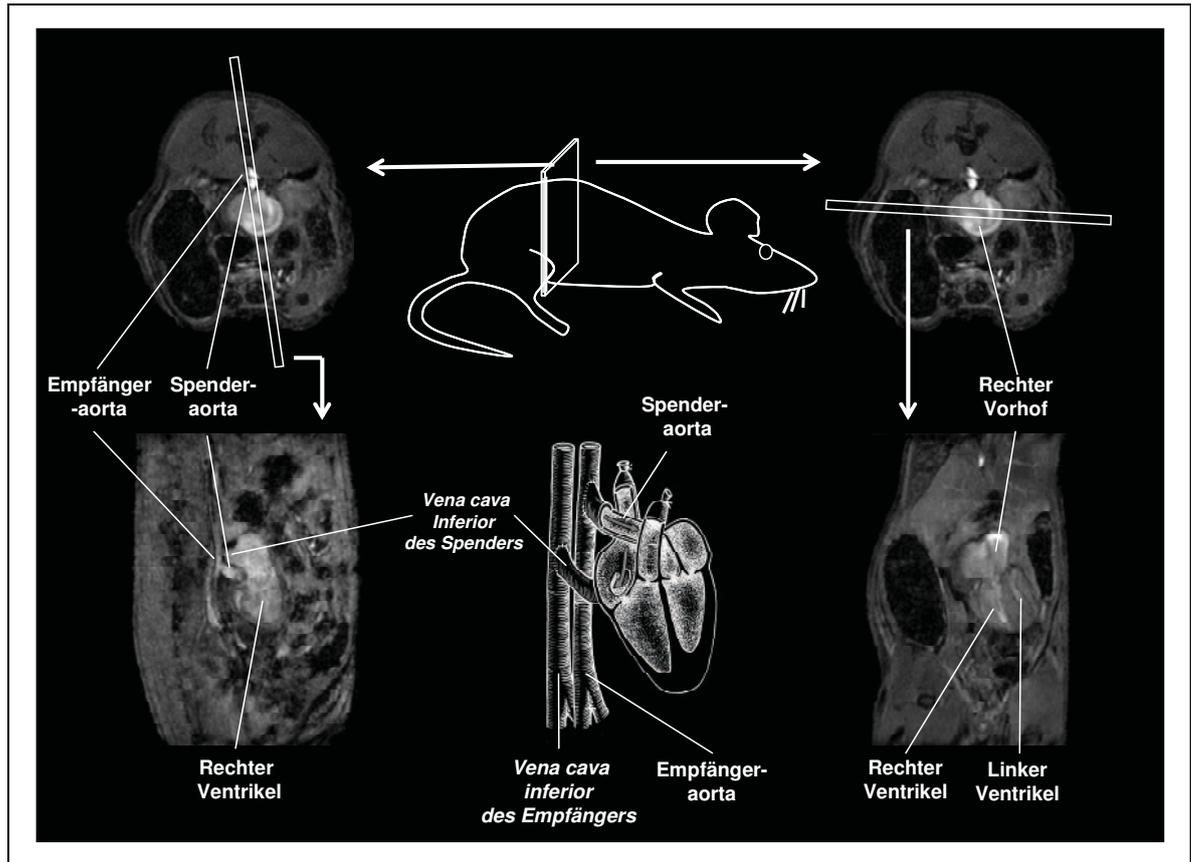
Zur räumlichen Orientierung wurden, wie unten abgebildet, zunächst transversale Übersichtsbilder angefertigt. Wie in Abbildung 3.1 zu erkennen, wird das Spenderherz ventral von Darmschlingen umgeben, dorsal grenzt es an den retroperitonealen Raum, in dem *Aorta abdominalis* und *Vena cava inferior* des Spenders zu finden sind.



**Abb. 3.1** Transversale Aufnahme eines *allogenen* Herztransplantats (C57B10.A - C57BL/6) im Abdomen der Empfängermaus.

(FOV 3x3 cm<sup>2</sup>, Schichtdicke 1 mm); Modifiziert nach Originalarbeit 1.

Abbildung 3.2 zeigt, wie anhand der zuvor angefertigten transversalen Übersichtsaufnahme die Schnittebene coronar sowie sagittal, entlang der langen Herzachse festgelegt wurde. Auf dem Schnitt entlang der langen Herzachse ist neben der längs angeschnittenen *Empfängeraorta* deren Verbindung mit der Spender-*Aorta* zu sehen. Der coronare Schnitt ermöglicht einen ausgezeichneten Blick auf alle vier Kammern des Transplantat-herzens.



**Abb. 3.2** Lokalisation der MR-Schnittebenen durch das Herztransplantat im Abdomen der Empfängermaus.

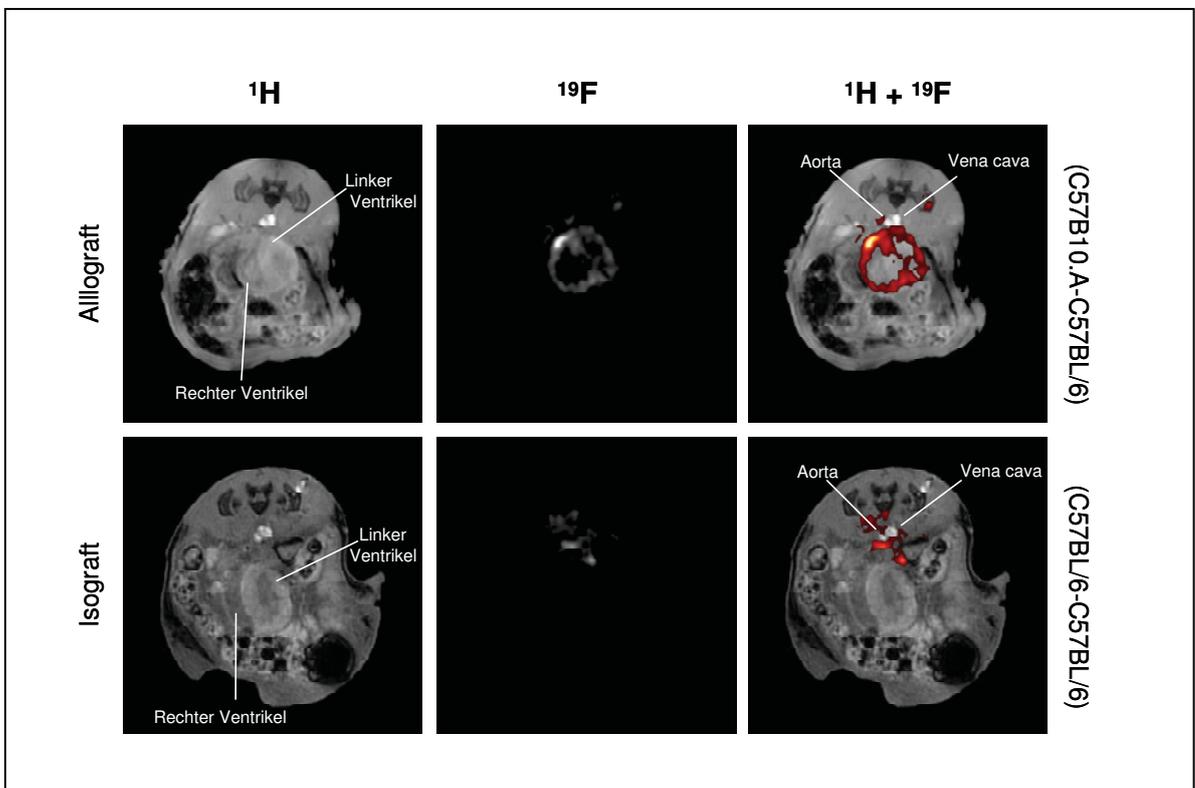
(FOV 3x3 cm<sup>2</sup>, Schichtdicke 1 mm); Modifiziert nach Originalarbeit 1.

### 3.1.2 Beurteilung der Transplantatabstoßung anhand der PFC-Infiltration in Allografts mittels <sup>19</sup>F-MRT

In Kooperation mit dem Promotionsprojekt von Inga Kreideweiß wurden *Allografts* von C57B10.A-Spendermäusen C57BL/6-Empfängermäusen transplantiert, um eine vorhersehbare, progressive Abstoßungsreaktion zu provozieren, die innerhalb von zwei Wochen zum Transplantatversagen führt [19;34]. Um diese Abstoßungsreaktion durch <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT sichtbar zu machen, erhielten die Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem operativen Eingriff eine Injektion von 500 µl einer 10%igen PFC-Emulsion in die Schwanzvene.

Um das transplantierte Herz im Abdomen der Spendermaus zu lokalisieren, wurden zunächst wiederum <sup>1</sup>H-Gradientenecho-Bilder aufgenommen. Anschließend wurden anatomisch entsprechende <sup>19</sup>F-Bilder zur Lokalisation der injizierten PFCs erstellt. Anhand dieser – als Korrelat der Abstoßungsreaktion – wurden die in das Herz infiltrierenden PFC-beladenen Immunzellen visualisiert. Die untenstehende, repräsentative Abbildung 3.3 entstand 6 Tage nach der *Allotransplantation*. Das Referenz-Protonenbild (links) ermög-

licht die Sicht auf die kurze Achse des Transplantatherzens. Die anatomisch korrespondierende Fluoraufnahme (Mitte) zeigt eine Signalanordnung in Form des ventrikulären Myokards. Die Korrelation der beiden Bilder (rechts) bestätigt die Zuordnung der PFCs zum Myokard des rechten und linken Ventrikels. Um den Zusammenhang des Fluorsignals mit der Immunzellinfiltration in das Transplantat zu validieren, wurden Gewebeteile histologisch analysiert. Erwartungsgemäß zeigte die konventionelle HE-Färbung eine Immunzell-Infiltration in die *Allografts* (siehe Abbildung 3.5). In der immunhistochemischen Auswertung wurde mittels CD11b, als globalem Marker für die meisten Zellen des angeborenen Immunsystems, die Invasion von Zellen mit großer Phagozytosekapazität bewiesen (siehe Abbildung 3.5).



**Abb. 3.3** Protonen- und Fluorbilder zum Vergleich der Abstoßungsreaktion bei *Iso*- beziehungsweise *Allografts*.

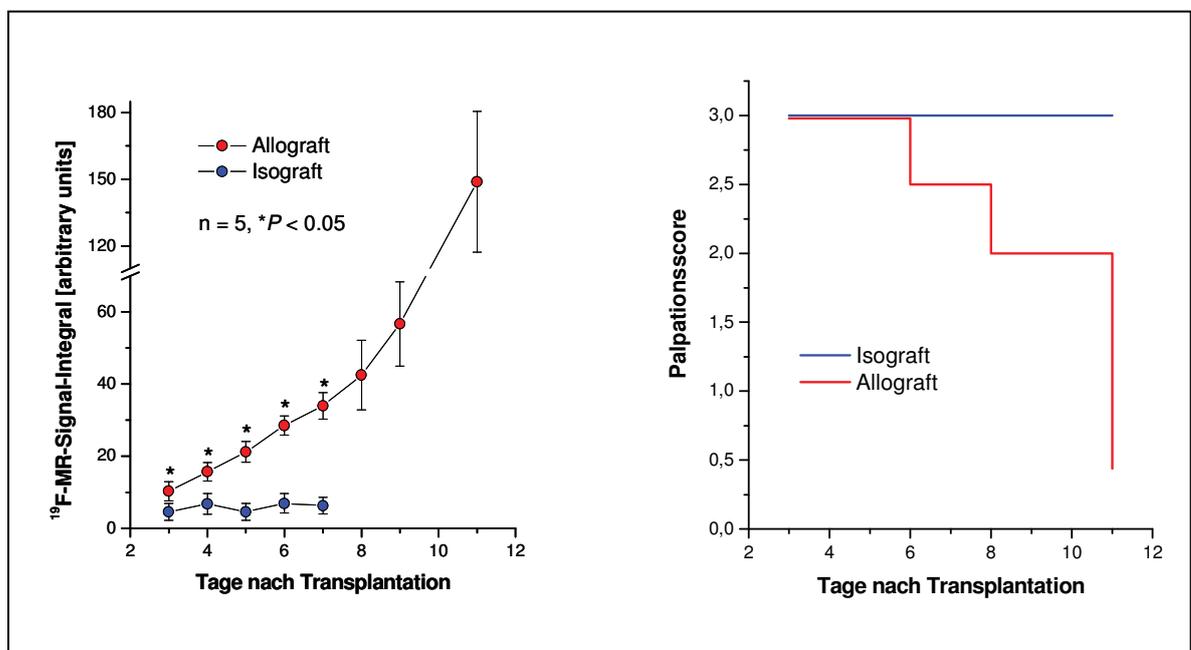
(FOV 3x3 cm<sup>2</sup>, Schichtdicke 1 mm, n=5); Modifiziert nach Originalarbeit 1.

In Kontrolleexperimenten wurden genetisch identische *Isografts* zum gleichen Zeitpunkt nach der Operation untersucht, um eine Überlagerung von Effekten, die durch operative Intervention ausgelöst werden, auszuschließen. Die Protonenbilder zeigen eine vergleichbare Geometrie des Transplantatherzens im Abdomen der Empfängermaus wie bei den *Allografts* (Abbildung 3.3). Allerdings ist auf den anatomisch entsprechenden Fluorbildern des *Isografts* lediglich im Bereich der operativ angelegten Anastomosen und nur zu sehr

geringem Teil im Myokard Fluorsignal zu sehen. In der histologischen Analyse bestätigte sich die, im Vergleich zum *Allograft*, rare Zelleninfiltration in das Gewebe des *Isografts* (siehe Abbildung 3.5).

### 3.1.3 Überwachung der Transplantatfunktion anhand der *Palpations-scores*

Die digitale Palpation der Herzaktion parallel zu den Fluor-MR-Messungen diene zur zusätzlichen Dokumentation der Transplantatfunktion über den gesamten Beobachtungszeitraum. Da sich die Tiere zunächst von der Operation und der Narkose regenerieren sollten, wurde erst 3 Tage nach der Operation mit den Untersuchungen begonnen. Am Anfang der Untersuchungsreihe ergab sich in beiden Gruppen kein Hinweis für eine ablaufende Abstoßungsreaktion durch die Palpation des Herzschlags. Die  $^{19}\text{F}$ -Messung hingegen ließ bereits an Tag 3 eine höhere Signalintensität als Hinweis auf eine Abstoßungsreaktion bei den *Allografts* erkennen, während über den *Palpationsscore* erst an Tag 6 eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft des *Allografts* zu registrieren war. Daraus lässt sich ableiten, dass das MRT die Detektion der Abstoßungsreaktion zu einem erheblich früheren Zeitpunkt erlaubt als die manuelle Palpation (Abbildung 3.4).



