

Aus der Poliklinik und dem Funktionsbereich für Rheumatologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Matthias Schneider

Evaluation eines humanen chondrosynovialen  
Explantationsmodells im Hinblick auf die Durchführbarkeit  
funktioneller Studien für Arthrose und rheumatoide Arthritis

Dissertation

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

vorgelegt von  
Victoria Warzynski  
2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stefan Vordenbäumen

Zweitgutachter: PD Dr. med. Sebastian Braun

# Widmung

Für meine geduldigen Lehrmeister

## Zusammenfassung

Bei der rheumatoiden Arthritis (RA) handelt es sich um die häufigste chronisch-entzündliche rheumatische Erkrankung, bei der Arthrose (*Osteoarthritis* = OA) um die häufigste degenerative Gelenkerkrankung [1]. Die RA ist eine systemische Erkrankung mit vornehmlichem Befall der Gelenke. Trotz in den letzten Jahren deutlich verbesserter Therapieoptionen kann bisher nicht bei allen Patienten eine dauerhafte Remission erreicht werden. Beide Krankheitsentitäten gehen mit einem hohen Grad an Einschränkung der Lebensqualität einher und verursachen durch Inanspruchnahme des Gesundheitswesens, Behinderung und Arbeitsunfähigkeit erhebliche sozioökonomische Kosten [2-6].

Um entsprechende Therapien zu entwickeln, müssen zunächst die genaue Pathogenese der RA und OA und die Mechanismen der Gelenkdestruktion aufgedeckt werden. Bislang stehen keine geeigneten humanen *ex vivo*-Modelle zur Verfügung, anhand derer die Pathogenese erforscht und ggf. neue Therapien erprobt werden können. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Exploration eines solchen Modells. Es wurden humanes Knorpel- und Synovialgewebe von Patienten mit RA und OA, die sich Hüft- bzw. Kniegelenkersatzoperationen unterzogen, kultiviert sowie mit für die Pathogenese der RA als relevantesten erachteten Entzündungsmediatoren TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  [7, 8] stimuliert. An diesen Proben wurden das Ausmaß der entzündlichen Aktivität anhand histologischer und immunhistochemischer Parameter sowie das Maß der Knorpeldegradation als Marker für die Gelenkdestruktion, wie sie im Rahmen der fortgeschrittenen RA wie auch OA auftritt, bestimmt.

Die Kultur konnte für bis zu 42 Tage aufrechterhalten werden. In gemischten linearen Modellen konnte gezeigt werden, dass die Kulturdauer einen unabhängigen Einflussfaktor für die Degeneration v.a. der Synovialis darstellte. So sanken mit zunehmender Kulturdauer der Synovialitis-Score nach Krenn (Krenn-Score) [9] ( $p=0,01$ ) sowie die Expression von CD55 ( $p=0,03$ ) als Marker für die synovialen Fibroblasten. In Bezug auf die entzündliche Aktivität nach Krenn-Score konnte kein Unterschied zwischen OA und RA festgestellt werden ( $p=0,07$ ). Die Knorpeldegradation gemessen am Proteoglycanverlust war weniger mit der Dauer der Kultur ( $p=0,98$ ) als mit der Stimulation (Monostimulation:  $p<0,01$ . Costimulation:  $p=0,03$ ) sowie der Co-Kultur mit Synovialis ( $p<0,01$ ) assoziiert.

In diesem Modell konnten Interaktionen zwischen Knorpel und Synovialis, wie sie auch *in vivo* stattfinden, analysiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die stimulierbaren entzündlichen Reaktionen der späten OA und RA vergleichbar sind. Knorpel erwies sich als stabiler gegenüber den Bedingungen der Kultur als Synovialis, sodass hier vor allem die Stimulation des Gewebes und die Co-Kultur mit Synovialis als Faktoren identifiziert werden konnten, die zu einer Degradation führen.

## Summary

Rheumatoid Arthritis (RA) is the most common chronic-inflammatory rheumatic disease, whereas Osteoarthritis (OA) is the most common degenerative joint disease [1]. RA is a systemic disease which primarily affects the joints. Despite significantly improved therapeutic options over the past years, not all patients achieve permanent remission. Both diseases compromise the quality of life and go along with high socioeconomic costs that arise from use of healthcare system, disability and inability to work [2-6].

In order to develop new therapeutic strategies, the exact pathogenesis of RA and OA and mechanisms of joint destruction have to be elucidated first. Currently no appropriate human *ex vivo*-models are available to investigate the pathogenesis and test new therapies. This study takes a close look on such a model. Human cartilage and synovial membrane from patients who underwent hip or knee replacement surgery was cultivated. An inflammatory reaction was induced by stimulation with the inflammatory mediators TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  regarded as the most relevant mediators in RA [7, 8]. The specimens were examined for inflammatory activity which was evaluated by histologic and immunohistochemic parameters. The degree of cartilage degradation as it takes place in advanced stages of both RA and OA was recorded as well.

Culture could be maintained for up to 42 days. Mixed linear models showed duration of the culture as an independent parameter for degeneration of particularly synovial tissue. With increasing duration of the culture, we could observe significant decreases in Krenn synovialitis-score [9] ( $p=0,01$ ) and CD55-expression ( $p=0,03$ ) as a marker for synovial fibroblasts. Regarding the inflammatory activity indicated by Krenn score, no difference could be observed between OA and RA ( $p=0,07$ ). Cartilage degradation measured by proteoglycane loss was rather associated with stimulation (monostimulation:  $p<0,01$ , costimulation:  $p=0,03$ ) and coculture with synovial tissue ( $p<0,01$ ) than with duration of the culture ( $p=0,98$ ).

In this model, we were able to observe interactions between cartilage and synovial tissue as they occur *in vivo*. It was demonstrated that the inflammatory reaction in late OA is comparable to that in RA. Cartilage seemed to be more robust towards the cultural environment than synovial tissue. Hence, mainly stimulation and coculture with synovial tissue contributed to its degradation.

## Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ACPA	Antikörper gegen zyklisch citrullinierte Peptide
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
BSG	Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CRP	C-reaktives Protein
DMARDs	Disease Modifying Antirheumatic Drugs
dpi	<i>dots per inch</i> (Dichte von Punkten pro Inch)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
g	Gramm
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL-1β	Interleukin-1β
JAK	Janus-Kinase
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drug
OA	<i>Osteoarthritis</i> (Arthrose)
PAD	Protein-Arginin-Deiminasen

#### IV

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
pg	Picogramm
PIER	<i>Proteolytic-Induced Epitope Retrieval</i> (proteolytisch induzierte Epitop-Wiederfindung)
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
ROI	<i>region of interest</i>
S/O	Safranin-O-Lichtgrün (Färbung)
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	I
Summary .....	II
Abkürzungsverzeichnis .....	III
1 Einleitung .....	1
1.1 Rheumatoide Arthritis .....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Symptomatik und Folgen .....	1
1.1.2.1 Klinische Symptome.....	1
1.1.2.2 Komorbiditäten und Folgen .....	2
1.1.2.3 Diagnostik und Klassifikationskriterien .....	3
1.1.3 Pathophysiologie .....	4
1.1.3.1 Entstehung und Risikofaktoren der Autoimmunität .....	4
1.1.3.2 Inflammation und Zerstörung gelenkbildender Strukturen .....	5
1.1.4 Therapie .....	7
1.1.5 Bisherige Forschung.....	9
1.2 Zielsetzung der Studie .....	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Labormaterial.....	13
2.2 Untersuchungsmaterial .....	16
2.2.1 Beschreibung des Untersuchungsmaterials .....	16
2.2.2 Entnahme und Aufbewahrung .....	17
2.3 Kultur.....	17
2.3.1 Schema .....	17
2.3.2 Anfertigung der Kulturen.....	18
2.3.2.1 Vorbereitung der Zellkulturplatte mit Agarose-Gel.....	18
2.3.2.2 Behandlung der Proben .....	19
2.3.3 Mediumwechsel.....	19
2.3.4 Ernte.....	19
2.4 Schneiden .....	20

2.5	Fixieren.....	20
2.5.1	Anfertigung der Fixierlösung .....	20
2.5.2	Protokoll .....	20
2.6	Histologie.....	21
2.6.1	HE-Färbung.....	21
2.6.1.1	Definition.....	21
2.6.1.2	Durchführung der Färbung .....	21
2.6.1.3	Entwässern .....	21
2.6.1.4	Eindecken .....	21
2.6.2	S/O-Färbung.....	21
2.6.2.1	Definition.....	21
2.6.2.2	Herstellung der Eisenhämatoxylin-Lösung nach Weigert.....	22
2.6.2.3	Herstellung der Lichtgrün-Lösung .....	22
2.6.2.4	Herstellung der Safranin-O-Lösung.....	22
2.6.2.5	Färbeprozess .....	22
2.6.3	Immunhistochemie.....	22
2.6.3.1	Definition.....	22
2.6.3.2	Ansetzen des Tris-Puffers .....	22
2.6.3.3	Ansetzen der Trypsin-Lösung .....	23
2.6.3.4	Vorbereitung der Objektträger.....	23
2.6.3.5	Ansetzen der Antikörper-Lösungen.....	24
2.6.3.6	Färbung mittels IHC-Kit.....	24
2.6.3.7	Eindecken .....	25
2.7	Auswertung.....	25
2.7.1	Mikroskopie .....	25
2.7.1.1	HE-Färbung .....	25
2.7.1.2	S/O-Färbung .....	26
2.7.2	Immunhistochemie mittels <i>ImageJ</i> .....	27
2.7.3	Statistische Auswertung .....	29
3	Ergebnisse .....	30

3.1	Übersicht .....	30
3.1.1	Gewebe nach Entität .....	30
3.1.2	Anzahl der Messungen pro Färbung .....	30
3.1.2.1	HE-Färbung .....	31
3.1.2.2	S/O-Färbung .....	32
3.1.2.3	CD55.....	33
3.1.2.4	CD68.....	34
3.1.3	Fehleranalyse .....	35
3.1.3.1	Übersicht Fehlerzahl pro Färbung .....	35
3.1.3.2	Gründe für die Nichtauswertbarkeit .....	35
3.1.3.3	Nicht auswertbare Proben HE .....	35
3.1.3.4	Nicht auswertbare Proben S/O .....	36
3.1.3.5	Nicht auswertbare Proben CD68.....	36
3.1.3.6	Nicht auswertbare Proben CD55.....	37
3.2	Korrelation zwischen den Ansätzen a und b .....	38
3.2.1	HE .....	38
3.2.1.1	<i>lining layer</i> .....	38
3.2.1.2	Infiltrate .....	39
3.2.1.3	Zelldichte .....	41
3.2.2	S/O-Färbung.....	43
3.2.3	CD68 .....	46
3.2.4	CD55 .....	47
3.3	Gemischte lineare Modelle .....	47
3.3.1	HE-Färbung.....	48
3.3.1.1	Krenn gesamt.....	48
3.3.1.2	<i>lining layer</i> .....	49
3.3.1.3	Infiltrate .....	50
3.3.1.4	Zelldichte .....	51
3.3.2	S/O .....	52
3.3.2.1	Univariate Analyse .....	52

3.3.2.2	MultivariableAnalyse .....	52
3.3.3	CD68 .....	53
3.3.3.1	Univariate Analyse .....	53
3.3.3.2	Multivariable Analyse .....	54
3.3.4	CD55 .....	54
3.3.4.1	Univariate Analyse .....	54
3.3.4.2	Multivariable Analyse .....	55
3.4	Interaktion von Knorpel und Synovialis .....	55
4	Diskussion .....	59
4.1	Etablierung eines einfachen, humanen chondrosynovialen Explantationsmodells .	59
4.1.1	Zusammenfassung Ergebnisse .....	59
4.1.2	Modell.....	59
4.1.2.1	Probengewinnung .....	59
4.1.2.2	Kultur .....	60
4.1.3	Färbungen und Auswertung.....	62
4.1.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	62
4.1.3.2	Safranin-O-Lichtgrün-Färbung.....	64
4.1.3.3	Immunhistochemische Färbungen .....	65
4.1.4	OA vs. RA.....	67
4.1.5	Knorpeldegradation .....	70
4.2	Anschließende Fragestellungen.....	72
4.3	Schlussfolgerungen .....	73
5	Literatur- und Quellenverzeichnis .....	75
6	Abbildungsverzeichnis.....	80
7	Tabellenverzeichnis.....	81
8	Danksagung .....	83
9	Eidesstattliche Versicherung .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Rheumatoide Arthritis

### 1.1.1 Epidemiologie

Die Prävalenz der rheumatoiden Arthritis (RA) liegt in der europäischen und nordamerikanischen Allgemeinbevölkerung zwischen 0,5-1% [10-12] und steigt mit zunehmendem Alter. Die Inzidenz wird mit 0,02-0,05% beziffert und hat ihren Höhepunkt in der 5. Lebensdekade [13]. Während die Inzidenz konstant bleibt, ist die Prävalenz über die letzten Jahre gestiegen. Dies lässt auf einen längeren Krankheitsverlauf und somit bei einer bislang nicht heilbaren Erkrankung auf ein längeres Überleben durch adäquatere Therapien schließen [14]. Etwa zwei Drittel der Betroffenen sind weiblich [10]. Zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen gibt es erhebliche Unterschiede in der Prävalenz der RA: So besteht bei indigenen Nordamerikanern eine Prävalenz von 5-8% [10, 12], wohingegen in China und Japan eine Prävalenz von nur 0,2-0,3% verzeichnet wird [12]. Abhängig vom Erkrankungszeitpunkt und der Krankheitsaktivität ist die Lebenserwartung von Betroffenen um drei bis zehn Jahre geringer als die der Allgemeinbevölkerung. Dabei sind die Todesursachen dieselben, diese treten nur um den genannten Zeitraum früher auf [13].