**Abb. 3.4 MR-Signal- und Palpationsscoreverläufe bei Iso- beziehungsweise Allografts.**

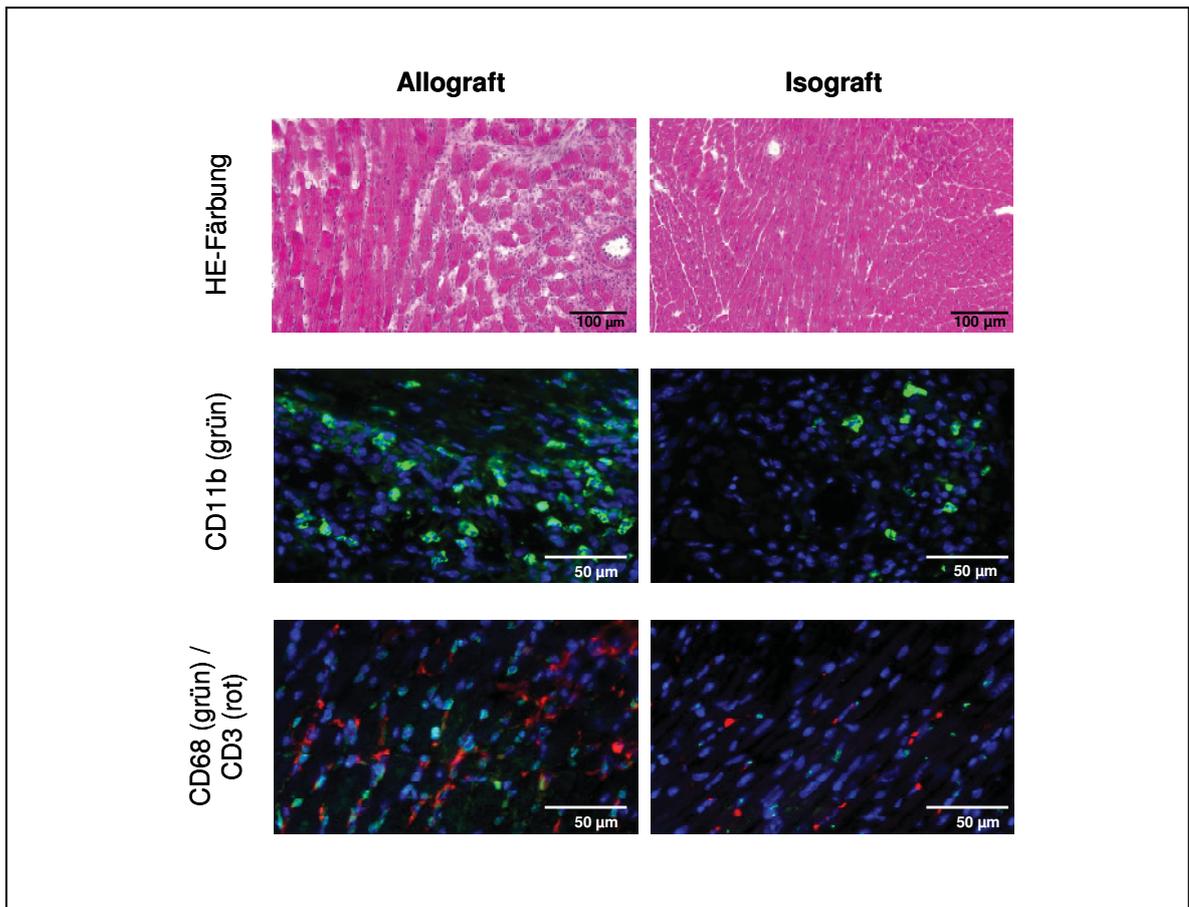
Links: Graphische Darstellung der  $^{19}\text{F}$ -Signalintensitäten im MRT bei Iso- und Allografts. Rechts: Abbildung der Palpationsscores bei Iso- und Allografts im Zeitverlauf ( $n = 5$ ,  $*P < 0,05$ ); Modifiziert nach Originalarbeit 1.

### 3.1.4 Beurteilung der PFC-Anreicherung in *Allografts* durch $^{19}\text{F}$ -MR-Messungen

Zur Validierung der Hypothese, dass das  $^{19}\text{F}$ -Signal mit der Immunzell-Infiltration im Transplantat korreliert, wurde – wie in Abschnitt 3.1.3 bereits erwähnt – parallel eine klassische histologische Analyse an *post-mortem* gewonnenen Gewebsschnitten vorgenommen. Epi-, myo- und endokardiale Wandschichten wurden zu gleichen Anteilen in die quantitative Analyse der eingewanderten Makrophagen einbezogen. Wie erwartet, zeigte sowohl die konventionelle HE-Färbung als auch die immunhistochemische Aufbereitung eine eindeutige entzündungsassoziierte Veränderung der *Allograft*-Präparate (Abbildung 3.5).

Schon in der Übersichtsvergrößerung fiel in den HE-Schnitten ein deutlicher Unterschied zwischen *Iso*- und *Allografts* auf. So war das *Allograft* von sehr viel bindegewebigem Narbengewebe durchzogen und ließ keine typische Gewebearchitektur mehr erkennen. Die Gewebearchitektur des *Isografts* war neben minimalen bindegewebig umgebauten Arealen hingegen gut erhalten und klar erkennbar. Zudem konnte durch den Einsatz des Antikörpers CD11b, als Marker für Makrophagen und Monozyten in der immunhistochemischen Analyse, die Einwanderung einer enormen Anzahl von Zellen in das Gewebe der *Allografts* nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde zum spezifischen Nachweis von Makrophagen CD68 eingesetzt und anhand des Antikörpers CD3 die spezifische Markierung von T-Zellen vorgenommen.

Um auch hier die Fehlinterpretation der Ergebnisse durch Relikte der Transplantationsoperation zu vermeiden, wurde analog eine systematische Untersuchung der *Isografts* durchgeführt. In der immunhistochemischen Analyse fand sich eine deutlich verminderte Zahl eingewanderter, immunkompetenter Zellen. Auf diese Weise konnte eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Operationsverletzungen ausgeschlossen und die Spezifität der beobachteten Effekte für die Transplantatabstoßung gezeigt werden.



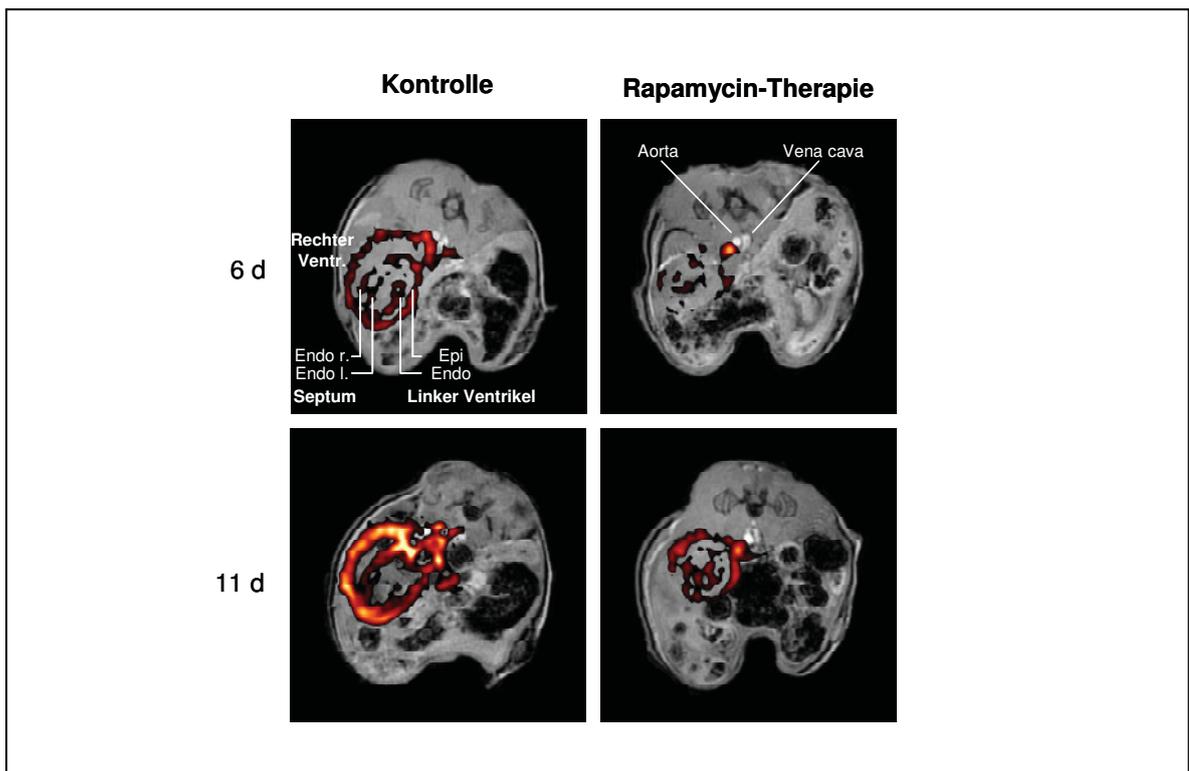
**Abb. 3.5** Gegenüberstellung der histologischen Ergebnisse der *Allo-* und *Isografts* aus HE-Färbung und Immunhistochemie

(n = 5); Modifiziert nach Originalarbeit 1.

### 3.1.5 Darstellung des Behandlungserfolgs einer Rapamycin-Therapie mittels $^{19}\text{F}$ -MRT

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob durch die oben beschriebene MR-Methode der Erfolg einer immunsuppressiven Therapie nach Herztransplantation bestätigt werden kann. Hierfür wurden die Versuchstiere 48 Stunden vor der Herztransplantationsoperation mit Rapamycin behandelt und erhielten daraufhin alle zwei Tage erneut eine Rapamycin-Applikation. Schon 6 Tage nach Behandlungsbeginn mit Rapamycin konnte ein deutlicher Unterschied der Fluor-Signalintensität zwischen den immunsupprimierten Tieren und den unbehandelten Kontrolltieren nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe wurde eine von den epi- und endokardialen Regionen ausgehende PFC-Verteilung im gesamten Herzen detektiert, die bereits in vorhergegangenen Untersuchungen als charakteristisches Muster für eine Abstoßungsreaktion beobachtet wurde (Abbildung 3.6). Dagegen ist die Signalintensität in der Rapamycin-Gruppe nur auf einzelne, kleinere Areale begrenzt und erinnert phänotypisch an die *Isografts* aus der vorausgegangenen Unter-

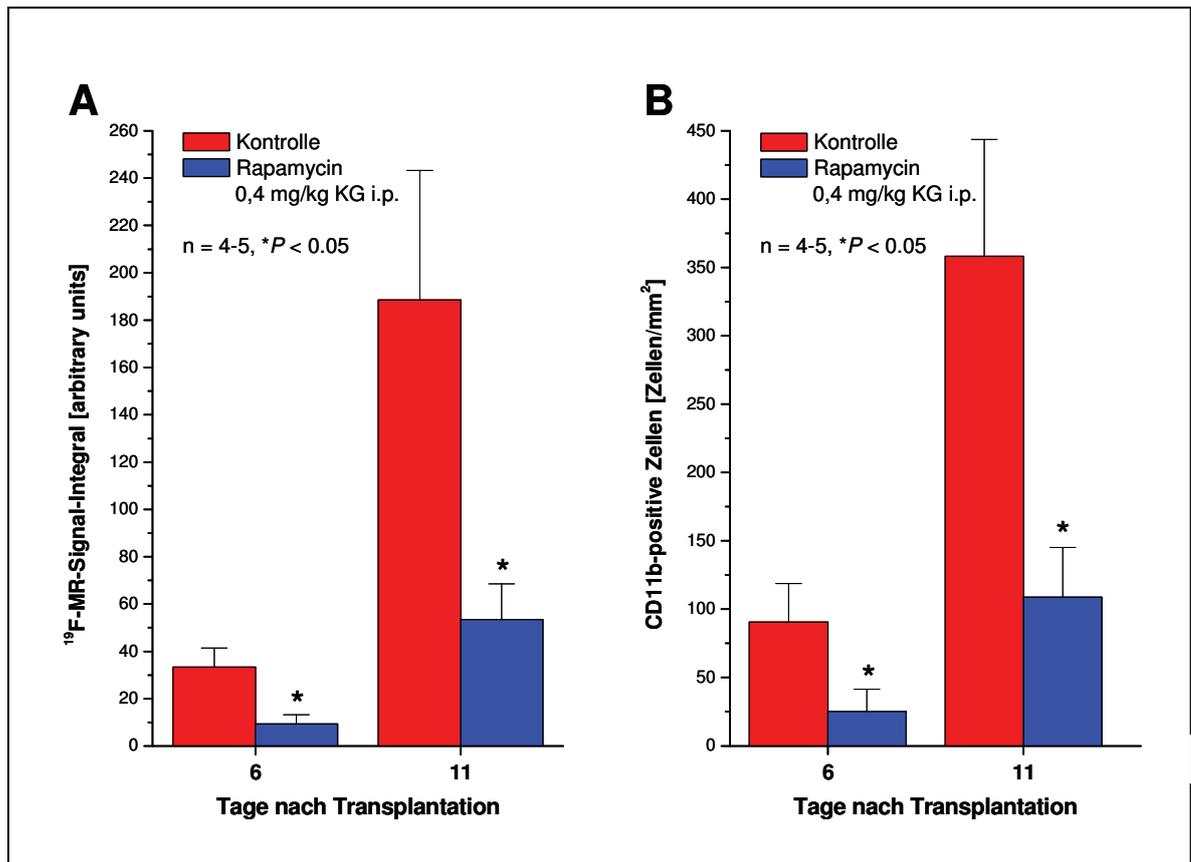
suchung (vergleiche Abbildung 3.3). Eine punktuell hohe Signalintensität wurde intermittierend im Bereich der Gefäßanastomosen festgestellt. Als die MR-Untersuchung am 11. Tag wiederholt wurde, zeigte sich in der unbehandelten Gruppe eine immense Zunahme der  $^{19}\text{F}$ -Signalintensität. Daraus kann auf eine Invasion von Immunzellen in alle Areale des Spenderherzens geschlossen werden. Bei den Rapamycin-behandelten Tieren zeigte sich zwar auch eine Zunahme der Signalintensität, jedoch war das Ausmaß deutlich geringer als in der Kontrollgruppe. Die  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Bilder in Abbildung 3.6 zeigen exemplarisch, wie die Rapamycin-Therapie das Auftreten der Immunantwort des Spenders verzögerte.



**Abb. 3.6** PFC-Anreicherung als Korrelat der Abstoßungsreaktion 6 beziehungsweise 11 Tage nach Therapiebeginn.

(FOV  $3 \times 3 \text{ cm}^2$ , Schichtdicke 1 mm,  $n = 10$ , d.h. 5 pro Zeitpunkt); Modifiziert nach Originalarbeit 1.

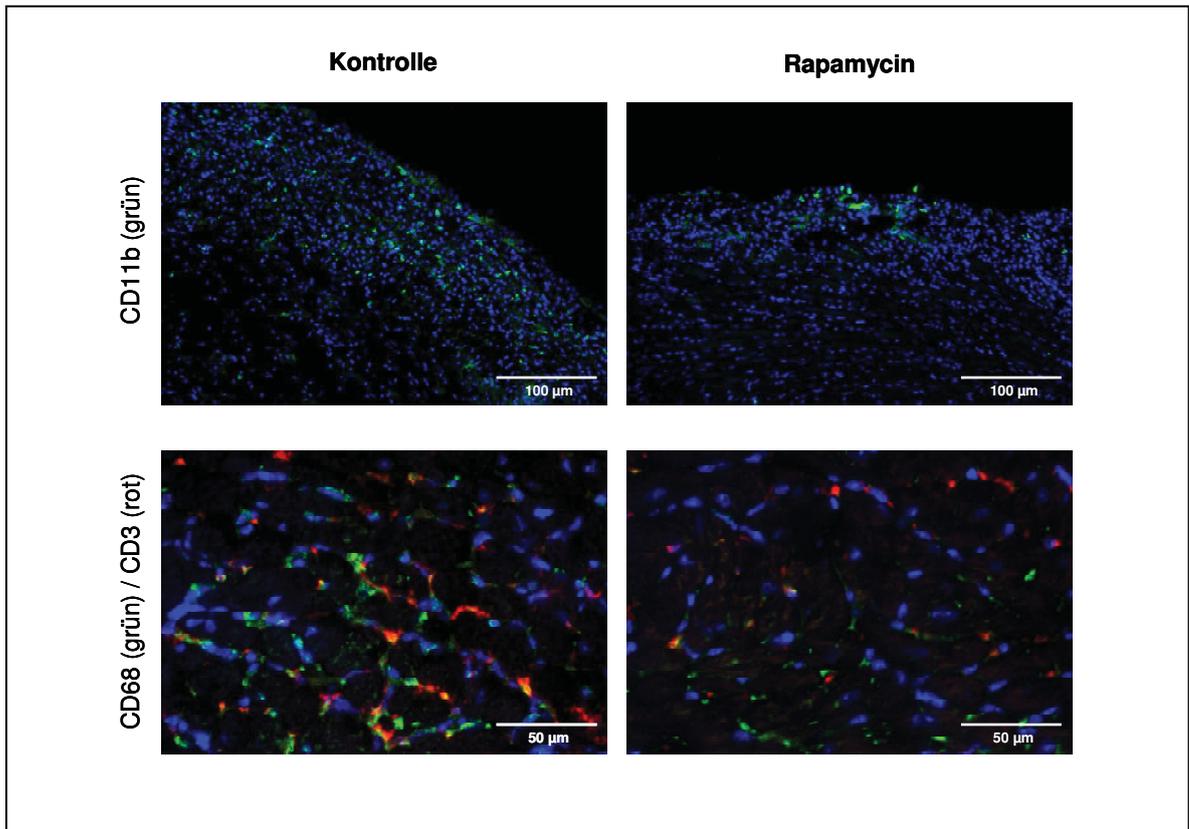
Die quantitative Analyse der detektierten Signalintensitäten 6 Tage nach der Transplantation zeigte eine 70%ige Reduktion der PFC-Akkumulation unter Rapamycin-Therapie.



**Abb. 3.7 Effekt der immunsuppressiven Therapie mit Rapamycin.**

A: Vergleich der detektierten MR-Signalintensitäten bei Kontrolltieren und Tieren unter Therapie; B: Vergleich der Makrophagen-Akkumulation bei Kontrolltieren und unter Rapamycin-Behandlung; (n = 4 - 5, \* P < 0,05); Modifiziert nach Originalarbeit 1.

Im Gegensatz zur unbehandelten Kontrollgruppe resultierte die Fortsetzung der immunsuppressiven Therapie auch noch an Tag 11 nach Transplantation in anhaltend stark unterdrückten Fluor-Signalen bei den behandelten Tieren (Abbildung 3.7 A). Um die in der *in vivo* <sup>19</sup>F-MR-Messung erhaltenen Ergebnisse durch gebräuchliche pathologische Abstoßungsmarker zu validieren, fand *post-mortem* eine Entnahme der Transplantate statt. Anschließend erfolgte die immunhistochemische Aufbereitung mit CD11b. Die darauf folgende mikroskopische Auszählung der mit CD11b markierten Zellen (Monozyten und Makrophagen) im Myokard der Transplantatherzen ergab eine deutliche Reduktion der Immunzelleinwanderung unter Rapamycin-Behandlung (Abbildung 3.7 B und 3.8). Darüber hinaus wurde die Hypothese einer Koordination der Immunreaktion im Rahmen der Abstoßungsreaktion durch Makrophagen und T-Zellen mit dem Nachweis des spezifischen Makrophagen-Markers CD68 sowie des T-Zell-Markers CD3 untermauert.



**Abb. 3.8** Immunhistochemische *post-mortem* Analyse der Transplantatherzen

(n = 10, d.h. 5 pro Zeitpunkt); Modifiziert nach Originalarbeit 1.

Wie aus Abbildung 3.8 eindeutig zu erkennen ist, korrelierten die *in vivo* Messungen mittels MRT sehr gut mit den histologisch *post-mortem* gewonnenen Daten.

Hiermit konnte gezeigt werden, dass die MR-Methode nicht nur zur frühzeitigen Detektion einer Abstoßungsreaktion geeignet ist, sondern darüber hinaus auch zur Überwachung der Effektivität einer immunsuppressiven Therapie dienen kann.

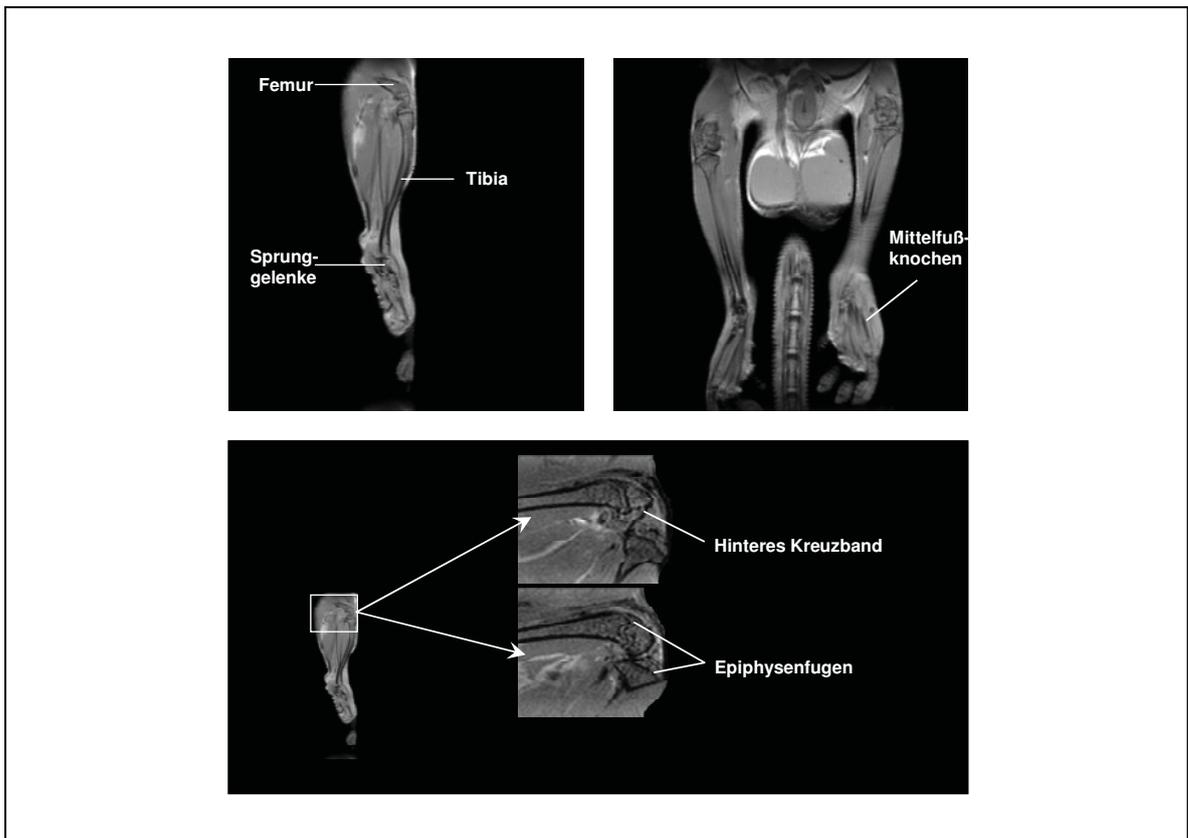
## 3.2 Detektion von rheumatoider Arthritis mittels MRT

### 3.2.1 Darstellung der anatomischen Verhältnisse durch Aquisition von Protonenbildern und Nachweis der RA mithilfe von $^{19}\text{F}$

Zur Darstellung der Hinterläufe wurde im Unterschied zu den vorherigen Untersuchungen statt einer Gradientenchosequenz eine klassische Spinechosequenz verwendet. Auch bei diesen Versuchen erfolgte zunächst die Aquisition der Protonenbilder als anatomische Referenz. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Abbildung der Gelenke an den

Hinterbeinen der Maus – vom Knie nach distal, einschließlich der Hinterpfote, gelegt. Neben Knie- und Sprunggelenken lassen sich auf den Aufnahmen auch die Mittelfußknochen sowie die Zehen mitsamt den dort vorhandenen Gelenken erkennen. Dank des besonders guten Kontrastes zwischen Knochen und umliegendem Weichteilgewebe im Spinnecho sind außerdem die einzelnen Schwanzwirbel klar abzugrenzen (Abbildung 3.9, oben rechts). Darüber hinaus ist in der Sagittalebene sogar das hintere Kreuzband zu sehen. Da für die Untersuchungen nur Tiere im Alter von 8 Wochen eingesetzt wurden, zeigen sich außerdem noch die, für dieses Alter typischen, Epiphysenfugen der Knochen. Die ausschließliche Verwendung männlicher Tiere in den durchgeführten Untersuchungen bedingt entsprechend der Anatomie auch die Abbildung des Skrotums der Tiere auf den Protonenbildern.

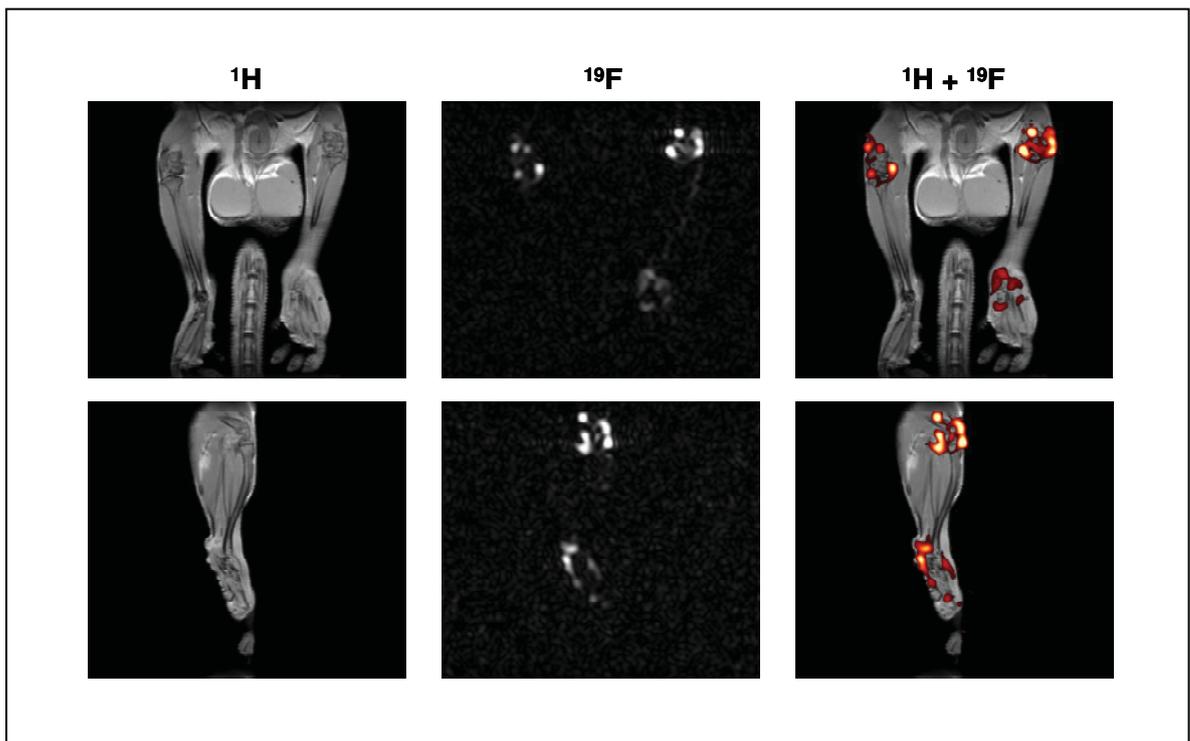
Die gezeigten Beispielbilder wurden von einer DBA-Maus 2 Wochen nach akuter Induktion der RA erstellt. Bei genauerer Betrachtung der Pfoten fällt eine Umfangsvermehrung als Korrelat einer Weichteilschwellung an der linken Pfote auf – die andere Pfote sowie die Knie scheinen jedoch nicht betroffen zu sein.



**Abb. 3.9**  $^1\text{H}$ -MR-Bilder vom Hinterbein der Maus zur Darstellung der anatomischen Verhältnisse. (FOV  $4 \times 4 \text{ cm}^2$ , Schichtdicke 1 mm).

Anschließend wurden auch in diesen Experimenten die  $^{19}\text{F}$ -Bilder aufgenommen. Um eine räumliche Zuordnung der Fluorsignale vornehmen zu können, wurden diese anschließend über die Protonenbilder gelegt (vgl. Abbildung 3.10). Dabei erschienen die Fluorsignale vor allem im Bereich der Gelenke, so dass die Zuordnung der Signale zum Gelenkraum nahe lag. Eine hohe Signalintensität zeigte sich erwartungsgemäß in der geschwollenen Hinterpfote. Erstaunlicherweise konnten jedoch weitere starke Signale in den Kniegelenken detektiert werden, für die im morphologischen Bild keine Auffälligkeiten zu beobachten waren. Dabei war die Intensität der Fluorsignale so hoch, dass erstmalig eine Schichtdicke von 1 mm in den *Flourscans* analog zu den entsprechenden Protonenbildern verwendet werden konnte.

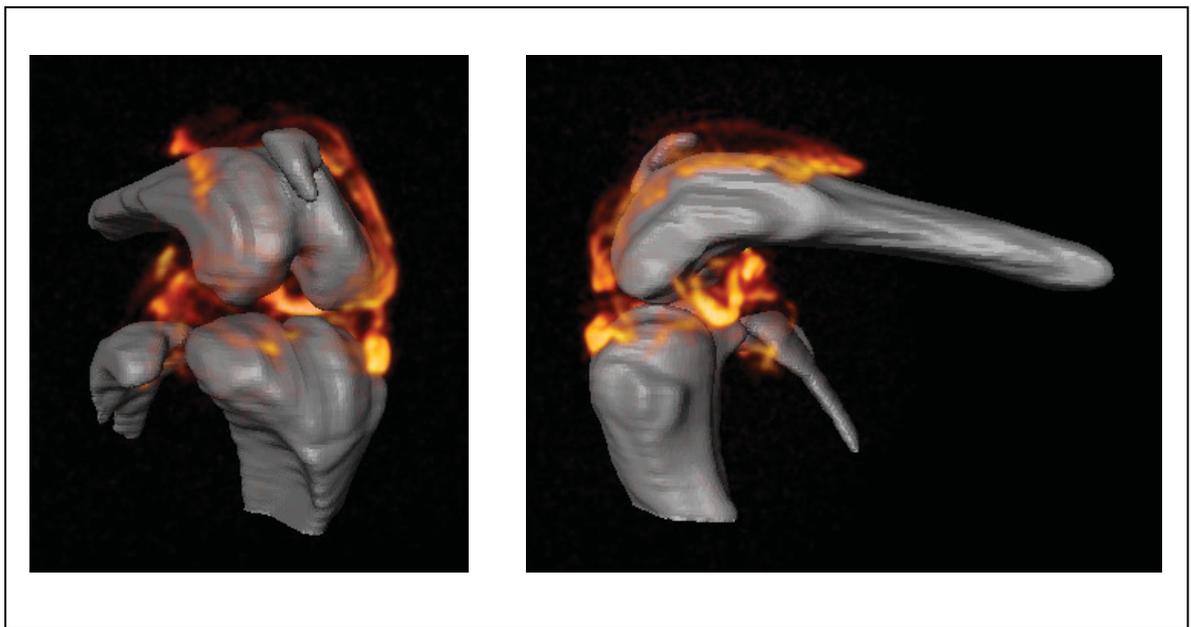
Ähnlich wie auf obigen  $^1\text{H}$ -Referenzbildern blieb die Veränderung im Bereich der Kniegelenke jedoch durch die klassische *Scoring-Methode* unentdeckt, da das Kniegelenk der Maus aufgrund der anatomischen Verhältnisse visuell kaum beurteilt werden kann.



**Abb. 3.10 MR-Aufnahmen der Hinterpfoten in Frontal- und Sagittalebene.**

Oben: Frontalebene, links Protonenbild, in der Mitte anatomisch korrespondierendes Fluorbild und rechts Protonenbild mit den überlagerten Fluorsignalen. Unten: MR-Aufnahmen wie oben, allerdings in der Sagittalebene. (FOV  $4 \times 4 \text{ cm}^2$ , Schichtdicke 1 mm); Modifiziert nach Originalarbeit 2.