### 1.1.2 Symptomatik und Folgen

#### 1.1.2.1 Klinische Symptome

Die Symptomatik von RA-Patienten ist vielfältig und umfasst neben den nachstehenden Gelenkbeschwerden auch einige extraartikuläre Manifestationen. Es handelt sich bei der RA um eine symmetrische Polyarthritis, die häufig, aber nicht obligat zunächst die kleinen Gelenke betrifft und sich nach proximal ausbreitet [15, 16]. Die Betroffenen leiden häufig unter Schmerzen [2, 15], dem für sie relevantesten Symptom, das trotz inzwischen vieler guter Therapieoptionen chronifizieren kann [17]. Des Weiteren sind Schwellungen der Gelenke und (Morgen-) Steifigkeit häufig berichtete Symptome, die beide auf eine Entzündung wie die Synovialitis hindeuten [2, 15]. Die Gelenkschädigung kann bis zur völligen Destruktion des Gelenks führen, sodass charakteristische Befunde wie die Ulnardeviation oder Subluxationen [18, 19] der Finger auftreten und chirurgische Korrekturen [19] oder ein Gelenkersatz notwendig werden [2].

Neben diesen artikulären Beschwerden gibt es auch zahlreiche extraartikuläre Manifestationen der RA [2, 15, 16, 20]. Hierzu zählen exemplarisch Rheumaknoten, die subcutan, aber auch in verschiedenen Organen, beispielsweise der Lunge, auftreten können, Pleura- und Pericardergüsse, okuläre Symptome wie Keratokonjunktividen und

Episkleritiden, Vaskulitiden sowie eine Nierenbeteiligung [2, 15, 16, 20]. Begleitend tritt oft eine Anämie bei chronischer Erkrankung („*anemia of chronic disease*“) auf [2, 15]. Auch eine B-Symptomatik mit Gewichtsabnahme, Fatigue und leichtem Fieber kann auftreten [2]. Als „Maximalvariante“ der RA gilt das Felty-Syndrom mit Rheumafaktor-positiver RA, Splenomegalie und Leukopenie [2, 15].

#### 1.1.2.2 Komorbiditäten und Folgen

Die RA ist mit zahlreichen Komorbiditäten assoziiert. Aufgrund der Schmerzen und Funktionseinschränkungen des Bewegungsapparates bewegen sich viele Patienten weniger. Dies führt, gemeinsam mit einer vermehrten Osteoklastenaktivierung, zu einer verminderten Knochendichte bis hin zu Osteoporose, sodass die durch Schmerzen und muskuloskeletale Funktionseinschränkungen bedingten Stürze zu einer erhöhten Frakturrate führen [2, 3, 15, 16, 20, 21]. Auch durch die Therapie mit Glucocorticoiden kommt es zu einer Abnahme der Knochendichte [16]. Sowohl hierdurch als auch durch die atraumatische progressive Gelenkdestruktion im Krankheitsverlauf werden immer noch gelegentlich Operationen notwendig

RA-Patienten haben ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko, welches mit dem permanenten Zustand der Inflammation erklärt wird [2, 3, 15, 20, 22]. Ebenso besteht ein doppelt so hohes Thromboembolierisiko wie in der Allgemeinbevölkerung [23]; es existieren Fallberichte, in denen Lungenembolien bei Patienten auftraten, deren einziger diesbezüglicher Risikofaktor eine bestehende RA war [24].

Abgesehen von kardiovaskulären Komplikationen wird auch die hohe Prävalenz psychischer Erkrankungen wie Depressionen, Angststörungen und bipolarer Störungen neben dem chronischen Schmerz mit dem dauerhaften Entzündungszustand in Zusammenhang gebracht, da sich die psychischen Symptome nach Initiierung einer immunmodulatorischen Therapie, auch unabhängig von den physischen Symptomen, bessern [2, 15-17, 25-27] und bereits vor der Diagnose der RA die Rate an psychischen Erkrankungen erhöht ist [28]. RA-Patienten haben außerdem ein erhöhtes Risiko für viele Malignome, v.a. Lymphome und Lungenkarzinome [2, 15, 20]. Die RA im Allgemeinen, Komorbiditäten und das Alter der Betroffenen sind häufig mit dem Syndrom der *frailty* („Gebrechlichkeit“) assoziiert, bei dem es zur Abnahme von Kraft, Ausdauer und verschiedener physiologischer Funktionen kommt [21]. Folgen sind eine verringerte Selbstständigkeit der Betroffenen und ein erhöhtes Mortalitätsrisiko [21].

Neben den geschilderten Komorbiditäten und den dadurch entstehenden Beeinträchtigungen der Patienten verursacht die RA auch hohe sozioökonomische Kosten: Bis zu 35% der Patienten werden innerhalb von zehn Jahren nach Diagnosestellung arbeitsunfähig [2]. Etwa ein Drittel der RA-Patienten werden pro Jahr stationär behandelt und sind annähernd doppelt

so häufig in stationärer Behandlung wie die Allgemeinbevölkerung [3]. Vor allem Patienten, die von Fatigue oder Gelenksteifigkeit betroffen sind, nehmen häufiger Gesundheitsdienstleistungen in Anspruch und verursachen signifikant höhere Kosten im Gesundheitssystem [4].

### 1.1.2.3 Diagnostik und Klassifikationskriterien

Die Diagnose beruht im Wesentlichen auf der Anamnese und klinischen Untersuchung, die gemeinsam mit den Laborparametern Rheumafaktor, Antikörper gegen zyklisch citrullinierte Peptide (ACPA), C-reaktives Protein (CRP) und Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit (BSG) in Kombination mit den Klassifikationskriterien die Diagnosestellung ermöglichen. Bis zu 80% der RA-Patienten sind Rheumafaktor- oder ACPA-positiv [2]. In der folgenden Tabelle sind die 2010 vom *American College of Rheumatology* (ACR) und der *European League Against Rheumatism* (EULAR) etablierten Klassifikationskriterien der RA zusammengefasst.

**Tabelle 1.1 RA-Klassifikationskriterien**

Score	A: Gelenkbeteiligung	B: Serologie	C: Akute-Phase-Proteine	D: Symptombdauer
0	1 großes Gelenk	RF und ACPA negativ	CRP und BSG normal	< 6 Wochen
1	2-10 große Gelenke		CRP und BSG erhöht	≥ 6 Wochen
2	1-3 kleine Gelenke	RF und/ oder ACPA schwach positiv		
3	4-10 kleine Gelenke	RF und/ oder ACPA stark positiv		
5	> 10 Gelenke (min. 1 kleines)			

**Tab. 1.1: RA-Klassifikationskriterien (ACR und EULAR).** Für jeden Teilscore können bis zu 5 Punkte erreicht werden, die zum Gesamtscore addiert werden.

Angewandt werden sollen die Kriterien auf Patienten mit mindestens einem Gelenk, bei dem eine bestätigte Synovialitis vorliegt, die nicht plausibler durch eine andere Erkrankung erklärt werden kann. Es werden Punkte in den Kategorien Gelenkbeteiligung, Serologie, Akute-Phase-Proteine und Symptombdauer vergeben, deren höchste Werte addiert werden. Maximal können so zehn Punkte erreicht werden; ab sechs Punkten gilt eine RA als wahrscheinlich. Die möglichst frühzeitige Diagnosestellung umfasst auch bildgebende Verfahren wie die Sonographie und Magnetresonanztomographie (MRT) zur Darstellung von Synovialitis und

Knochenmarködem. Ebenso kommt auch der konventionellen Radiologie eine wichtige Rolle zu, vor allem zur Erfassung knöcherner Veränderungen in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien [18].

### 1.1.3 Pathophysiologie

#### 1.1.3.1 Entstehung und Risikofaktoren der Autoimmunität

Die Pathophysiologie der RA ist bis heute nicht vollständig verstanden. Vermutet wird eine multifaktorielle Genese, bei der letztlich Entzündungsmediatoren und direkte Interaktionen der gelenkbildenden Strukturen zur Gelenkdestruktion führen. Vor allem genetische Faktoren sind als Risikofaktoren für die Entstehung der RA bekannt und etabliert [10, 13, 29, 30]. Zu beachten ist die unterschiedliche Verbreitung von Risiko-Allelen wie z. B. dem „*shared epitope*“ in verschiedenen ethnischen Gruppen [31]. Einige HLA-DR-Allele (*Human Leukocyte Antigen* vom DR-Isotyp) codieren für sog. „*shared epitopes*“, bestimmte Aminosäuresequenzen, die mit einem erhöhten Risiko, an RA zu erkranken und mit einem schwereren Verlauf assoziiert sind [32]. „*Shared epitopes*“ binden verstärkt citrullinierte (statt der physiologischen argininhaltigen) Peptide, die v.a. bei Entzündungsreaktionen gebildet werden, und präsentieren diese somit effektiver T-Zellen [10, 33], was in der Folge über die Produktion von Zytokinen (v. a. TNF $\alpha$  und IL-1) zur Antikörperproduktion führt. Von aktuellem Interesse ist das Konzept der „*preclinical RA*“: Hierbei scheinen zirkulierende Autoantikörper, vor allem ACPAs, ohne klinische Symptome einer seropositiven RA mehrere Jahre im Voraus zu bestehen [10, 29, 34] und ggf. bereits zunächst asymptomatische Erosionen an den Knochen zu verursachen [35, 36]. Diese Erkenntnis bietet interessante Ansätze zur Identifikation und frühzeitigen Therapie der Betroffenen. Hierüber könnten außerdem der Ansatz der genetischen Komponente sowie der der bereits vor Krankheitsbeginn zirkulierenden Autoantikörper (ACPA) zusammengebracht werden, da das Vorhandensein von „*shared epitopes*“ in einigen Studien v.a. mit ACPA-positiver RA in Verbindung gebracht wird [10, 37]. Genetische Faktoren tragen zu einem Teil der Entstehung v.a. der seropositiven, weniger der seronegativen, RA bei [10, 38, 39]. Vor allem bei der seropositiven RA ist die erstgradige Verwandtschaft mit einem Betroffenen der größte Risikofaktor, selbst an RA zu erkranken. Dahingegen scheinen epigenetische Veränderungen wie der Methylierungsstatus in bestimmten Regionen des Genoms vor allem mit der Krankheitsaktivität in Zusammenhang zu stehen [10]. Ebenfalls Teil eines umfassenden Konzepts zur Pathogenese der RA könnte die Entstehung der Autoimmunität an Schleimhäuten sein, wie es beispielsweise auch bei anderen rheumatischen Erkrankungen wie rheumatischem Fieber und reaktiver Arthritis der Fall ist [34, 40]. Die bis zu zweifach erhöhte RA-Prävalenz bei Rauchern [10, 34, 40-42] kann ebenso durch eine höhere Rate an Citrullinierung von Peptiden durch den Entzündungsreiz an den pulmonalen Schleimhäuten bedingt sein [41] [43]. Neben dem Rauchen werden in verschiedenen Studien weitere Ernährungs-, Umwelt- und Lifestylefaktoren teilweise inkonsistent mit einem erhöhten

oder verringerten Risiko, an RA zu erkranken, in Verbindung gebracht [2, 10, 12, 13, 20, 41, 44, 45].

#### 1.1.3.2 Inflammation und Zerstörung gelenkbildender Strukturen

Durch verschiedene Typen von T-Zellen und Makrophagen entsteht ein permanent proinflammatorischer Zustand [46-48]. Die beteiligten Zellen beeinflussen sich gegenseitig, gehen von einer potentiell protektiven in eine proinflammatorische Funktion über und tragen auf diese Weise zur Aufrechterhaltung des proinflammatorischen Zustands bei [47, 49]. Makrophagen können T-Zellen rekrutieren und ihre Differenzierung hin zu proinflammatorischen Akteuren initiieren [50]. Diese aktivierten T-Zellen wiederum sorgen für eine gesteigerte Zytokinproduktion durch die Makrophagen [51]. Wie genau diese Prozesse schlussendlich zur Gelenkzerstörung führen, ist gegenwärtig noch Gegenstand der Forschung. Diskutiert werden zwei verschiedene Ausgangspunkte der Gelenkschädigung, welche als *inside-out*- und *outside-in-Hypothese* [36, 52, 53] bezeichnet werden, wobei beide sich nicht gegenseitig ausschließen [52]. Die „traditionelle“ *outside-in-Hypothese* geht davon aus, dass die Autoimmunität im Gelenk primär an der Synovialis beginnt. Hierdurch entsteht eine Synovialitis, welche im Folgenden den Gelenkknorpel und den Knochen schädigt, beispielsweise durch eine Aktivierung von Osteoklasten durch die Synovialitis [52] oder direkte Invasion von Synoviozyten in Gelenkknorpel und Knochen, die außerdem katabole Kaskaden triggern [36]. Die *inside-out-Hypothese* hingegen besagt, dass die Gelenkdestruktion vom Knochen ausgeht und sich von dort in die Gelenkhöhle ausbreitet und Knorpel und Synovialis schädigt. Weiterhin werden Knorpel und (periartikuläres) Fettgewebe [36, 52] als mögliche Orte der frühen RA in Betracht gezogen. Fettgewebe wird zum einen von Entzündungszellen infiltriert und produziert zum anderen selbst zahlreiche potentielle Entzündungsmediatoren [36, 52].

Zum Verständnis der entzündlichen Veränderungen sind profunde Kenntnisse des normalen Aufbaus der Synovialis vonnöten. Die Synovialis besteht aus einer abgrenzbaren Zellschicht, der Intima oder dem *lining layer* sowie dem Stroma oder *sublining*. Zwischen diesen ist im Gegensatz zu Epithelien keine Basalmembran ausgebildet [54]. Das *lining layer* besteht physiologischerweise aus 1-2 Zellschichten [9, 54]. Das normale Stroma selbst ist relativ zellarm mit wenigen Blut- und Lymphgefäßen, Fibroblasten sowie je nach Ursprung Fettzellen und Fasern [54]. Entzündliche Zellen sind nur in geringem Ausmaß und entzündliche Infiltrate sind gar nicht vorhanden [9, 54]. Vorherrschende Zelltypen sind Fibroblasten und Makrophagen, die sowohl im Stroma als auch im *lining layer* vorkommen. Synoviale Fibroblasten exprimieren CD55 als Oberflächenantigen, wodurch sie von Makrophagen unterschieden werden können, die v.a. CD68 exprimieren [54]. Die Funktion der Synovialis liegt zum einen darin, eine Verschiebeschicht für den dreidimensionalen Gelenkknorpel zu bilden, zum anderen in der Bereitstellung von Synovia zur Ernährung des Gelenkknorpels

sowie um eine Schmierschicht zu bilden [54]. Ausgehend von diesen Eigenschaften der Synovialis lassen sich die Veränderungen bei einer Synovialitis charakterisieren. Strukturiert anhand eines semiquantitativen Scores wurden diese Veränderungen von *Krenn et al.* 2006 erfasst [9]. Auf diesen wird in Kapitel 2.7.1 näher eingegangen. Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass v.a. die Zellularität bei entzündlichen Veränderungen zunimmt. Das ein- bis zweischichtige *lining layer* kann über fünf Schichten umfassen und verschiedene Zellarten enthalten [9]. Im Stroma finden sich vermehrt Zellen, die im Falle von Lymphozyten auch Follikel formen können [9].

Die Voraussetzungen für die letztliche Manifestation der RA in einem Gelenk, nach einer möglichen asymptomatischen Phase im Sinne einer präklinischen RA, sind unabhängig vom genauen Ausgangsgewebe ungeklärt. Diskutiert werden Mikrotraumen. Belegt ist, dass Gewebsschäden einen permanenten Entzündungsreiz darstellen, sodass beispielsweise ein Knorpelschaden eine Synovialitis auslösen kann [36]. Entzündlich veränderte Synovialis wiederum hat ein hohes Potential zur Invasion [52, 54-57] und sezerniert verschiedene Entzündungsmediatoren, allen voran TNF- $\alpha$  und IL-1, welche zur Knorpel- und Knochendegradation führen, indem sie Chondrozyten stimulieren, Metallo-Proteinasen zu sezernieren [7, 8, 36] sowie zur Differenzierung von Osteoklasten beitragen [55]. *Sun et al.* konnten in einer Arbeit zeigen, dass präexistente ACPAs Synoviozyten nur dann zu einer gesteigerten Migration anregen können, wenn diese durch Schäden oder Stress, beispielsweise im Sinne einer Minderernährung, dazu angeregt werden, Protein-Arginin-Deiminasen (PAD) zu exprimieren und somit Proteine zu citrullinieren [58]. Bei der RA kommt es nicht nur zu einer lokalisierten Knochenschädigung in den betroffenen Gelenken, sondern zu einer generalisierten Osteopenie und Osteoporose [59], was auf einen direkten Effekt der Inflammation auf den gesamten Knochenstoffwechsel schließen lässt. Es konnte gezeigt werden, dass ACPAs und Rheumafaktor gemeinsam die Produktion von TNF- $\alpha$  stimulieren; eines der potentesten Zytokine in Bezug auf die Aktivierung der Osteoklastogenese [35, 46, 60, 61]. Selbst bei gesunden, ACPA-positiven Probanden konnte eine geringere Knochendichte im Vergleich mit ACPA-Negativen sowie eine veränderte Zytokinexpression festgestellt werden [35, 62]. Dies könnte damit erklärt werden, dass Osteoklasten die bisher einzigen bekannten Zellen sind, die citrullinierte Oberflächenantigene auch in einem nicht-inflammatorischen Zustand exprimieren [63]. An diese binden evtl. vorhandene ACPA, was zur Freisetzung von IL-8 und somit zu Knochenläsionen führt.

In SPECT-Untersuchungen von RA-Patienten konnte eine reaktive Zunahme der Osteoblastenaktivität, dargestellt durch eine erhöhte Technetium-Dicarboxypropandiphosphonat (Tc-99mDPD)-Aufnahme, an fokalen Erosionen vornehmlich bei Patienten mit schwerer Synovialitis detektiert werden [53]. Dies könnte für die *outside-in-Hypothese* sprechen oder aber ein Zeichen der gegenseitigen Beeinflussung von Knochen

und Synovialis sein. *Jimenez-Boj et al.* fanden in ihrer Studie [55] einen Ersatz von fettreichem Knochenmark durch B-Zell-reiche Aggregate in Bereichen von durchbrochener Kortikalis und Kontakt des Knochenmarks mit Synovialis. Dies wird mit einer Invasion der Synovialis erklärt. Ebenso könnte es sich allerdings um das histologische Korrelat eines in der Magnetresonanztomographie sichtbaren Knochenmarködems handeln. Dieses kann bereits in der Frühphase der RA, auch ohne relevante Synovialitis, auftreten und besitzt prognostische Bedeutung, da es mit einem rapiden Verlauf assoziiert ist [36, 64-70]. An genau den Lokalisationen im Gelenk, an denen bereits früh ein Knochenmarködem sichtbar ist, entwickeln sich im Krankheitsverlauf Erosionen [65, 67]. Auf der anderen Seite sind Knochenmarködeme unter Therapie, z. B. mit TNF- $\alpha$ -Hemmern, rückläufig [36]. Diese Erkenntnisse sprechen für eine Komponente der RA, die sich aus dem Knochen(mark) heraus entwickelt und ein Indiz für eine Beteiligung der *inside-out-Hypothese* darstellt. Ebenfalls für diese Hypothese spricht, dass sich bei einer Arthritis genau die Knochenkanälchen erweitern, die mit der Synovialis kommunizieren [52]. Im B-Zell-reichen Infiltrat des Knochenmarködems finden sich außerdem Makrophagen, T-Zellen, Osteoklasten und Plasmazellen, was dem Bild einer Osteitis entspricht [36]. Diese differenzierten Zellen könnten die Synovialis gemeinsam mit mesenchymalen Zellen des Knochenmarks sowohl durch die erwähnten erweiterten Knochenkanälchen oder aber hämatogen erreichen und infiltrieren und so eine Synovialitis verursachen [36, 52]. Auf der anderen Seite könnten möglicherweise auch Mediatoren aus der Synovialis wie z. B. Matrix-Metallo-Proteinase aus den Synoviozyten eine Erweiterung der Knochenkanälchen verursachen und so zu von der Synovialis ausgehenden Erosionen führen.

Viele Aspekte der Pathogenese sind noch unzureichend erforscht, wie z.B. der genaue Entstehungsmechanismus der Autoimmunität, welche Faktoren eine „asymptomatische“ Autoimmunität wie bei der präklinischen RA bewirken und warum diese letztlich symptomatisch im Sinne einer Gelenkdestruktion werden kann. Daran schließt sich die Frage an, wie ein generalisiertes autoimmunes Syndrom zu einem Befall vornehmlich der Gelenke führen kann. Des Weiteren müssten die genauen Mechanismen, wie die Gelenkschädigung bei der RA vorstättengeht, erforscht werden. Dabei könnte sich beispielsweise herausstellen, dass die *inside-out-* und die *outside-in-Hypothese* sich nicht gegenüberstehen, sondern sich vielmehr gegenseitig ergänzen und beide Faktoren vonnöten sind, um solch tiefgreifende Störungen der Gelenkarchitektur hervorzurufen. Diese Arbeit hat zum Ziel, den Aspekt der histologischen Veränderungen in einer proinflammatorischen Umgebung näher zu beleuchten und so zu einem besseren Verständnis der Mechanismen der Gelenkdestruktion beizutragen.

#### 1.1.4 Therapie

Die Therapie der RA sollte so früh wie möglich beginnen, um eine komplette Remission zu erreichen und Folgeschäden zu vermeiden [2, 72, 73]. Sie umfasst medikamentöse Maßnahmen genauso wie die Anpassung des Lebensstils, Bewegung und

physiotherapeutische Maßnahmen wie auch psychologische Unterstützung. Außerdem sind bei fortgeschrittener Gelenkdestruktion ggf. chirurgische Maßnahmen wie Korrekturen und Gelenkersatz vonnöten [2, 17, 19].

Die pharmakologische Therapie beinhaltet v. a. sogenannte *Disease Modifying Antirheumatic Drugs* (DMARDs) [2, 16, 20]. Hierbei handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Pharmaka, für die eine Verlangsamung der Progression bzw. Übergang zur Remission für die RA nachgewiesen ist. Man unterscheidet zwischen csDMARDs (*conventional synthetic*), tsDMARDs (*targeted synthetic*) und bDMARDs (Biologika). Dahingegen sollten *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs* (NSAIDs) und Glucocorticoide aufgrund der bekannten Nebenwirkungen sowie der Tatsache, dass sie den Langzeit-Krankheitsverlauf nicht beeinflussen, nur kurzfristig eingesetzt werden [2, 20, 73, 74].