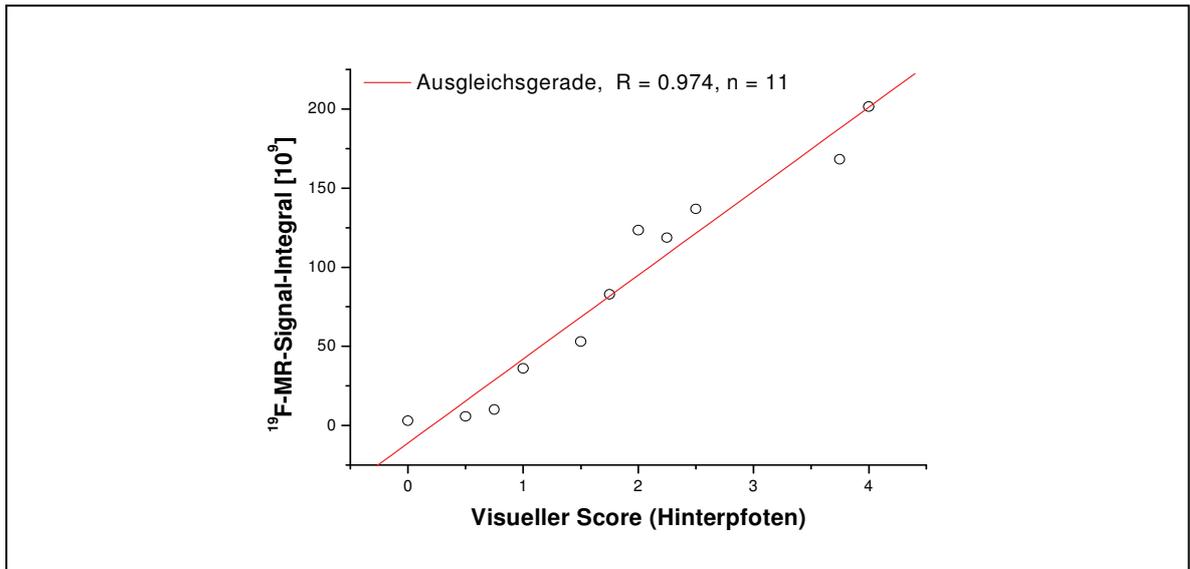
Zur exakteren Lokalisation der Fluorsignale wurden bei einigen Tieren, die der histologischen Analyse zugeführt werden sollten, *post-mortem* hochauflösende 3D-Datensätze des Knies erstellt. Zunächst wurden dazu erneut Protonenbilder als anatomische Referenz aufgenommen. Anschließend erfolgte die Anfertigung von Fluorbildern, um die PFC-Verteilung im Bereich des Gelenks als Entzündungskorrelat darzustellen. Diese wurden dann wieder übereinander gelegt. Dadurch wurde ersichtlich, dass die detektierten Fluorsignale zweifelsfrei dem Gelenkspalt und dem unmittelbar angrenzenden intraartikulären Raum innerhalb der Gelenkkapsel zugeordnet werden müssen und eindeutig nicht vom Knochen ausgehen (Abbildung 3.11).



**Abb. 3.11** Exemplarische Darstellung isotroper, hochauflöster  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -3D-Datensätze.  
(FOV  $1,5 \times 1,5 \times 0,75 \text{ mm}^3$ , Matrix  $128 \times 128 \times 64$ ); Modifiziert nach Originalarbeit 2.

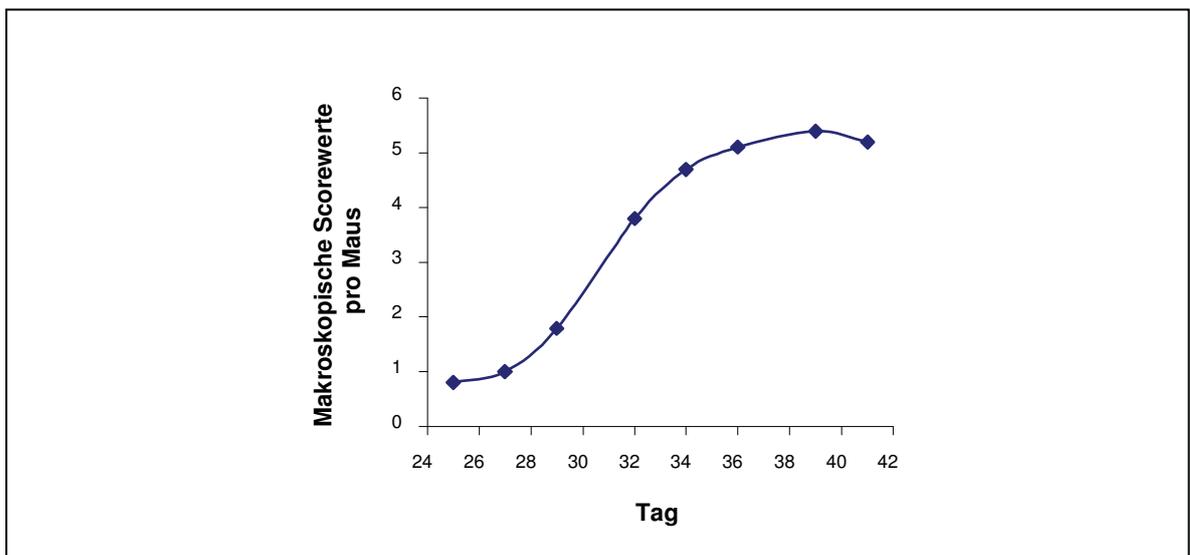
### 3.2.2 Vergleich der MR-Methode mit der klassischen *Scoring-Methode*

Zur Validierung der Daten aus den MR-Untersuchungen anhand der konventionellen *Scoring*-Daten, wurden im nächsten Schritt die Integrale der Signalintensitäten der Hinterpfoten aus den Fluor-MR-Messungen und die *Scores* aus der visuellen Inspektion verglichen. Wie sich aus dem untenstehenden Graphen (Abbildung 3.12) entnehmen lässt, ergab sich daraus eine sehr gute Korrelation der betrachteten Ergebnisse.



**Abb. 3.12** Korrelation von visuell erhobenem Score und <sup>19</sup>F-MR-Signal an den Hinterpfoten (n = 11); Modifiziert nach Originalarbeit 2.

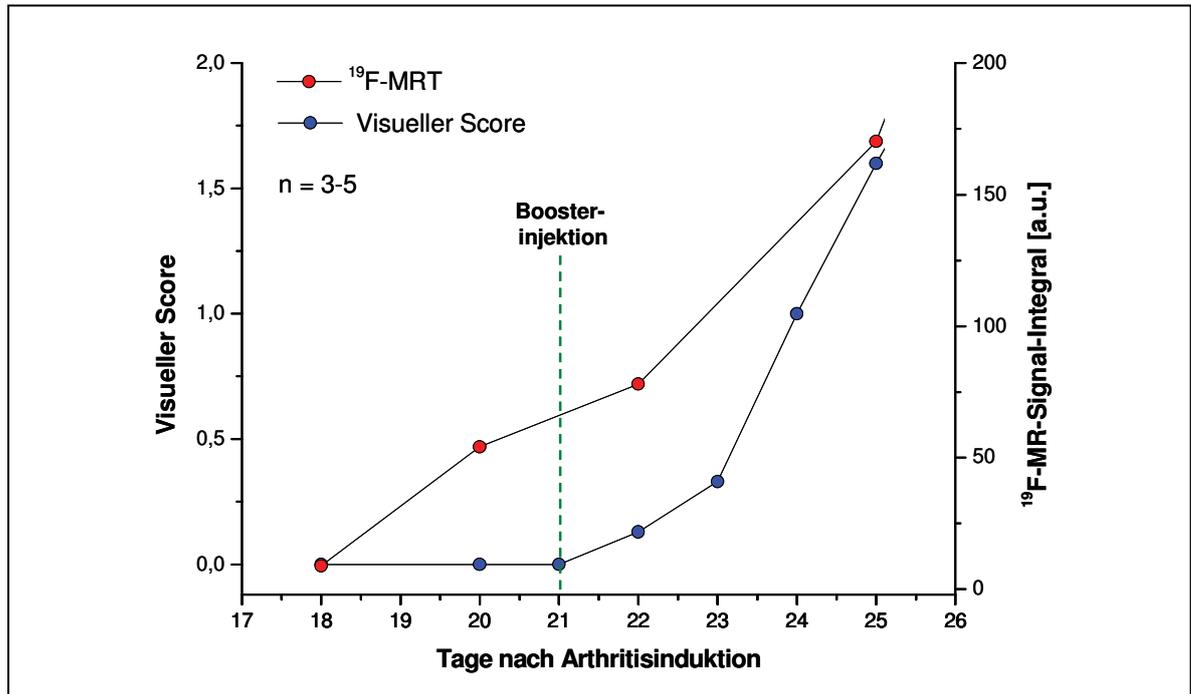
Bei klassischem Verlauf der induzierten Arthritis wird makroskopisch erst 3 bis 4 Tage nach der *Boosterinjektion* (Tag 21) eine Schwellung sichtbar, wie anhand eines charakteristischen *Scoreverlaufs* in Abbildung 3.13 dargestellt.



**Abb. 3.13** Darstellung der makroskopischen *Scorewerte* nach Arthritisinduktion (*CIA-Modell*) (Zur Verfügung gestellt von Peter van Lent, PhD, Department of Rheumatic Diseases, Radboud University Nijmegen Medical Centre).

Um zu überprüfen zu welchem Zeitpunkt eine Entzündungsreaktion im MRT nachzuweisen ist, wurden MR-Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Arthritisinduktion durchgeführt. Anschließend erfolgte die Gegenüberstellung mit der klassischen *Scoring-Methode*. Wie aus Abbildung 3.14 hervorgeht, liefert die MR-Bildgebung deutlich frü-

her Anhaltspunkte für die Entstehung einer Entzündungsreaktion als die visuelle Inspektion.



**Abb. 3.14** Vergleich der Früherkennung von Arthritis mittels visuellem Score und MRT im Zeitverlauf (n= 3-5); Modifiziert nach Originalarbeit 2).

Ganz ähnlich wie oben in Abbildung 3.13, zeigten sich beim visuellen *Scoring* erst 3 bis 4 Tage nach erfolgter *Boosterinjektion* eindeutige Anzeichen einer Schwellung, während in der MR-Bildgebung schon deutlich zuvor  $^{19}\text{F}$ -Signale zu detektieren waren. Des Weiteren fiel bei einigen Tieren bereits an Tag 20, also noch vor der *Boosterinjektion* mit Kollagen Typ II/Medium, ein MR-Signal auf, welches eindeutig dem Gelenkraum zugeordnet werden konnte. Diese Signalintensität verstärkte sich in den folgenden Tagen mit zunehmender Entzündungsreaktion. Demgegenüber traten die visuell erfassbaren Entzündungszeichen erst mit erheblicher Verzögerung im Zeitverlauf nach der *Boosterinjektion* auf.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die MR-Bildgebung nicht nur einen erheblichen Zeitvorteil gegenüber der alleinigen visuellen Beurteilung der Gelenke hat, sondern auch eine deutlich höhere Empfindlichkeit zur Detektion erster Entzündungszeichen aufweist.

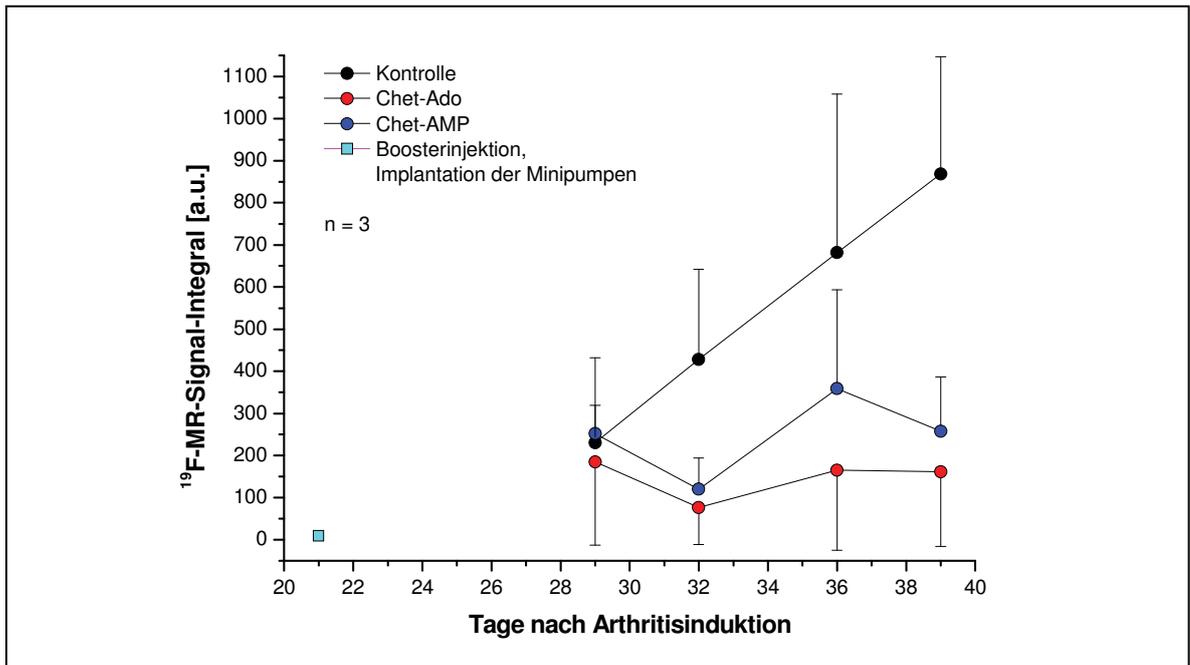
### 3.2.3 Anwendung verschiedener Therapieschemata im Arthritismodell

In den folgenden Versuchsreihen wurde die oben beschriebene Verfahrensweise eingesetzt, um die Wirksamkeit eines selektiven  $A_{2A}$ -Agonisten (Chet-Adenosin) und dessen inaktiven Vorläufers (Chet-AMP/Prodrug) im Arthritismodell zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde in einem ersten Schritt die Substanzen parallel zur *Boosterinjektion* verabreicht. Bei weiteren Versuchen erhielten die Tiere die Verbindungen erst 14 Tage nach der *Boosterinjektion*, um eine "realistischere" Therapiesituation herbeizuführen.

#### 3.2.3.1 Therapiebeginn parallel zur *Boosterinjektion*

Wie oben bereits angedeutet, wurden die ersten Untersuchungen zunächst in Form einer Machbarkeitsstudie unter eher unphysiologischen Bedingungen durchgeführt. Zum einen wurde die Implantation der Minipumpen parallel zur *Boosterinjektion* vorgenommen, zum anderen wurden Chet-Ado und Chet-AMP in sehr hohen Konzentrationen (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) verabreicht.

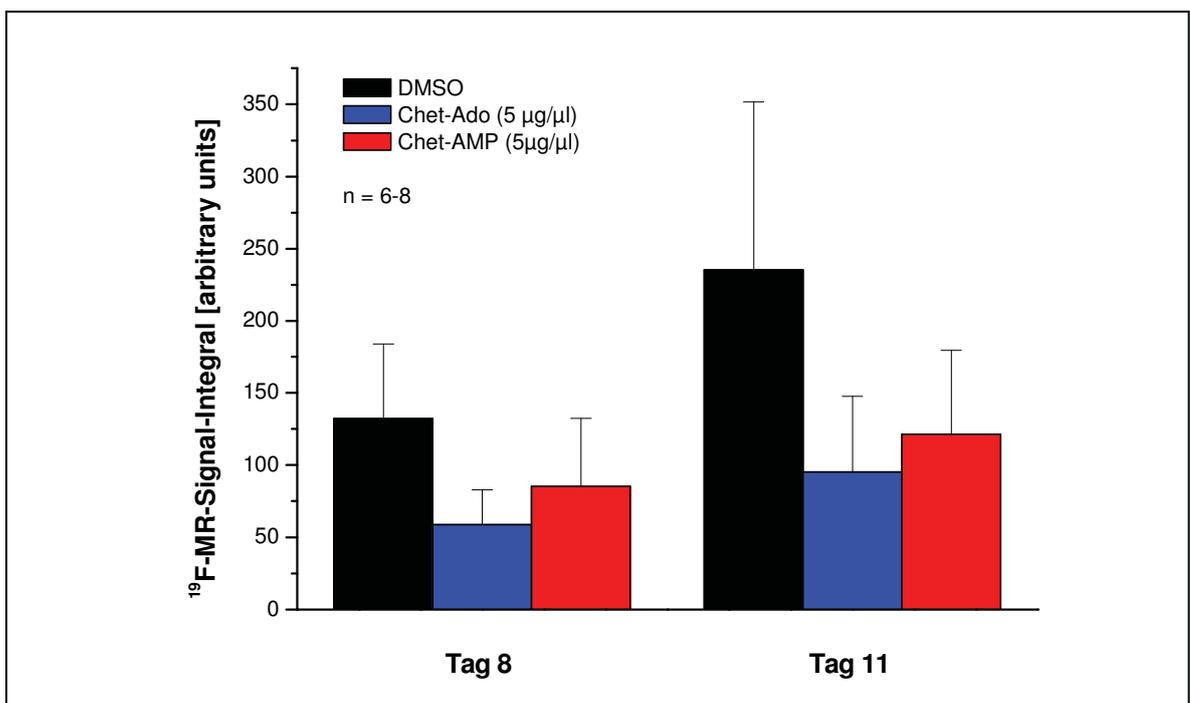
Aus der quantitativen Auswertung der MR-Signale ging hervor, dass 8 Tage nach *Boosterinjektion* und Therapiebeginn innerhalb der verschiedenen Gruppen noch kein bedeutender Unterschied zwischen den Signalintensitäten zu identifizieren war. Dieses Ergebnis kann darauf zurückgeführt werden, dass sich die Arthritis bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausreichend entwickelt hatte. Von Tag 11 bis Tag 21 nach Behandlungsbeginn zeigte sich im weiteren Verlauf jedoch eine stetige Zunahme des Fluorsignals in der Kontrollgruppe (Abbildung 3.15). Die Chet-AMP-Behandlung bewirkte dagegen eine deutliche Verringerung des detektierten Signals. Als ähnlich wirksame Therapie stellte sich die Chet-Adenosin-Behandlung heraus. Beide Substanzen hielten die PFC-Deposition über die gesamte Untersuchungsperiode konstant auf niedrigem Niveau.