Bei den csDMARDs handelt es sich um antiproliferative Substanzen wie Methotrexat, Sulfasalazin oder Leflunomid [2, 20], wobei dem Methotrexat als Antimetabolit eine herausragende Rolle zukommt [73]. Dieses sollte in der Initialtherapie in Kombination mit einem Glucocorticoid eingesetzt werden, welches nach einigen Wochen in der Dosis reduziert und nach drei bis sechs Monaten ausgeschlichen werden sollte [73, 74]. Unter dieser Therapie kommt es zu einer Remissionsrate von 73,6% nach 16 Wochen, die nach einem Jahr noch 60,2% beträgt [73, 75].

Als tsDMARDs werden synthetische Moleküle bezeichnet, die sich gegen bestimmte Strukturen richten. Hier sind v.a. Inhibitoren der Janus-Kinase (JAK) wie beispielsweise Tofacitinib oder Baricitinib zu nennen. Diese Substanzen hemmen die intrazelluläre Signaltransduktion via JAK, welche von verschiedenen Zytokinen genutzt wird [76, 77]. Somit werden die vermehrte Transkription von Genen für Zytokine sowie die Reifung und Aktivierung von Leukocyten und die damit verbundene Entzündungsreaktion bzw. Aufrechterhaltung derselben gehemmt [77, 78].

Bei den Biologika handelt es sich im Kontext der Therapie der RA v.a. um monoklonale Antikörper, beispielsweise gegen TNF- $\alpha$  (Adalimumab), das von verschiedenen Immunzellen exprimiert wird oder den Interleukin-6-Rezeptor (Tocilizumab), der v.a. von B-Zellen und Plasmazellen exprimiert wird [77]. An B-Zellen greift auch Rituximab, ein Antikörper gegen CD20, an [77]. Eine weitere relevante Substanz ist Abatacept, ein Fusionsprotein, das die Aktivierung von T-Zellen durch die Bindung an CD80/86 an antigenpräsentierenden Zellen verhindert. All diese Substanzen hemmen somit über ihre jeweiligen Zielstrukturen bestimmte Signalwege und tragen so zu einer gezielten Unterbrechung der proinflammatorischen Reaktionen bei. Das Ansprechen auf die Substanzen ist von Patient zu Patient unterschiedlich. Einige Patienten zeigen ein schlechtes Ansprechen auf Biologika [79]. Zur Therapieoptimierung wäre es von Vorteil, Biologika *in vitro* testen zu können oder Biomarker

zu identifizieren, anhand derer eine Vorhersage für das Ansprechen möglich ist. Für Abatacept konnte in mehreren Studien ein verbessertes Ansprechen von ACPA-positiven im Vergleich zu ACPA-negativen Patienten nachgewiesen werden [79-82]. Ein solcher Zusammenhang konnte für andere Substanzen, beispielsweise für TNF $\alpha$ -Hemmer, bisher nicht nachgewiesen werden [82].

Verschiedene Faktoren sind mit einer hohen Remissionswahrscheinlichkeit assoziiert. Hierzu gehören eine kurze Krankheitsdauer, männliches Geschlecht, Nichtraucher, junge Patienten, geringe Krankheitsaktivität und fehlende serologische Marker [2]. In der Schwangerschaft kommt es physiologischerweise aufgrund der gewissen Immuntoleranz zu einer Besserung [2]. Hingegen mit einer schlechten Prognose assoziiert sind beispielsweise eine hohe Anzahl betroffener Gelenke, Nichtansprechen auf die initiale csDMARD-Therapie oder hohes CRP [73].

Trotz aller Fortschritte, insbesondere durch die Einführung von Biologika, bleibt festzuhalten, dass eine Heilung der Erkrankung bisher nicht möglich ist und alle bislang verfügbaren Therapieoptionen aufgrund der nicht RA-spezifischen Wirkung auf das Immunsystem mit Nebenwirkungen verbunden sind. Daher ist eine weitergehende Erforschung der Pathophysiologie der RA notwendig, um gezieltere und wirksamere Therapien entwickeln zu können.

#### 1.1.5 Bisherige Forschung

Zur Erforschung der RA kamen in der Vergangenheit verschiedene Modelle zum Einsatz, darunter Tiermodelle, hauptsächlich in Nagern wie Mäusen und Ratten, als auch Zellkulturen sowie Kulturen von Geweben. Aufgrund der Unterschiede zwischen der humanen Immunantwort und der von Nagern ist die Übertragbarkeit von *in vivo*-Tiermodellen auf den Menschen nicht notwendigerweise gewährleistet [83]. Diesbezüglich ergibt sich ein Vorteil humaner Modelle, auch wenn es sich hierbei um *ex vivo*-Modelle handelt. Auch gibt es ethische Vorbehalte gegen die Verwendung von *in vivo*-Tiermodellen, weshalb deren Anwendung auf ein absolut notwendiges Maß beschränkt werden sollte, zumal wenn, wie in diesem Beispiel, humanspezifische Besonderheiten der Immunreaktion untersucht werden sollen. Auch die Verwendung humanen Materials zur *ex vivo*-Forschung unterliegt strengen Voraussetzungen, allerdings sind die ethischen Bedenken zur Verwendung eines ansonsten verworfenen Operationsmaterials, wie in der vorliegenden Studie, und natürlich mit Einverständnis der Patienten, gering.

In Zellkulturen hauptsächlich synovialer, weniger chondraler Zellen, kann beispielsweise die Expression verschiedener Oberflächenantigene oder die Zytokinproduktion durch diese Zellen mittels Verfahren wie ELISA untersucht werden. Exemplarisch sei hier die Arbeit von *Noack et al.* [84] genannt, in der eine Zellkultur aktivierter peripherer Monozyten mit RA-Synoviozyten

angelegt wurde. Es wurde der Effekt verschiedener Dosen Methotrexat allein oder in Kombination mit verschiedenen Biologika, wie sie auch für die Therapie der *RA in vivo* eingesetzt werden, auf die Zytokinproduktion, die mittels ELISA gemessen wurde, untersucht. Hierbei zeigte sich, dass eine der niedrigsten untersuchten Dosen am effektivsten die Zytokinproduktion reduzierte. Dies geschah jedoch nicht in dem Maße wie durch die verschiedenen untersuchten Biologika. Deren Effektivität konnte durch die Kombination mit Methotrexat nicht signifikant gesteigert werden.

Untersuchungen von verschiedenen Geweben wurden bisher häufig isoliert betrachtet, indem nur Knorpel- oder Synovialisgewebe untersucht wurde, was jedoch nicht die Interaktionen der beiden Gewebetypen [85] berücksichtigt. Ein Knorpelmodell zur Durchführung verschiedener Untersuchungen wurde in der Studie von *Thudium et al.* [86] beschrieben. *Broeren et al.* [87] präsentierten 2019 ein Modell, in dem aus Synovialisbiopsien von RA-Patienten isolierte synoviale Zellen eine Matrix besiedeln. In dieser Form formieren sich die Zellen ähnlich dem Synovialisgewebe *in vivo*, indem beispielsweise das typische *lining layer* ausgebildet wird. Dieses Synovialis-Modell wurde verschiedenen Entzündungsmediatoren ausgesetzt und es konnte gezeigt werden, dass pathophysiologische Reaktionen wie bei der RA auftreten, so z.B. die Zunahme von Zellschichten im *lining layer* oder die gesteigerte Synthese proinflammatorischer Zytokine. Das Ziel der Studie lautete, ein Modell zu entwickeln, das sowohl die Zellkomposition als auch die Zell-Matrix-Interaktion der Synovialis abbildet. Die nativen synovialen Biopsien sollten nicht verwendet werden, da eine Hyperplasie der Synovialis bei den RA-Patienten bereits stattgefunden haben könnte und somit nicht mehr der Beginn derselben untersucht werden könnte. Außerdem wurde angeführt, dass sich Biopsien desselben Gelenks deutlich unterscheiden können in Bezug auf die Anzahl von Zellschichten des *lining layer* sowie die Komposition und Verteilung synovialer Zellen im *sublining*. Allerdings sind gerade diese Inhomogenitäten typisch für das Gewebe *in vivo*. Zusammenfassend konnte hier also eine *de novo*-Ausbildung eines *lining layer* sowie dessen Hyperplasie durch Stimulation gezeigt werden. Ähnlich hierzu wurden in der Arbeitsgruppe von *Peck et al.* [88] porcine Chondrozyten isoliert und in eine Matrix eingebettet. Diese wurden co-kultiviert mit synovialen Fibroblasten einer Sarkom-Zelllinie und mittels Lipopolysaccharid aktivierten Makrophagen. Durch diese Zellkomposition wurde die Genexpression für Entzündungsmediatoren hoch- und die chondrale Genexpression für Matrixkomponenten (Typ-II-Kollagen, Aggrecan) herunterreguliert. Die Veränderungen führten zu einem Matrixverlust und gesteigerten Apoptoseraten der Chondrozyten. Interessanterweise konnten die genannten, RA-ähnlichen Veränderungen des Knorpels durch die Substitution von Celecoxib regeneriert werden. Aufgrund des Aufbaus des Modells konnten die pathophysiologischen Veränderungen der Synovialis im Entzündungszustand nicht untersucht werden.

Co-Kulturen intakten Gewebes wurden bisher entweder als Kulturen von Knorpelscheiben mit synovialen Fibroblasten oder, im Falle von Kulturen von Knorpel- und Synovialisgewebe, in tierischen oder hybriden Modellen untersucht. Beispielfhaft genannt seien hier die Arbeiten von *Pretzel* [85] und *Schultz* [89]. Pretzel kultivierte bovine Knorpelscheiben mit isolierten, humanen synovialen Fibroblasten unter Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder der Kombination beider Zytokine. Es zeigte sich, dass die stimulierten Synoviozyten die Kollagensynthese des Knorpels unterdrückten und die unter Zytokineinfluss durch die Chondrozyten selbst initiierte Knorpeldegradation förderten. Unter Stimulation war die Aktivität gewebedegradierender Enzyme wie Matrix-Metallo-Proteinasen und proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-8 sowohl in Chondrocyten als auch in synovialen Fibroblasten erhöht. Die Aktivität gewebedegradierender Enzyme war in der Co-Kultur deutlich höher als in der Knorpel-Monokultur, was auf die oben erwähnten Wechselwirkungen der beiden Gewebetypen im Rahmen der Pathophysiologie der RA hindeutet. Auch in diesem Modell wurden lediglich synoviale Fibroblasten betrachtet, welche allerdings möglicherweise nicht die einzigen beteiligten Zellen vonseiten der Synovialis sind. Außerdem gelten auch für diese Arbeit die genannten Einschränkungen der Übertragbarkeit von tierischen bzw. Hybridmodellen auf den Menschen. Diese Limitierung hat die Arbeitsgruppe um *Schultz et al.* [89] bereits 1996 erkannt. Es wurde die fehlende Möglichkeit, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen zu studieren, hervorgehoben. Außerdem war schon damals bekannt, dass isolierte Zellen in Kultur strukturelle Veränderungen sowie Veränderungen der Genexpression erfahren, was eine Erforschung der Eigenschaften eines bestimmten Zelltyps *in vivo* verkompliziert. Deshalb stellte die Arbeitsgruppe in der genannten Studie unter anderem eine Co-Kultur von intaktem Knorpel- und Synovialisgewebe her. Beide Komponenten wurden gemeinsam in eine Matrix eingebettet und mit einem Nährmedium versorgt, sodass eine bis zu zehnwöchige Kultur untersucht wurde. Nach etwa vier Wochen konnte eine Invasion von Zellen der Synovialis in den Knorpel beobachtet werden, die bei RA-Synovialis signifikant häufiger war als bei Arthrose (*Osteoarthritis* = OA). Es gibt zwei wesentliche Limitationen der Studie. Zum einen wurden die Kulturen lediglich mit einem Nährmedium versorgt und nicht mittels Entzündungsmediatoren stimuliert, wodurch die inflammatorische Komponente der RA unter Umständen nicht genügend berücksichtigt wurde. Zum anderen wurde der Knorpel zum Teil im Rahmen von gelenkchirurgischen Eingriffen entnommen, zum Teil handelte es sich um Knorpel des Nasenseptums und es kam auch boviner Knorpel zum Einsatz. Obwohl die Autoren betonen, dass es keine Unterschiede bezüglich der Knorpelentität gab, bleibt festzuhalten, dass eine Übertragbarkeit auf die Situation *in vivo* unter diesen Umständen fraglich ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es eines Modells bedarf, in dem eine Arthritis *in vitro* induziert werden kann und in dem die beteiligten Kompartimente Knorpel und

Synovialis in ihrer Interaktion unter Stimulation untersucht werden können. An einem solchen Modell wäre auch die Untersuchung neuer Therapeutika vorstellbar.

## 1.2 Zielsetzung der Studie

Ziel der Studie ist es, ein humanes *ex vivo*-Modell zu etablieren, das eine experimentelle Arthritis mit den beteiligten Kompartimenten Knorpel und Synovialis simuliert. Dieses soll dem Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Knorpel und Synovialis im Gewebeverband, wie er auch *in vivo* vorliegt, dienen. Konkret werden Unterschiede und Gemeinsamkeiten der entzündlichen Reaktion bei den Entitäten OA und RA unter fakultativer Stimulation untersucht. Hierzu dienen histologische Parameter wie die Zellkomposition der Synovialis, Interaktionen zwischen Knorpel und Synovialis, die immunhistochemische Identifikation und Quantifizierung bestimmter Zelltypen sowie die Bestimmung des Proteoglycangehalts des Knorpels als Maß der Degradation desselben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Labormaterial

Nachfolgend findet sich tabellarisch aufgelistet das verwendete Material, unterteilt in Geräte, Chemikalien, Antikörper und Verbrauchsmaterial sowie alphabetisch sortiert.

**Tabelle 2.1: Geräte**

Beschreibung	Bezeichnung	Firma
Abzug	Airflow-Control	Vinitex, Sint Oedenrode, NL
Bildverarbeitungssoftware	ImageJ	
Kamera	Nikon DS Vi 1	Nikon, Düsseldorf
Kryostat	Leica CM 3000	Leica Biosystems, Nussloch
Magnetrührer	Heidolph MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach
Mikroskop	Axioskop 2 plus	Carl Zeiss, Jena
Mikroskopiersoftware	NIS-Elements F	Nikon, Düsseldorf
pH-Meter	Hanna pH 211	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen
Pipetten	Eppendorf Reference 2	Eppendorf AG, Hamburg
Statistiksoftware	R Version 3.5.0 (The R Foundation for Statistical Computing)	
Trockenschrank		Heraeus Holding GmbH, Hanau
Vortexmischer		VWR International bvba, Leuven, B
Waage		Sartorius AG, Göttingen

**Tab. 2.1: Aufgelistet sind die verwendeten Gerätschaften inkl. Hersteller.**

**Tabelle 2.2: Chemikalien**

Stoff	Firma
Agarose-Tabletten 0,5g Agarose/ Tablette	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

<i>Antibody Diluent with background reducing components</i>	Dako, Glostrup, DK
<i>Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse</i>	Dako, Glostrup, DK
Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose, GlutaMAX™ Supplement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Eisessig	
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol 70%	
Ethanol 80%	
Ethanol 96%	
Ethanol 99,5%	
<i>Fetal Bovine Serum, Heat Inactivated</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Hämalaun Mayer	Merck KGaA, Darmstadt
Hämatoxylinlösung A nach Weigert (alkoholische Hämatoxylinlösung 1 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hämatoxylinlösung B nach Weigert (saure Eisen(III)-chlorid-Lösung)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<i>Ham's F-12 Nutrient Mixture</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
<i>Hematoxylin</i>	Dako, Glostrup, DK
Insulin, Transferrin and Selenium 500X (ITS)	Lonza Group AG, Basel, CH
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
KP Cryocompound-Einbettmedium	Klinipath BV, Duiven, NL
Lichtgrün SF für die Mikroskopie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid-Lösung 5M	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PBS 10X pH 7,4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
<i>Recombinant Human IL-1β</i>	PeptoTech, Rocky Hill, NJ USA
<i>Recombinant Human TNF-α</i>	PeptoTech, Rocky Hill, NJ USA
Roti®-Histokitt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Roti®-Histol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Safranin O für die Mikroskopie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure 1M	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure 2M	Merck KGaA, Darmstadt
Trizma® base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizma® hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin From Porcine Pancreas	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
VectaMount AQ Mounting Medium	Vector Laboratories Burlingame, CA, USA

Tab. 2.2: In der Tabelle sind die verwendeten Chemikalien mit Herstellern aufgelistet.

Tabelle 2.3: Antikörper

Spezifität	Firma
Mouse Anti-Human CD55-UNLB	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
Negative Control Mouse IgG1	Dako, Glostrup, DK
Monoclonal Mouse Anti-Human CD68 (Concentrate) Clone EBM11	Dako, Glostrup, DK

Tab. 2.3: Aufgeführt sind die verwendeten Antikörper.

Tabelle 2.4: Verbrauchsmaterial

Beschreibung	Bezeichnung	Firma
Deckgläschen	Deckgläser 24 x 60 mm	
Einmal-Biopsiestanze		pfm medical ag, Köln
Eppendorf-Tube, 1,5 ml	Eppendorf Safe Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf-Tube, 2 ml	Eppendorf Safe Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon-Tube, 25 ml	Cellstar® Tubes	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, A
Falcon-Tube, 50 ml	Cellstar® Tubes	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, A
Korkplättchen	Korkplättchen D = 20mm, Stärke = 2mm	Brämswig GmbH, Dinklage
Metalldöschen	<i>Aluminium cryo tubes + caps, 15 ml, 29mmx 30mm</i>	Sanbio B.V. Uden, NL
Objektträger	SuperFrost® plus	VWR International bvba, Leuven, B

Pipettenspitzen	TipOne® Pipettenspitzen	Starlab International GmbH, Hamburg
Steriles Einmal-Skalpell	Feather Disposable Scalpel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Wachsstift	Super Pap Pen	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, USA
Zellkulturplatte	Cellstar® Cell Culture Multiwell Plate, 48 Well	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, A

Tab. 2.4: In der Tabelle ist das verwendete Verbrauchsmaterial aufgelistet.

## 2.2 Untersuchungsmaterial

### 2.2.1 Beschreibung des Untersuchungsmaterials

Untersucht wurden Synovialis- und Knorpelfragmente von Patienten, die aufgrund einer Arthrose (*Osteoarthritis* = OA) oder einer rheumatoiden Arthritis (RA) eine Hüft- bzw. Knie-Totalendoprothese im Rheinischen Rheumazentrum am St. Elisabeth-Hospital in Meerbusch-Lank erhielten. Alle Patienten unterschrieben im Rahmen des Aufklärungsgesprächs eine von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigte Einverständniserklärung zur Verwendung des Gewebes im Rahmen von rheumatologischen Studien (Ethikvotum Nummer 4944 vom 27.02.2015 zur Erforschung proinflammatorischer Stoffe in Knorpel und Synovialis). In Tabelle 2.2.5 wird das Patientenkollektiv näher beschrieben.

Tabelle 2.5: Patientenkollektiv

Entität	Anzahl	Geschlecht		Alter in Jahren		Gelenk	
		M	W	Median	Spannweite	Hüfte	Knie
RA	9	1	8	69	53-82	4	5
OA	10	4	6	76	56-81	3	7
Ges.	19	5	14	71	53-82	7	12

Tabelle 2.5: Angegeben sind die Anzahl der Proben aufgeschlüsselt nach Entität (RA bzw. OA) sowie Alter, Geschlecht (M: männlich; W: weiblich) und betroffenem Gelenk

Es wurden Proben von 19 Patienten untersucht. Neun Proben stammten von Patienten mit RA, zehn von OA-Patienten. In der RA-Gruppe war das weibliche Geschlecht mit 8:1 überrepräsentiert im Vergleich zur OA-Gruppe mit einem nahezu ausgeglichenen Geschlechterverhältnis (6:4). Dies deckt sich mit Erkenntnissen aus der bestehenden Literatur [90, 91]. Das Alter zum Zeitpunkt des Gelenkersatzes lag bei der RA mit durchschnittlich 65,3

Jahren niedriger als bei der OA mit 72,5 Jahren. Bei beiden Entitäten lag die Anzahl der Proben für das Kniegelenk höher als die für das Hüftgelenk.

Die Klassifikation erfolgte nach den ACR/ EULAR Klassifikationskriterien für RA aus dem Jahre 2010 [72] sowie den ACR Klassifikationskriterien für Hüft- bzw. Kniearthrose aus den Jahren 1991 und 1986 [92, 93]. Die Patienten wurden unabhängig von ihrer medikamentösen Therapie eingeschlossen. Als Material für Positivkontrollen für die immunhistochemischen Untersuchungen stand nach der Entnahme schockgefrorenes Synovialisgewebe ebenfalls aus dem Rheinischen Rheumazentrum zur Verfügung. An diesem war in früheren Untersuchungen eine Positivität für CD55 bzw. CD68 nachgewiesen worden.

### 2.2.2 Entnahme und Aufbewahrung

Intraoperativ wurden Proben von makroskopisch geeignet erscheinenden Knorpel- und Synovialisbereichen entnommen. Diese wurden noch im OP-Saal in ein Medium bestehend aus einer 1:1-Mischung von *Dulbecco's Modified Eagle Medium* und *Ham's F-12 Nutrient Mixture* überführt. Nach dem unverzüglichen Transport in unser Labor wurden die Proben noch am gleichen Tag weiterverarbeitet.

## 2.3 Kultur

### 2.3.1 Schema

Es wurden zunächst Co-Kulturen, d.h. Kulturen, die Knorpel und Synovialis enthielten, für je 7, 15, 28 und 42 Tage angelegt und wahlweise nur ernährt ohne Stimulation oder mit TNF $\alpha$  in der Dosierung 10 pg/ml bzw. mit TNF $\alpha$  10 pg/ml und gleichzeitig IL-1 $\beta$  in einer Dosierung von 5 pg/ml stimuliert. Nach Analyse einiger nach diesem Schema angelegten Proben zeigte sich, dass es zweckmäßiger ist, das Gewebe nur nach Tag 28 und 42 zu ernten, da zu den früheren Zeitpunkten noch keine signifikanten Veränderungen der Gewebe zu beobachten waren. Des Weiteren wurden, wenn genügend Gewebe vorhanden war, Proben von Tag 0 ausgewertet. Um die Chance auf die Ernte auswertbaren Gewebes zu erhöhen, wurden in den Co-Kulturen Doppelansätze angelegt. Außerdem wurden Mono-Kulturen angefertigt, in denen nur Knorpel oder nur Synovialis kultiviert wurde. Die Tabelle 2.6 veranschaulicht die Ansätze, wobei die Zahlen die Anzahl der so angelegten Kulturen für jedes Gewebe widerspiegeln. Die Angabe im Feld Monokultur an Tag 28 unter TNF-Stimulation bedeutet, dass dieser Ansatz zunächst nicht angelegt wurde. Im Zuge der Auswertung stellte sich allerdings heraus, dass es für den vorliegenden Versuch relevant ist, eine Knorpel-Monokultur nur mit TNF zu stimulieren, sodass diese nachträglich angesetzt wurde, wenn vom entsprechenden Gewebe noch tiefgefrorenes Material vorlag. Insgesamt waren dies fünf Gewebe mit zwei Doppel- und drei einzelnen Ansätzen.