**Abb. 3.15** Quantifizierung der Ergebnisse aus den MR-Messungen bei Therapie parallel zur *Boosterinjektion*

(n = 3); Modifiziert nach Originalarbeit 2.

Wie in Abbildung 3.16 dargestellt, nahm das registrierte Fluorsignal in der Kontrollgruppe von Tag 8 bis Tag 11 nach Therapiebeginn als Ausdruck der progredienten Arthritis stark zu. Bei den behandelten Tieren führte die Therapie zu einer Unterdrückung der Entzündung und damit nur zu einer recht geringen Zunahme der Fluorsignale.



**Abb. 3.16** Quantitative Auswertung der MR-Signale bei Therapiebeginn parallel zur *Boosterinjektion*

(n = 6-8)

Im Laufe dieser Serie erfolgte auch eine Substanzspiegelbestimmung von Chet-Adenosin im Blut. Daraus ergab sich ein Wirkspiegel von 1,08 ( $\pm 0,45$ ) nM, der die Bindungskapazität des  $A_{2A}$ -Rezeptors weit übersteigt.

### 3.2.3.2 Therapiebeginn nach Krankheitsausbruch

Um einen Vergleich mit einem Therapieansatz herzustellen, der der alltäglichen Situation näher kommt (also die Behandlung nach Krankheitsausbruch), wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt. Hier wurde die Behandlung erst 14 Tage nach *Boosterinjektion* eingeleitet. Um eine Überdosierung wie im vorherigen Schritt zu vermeiden, wurden die Substanzen in einer erheblich niedrigeren Konzentration eingesetzt. Um darüber hinaus eine Dosis-/Wirkungsbeziehung zu untersuchen, wurde Chet-AMP in zwei unterschiedlich hohen Konzentrationen (1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  beziehungsweise 0,75  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) verabreicht.

Nach der Auswertung der erhaltenen Ergebnisse wurde deutlich, dass der reine  $A_{2A}$ -Rezeptor-Agonist Chet-Ado nur noch eine kaum erfassbare Wirkung hervorrufen konnte. Eine zu rasche Diffusion aus dem Blutkreislauf ins Gewebe könnte dafür ursächlich sein. Chet-AMP zeigte im Gegensatz dazu eine klar zu detektierende Reduktion der MR-Signalintensität. Dabei entfaltete die höher konzentrierte Therapie eine bessere Wirkung als die niedrig dosierte Behandlung und reduzierte das Ausmaß der Arthritis um mehr als 60% (Abbildung 3.17 und 3.18). Dies ist ein klarer Beleg für die Wirksamkeit des verwendeten AMP-Derivates zur Behandlung der RA. Offenbar wird das inaktive Vorläufermolekül bevorzugt vor Ort bei der Entzündung durch die dort in größerem Ausmaß exprimierte CD73 aktiviert.

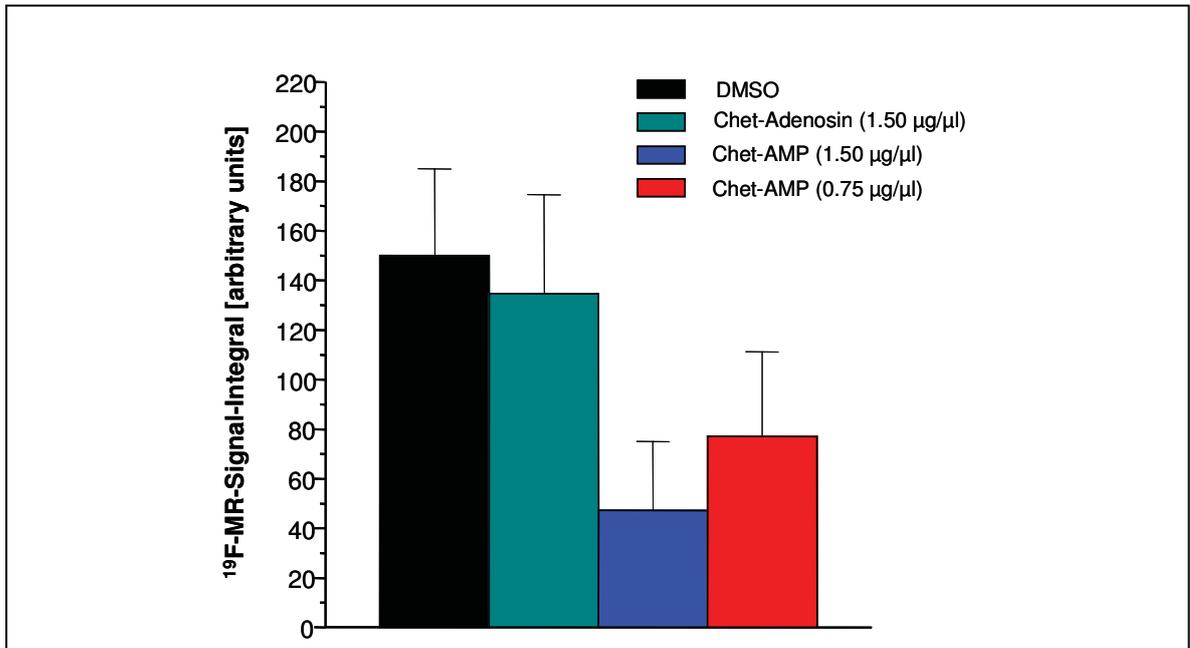


Abb. 3.17 Ergebnisse der  $^{19}\text{F}$ -MR-Messungen bei Therapiebeginn 14 Tage nach *Boosterinjektion* (n = 6 pro Gruppe); Modifiziert nach Originalarbeit 2

Die in den einzelnen Gruppen erhobenen, visuellen *Scorewerte* korrelierten exzellent mit den Ergebnissen aus den MR-Messungen (Abbildung 3.18). Auch hier stellte sich die Chet-AMP-Behandlung in höherer Konzentration als wirksamste Therapie heraus. Die Chet-Adenosin-Therapie erwies sich auch durch die klassische *Scoring*-Methode als praktisch unwirksam.

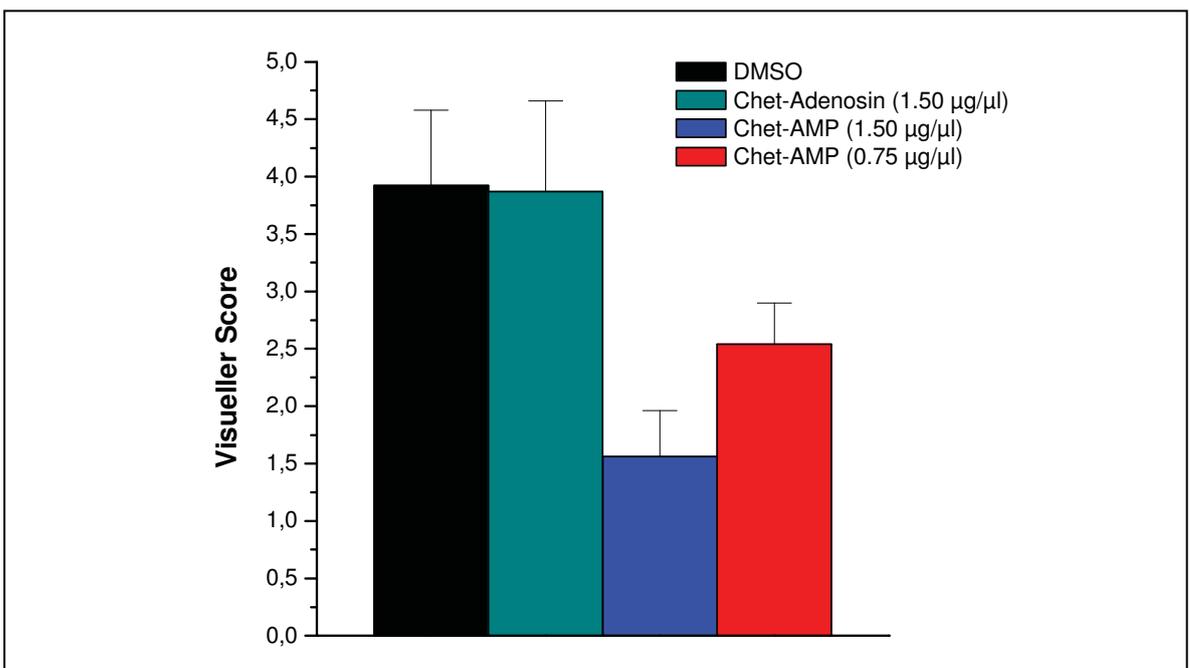
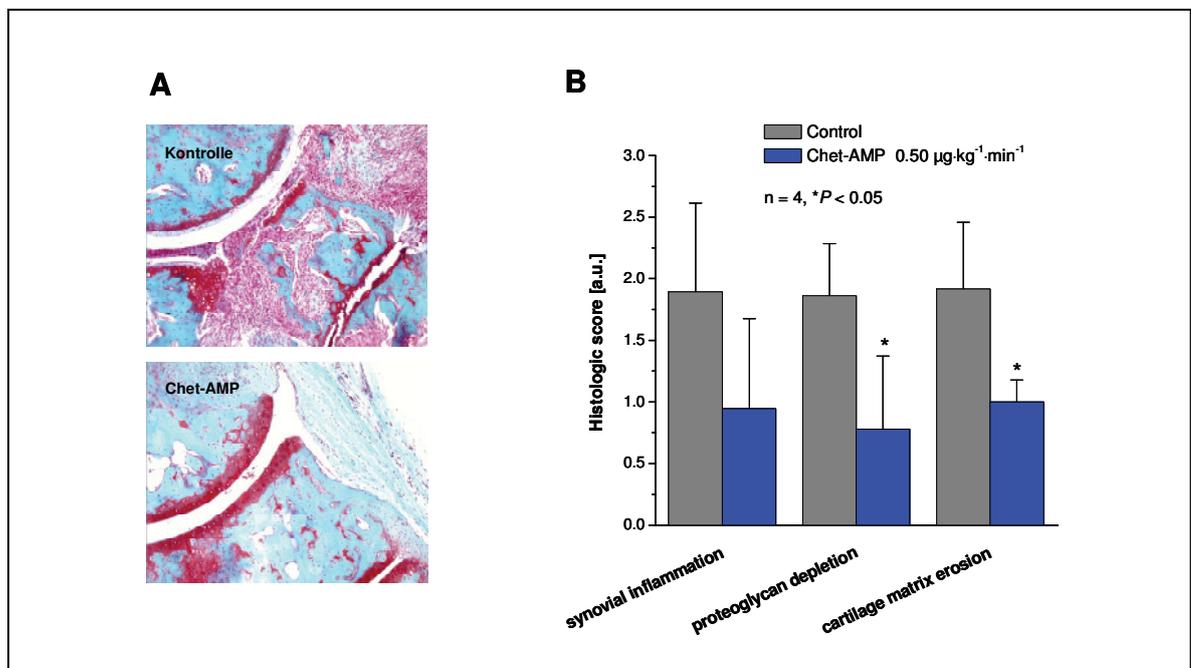


Abb. 3.18 Darstellung der visuell erhobenen *Scorewerte* in den unterschiedlich behandelten Versuchsgruppen

(n = 6 pro Gruppe); Modifiziert nach Originalarbeit 2.

### 3.2.4 Validierung der MR-Methode anhand der histologischen Ergebnisse

Zur Bestätigung der *in vivo* Versuche wurden zusätzlich histologische Analysen der Hinterbeine durchgeführt. Um die antiinflammatorischen Eigenschaften von Chet-AMP bei RA nachzuweisen, wurden die Hinterbeine der Mäuse aus der Chet-AMP-Gruppe sowie aus der Kontrollgruppe zum Institut von Peter van Lent, PhD nach Nijmegen zur histologischen Analyse geschickt. Die dort durchgeführten histologischen Analysen ergaben nicht nur eine Hemmung des Proteoglykan-Abbaus durch Chet-AMP um 57%, sondern auch eine Verringerung von Erosionen der Knorpelmatrix um 47% in der Chet-AMP-Gruppe (Abbildung 3.19).



**Abb. 3.19** Histologische Analyse arthritischer Kniegelenke.

A: Mikroskopischer Befund der Immunzellinfiltration in Synovia und im Exsudat; B: Darstellung der Chet-AMP-Wirkung im Vergleich zur Kontrollgruppe; (n = 4; \*P < 0,05); Originalarbeit 2.

Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die RA durch die  $^{19}\text{F}$ -MR-Methode detektiert werden kann. Im Vergleich mit der *Scoring*-Methode wurde belegt, dass die MR-Methode gegenüber dem visuellen *Scoring* deutlich sensitiver ist. So konnten mittels MRT bereits lange vor dem Auftreten klinischer Symptome  $^{19}\text{F}$ -Signale detektiert werden. Darüber hinaus kann das MRT zum *Monitoring* von Therapien eingesetzt werden. Hier ergaben sich deutliche Hinweise auf ein neues Therapiekonzept mit Chet-AMP als Vorläufermolekül von Chet-Adenosin, wobei die vasodilatatorische Wirkung

---

des Adenosins, durch Spaltung vor Ort im entzündeten Gewebe in seine aktive Form, systemisch nur noch von untergeordneter Bedeutung ist. In weiterführenden Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass in den Immunzellen im arthritischen Knie sowohl die CD73 als auch der  $A_{2A}$ -Rezeptor hochreguliert waren, was die Aktion des *Prodrugs* über die CD73- $A_{2A}$ -Achse zusätzlich untermauert.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass intravenös applizierte PFC-Nanoemulsionen als MR-Kontrastmittel zur sensitiven und frühzeitigen Darstellung einer Entzündungsreaktion in zwei völlig unterschiedlichen Szenarien genutzt werden können: Sowohl in einem Transplantations- als auch in einem Arthritismodell gelang es mittels der  $^{19}\text{F}$ -MRT den Ausbruch der Krankheit wesentlich früher als mit konventionellen Methoden zu detektieren.

### 4.1 Herztransplantation

Momentan ist der Goldstandard zur Detektion einer Transplantatabstoßung die Analyse einer Gewebebiopsie (37,38). Allerdings ist diese Methode durch ihre Invasivität mit Risiken verbunden und liefert unter Umständen falsch-negative Ergebnisse. Dies wird durch die in dieser Arbeit registrierten heterogenen  $^{19}\text{F}$ -Signalmuster als Folge einer progressiven PFC-Deposition, ausgehend von den epi- und endokardialen Randarealen zum Myokard hin, ebenfalls verdeutlicht (vgl. Abbildung 3.6). Die erfasste Heterogenität stimmt mit früheren Beobachtungen überein (58) und unterstreicht die Schwierigkeiten, die durch die Entnahme kleiner Gewebeproben durch Biopsien entstehen sowie deren Anfälligkeit für Stichprobenfehler. Demgegenüber ermöglicht die direkte Darstellung der Infiltration von Monozyten und Makrophagen mit der  $^{19}\text{F}$ -MRT die Visualisierung des gesamten Organs und umgeht so die Probleme, welche mit kleinen Gewebebiopsien assoziiert sind.

Darüber hinaus gelang die Diagnose der Organabstoßung mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT zu einem Zeitpunkt, an dem funktionelle Parameter noch keinen Hinweis auf eine Abstoßung liefern. Dies beruht auf der Detektion PFC-beladener Monozyten, welche während der *allogenen* Immunantwort bereits im Anfangsstadium zum transplantierten Herzen rekrutiert werden (50).

Im Vergleich zu früheren Versuchen mittels konventioneller  $^1\text{H}$ -MRT die Infiltration immunkompetenter Zellen durch signalauslöschende Eisenoxid-basierte Kontrastmittel zu verfolgen, hat die in dieser Arbeit angewandte Methode den Vorteil einer positiven Signaldetektion. Dies ermöglichte die Erfassung der PFC-Deposition innerhalb des *Allografts* schon zum frühest möglichen Untersuchungszeitpunkt, also bereits 3 Tage nach Transplantation. Im Gegensatz dazu erlaubte die Verwendung von Eisenoxid-Nanopartikeln in einem sehr ähnlichen, murinen Abstoßungsmodell [Balb/c (h-2<sup>d</sup>)- in C57BL/6 (h-2<sup>d</sup>)-Mäuse] einen *In-vitro-Nachweis* der Abstoßung erst 7 Tage *post OP*, obwohl in dieser

Studie bereits 3 Tage nach Transplantation in histologischen Schnitten eine erhöhte Makrophageninfiltration in die Allografts beobachtet wurde (3). In gleicher Weise zeigte eine frühere Arbeit mit vergleichbaren *Allotransplantationsmodellen* für Ratten (BN- in DA-Ratten) mit *USPIOs* und *MSPIOs* das Potenzial dieses Ansatzes zur Visualisierung einer Organabstoßung, jedoch wiederum nur zu späteren Zeitpunkten als die hier verwendete Technik (4,5,59).

Die Sensitivität der in dieser Arbeit vorgestellten Vorgehensweise wird zusätzlich durch die  $^{19}\text{F}$ -Signal-Detektion in Arealen von Gefäßanastomosen sowie durch die Beobachtung geringerer PFC-Deposition im Myokard von *Isografts* untermauert. Bei *In-vivo*-Untersuchungen nicht-transplanter Herzen konnte zu keinem Zeitpunkt  $^{19}\text{F}$ -Signal im Myokard oder in angrenzenden Gefäßen detektiert werden (60). Deshalb stellen die  $^{19}\text{F}$ -Signale in den Regionen der Anastomosen und innerhalb des Herzens höchstwahrscheinlich operationsbezogene Gewebetraumata und Ischämie-/Reperfusionsschäden dar, welche durch die Transplantationsoperation verursacht wurden. Weil *Allo*- und *Isografts* in gleicher Weise durch die kalte Ischämiezeit beeinträchtigt werden, kann der Anteil am  $^{19}\text{F}$ -Signal, welcher durch die fortschreitende Zunahme der *Alloimmunantwort* im *Allograft* verursacht wird, durch Subtraktion der Werte der syngen Kontrollen ermittelt werden.

Wie auch bereits in früheren Untersuchungen gezeigt, hat die intravenöse Injektion der PFC-Emulsion eine effiziente Markierung (circa 50%) der Monozyten-/Makrophagenpopulation zur Folge (8,9,60,61). Kombinierte Experimente an Blut- und Gewebeproben unter Zuhilfenahme von Dichtegradientenzentrifugation, *Fluorescence activated cell sorting* (FACS) und  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT konnten demgegenüber nur eine geringe Aufnahme von PFC-Nanopartikeln durch andere zirkulierende Zellen, wie Neutrophile, B- oder T-Zellen, nachweisen. Dies stimmt mit früheren Berichten überein, laut denen zum Erreichen einer effizienten PFC-Markierung von schwach phagozytose-aktiven Zelltypen Hilfsmittel wie Lipofectamin zur Transfektion genutzt werden mussten (62). Eine spezifische *in situ*-Markierung anderer Immunzellen scheint deshalb unter diesen Umständen nur schwer möglich zu sein. Allerdings könnte eine Modifikation der Größe und Oberflächenbeschaffenheit dieser Nanopartikel zukünftig eine vielversprechende Option darstellen, um PFCs auch in andere Zellpopulationen zu dirigieren. Da zurzeit jedoch der verwendete Ansatz auf die Verfolgung der PFC-beladenen Monozyten und Makrophagen beschränkt ist, erlaubt diese Methode keine Detektion von T- und B-Zellen, welche für die Limitierung und Koordination der *allogenen* Immunantwort verantwortlich sind (50,63). Da jedoch Monozyten und Makrophagen einen erheblichen Anteil an der frühen, zellulären Infiltration in das *allogene* Herzgewebe haben (4,22) prädestiniert ihre hohe Anzahl sowie die Schlüsselrol-

le ihrer Effektorfunktionen während der Abstoßung sie als nützlichen Index für die akute Abstoßung – nicht nur für kardiale sondern auch für renale und corneale *Allografts* (50,64-66).

Eine erfolgreiche Organtransplantation erfordert eine effektive Immunsuppression. Die meisten Fortschritte bei der Gewebetransplantation resultieren aus dem Verständnis der immunologischen Prozesse, die eine Rolle bei der Gewebeabstoßung spielen. Rapamycin ist ein potentes Immunsuppressivum, welches die Langzeitüberlebensrate in Nagetiermodellen erhöht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rapamycin die inflammatorische Immunantwort, wie durch die  $^{19}\text{F}$ -MRT ermittelt wurde, um ungefähr 70% reduziert. Diese *in vivo*-Daten stimmen mit Daten aus der immunhistochemischen Analyse überein. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die  $^{19}\text{F}$ -MR-Bildgebung nicht nur ein geeignetes Verfahren zur frühzeitigen Aufdeckung einer Abstoßung darstellt, sondern genauso gut zur Beurteilung einer immunsuppressiven Therapie dienen kann.

## 4.2 Arthritis

### 4.2.1 Diagnose

Des Weiteren gelang es in der vorliegenden Arbeit, durch intravenöse Gabe von PFC-Nanoemulsionen in einem murinen Arthritismodell,  $^{19}\text{F}$ -beladene Monozyten mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT im Frühstadium der Erkrankung noch vor Auftreten klinischer Symptome zu detektieren. Durch diese Methode lässt sich die Erkrankung erheblich früher diagnostizieren als durch die parallel angewendete, konventionelle Scoring-Methode. Weil die rheumatoide Arthritis bereits in sehr frühen Stadien mit der Einwanderung immunkompetenter Zellen in die entzündeten Areale gekennzeichnet ist (67), konnte durch die Aquisition von  $^1\text{H}$ - und anatomisch korrelierenden  $^{19}\text{F}$ -MR-Bildern die Signalregistrierung PFC-beladener Monozyten als Korrelat einer ablaufenden Entzündungsreaktion im Gelenk vorgenommen werden. Die exakte Lokalisation des PFC-Signals im Gelenkspalt und dem unmittelbar angrenzenden, intraartikulären Raum zum Ausschluss eines vom Knochen ausgehenden Signals, wurde durch hochauflösende 3D-Scans vom Kniegelenk *post-mortem* festgestellt.

Da zur Diagnosestellung der RA bis jetzt kein einzelner, beweisender Test existiert, sind heute im klinischen Alltag zur Diagnostik einer RA die Anamnese, die körperliche Untersuchung, die Labordiagnostik sowie bildgebende Verfahren, hier vor allem die Röntgen-

Untersuchung beider Hände und Füße üblich. Diese Tatsache erschwert eine frühe Diagnosestellung jedoch ungemein, da nur die differenzierte Betrachtung der Ergebnisse verschiedener Verfahren im Zusammenhang den Verdacht auf eine RA erhärten kann. Nicht zuletzt führt die Vielzahl der durchzuführenden Untersuchungen an sich zu einer zeitlichen Verzögerung bis zur sicheren Diagnosestellung und erhöht zusätzlich das Risiko einer verpassten frühzeitigen Therapie. Momentan sind noch keine selektiven Labortests zur Früherkennung der RA verfügbar. Exemplarisch kann hier auf den IgM-Rheumafaktor verwiesen werden, welcher lediglich bei ca. 55 bis 85% der Patienten mit Verdacht auf eine RA im Frühstadium positiv ausfällt (52,68). Zudem erscheinen bisher praktizierte Verfahren zwar leicht zugänglich, jedoch sind sie nicht spezifisch und verlässlich für das Frühstadium der RA. So erfasst die Röntgenuntersuchung beider Hände und Füße Gelenkerosionen, welche vor allem charakteristisch für spätere Krankheitsstadien sind. Eine RA kann jedoch bei Fehlen von Erosionen nicht ausgeschlossen werden. Dennoch ermöglicht die Erhebung der röntgenologischen Befunde bei Wiederholung der Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt die Beurteilung des Krankheitsprogresses.

Die pathologischen Prozesse der RA laufen unter anderem im intraartikulären Raum ab, so dass es sinnvoll erscheint, die bislang übliche Diagnostik durch ein bildgebendes Verfahren zu ergänzen, das insbesondere das Innere der potenziell betroffenen Gelenke darstellt. Zu diesem Zweck eignet sich die MRT besonders gut, da mit dieser Technik Weichteile mit hervorragendem Kontrast dargestellt und beginnende Knochenerosionen beziehungsweise Gelenkdestruktionen zu einem früheren Zeitpunkt als mit konventionellen Röntgenuntersuchungen festgestellt werden können (69;70). In den letzten Jahren ist auch MRT mit Gd-basierten Kontrastmitteln zum Nachweis krankheitsspezifischer entzündlicher Veränderungen wie Knochenmarködem, Syniovalitis und Tendovaginitis der großen und kleinen Gelenke eingesetzt worden (71). Des Weiteren befinden sich zahlreiche MR-Techniken in der Entwicklung, welche eine Darstellung ohne KM-Applikation ermöglichen sollen, so exemplarisch die diffusionsgewichtete MRT oder die Arterial-spinlabeling-Technik (71). Darüber hinaus wird derzeit über Kombination verschiedener bildgebender Verfahren versucht, neben anatomischen auch begleitende Stoffwechselveränderungen in den betroffenen Gelenken darzustellen. So wurden vor kurzem PET und MRT zur Darstellung entzündlicher Veränderungen kombiniert (72) und eine erhöhte Tracer-Aufnahme bei Synovitis und Tenovaginitis nachgewiesen. Ganz ähnlich konnte mittels multi-spinhole SPECT ein erhöhter *Tracer-uptake* durch gesteigerte Osteoblastenaktivität gezeigt werden, der die reaktive Knochenreparatur bei RA widerspiegelt. Beiden Verfahren ist gemein, dass ein *Tracer-uptake* als Visualisierung des Pathomechanismus einer Knochenentzündung interpretiert werden kann (73). Allerdings geben sowohl ge-

steigerter Blutfluss/Stoffwechselaktivität als auch Ödemdetektion sowie KM-Akkumulation im Gewebe nur indirekte Hinweise auf die unterliegende Entzündung – alle diese Veränderungen können auch durch andere Pathomechanismen hervorgerufen werden und sind nicht spezifisch für die inflammatorische RA. Darüber hinaus sind PET und SPECT-Untersuchungen mit Strahlenbelastung verbunden. Auch die gut verfügbare, kostenarme Sonographie kann eine Immunezellinfiltration in den Knochen nicht direkt sichtbar machen, sondern es lässt sich nur indirekt über die Dicke der Synovialmembran auf eine Synovitis schließen (74), was durch dopplersonographische Darstellung eines erhöhten synovialen Blutflusses untermauert werden kann (75).

Eine zusätzliche „direkt positive“ Darstellung der Prävalenz entzündlicher Veränderungen in einzelnen Gelenken und die Identifikation signifikanter Verteilungsmuster infiltrierender Immunezellen könnte in Zukunft mit der hier vorgestellten  $^{19}\text{F}$ -MRT-Untersuchungstechnik geleistet und zu einer noch frühzeitigeren/zuverlässigeren Diagnose und einer davon abzuleitenden patientenspezifischen Therapie genutzt werden. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Relevanz einer frühzeitigen Erkennung der rheumatischen Erkrankung im klinischen Alltag wird deutlich, dass eine Diagnostik nur anhand klinischer Symptome zum Nachteil des Patienten sein kann. Grund hierfür ist die Tatsache, dass unverzüglich gestellte Diagnosen insbesondere bei aggressiv progredienten Verlaufsformen der RA großen Einfluss auf den weiteren Verlauf haben können. So empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie e.V. in ihren Leitlinien zum Management der frühen rheumatoiden Arthritis einen möglichst frühen Behandlungsbeginn mit einer so genannten Basistherapie innerhalb der ersten 6 Monate nach Beschwerdebeginn, da in diesem Zeitfenster die Prognose der Erkrankung entscheidend verbessert werden kann (52,76,77).

Die MRT ist trotz der überlegenen Sensitivität bei der Erfassung struktureller Veränderungen im Rahmen einer RA gegenüber anderen Untersuchungstechniken (78) bis jetzt nicht als Standardverfahren zur Diagnostik für Patienten, bei denen der Verdacht auf RA im Frühstadium besteht, etabliert. Dies liegt wohl zum einen daran, dass momentan noch kein universell einsetzbares Kontrastmittel für die Verwendung im klinischen Alltag zur Verfügung steht, und zum anderen an der beträchtlichen Größe des betroffenen Patientenkollektivs. Denn für den Fall, dass jeder der oben beschriebenen Patienten einer MRT-Untersuchung unterzogen würde, zöge dies nicht nur eine hohe Belastung des Gesundheitssystems durch enorme Untersuchungskosten nach sich, es müssten darüber hinaus neue Kapazitäten geschaffen werden, um die Untersuchungsmethode für jeden betroffenen Patienten zugänglich zu machen. Sollte es jedoch in Zukunft möglich sein, Patienten, denen ein rasch progredienter Krankheitsverlauf im Rahmen einer RA bevorsteht, frühzei-

tig zu identifizieren, wäre die Anwendung der  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT-Untersuchung bei diesem vorselektierten, kleineren Patientenkollektiv denkbar und würde diesen Patienten zu einer besseren Prognose verhelfen.

#### 4.2.2 Therapie

Bei RA und anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen ist heute eine Therapie mit Methotrexat am weitesten verbreitet. Experimentelle Studien *in vivo* und *in vitro* wie auch klinische Studien legen nahe, dass die Wirkung von Methotrexat teilweise über Adenosin vermittelt wird (79). Interessant ist darüber hinaus die Beobachtung einer Abschwächung der antiinflammatorischen Wirkung des Adenosins bei pharmakologischer Hemmung der CD73 (80) sowie bei der Untersuchung von CD73-defizienten-Mäusen (81).