Tabelle 2.6: Schema Kultur

Tag	Mono-/ Co-Kultur	Ohne Stimulation (n)	TNF $\alpha$ (n)	TNF $\alpha$ + IL-1 $\beta$ (n)
28	Co	2	2	2
42	Co	2	2	2
28	Mono	1	0-2	1

Tab. 2.6: In dieser Tabelle ist das Schema für die Kultur angegeben. n = Anzahl der Ansätze. Co-Kulturen wurden an Tag 28 und 42 ohne Stimulation, mit Mono- und Costimulation in möglichst zwei Ansätzen angelegt. Monokulturen wurden zunächst mit je einem Ansatz ohne Stimulation und mit Costimulation angelegt. Für die Knorpel-Monokultur wurden schließlich noch nach Möglichkeit bis zu zwei Ansätze mit TNF $\alpha$ -Stimulation angelegt,

Das Medium für die Kultur bestand aus den in der folgenden Tabelle aufgeführten Inhaltsstoffen.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung Kulturmedium

Stoff	Menge in ml
Dulbecco's Modified Eagle Medium	225
<i>Ham's F-12 Nutrient Mixture</i>	225
<i>Fetal Bovine Serum, Heat Inactivated</i>	50
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	5
Insulin, Transferrin and Selenium 500X (ITS)	0,5

Tab. 2.7: In der linken Spalte sind die angegebenen Inhaltsstoffe, in der rechten deren Menge in ml für das Kulturmedium aufgeführt

### 2.3.2 Anfertigung der Kulturen

#### 2.3.2.1 Vorbereitung der Zellkulturplatte mit Agarose-Gel

Zunächst wurde die Agarose-Matrix gegossen. Dafür wurden zwei Agarose-Tabletten à 0,5 g Agarose in einer Lösung aus 25 ml PBS 1X und 25 ml einer Lösung aus einer 1:1-Mischung von Dulbecco's Modified Eagle Medium und *Ham's F-12 Nutrient Mixture* aufgelöst. Der Flüssigkeitsspiegel wurde am Gefäß markiert und die Lösung fünf Mal aufgeköcht. Anschließend wurde bis zur Markierung mit *Aqua dest.* aufgefüllt, um das beim Kochen verdampfte Wasser zu ersetzen. Von der hergestellten Agarose-Lösung wurden je 450  $\mu$ l in die Wells einer 48-Well-Zellkulturplatte pipettiert. In die noch flüssige Lösung wurden Platzhalter zentral eingebracht und das Gel 10 Minuten aushärten gelassen. Anschließend wurden die Platzhalter entfernt und die Zellkulturplatte bis zur weiteren Verwendung bei 37°C im Brutschrank gelagert. Zur Visualisierung des Vorgehens s. Abb. 1.

### 2.3.2.2 Behandlung der Proben

Mittels einer Einmal-Biopsiestanze wurden 3 mm große Knorpelstanzen gefertigt. Die Synovialis wurde mit einem sterilen Skalpell in ca. 3 mm große Stücke geschnitten. Anschließend wurde die vorbereitete Zellkulturplatte aus dem Brutschrank entnommen und in je vorbereitetes Well zunächst eine Knorpelstanze und darauf ein Synovialis-Exzidat eingefüllt. Das Gewebe wurde hiernach mit jeweils 500 µl des in Tabelle 2.7 beschriebenen Co-Kulturmediums bzw. mit dem Medium und Zusatz von TNF $\alpha$  oder TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  bedeckt.

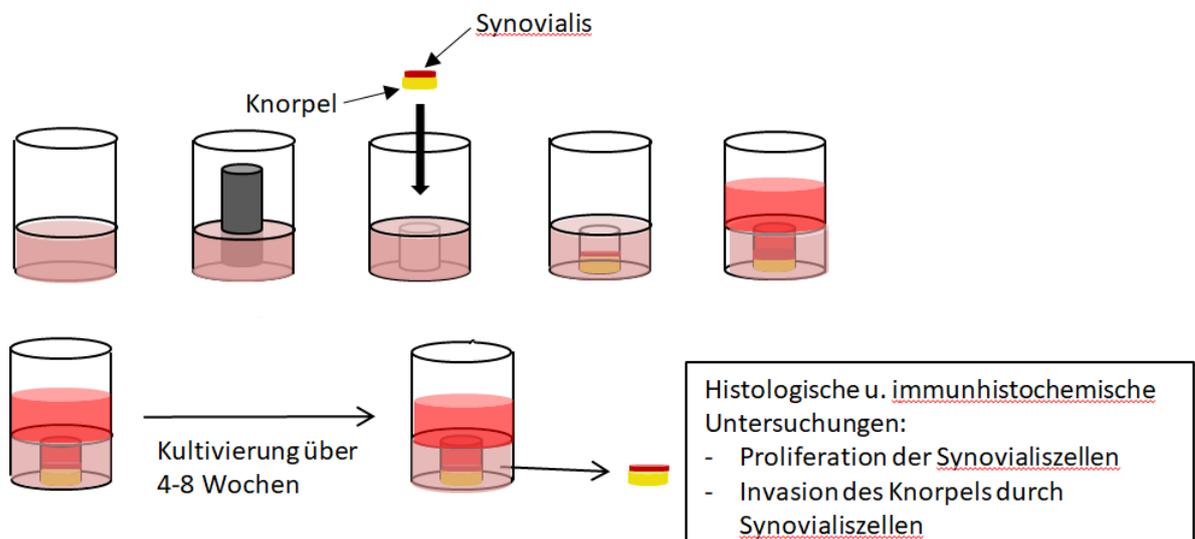
### 2.3.3 Mediumwechsel

Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt, wobei jeweils 250 µl entnommen wurden und genauso viel ersetzt wurde. Dieses Vorgehen hatte sich bewährt, da bei Entnahme des kompletten Volumens häufig die Synovialis- und Knorpelfragmente voneinander getrennt wurden und dies so vermieden werden konnte.

### 2.3.4 Ernte

Nach der vorgesehenen Zeit wurde das Gewebe geerntet. Dafür wurde es *en bloc* mit dem umgebenden Gel aus der Vertiefung der Zellkulturplatte gelöst und anschließend vorsichtig mit einem Skalpell das Gel vom Gewebe gelöst. Es wurden Korkplättchen mittig mit einer kleinen Menge Einbettmedium beschickt. Darauf wurde das Gewebe gebettet und zwar bei der Co-Kultur so, dass beim späteren Schneiden sowohl Knorpel als auch Synovialis gleichzeitig angeschnitten werden und die Kontaktfläche der beiden Gewebetypen beurteilt werden konnte. Falls das Gewebe nicht vollständig vom Einbettmedium umgeben war, wurde ein weiterer Tropfen hinzugefügt. Danach wurde das Plättchen mit dem Gewebe in 2-methylbutan bei -160°C schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung in Metalldöschen bei -80°C gelagert. In Abbildung 1 ist das Prinzip der Kultur visuell dargestellt.

**Abbildung 1: Schema Kultur**



**Abb. 1: Aushärten des Gels mit einem Platzhalter in der Mitte des Wells. Knorpel und Synovialis werden übereinander in der entstehenden Aussparung platziert. Nährmedium ± Entzündungsmediatoren wird hinzugefügt und alle 48 Stunden gewechselt. Nach 28 bzw. 42 Tagen erfolgt die Ernte des Gewebes *en bloc*.**

## 2.4 Schneiden

Zum Anfertigen der Kryoschnitte wurde das Gewebe zunächst für mindestens zwei Stunden im Kryostaten auf eine Temperatur von  $-25^{\circ}\text{C}$  gebracht. Anschließend wurde das Korkplättchen mit dem darin eingebetteten Gewebe mittels Einbettmedium auf einen Halter aufgebracht, welcher im Kryostaten an der dafür vorgesehenen Vorrichtung fixiert wurde. Nun wurden  $12\ \mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und je drei Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen. Nach Möglichkeit wurden jeweils fünf Objektträger à drei Schnitten eines Ansatzes angefertigt.

## 2.5 Fixieren

### 2.5.1 Anfertigung der Fixierlösung

Zum Fixieren des Gewebes wurde eine dreiprozentige Paraformaldehydlösung angesetzt. Dafür wurden  $7,5\ \text{g}$  Paraformaldehyd unter dem Abzug in  $200\ \text{ml}$  auf  $60^{\circ}\text{C}$  erhitztem destilliertem Wasser aufgelöst und dieses unter ständigem Rühren tropfenweise mit 5-molarer Natriumhydroxidlösung versetzt, bis die Lösung klar wurde. Dann wurden  $25\ \text{ml}$  PBS 10X hinzugefügt und anschließend der pH-Wert mit Salzsäure auf  $7,0$  eingestellt. Nach Erreichen des gewünschten pH-Wertes wurde die Lösung mit *Aqua dest.* auf  $250\ \text{ml}$  aufgefüllt. Die PFA-Lösung ist mehrfach verwendbar und wurde eine Woche lang dunkel bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.5.2 Protokoll

Um das Gewebe auf dem Objektträger zu fixieren, wurden die Objektträger nach dem Schneiden zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurden sie unter dem Abzug für 15 Minuten in die oben beschriebene Fixierlösung getaucht. Hiernach schloss sich eine zehnmütige Behandlung mit 1X PBS an. Die Lösung wurde durch eine Verdünnung von  $100\ \text{ml}$  der 10X-Stammlösung mit  $900\ \text{ml}$  *Aqua dest.* hergestellt. Die Objektträger wurden schließlich in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, wofür sie für je zwei Minuten in 70-, 80- und 95-prozentigen Alkohol getaucht wurden. Nun wurden die Präparate an der Luft getrocknet. Auf diese Weise fixiert, wurden die Objektträger bis zur weiteren Verarbeitung bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.6 Histologie

### 2.6.1 HE-Färbung

#### 2.6.1.1 Definition

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Standardfärbung, die Zellkerne blau und übrige Strukturen rosa bis rötlich mit unterschiedlicher Intensität anfärbt.

#### 2.6.1.2 Durchführung der Färbung

Vor Durchführung der Färbung wurden die Objektträger in einer Küvette mit *Aqua dest.* rehydriert. In der Zeit wurde die Hämalaunlösung nach Mayer filtriert. Anschließend wurden die Objektträger in einen Halter gestellt, in welchem sie nacheinander in die Färbelösungen überführt werden konnten. Zunächst erfolgte eine vierminütige Färbung mit der filtrierten sauren Hämalaunlösung. Nach einer kurzen Spülung mit *Aqua dest.* wurden die Objektträger für 15 Minuten in fließendem, warmem Leitungswasser gebläut. Es folgte eine zweiminütige Spülung mit *Aqua dest.* Danach wurden die Objektträger drei Minuten lang in wässriger Eosin-G-Lösung inkubiert, welche je 100 ml mit einem Tropfen Eisessig versetzt wurde, um durch den Abbruch des alkalischen Bläuens die Gegenfärbung zu erleichtern [94]. Nun wurden die Objektträger kurz mit Leitungswasser abgespült und anschließend unter dem Abzug über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert.

#### 2.6.1.3 Entwässern

Dabei wurde jede Alkoholkonzentration zwei Mal hintereinander in zwei verschiedenen Behältern verwendet, um die entsprechende Konzentration definitiv zu erreichen und nicht mit der vorhergehenden Lösung zu verdünnen. Die Objektträger wurden für ca. zehn Sekunden in 70-prozentigen Alkohol getaucht, anschließend eine Minute lang in 80-prozentigen und drei Minuten in 99,5-prozentigen Alkohol.

#### 2.6.1.4 Eindecken

Als Intermedium vor dem Eindecken wurde *Roti®-Histol* benutzt, in welches die Objektträger einmalig für zwei Minuten getaucht wurden. Nach dem Trocknen wurden einige Tropfen *Roti®-Histokitt*-Einbettmedium auf die Objektträger aufgebracht, Deckgläschen aufgelegt und mit einer 200- $\mu$ l-Pipettenspitze ausgestrichen, um überflüssiges Einbettmedium sowie Lufteinschlüsse zu entfernen. Die fertigen Objektträger wurden an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.6.2 S/O-Färbung

#### 2.6.2.1 Definition

Mit der Safranin-O-Lichtgrün-Färbung (S/O-Färbung) kann der Proteoglycangehalt von Knorpelgewebe visualisiert werden. Proteoglycane werden orangerot angefärbt. Gewebe, das

keine Proteoglycane enthält, erscheint weiß bis türkis. Die Zellkerne werden mit Hämatoxylin braun bis schwarz angefärbt.

#### 2.6.2.2 Herstellung der Eisenhämatoxylin-Lösung nach Weigert

Die Hämatoxylinlösung A nach Weigert, eine einprozentige alkoholische Hämatoxylinlösung und die Lösung B, eine saure Eisen(III)-chlorid-Lösung, wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Die fertige Lösung ist eine Woche haltbar und wurde dunkel gelagert.

#### 2.6.2.3 Herstellung der Lichtgrün-Lösung

Es wurde eine 0,02-prozentige Lichtgrün-Lösung verwandt. Dafür wurden mit einer Feinwaage 0,02 g Lichtgrün-Pulver abgewogen und in 100 ml *Aqua dest.* gelöst.

#### 2.6.2.4 Herstellung der Safranin-O-Lösung

Zur Herstellung der 0,1-prozentigen Safranin-O-Lösung wurden 0,1 g Safranin O in 100 ml *Aqua dest.* gelöst.