Patienten die an einer RA erkrankt sind verfügen über eine erhöhte Dichte von  $A_{2A}$ - und  $A_3$ -Rezeptoren auf Immunzellen. Eine Tatsache, die mit den Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit bei Mäusen übereinstimmt. Diese Erkenntnis deutet darauf hin, dass der Stoffwechselweg von Adenosin über die  $A_{2A}$ - und  $A_3$ -Rezeptoren vermutlich am Wirkmechanismus des Methotrexats beteiligt ist. Somit steht möglicherweise in Zukunft eine neue Therapieoption mit Adenosin zur Verfügung, welches als natürlich vorkommendes Nukleosid eine bedeutende Rolle bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen spielt. Das therapeutische Potential ergibt sich aus seinen immunsuppressiven und antiinflammatorischen Eigenschaften, das jedoch durch die stark vasodilatatorischen Effekte eingeschränkt bleibt. Dabei wird die immunsuppressive und vasodilatative Wirkung des Adenosins über  $A_{2A}$ -Rezeptoren vermittelt (26), welche in hoher Anzahl von Zellen des Immunsystems exprimiert werden. Eine Stimulation der  $A_{2A}$ -Rezeptoren hemmt die TNF $\alpha$ -Produktion in den peripheren mononukleären Zellen (PBMC) (82,83) und führt über diesen Mechanismus bei RA-Patienten zu einer Abnahme der Konzentration proinflammatorischer Zytokine (82,84).

In der vorliegenden Arbeit konnte der Behandlungserfolg mit einem Adenosin-Agonisten, beziehungsweise dessen Vorläufermoleküls, mittels  $^{19}\text{F}$ -MR-Bildgebung visuell und quantitativ verfolgt werden. Da eine antiinflammatorische Wirkung des Adenosin-Agonisten im verwendeten Tiermodell nahezu nicht nachzuweisen war, muss davon ausgegangen werden, dass die Konzentration der eingesetzten Substanz in den entzündeten Regionen zu gering war, um das Entzündungsgeschehen merklich zu beeinflussen. Dies wird durch die Spaltung des *Prodrugs* Chet-AMP in die aktive Form Chet-Adenosin vor Ort in den entzündeten Arealen durch die dort in erhöhtem Maße von Immunzellen exprimierte CD73

vermieden. Durch diese Reaktion wird in den entzündeten Geweben eine höhere Konzentration des Adenosins als bei systemischer Applikation erreicht, so dass auf diese Weise ein lokaler therapeutischer Effekt erzielt werden kann. Dieser Mechanismus wird durch den eindeutigen Nachweis der antiinflammatorischen Wirkung, trotz des Einsatzes in exakt gleicher Konzentration wie der Adenosin-Agonist, untermauert.

In dieser Arbeit wurde eine starke Entzündungshemmung bei CIA durch Chet-AMP, einem phosphorylierten  $A_{2A}$ -Rezeptor-Agonist, als Substrat von CD73 beobachtet (85). Dieses Ektoenzym war in neutrophilen Granulozyten, Monozyten sowie Makrophagen deutlich hochreguliert. Daneben wurde hier auch der  $A_{2A}$ -Rezeptor in erhöhtem Maße exprimiert. So scheint es, dass die Aktivierung des extrazellulären Stoffwechselweges beim Adenin-Nukleotid-Abbau und des  $A_{2A}$ -Rezeptors eine natürliche Reaktion des Körpers ist, antiinflammatorisches Adenosin gegen die Entzündungsreaktion zu bilden. Dies wird durch Berichte über grundsätzlich proinflammatorische Phänotypen von CD73-defizienten-Mäusen (86-88) sowie die gut untersuchte, immunsuppressive Funktion von Adenosin bei Immunzellen (26,27) zusätzlich unterstützt. Ein weiterer Hinweis auf eine ausschließlich lokale Wirkung ist die Tatsache, dass eine systemische hypotensive Wirkung durch vasodilatative Effekte ausbleiben scheint. Eine vasodilatatorische Wirkung tritt erst bei deutlich höheren Plasmakonzentrationen auf. Darüber hinaus kann das *Prodrug* auch von der alkalischen Phosphatase gespalten werden, welche allerdings in nur geringer Zahl von T-Zellen exprimiert wird und zudem einen höheren  $K_m$ -Wert aufweist, als CD73 (89). Demzufolge fällt die Spaltung von AMP durch CD73 bei niedrigen Konzentrationen deutlich mehr ins Gewicht.

### 4.3 Allgemeine Aspekte

PFCs werden bevorzugt von Monozyten und Makrophagen phagozytiert und können leicht in entzündeten Gewebsregionen durch simultane Aquisition von morphologisch entsprechenden  $^1H$ - und  $^{19}F$ -MR-Bildern detektiert werden. Da jeglicher  $^{19}F$ -Hintergrund im Körper fehlt, sind die beobachteten Signale sehr robust und erreichen einen hohen Grad an Spezifität. Histologische Analysen bestätigten, dass die  $^{19}F$ -Signale mit der Quantität infiltrierender Monozyten korrelieren. Deshalb ist die  $^{19}F$ -MRT eine geeignete Methode, um eine progressive Infiltration immunkompetenter Zellen in das betroffene Zielorgan zu überwachen und die Effektivität therapeutischer Interventionen zu bestimmen.

Da die Infiltrationskinetik markierter Zellen in *Allografts*, wie in dieser Studie beobachtet, mit den Daten in der Literatur übereinstimmt, scheint die PFC-Beladung die Funktion der

Monozyten nicht zu beeinträchtigen (3,50,59). Ähnliche Befunde wurden in vorherigen Untersuchungen bei cerebraler und myokardialer Ischämie erhalten. Des Weiteren zeigte sich, dass PFC-beladene Leukozyten selbst auf Schwellenreize im Fall einer LPS-induzierten Pneumonie in adäquater Weise reagieren (9). Die Gründe für dieses inerte Verhalten liegen in der Stärke der C-F-Bindung, welche beständig gegenüber jeglicher Spaltung durch endogene Enzyme ist, und der dichten, abstoßenden Elektronenwolke, welche die C-F-Ketten umhüllt, was nur extrem schwache intermolekulare Wechselwirkungen zulässt (62). Dementsprechend wurden bis jetzt keine schädlichen Nebenwirkungen beobachtet, weder bei Tieren nach intravenöser Injektion, noch bei der Proliferation oder Reifung von Immunzellen nach Aufnahme der Fluormarkierung in Zellkulturen (7,9,62,90). Da einige PFC-Agenzien, wie Perfluordecalin und Perfluorocetyl bromid (Oxygent®), bereits bei Patienten als künstliche Blutersatzstoffe eingesetzt wurden (64), könnte die  $^{19}\text{F}$ -MRT durchaus Anwendung in der klinischen Diagnostik finden. Bis heute wird die  $^{19}\text{F}$ -MRT zwar nicht in der klinischen Routine angewandt, die Fluorspulen könnten jedoch problemlos in die *Scanner* der Klinik integriert werden. Da der  $^{19}\text{F}$ -Kern eine ähnliche Sensitivität wie der  $^1\text{H}$ -Kern aufweist, sollten die klinischen *Scanner* mit einer Magnetfeldstärke von 3 Tesla eine vergleichbare Sensitivität bei humanen Voxelgrößen (im Bereich von 2-20  $\mu\text{l}$ , entsprechend zu den nur 0,2  $\mu\text{l}$  in der aktuellen Studie mit 9,4 Tesla) erreichen.

Darüber hinaus können  $^{19}\text{F}$ -Bilder ohne Hintergrundsignale zuverlässig quantitativ ausgewertet werden, was bei den alternativ eingesetzten, signal-auslöschenden Eisenoxidpartikeln deutlich schwieriger ist. Zudem ist hier nicht immer eindeutig zu bestimmen, ob dunkle Areale von diesen Nanopartikeln hervorgerufen werden oder ob sie das Ergebnis anderer denkbarer Artefakte, wie zum Beispiel Blutungen oder Grenzflächen von Geweben, darstellen. Demzufolge ist die vorliegende Arbeit die Erste, die eine klare quantitative Beziehung zwischen MR-Signal-Intensität und Organinfiltration immunkompetenter Zellen zeigen kann. Darüber hinaus besteht das Potenzial, eine effektive Immunsuppression zu überwachen.

Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren ist jedoch in dieser Form beim Menschen nur begrenzt anwendbar. Probleme können zum einen durch das recht große Volumen der verwendeten PFCs und zum anderen durch die fehlende Eliminierung der PFCs aus Organen, wie Leber und Milz, die Zellen mit hoher Phagozytosekapazität enthalten, entstehen. Allerdings entspricht die genutzte Menge an PFCs im Rahmen dieser Arbeit einer Größenordnung, in welcher bereits im Rahmen klinischer Patientenstudien PFCs als künstliche Blutersatzstoffe angewendet wurden (91). In den meisten aktuellen Tierversu-

chen werden Perfluoro-15-kronen-5-ether-Emulsionen verwendet, welche ideale Eigenschaften für die MR aufweisen. Diese zeigen jedoch eine zu lange Verweildauer im Körper auf (60), was sich auf repetitive Diagnostik nachteilig auswirkt. Jedoch gibt es einige PFCs, die schon als künstliche Blutersatzstoffe in der Klinik eingesetzt wurden (92,93) und darüber hinaus eine kurze biologische Halbwertszeit durch Elimination über die Lungen aufweisen. Im Hinblick auf die MRT haben diese Verbindungen den Nachteil, dass konventionell erstellte  $^{19}\text{F}$ -Bilder durch das Signalsplitting unterschiedlich magnetischer  $^{19}\text{F}$ -Kerne deutliche Artefakte aufweisen können. Dieses Problem kann jedoch mit neuen, kürzlich entwickelten Detektionsmethoden gelöst werden (94). Darüber hinaus könnte eine Modifikation der Oberflächeneigenschaften der Nanopartikel in zukünftigen Studien helfen, die PFCs spezifischer an relevante Ziele zu leiten.

Auch wenn eine derart kostspielige Untersuchung bei der Volkskrankheit RA sicherlich schwer finanzierbar sein wird, so ist die Anwendung bei Transplantationspatienten durchaus denkbar. Dies resultiert aus der geringen Anzahl betroffener Patienten, die von diesem schweren Krankheitsbild betroffen sind. Es erscheint deshalb sinnvoll, eine MR-Untersuchung durchzuführen, um eine Abstoßungsreaktion nicht zu übersehen. Dies wird durch die Darstellung des gesamten Organs gewährleistet und bietet somit eine vernünftige Alternative zur invasiven (Myokard-) Biopsie, die nur einen kleinen Ausschnitt des Organs erfasst. Darüber hinaus könnte die MR-Methode auch bei anderen Erkrankungen, bei deren Diagnostik eine Biopsie unerlässlich ist (wie beispielsweise Nephritis) eine zuverlässigere und dabei weniger invasive Option sein.

## Literaturverzeichnis

1. Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J, Rabito CA, Bengele HH, Josephson L. Ultras-small superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology* 1990; 175: 489-93.
2. Kleinschnitz C, Bendszus M, Frank M, Solymosi L, Toyka KV, Stoll G. In vivo monitoring of macrophage infiltration in experimental ischemic brain lesions by magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 1356-61.
3. Christen T, Nahrendorf M, Wildgruber M, Swirski FK, Aikawa E, Waterman P, et al. Molecular imaging of innate immune cell function in transplant rejection. *Circulation* 2009; 119: 1925-32.
4. Kanno S, Wu YJ, Lee PC, Dodd SJ, Williams M, Griffith BP, et al. Macrophage accumulation associated with rat cardiac allograft rejection detected by magnetic resonance imaging with ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles. *Circulation* 2001; 104: 934-8.
5. Wu YL, Ye Q, Foley LM, Hitchens TK, Sato K, Williams JB, et al. In situ labeling of immune cells with iron oxide particles: an approach to detect organ rejection by cellular MRI. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2006; 103: 1852-7.
6. Ye Q, Wu YL, Foley LM, Hitchens TK, Eytan DF, Shirwan H, et al. Longitudinal tracking of recipient macrophages in a rat chronic cardiac allograft rejection model with noninvasive magnetic resonance imaging using micrometer-sized paramagnetic iron oxide particles. *Circulation* 2008; 118: 149-56.
7. Flogel U, Ding Z, Hardung H, Jander S, Reichmann G, Jacoby C, et al. In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging. *Circulation* 2008; 118: 140-8.
8. Mattrey RF, Long DM, Multer F, Mitten R, Higgins CB. Perfluorooctylbromide: a reticuloendothelial-specific and tumor-imaging agent for computed tomography. *Radiology* 1982; 145: 755-8.

9. Ebner B, Behm P, Jacoby C, Burghoff S, French BA, Schrader J, et al.  
Early assessment of pulmonary inflammation by 19F MRI in vivo. *Circulation: Cardiovascular Imaging* 2010; 3: 202-10.
10. Böcker W, Denk H, Heitz PHU, Moch H, Herbst H, Niedobitek G, Müller CH.  
*Pathologie*. 4.Auflage. Elsevier Verlag München 2008; 117.
11. Böcker W, Denk H, Heitz PHU, Moch H, Herbst H, Niedobitek G, Müller CH.  
*Pathologie*. 4. Auflage. Elsevier Verlag München 2008; 117-46.
12. Böcker W, Denk H, Heitz PHU, Moch H, Herbst H, Niedobitek G, Müller CH.  
*Pathologie*. 4.Auflage. Elsevier Verlag München 2008; 118.
13. Fearon DT, Locksley RM.  
The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272: 50-3.
14. Medzhitov R, Janeway CA, Jr.  
Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology* 1997; 9: 4-9.
15. Morita K, Miura M, Paolone DR, Engeman TM, Kapoor A, Remick DG, et al.  
Early chemokine cascades in murine cardiac grafts regulate T cell recruitment and progression of acute allograft rejection. *Journal of Immunology* 2001; 167: 2979-84.
16. van Furth R.  
Origin and turnover of monocytes and macrophages. *Current Topic of Pathology* 1989; 79: 125-50.
17. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA.  
Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 1993; 259: 1739-42.
18. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H.  
HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 15107-12.

19. Zhai Y, Shen XD, O'Connell R, Gao F, Lassman C, Busuttill RW, et al.  
Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *Journal of Immunology* 2004; 173: 7115-9.
20. Underhill DM, Bassetti M, Rudensky A, Aderem A.  
Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 190: 1909-14.
21. Brent L, Brown J, Medawar PB.  
Skin transplantation immunity in relation to hypersensitivity. *Lancet* 1958; 2: 561-4.
22. Dresske B, Zhu X, Herwartz C, Brotzmann K, Fandrich F.  
The time pattern of organ infiltration and distribution of natural killer cells and macrophages in the course of acute graft rejection after allogenic heart transplantation in the rat. *Transplant Proceedings* 1997; 29: 1715-6.
23. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J.  
International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews* 2001; 53: 527-52.
24. Klotz KN.  
Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2000; 362: 382-91.
25. Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W.  
Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2000; 362: 364-74.
26. Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P.  
Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 2008; 7: 759-70.
27. Varani K, Laghi-Pasini F, Camurri A, Capecchi PL, Maccherini M, Diciolla F, et al.  
Changes of peripheral A2A adenosine receptors in chronic heart failure and cardiac transplantation. *FASEB Journal* 2003; 17: 280-2.

28. Morovic-Vergles J, Culo MI, Gamulin S, Culo F.  
Cyclic adenosine 5'-monophosphate in synovial fluid of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Rheumatology International* 2008; 29: 167-71.
29. Akkari R, Burbiel JC, Hockemeyer J, Muller CE.  
Recent progress in the development of adenosine receptor ligands as antiinflammatory drugs. *Current Topic in Medicinal Chemistry* 2006; 6: 1375-99.
30. Zhao G, Linke A, Xu X, Ochoa M, Belloni F, Belardinelli L, et al.  
Comparative profile of vasodilation by CVT-3146, a novel A2A receptor agonist, and adenosine in conscious dogs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003; 307: 182-9.
31. Cunha RA, Ferre S, Vaugeois JM, Chen JF.  
Potential therapeutic interest of adenosine A2A receptors in psychiatric disorders. *Current Pharmaceutical Design* 2008; 14: 1512-24.
32. Livingston M, Heaney LG, Ennis M.  
Adenosine, inflammation and asthma –a review. *Inflammation Research* 2004; 53: 171-8.
33. El-Tayeb A, Iqbal J, Behrenswerth A, Romio M, Schneider M, Zimmermann H, et al.  
Nucleoside-5'-monophosphates as prodrugs of adenosine A2A receptor agonists activated by ecto-5'-nucleotidase. *Journal of Medicinal Chemistry* 2009; 52: 7669-77.
34. Li X, Zhou T, Zhi X, Zhao F, Yin L, Zhou P.  
Effect of hypoxia/reoxygenation on CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in mouse microvessel endothelial cell lines. *Microvascular Research* 2006; 72: 48-53.
35. Schmid C, Schmitto JD, Scheld HH.  
Herztransplantation in Deutschland: Ein geschichtlicher Überblick. Steinkopff Verlag Darmstadt 2003; 34.
36. Piper W  
Innere Medizin, Springer Medizin Verlag Heidelberg 2007; 95

37. Billingham ME.  
Endomyocardial biopsy diagnosis of acute rejection in cardiac allografts. *Prog. of Cardiovascular Diseases* 1990; 33: 11-8.
38. Yoshizato T, Edwards WD, Alboliras ET, Hagler DJ, Driscoll DJ.  
Safety and utility of endomyocardial biopsy in infants, children and adolescents: a review of 66 procedures in 53 patients. *Journal of the American College of Cardiology* 1990; 15: 436-42.
39. Hummel M, Muller J, Dandel M, Hetzer R.  
Surveillance biopsies in heart and lung transplantation. *Transplantation Proceedings* 2002; 34: 1860-3.
40. Yang HM, Lai CK, Gjertson DW, Baruch-Oren T, Ra SH, Watts W, et al.  
Has the 2004 revision of the International Society of Heart and Lung Transplantation grading system improved the reproducibility of the diagnosis and grading of cardiac transplant rejection? *Cardiovascular Pathology* 2009; 18: 198-204.
41. Bourge R, Eisen H, Hershberger R, Keller A, Radovancevic B, Schreier G, et al.  
Noninvasive rejection monitoring of cardiac transplants using high resolution intramyocardial electrograms: initial US multicenter experience. *Pacing and Clinical Electrophysiology* 1998; 21: 2338-44.
42. Fabregas RI, Crespo-Leiro MG, Muniz J, Regueiro M, Rodriguez JA, Alvarez N, et al.  
Usefulness of pulsed Doppler tissue imaging for noninvasive detection of cardiac rejection after heart transplantation. *Transplantation Proceedings* 1999; 31: 2545-7.
43. Izrailtjan I, Kresh JY, Morris RJ, Brozena SC, Kutalek SP, Wechsler AS.  
Early detection of acute allograft rejection by linear and nonlinear analysis of heart rate variability. *Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery* 2000; 120: 737-45.
44. Moidl R, Chevchik O, Simon P, Grimm M, Wieselthaler G, Ullrich R, et al. Noninvasive monitoring of peak filling rate with acoustic quantification echocardiography accurately detects acute cardiac allograft rejection. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 1999; 18: 194-201.

45. Dengler TJ, Zimmermann R, Braun K, Muller-Bardorff M, Zehelein J, Sack FU, et al. Elevated serum concentrations of cardiac troponin T in acute allograft rejection after human heart transplantation. *Journal of the American College of Cardiology* 1998; 32: 405-12.
46. Muller TF, Vogl M, Neumann MC, Lange H, Grimm M, Muller MM. Noninvasive monitoring using serum amyloid A and serum neopterin in cardiac transplantation. *Clinica Chimica Acta* 1998; 276: 63-74.
47. Valantine HA, Yeoh TK, Gibbons R, McCarthy P, Stinson EB, Billingham ME, et al. Sensitivity and specificity of diastolic indexes for rejection surveillance: temporal correlation with endomyocardial biopsy. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 1991; 10: 757-65.
48. Yeoh TK, Frist WH, Eastburn TE, Atkinson J. Clinical significance of mild rejection of the cardiac allograft. *Circulation* 1992; 86: II267-II271.
49. Russell ME, Hancock WW, Wallace AF, Wyner LR, Karnovsky MJ. Modulation of inflammatory activation pathways in the Lewis-to-F-344 rat chronic cardiac rejection model. *Transplantation Proceedings* 1995; 27: 2100-4.
50. Wyburn KR, Jose MD, Wu H, Atkins RC, Chadban SJ. The role of macrophages in allograft rejection. *Transplantation* 2005; 80: 1641-7.
51. Schneider M, Lelgemann M, Abholz HH, Blumenroth M, Flügge C, Gerken M, Jäniche H, Kunz R, Krüger K, Mau W, Specker C, Zellner M. DGRh-Leitlinie: Management der frühen rheumatoiden Arthritis. 3. überarbeitete und erweiterte Auflage. Steinkopff Verlag Darmstadt 2007; 2
52. Schneider M, Lelgemann M, Abholz HH, Blumenroth M, Flügge C, Gerken M, Jäniche H, Kunz R, Krüger K, Mau W, Specker C, Zellner M. DGRh-Leitlinie: Management der frühen rheumatoiden Arthritis. 3. überarbeitete und erweiterte Auflage. Steinkopff Verlag Darmstadt 2007; 6-8.

53. Rindfleisch JA, Muller D.  
Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *American Family Physician* 2005; 72: 1037-47.
54. Emery P.  
Therapeutic approaches for early rheumatoid arthritis. How early? How aggressive? *British Journal of Rheumatology* 1995; 34 Suppl 2: 87-90.
55. Machold KP, Eberl G, Leeb BF, Nell V, Windisch B, Smolen JS.  
Early arthritis therapy: rationale and current approach. *Journal of Rheumatology Supplement* 1998; 53: 13-9.
56. Bas S, Perneger TV, Seitz M, Tiercy JM, Roux-Lombard P, Guerne PA.  
Diagnostic tests for rheumatoid arthritis: comparison of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-keratin antibodies and IgM rheumatoid factors. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41: 809-14.
57. Machold KP, Stamm TA, Eberl GJ, Nell VK, Dunky A, Uffmann M, et al.  
Very recent onset arthritis--clinical, laboratory, and radiological findings during the first year of disease. *Journal of Rheumatology* 2002; 29: 2278-87.
58. Wu K, Zhang J, Fu J, Wu S, Philipp T, Uwe H, et al.  
Novel technique for blood circuit reconstruction in mouse heart transplantation model. *Microsurgery* 2006; 26: 594-8.
59. Wu YL, Ye Q, Sato K, Foley LM, Hitchens TK, Ho C.  
Noninvasive evaluation of cardiac allograft rejection by cellular and functional cardiac magnetic resonance. *JACC: Cardiovascular Imaging* 2009; 2: 731-41.
60. Flogel U, Ding Z, Hardung H, Jander S, Reichmann G, Jacoby C, et al.  
In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging. *Circulation* 2008; 118: 140-8.
61. Smith DJ, Kornbrust ES, Lane TA.  
Phagocytosis of a fluorescently labeled perflubron emulsion by a human monocyte cell line. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology* 1994; 22: 1215-21.

62. Ahrens ET, Flores R, Xu H, Morel PA.  
In vivo imaging platform for tracking immunotherapeutic cells. *Nature Biotechnology* 2005; 23: 983-7.
63. Shimizu K, Libby P, Shubiki R, Sakuma M, Wang Y, Asano K, et al.  
Leukocyte integrin Mac-1 promotes acute cardiac allograft rejection. *Circulation* 2008; 117: 1997-2008.
64. Jose MD, Ikezumi Y, van RN, Atkins RC, Chadban SJ.  
Macrophages act as effectors of tissue damage in acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2003; 76: 1015-22.
65. Magil AB. Monocytes/macrophages in renal allograft rejection. *Transplantation Reviews (Orlando)* 2009; 23: 199-208.
66. Slegers TP, Broersma L, van RN, Hooymans JM, van RG, van der Gaag R. Macrophages play a role in the early phase of corneal allograft rejection in rats. *Transplantation* 2004; 77: 1641-6.
67. van Lent PL, Holthuysen AE, van RN, Van de Loo FA, van de Putte LB, Van den Berg WB.  
Phagocytic synovial lining cells regulate acute and chronic joint inflammation after antigenic exacerbation of smouldering experimental murine arthritis. *Journal of Rheumatology* 1998; 25: 1135-45.
68. Saraux A, Berthelot JM, Chales G, Le HC, Mary JY, Thorel JB, et al.  
Value of laboratory tests in early prediction of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2002; 47: 155-65.
69. Freeston JE, Conaghan PG, Dass S et al.  
Does extremity-MRI improve erosion detection in severely damaged joints? A study of long-standing rheumatoid arthritis using three imaging modalities. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1538-1540.
70. Weber, U, Ostergaard M, Lambert RG et al.  
The impact of MRI on the clinical management of inflammatory arthritides. *Skeletal Radiol* 2011; 40: 1153-1173.

71. Buchbender C, Schneider M, Ostendorf B.  
Magnetresonanztomografie und Hybridbildgebung in der Rheumatologie. *Z Rheumatol* 2013; 72: 137-144.
72. Miese F, Scherer A, Ostendorf B, Heinzel A, Lanzmann RS, Kröpil P, Blondin B, Hautzel H, Wittsack HJ, Schneider M, Antoch G, Herzog H, Jon Shah N.  
Hybrid <sup>18</sup>F-FDG PET-MRI of the hand in rheumatoid arthritis: initial results. *Clin Rheumatol* 2011; 30: 1247-1250.
73. Buchbender C, Ostendorf B, Mattes-György K, Miese F, Wittsack H. J, Quentin M, Specker C, Schneider M, Antoch G, Müller HW, Scherer A.  
Synovitis and bone inflammation in early rheumatoid arthritis: high-resolution multi-pinhole SPECT versus MRI. *Diagn Interv Radiol* 2013; 19: 20-24.
74. Grassi W, Cervini C.  
Ultrasonography in rheumatology: an evolving technique. *Ann Rheum Dis* 1998; 57: 268-271.
75. Szkudlarek M, Court-Payen, Strandberg C, Klarund M, Klaussen T, Ostergaard M.  
Power Doppler ultrasonography for assessment of synovitis in the metacarpophalangeal joints of patients with rheumatoid arthritis: a comparison with dynamic magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2018-2023.
76. Mottonen T, Hannonen P, Korpela M, Nissila M, Kautiainen H, Ilonen J, 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 and Rheumatism* 2002; 46: 894-8.
77. Wiles NJ, Lunt M, Barrett EM, Bukhari M, Silman AJ, Symmons DP, et al.  
Reduced disability at five years with early treatment of inflammatory polyarthritis: results from a large observational cohort, using propensity models to adjust for disease severity. *Arthritis and Rheumatism* 2001; 44: 1033-42.
78. Schmidt WA, Ostendorf B.  
Bildgebung in der Rheumatologie. *Z Rheumatol* 2013; 72: 117-118.

79. Cronstein B.  
How does methotrexate suppress inflammation? *Clinical and Experimental Rheumatology* 2010; 28: S21-S23.
80. Morabito L, Montesinos MC, Schreiber DM, Balter L, Thompson LF, Resta R, et al.  
Methotrexate and sulfasalazine promote adenosine release by a mechanism that requires ecto-5'-nucleotidase-mediated conversion of adenine nucleotides. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 101: 295-300.
81. Montesinos MC, Takedachi M, Thompson LF, Wilder TF, Fernandez P, Cronstein BN.  
The antiinflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5'-nucleotidase: findings in a study of ecto-5'-nucleotidase gene-deficient mice. *Arthritis and Rheumatism* 2007; 56: 1440-5.
82. Capecchi PL, Camurri A, Pompella G, Mazzola A, Maccherini M, Diciolla F, et al.  
Upregulation of A2A adenosine receptor expression by TNF-alpha in PBMC of patients with CHF: a regulatory mechanism of inflammation. *Journal of Cardiac Failure* 2005; 11: 67-73.
83. Hamano R, Takahashi HK, Iwagaki H, Kanke T, Liu K, Yoshino T, et al.  
Stimulation of adenosine A2A receptor inhibits LPS-induced expression of intercellular adhesion molecule 1 and production of TNF-alpha in human peripheral blood mononuclear cells. *Shock* 2008; 29: 154-9.
84. Baraldi PG, Tabrizi MA, Gessi S, Borea PA. Adenosine receptor antagonists: translating medicinal chemistry and pharmacology into clinical utility. *Chemical Reviews* 2008; 108: 238-63.
85. El-Tayeb A, Iqbal J, Behrenswerth A, Romio M, Schneider M, Zimmermann H, et al.  
Nucleoside-5'-monophosphates as prodrugs of adenosine A2A receptor agonists activated by ecto-5'-nucleotidase. *Journal of Medicinal Chemistry* 2009; 52: 7669-77.
86. Koszalka P, Ozuyaman B, Huo Y, Zerneck A, Fogel U, Braun N, et al.  
Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circulation Research* 2004; 95: 814-21.

87. Reutershan J, Vollmer I, Stark S, Wagner R, Ngamsri KC, Eltzschig HK.  
Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs. *FASEB Journal* 2009; 23: 473-82.
  
88. Zernecke A, Bidzhekov K, Ozuyaman B, Fraemohs L, Liehn EA, Luscher-Firzlaff JM, et al.  
CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. *Circulation* 2006; 113: 2120-7.
  
89. Schutz W, Schrader J, Gerlach E. Different sites of adenosine formation in the heart. *American Journal of Physiology* 1981; 240: H963-H970.
  
90. Partlow KC, Chen J, Brant JA, Neubauer AM, Meyerrose TE, Creer MH, et al.  
<sup>19</sup>F magnetic resonance imaging for stem/progenitor cell tracking with multiple unique perfluorocarbon nanobeacons. *FASEB Journal* 2007; 21: 1647-54.
  
91. Keipert PE. Use of Oxygent, a perfluorochemical-based oxygen carrier, as an alternative to intraoperative blood transfusion. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology* 1995; 23: 381-94.
  
92. Krafft MP.  
Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 47: 209-28.
  
93. Spahn DR.  
Blood substitutes. Artificial oxygen carriers: perfluorocarbon emulsions. *Critical Care* 1999; 3: R93-R97
  
94. Giraudeau C, Flament J, Marty B, Boumezbeur F, Meriaux S, Robic C, et al.  
A new paradigm for high-sensitivity <sup>19</sup>F magnetic resonance imaging of perfluorooctylbromide. *Magnetic Resonance in Medicine* 2010; 63: 1119-24.

## Danksagung

Die Erstellung der vorliegenden Dissertation wäre nicht möglich gewesen, ohne die Unterstützung der vielen Personen, die mich während dieser Zeit begleitet haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor J. Schrader für die freundliche, engagierte Betreuung und die Überlassung des interessanten Themas, das mich noch immer begeistert. Professor D. Blondin danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats und für das der Arbeit entgegengebrachte Interesse.

Nicht genug danken kann ich Dr. rer. nat. Ulrich Flögel für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft während der Durchführung der Versuche sowie für die wertvollen, konstruktiven Diskussionen und Anregungen rund um diese Arbeit. Für seine engagierte, zielgerichtete Betreuung möchte ich mich an dieser Stelle noch einmal herzlich bedanken.

Dr. rer. nat. Christoph Jacoby danke ich sehr für die jederzeit gewährte Unterstützung, unter anderem bei den MR-Messungen und die Geduld bei elektronischen Problemen. Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Dr. med. Zhaoping Ding, Frau Jutta Ziemann und Frau Dr. rer. nat. Emde für die labortechnische Unterstützung.

Für die Durchführung der Herztransplantationen bei den Versuchstieren danke ich den Mitarbeitern des Nephrologischen Instituts des Universitätsklinikums Essen. Ebenfalls danke ich der Arbeitsgruppe von Peter van Lent, PhD für die histologischen Analysen beim Arthritismodell.

Einen ganz besonderen Dank auch an meinen Bruder Max für die fortwährende Unterstützung in allen Lebenslagen. Meinen Eltern, Maria-Magdalena und Hans-Heinrich Galbarz danke ich für die uneingeschränkte Förderung meiner Ausbildung sowie ihren liebevollen Rückhalt und ihren Ansporn während meiner Studienzeit in Düsseldorf. Sie haben in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt.

Vor allem danke ich Fabian, der mir während der Anfertigung meiner Dissertation unentwegt liebevoll zur Seite stand und mich stets ermutigt und motiviert hat. Ohne ihn wäre die Entstehung dieser Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Lisa Galbarz