#### 2.6.2.5 Färbeprozess

Zunächst wurden die Objektträger mit *Aqua dest.* rehydriert. Währenddessen wurden die Lösungen wie oben beschrieben hergestellt. Als erstes erfolgte eine Färbung der Zellkerne durch fünfminütige Färbung der Objektträger mit Eisenhämatoxylin nach Weigert. Um diese Färbung haltbar zu machen, erfolgte nach dem Abspülen mit destilliertem Wasser eine Spülung mit fließendem, warmem Leitungswasser über 15 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger für fünf Minuten mit der Lichtgrün-Lösung gefärbt. Um diesen Färbeprozess zu beenden, erfolgte ein zehnssekündiges Bad in einprozentiger Essigsäure. Die Anfärbung der Proteoglycane erfolgte durch Inkubation mit der Safranin-O-Lösung für zehn Minuten. Daran schlossen sich die Entwässerung und das Eindecken analog zur HE-Färbung in Kapitel 2.6.1.3 und 2.6.1.4 an.

### 2.6.3 Immunhistochemie

#### 2.6.3.1 Definition

Die immunhistochemische Anfärbung diente der Darstellung der Expression und Verteilung der Oberflächenantigene CD55 und CD68, wobei CD55 von synovialen Fibroblasten [54, 95-97] und CD68 von Makrophagen [54, 96-98] exprimiert wird und deren Unterscheidung dient [54]. Die Antigene werden, je nach Testkit, mit einer bestimmten Farbe, hier rötlich, sichtbar gemacht. Die Zellkerne werden, analog zur HE-Färbung, mit Hämatoxylin bläulich gegengefärbt.

#### 2.6.3.2 Ansetzen des Tris-Puffers

Zur Herstellung des Spülpuffers wurden 6 g *Trizma® hydrochloride*, 1 g *Trizma® base* und 9 g Natriumchlorid mit 1 Liter *Aqua dest.* angesetzt. Als Detergens wurde pro Liter Lösung 1 ml

*TWEEN*® 20 unter ständigem Rühren hinzugefügt. Anschließend wurde der pH des Puffers mittels Hinzufügen von 1- bzw. 2-molarer Salzsäure oder 5-molarer Natriumhydroxid-Lösung auf einen Wert zwischen 7,4 und 7,6 eingestellt, wobei ein Wert von 7,5 angestrebt wurde.

#### 2.6.3.3 Ansetzen der Trypsin-Lösung

Da durch die Fixierung Proteine vernetzt werden können, welche in dieser Form nicht als Epitope durch die Antikörper erkannt werden, müssen diese Proteinvernetzungen aufgelöst werden [99]. Dies geschah in der vorliegenden Arbeit mithilfe der *PIER* genannten Technik, bei der proteolytische Enzyme die Proteinvernetzungen lösen sowie die Gewebeporosität steigern [99]. Es wurde ein 0,1-prozentiger Trypsin-Puffer verwendet. Für diesen wurden 0,16 g Trypsin und 0,16 g Kaliumchlorid mit 160 ml des o.g. Tris-Puffers angesetzt. Vor Verwendung wurde die Lösung auf 37°C erhitzt, um das Temperaturoptimum für Trypsin zu erreichen.

#### 2.6.3.4 Vorbereitung der Objektträger

Die Objektträger wurden beschriftet, wobei immer nach dem gleichen Schema vorgegangen wurde, um Verwechslungen im Verlauf auszuschließen. Es wurde je ein Objektträger für die Analyse der Expression von CD68 sowie einer für CD55 verwendet. Die oberen beiden Schnitte wurden mit dem entsprechenden Antikörper (CD55 oder CD68) inkubiert, der dritte Schnitt diente als Negativkontrolle zur Überprüfung einer unspezifischen Anfärbung. Im Falle von CD55 wurde als Negativkontrolle ein monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen ein Enzym, das von Säugern nicht exprimiert wird, eingesetzt, im Falle von CD68 ein Tropfen des Verdünnungsmediums *Antibody Diluent with background reducing components*, um die Reaktion auf beide Substanzen zu überprüfen. Als primärer Antikörper wurden gegen CD55 bzw. CD68 gerichtete murine Antikörper verwendet. Bei dem sekundären Antikörper handelte es sich um Immunglobuline aus der Ziege gegen Maus und Kaninchen. Diese banden an den primären murinen Antikörper. Mittels der Negativkontrolle Mouse-IgG1 sollte ausgeschlossen werden, dass der sekundäre Antikörper unspezifisch an das Gewebe bindet, da die Kontrolle normalerweise keine Bindungen mit humanem Gewebe eingeht. Die Negativkontrolle mit dem Verdünnungsmedium sollte ausschließen, dass dieses Bindungsstellen für den sekundären Antikörper enthält, sodass jede Probe positiv wäre, da alle Antikörper mit dem Medium verdünnt wurden. Mit einem Wachsstift wurde um jeden Schnitt ein geschlossener Wachsring gezogen, um ein Verlaufen der verwendeten Lösungen mit einer Vermischung der Proben oder Negativkontrolle zu vermeiden. Die Objektträger wurden für zwei Minuten im Tris-Puffer rehydriert. Anschließend folgte eine zehnmütige Proteolyse mit der auf eine Temperatur von 37°C gebrachten Trypsin-Lösung. Um die Proteolyse zu beenden, wurden die Objektträger vier mal zwei Minuten mit dem Spülpuffer gewaschen, welcher nach jedem Waschschrift verworfen wurde.

### 2.6.3.5 Ansetzen der Antikörper-Lösungen

Die kommerziell erhältlichen Antikörper-Lösungen wurden verdünnt, um eine unspezifische Anfärbung zu vermeiden. Die folgende Tabelle zeigt die Konzentrationen der Ursprungslösungen und die Verdünnungen.

**Tabelle 2.8: Verdünnungstabelle Antikörper**

	Konzentration Stammlösung	Verdünnungsverhältnis	Konzentration Gebrauchslösung	Menge Antikörper/ 500 µl Gebrauchslösung
CD68	237 mg/l	1:400	0,593 ng/µl	1,25 µl
CD55	0,1 µg/µl	1:300	0,333 ng/µl	1,7 µl
IgG1	100 ng/µl	1:170	0,588 ng/µl	2,94 µl

**Tab. 2.8:** In der Tabelle sind die Verdünnungen der jeweiligen Antikörper mit der resultierenden Konzentration der Gebrauchslösung und der Menge an Antikörper pro 500 µl Gebrauchslösung angegeben.

Zur Verdünnung wurde die *Antibody Diluent*-Lösung aus dem Kit verwendet. Diese wurde als erstes in ein beschriftetes Eppendorf-Röhrchen der entsprechenden Größe pipettiert. Anschließend wurde die Antikörper-Stammlösung hineinpipettiert und durch wiederholte Aspiration mit der Pipette beides vermischt sowie die gesamte Antikörper-Stammlösung aus der Pipettenspitze ausgewaschen. Vor der Verwendung wurden die Lösungen noch einmal mit dem Vortexmischer vermischt, um eine gleichmäßige Antikörperkonzentration zu gewährleisten.

### 2.6.3.6 Färbung mittels IHC-Kit

In vorbereiteten Feuchtkammern wurden die abgetropften Objektträger ausgelegt. Zur Reduktion unspezifischer Bindungen erfolgte eine Inkubation der Schnitte mit *Antibody diluent with background reducing components*. Nach 30-minütiger Einwirkzeit wurde dieses nur abgeklopft und pro Schnitt etwa 50 µl Antikörper und Negativkontrollen mittels Pipetten und entsprechenden Pipettenspitzen aufgebracht, bis der ganze Schnitt benetzt war. Nach Beendigung der Inkubationszeit von einer Stunde erfolgte eine Spülung mit dem Tris-Puffer, wobei zunächst nur die oberen beiden, also die Antikörper-benetzten Schnitte in ein mit dem Puffer gefülltes 50-ml-Tube getaucht wurden, um eine Kontamination der Negativkontrollen mit den Antikörpern zu vermeiden. Danach folgte eine dreimalige, je zweiminütige Spülung, wobei der Spülpuffer nach jedem Waschschrift verworfen wurde. Die überschüssige Flüssigkeit wurde abgeklopft und die Objektträger erneut in die Feuchtkammern überführt. Es schloss sich eine 15-minütige Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Antikörper aus dem Kit an (*Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)*; biotinylierte Ziege-Anti-Maus- und Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobuline). Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde *Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase (HRP)* (an Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin) aufgetropft. Der Überschuss wurde nach 15 Minuten ebenfalls nach dem o.g. Schema abgewaschen und anschließend die Schnitte mit jeweils etwa 50 µl

Chromogen, welches durch die Meerrettichperoxidase am Streptavidin umgesetzt wird, für 10-15 Minuten inkubiert, bis makroskopisch eine Rotfärbung sichtbar war. Daran schloss sich ein zweimaliges Spülen mit Tris-Puffer sowie kurzes Abspülen mit *Aqua dest.* an, bevor eine zweiminütige Inkubation mit Hämatoxylin zur Darstellung der Zellkerne erfolgte. Zum Bläuen im alkalischen Milieu wurden die Küvetten mit den Objektträgern unter fließendes, warmes Leitungswasser gestellt.

#### 2.6.3.7 Eindecken

Um einem Austrocknen der Schnitte und einer hierdurch möglichen Beeinflussung der Färbung vorzubeugen, wurden nur je 3 Objektträger zugleich hochkant zum Abtropfen hingestellt. Nach dem Abtropfen wurde überschüssige Flüssigkeit um die Schnitte herum vorsichtig mit einem weichen Papiertuch abgetupft. Pro Objektträger wurden etwa 5 Tropfen Eindeckmedium (VectaMount) aufgebracht, ein Deckgläschen aufgelegt und mittels einer 200- $\mu$ l-Pipettenspitze ausgestrichen, um überschüssiges Eindeckmedium zu entfernen und das Deckgläschen zu fixieren. Die so eingedeckten Präparate wurden bis zum Trocknen waagrecht gelagert, um ein Auslaufen des Eindeckmediums zu verhindern. Bis zur mikroskopischen Auswertung erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur.

## 2.7 Auswertung

### 2.7.1 Mikroskopie

Zur Auswertung wurden die Schnitte bei 100- bis 200-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop begutachtet. Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurden bei einer 200-fachen Vergrößerung Fotos angefertigt und im TIF-Format mit einer Auflösung von 1600 x 1200 Pixeln bei 96 dpi gespeichert. Pro Gewebe wurden möglichst zwei bis drei Aufnahmen inklusive Negativkontrollen (*mouse-IgG1*) zum Abgleich angefertigt.

#### 2.7.1.1 HE-Färbung

Die Auswertung der mittels der Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbten Schnitte hatte zum Ziel, den semiquantitativen Synovialitis-Score nach Krenn zu bestimmen [9] und so das Ausmaß der entzündlichen Aktivität in der Synovialis zu quantifizieren und vergleichbar zu machen. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde der Krenn-Score immer durch denselben Untersucher erhoben.

Berücksichtigt werden im Krenn-Score die Anzahl der Zellschichten im synovialen *lining layer*, also der Deckzellschicht, das Ausmaß der entzündlichen Infiltrate im Gewebe sowie die Zellkomposition im synovialen Stroma. Diese Kriterien werden unabhängig voneinander in einem vierstufigen Score von 0 bis 3 erhoben und zu einem Gesamtscore addiert, wobei Werte zwischen 0 und 9 möglich sind. Ein höherer Wert ist mit einem höheren Grad an entzündlicher

Aktivität verbunden. Die nachfolgende Tabelle veranschaulicht die Zusammensetzung des Scores.

**Tabelle 2.9: Krenn-Score**

<b>Score</b>	<b><i>lining layer</i> (Anzahl der Zellschichten)</b>	<b>Entzündliche Infiltration</b>	<b>Zellreichtum im Stroma</b>
0	1	keine	normal
1	2-3	leicht	leicht erhöht
2	4-5	moderat	moderat erhöht
3	≥6	stark	stark erhöht

**Tab. 2.9: Dargestellt ist der von Krenn beschriebene Synovialitis-Score [9]. In drei Kategorien können 0-3 Punkte vergeben werden, sodass der Gesamt-Score 0-9 Punkte betragen kann.**

Zu beachten ist, dass in einigen Fällen nur Teilscores erhoben werden konnten, da z.B. kein *lining layer* abgrenzbar war. Für Auswertungen, denen der Gesamtscore zugrunde lag, konnten diese Proben nicht berücksichtigt werden. Wenn nur ein Teilscore für bestimmte Auswertungen erforderlich war, wurden auch Gewebe, an denen der jeweilige Teilscore bestimmt werden konnte, eingeschlossen.

#### 2.7.1.2 S/O-Färbung

Zur Beurteilung des Proteoglycangehalts des mittels S/O-Färbung angefärbten Knorpels wurde ein vierstufiger Score zugrunde gelegt, wobei 0 bedeutete, dass keine Proteoglycane nachweisbar waren. 1 bedeutete einen niedrigen Proteoglycangehalt, 2 einen moderaten und 3 einen hohen Proteoglycangehalt nahezu ohne Proteoglycanverlust. Abb. 2 veranschaulicht den Score. Zehn Präparate konnten nicht ausgewertet werden, da der Ansatz nur Synovialis enthielt.

Abbildung 2: S/O-Score

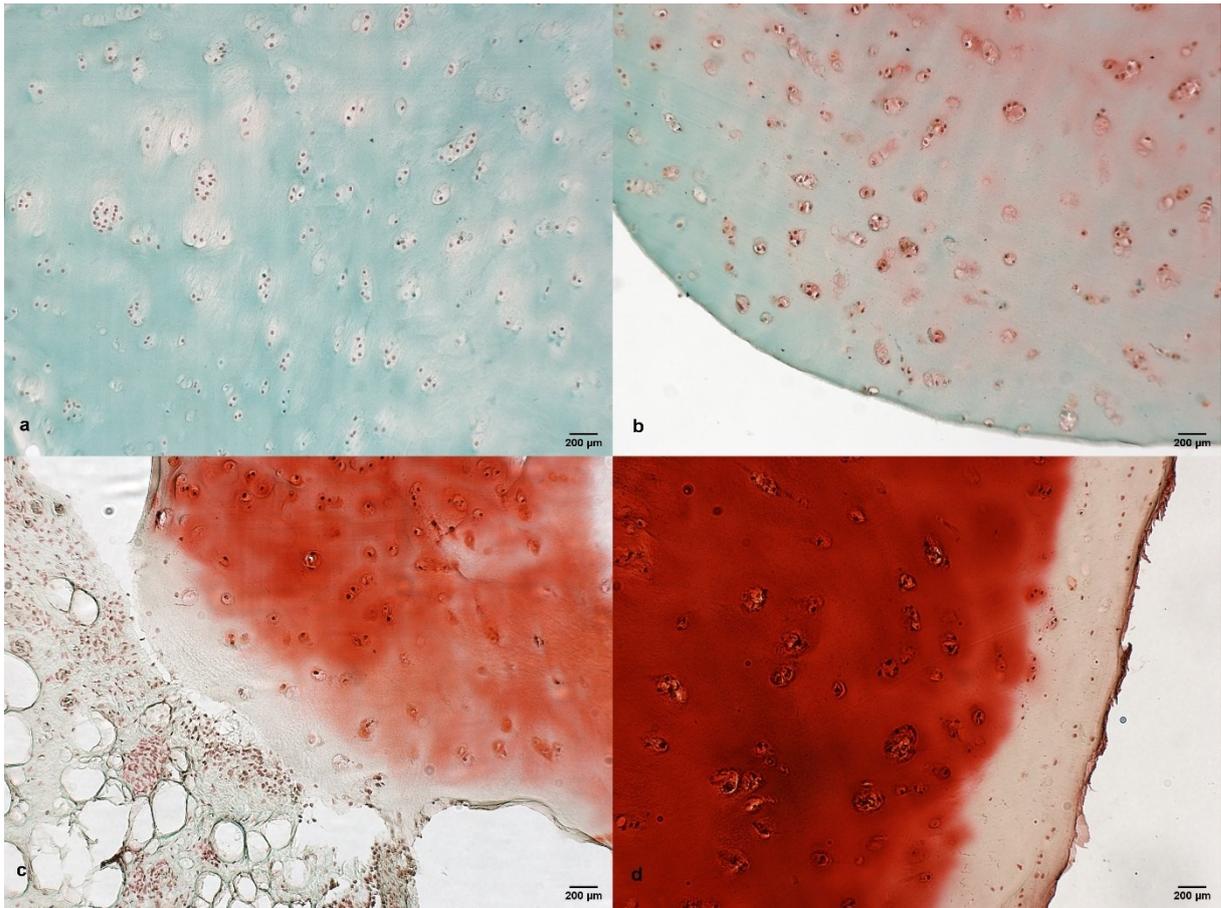
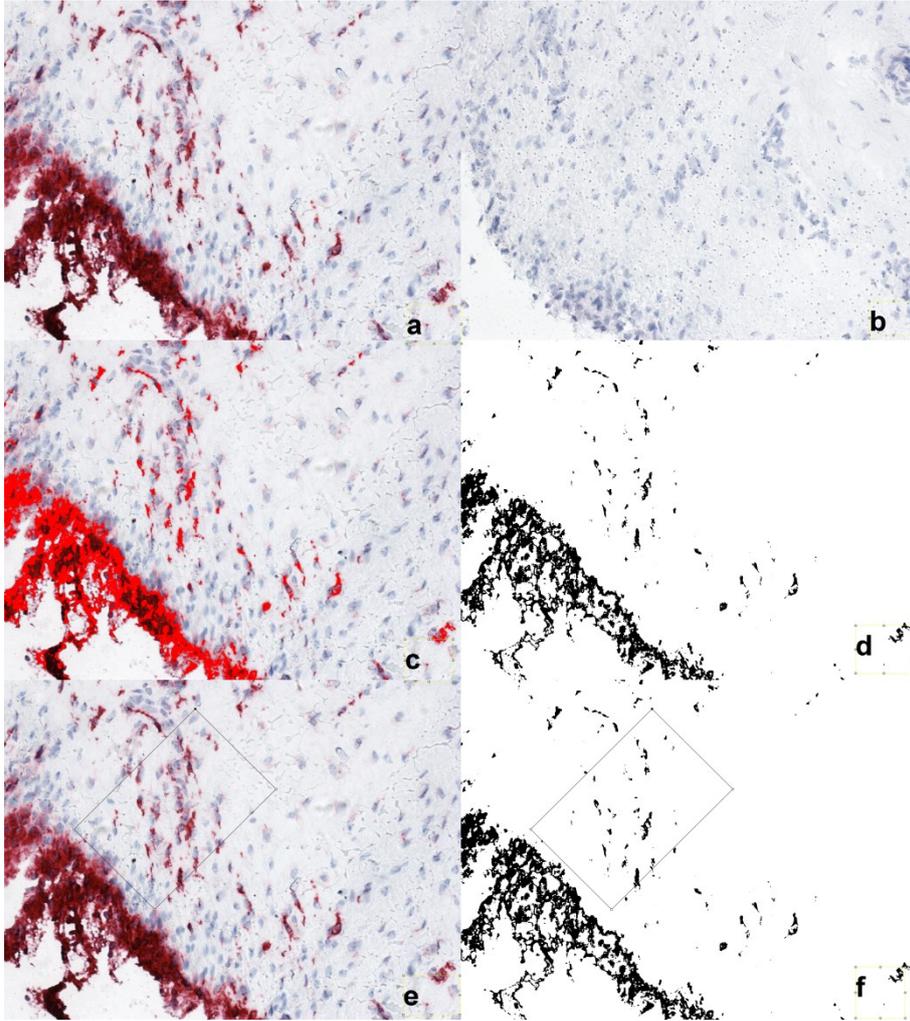


Abb. 2: S/O, 100x. a: S/O-Score = 0, b: S/O-Score = 1, c: S/O-Score = 2, d: S/O-Score = 3.

### 2.7.2 Immunhistochemie mittels *ImageJ*

Bei 200-facher Vergrößerung wurden möglichst zwei bis drei Fotos pro Gewebe ausgewertet. Mittels der frei verfügbaren Bildverarbeitungssoftware *ImageJ* [100] wurde das Testbild mit der dazugehörigen Negativkontrolle verknüpft. Die nachfolgenden Schritte der Bildanalyse sind in Abb. 3 exemplarisch dargestellt. Farbton, Sättigung und Helligkeit wurden so angepasst, dass die spezifische Rotfärbung auf dem Testbild erkannt wurde und das nicht angefärbte Kontrollbild negativ war. Dieser Vergleich wurde zu Dokumentationszwecken abgespeichert. Anschließend wurde das Testbild mit den im vorherigen Schritt ermittelten Werten bezüglich des Farbtons, der Sättigung und Helligkeit in ein Schwarz-Weiß-Bild überführt, in dem lediglich die mittels Immunhistochemie rot angefärbten Bereiche schwarz waren. Dieses Bild wurde wieder abgespeichert. Im nächsten Schritt wurden im Original-Testbild rechteckige *regions of interest* (ROIs) mit einer Größe von 400 x 600 Pixeln unmittelbar unterhalb des *lining layers* festgelegt. Diese waren mit der kurzen Seite in Richtung *lining layer* orientiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass das *sublining* der gegenüberliegenden Seite nicht miterfasst wurde [96] und dass sich die ROIs nicht überlappten.

Abbildung 3: Bildprozessierung mittels ImageJ



**Abb. 3: CD68, 200x. a und b: Angefarbtes Bild und Negativkontrolle. c und d: Im Vergleich mit der Negativkontrolle Markierung der angefarbten Bereiche durch Anpassung von Farbton, Sättigung und Helligkeit. e und f: Positionieren einer ROI und Übertragen auf das binärisierte Bild.**

Pro Gewebe wurden möglichst drei ROIs angelegt, wobei es aus Gründen der Gewebequalität sowie der zu geringen Größe der Synovialisfragmente bei der CD55-Färbung in 45 Fällen gelang, drei ROIs zu definieren, in 14 Fällen nur zwei und in vier Fällen nur eine. Für die CD68-Färbung konnten 53 Mal drei ROIs generiert werden, in sieben Fällen zwei und sechs Mal nur eine. Die ROIs wurden abgespeichert. Das Schwarz-Weiß-Bild wurde binärisiert und nacheinander die entsprechenden ROIs hineingelegt. Es wurden der Prozentsatz der gefärbten Fläche innerhalb der gewählten ROI sowie der absolute Wert dieser Fläche in Pixeln ermittelt. Falls in der ROI Blutgefäße oder Risse im Gewebe vorhanden waren, wurden diese umrissen und von der ROI subtrahiert [96], sodass unterschiedlich große ROIs resultierten, die allerdings ausschließlich Gewebe und keine Gefäße enthielten. Aus diesem Grund konnten in der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Präparate nur relative Angaben miteinander verglichen werden.

### 2.7.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des frei verfügbaren Programms R Version 3.5.0 (*The R Foundation for Statistical Computing*). Zur Analyse von Zusammenhängen und Einflussfaktoren wurden gemischte lineare Modelle berechnet. Diese beinhalteten sowohl univariate Analysen mit einer Adjustierung für Alter und Geschlecht als auch multivariable Analysen, in denen neben Alter und Geschlecht auch folgende weitere Variablen berücksichtigt wurden: Im Einzelnen handelte es sich bei den Variablen um die Entität des Gewebes, also ob es sich um OA oder RA handelte, den Zeitpunkt der Ernte, also Tag 0 direkt nach der Entnahme, Tag 7, Tag 15, Tag 28 oder Tag 42. Weitere Variablen waren Mono- und Co-Stimulation sowie Synovialis- bzw. Knorpel-Monokultur für die Analyse des Krenn-Scores und der Immunhistochemie bzw. des Proteoglycangehalts. Aufgrund der Tatsache, dass nicht bei allen Geweben an allen Zeitpunkten und für jede Stimulation Doppelansätze verfügbar waren, wurde in diesen Berechnungen nur der anhand der HE-Färbung intaktere Ansatz mit besser erhaltener Gewebequalität (Ansatz a) berücksichtigt. Die Berechnungen für den Krenn-Score wurden sowohl für den Gesamt-Score als auch für die drei Teil-Scores erstellt. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 0,05$  gewählt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Übersicht

#### 3.1.1 Gewebe nach Entität

In der nachfolgenden Tabelle sind die Explantate für einen Überblick nach Nummer und Entität sowie Alter, Geschlecht und betrachtetem Gelenk präsentiert.

**Tabelle 3.1 Explantatnummer und Entität**

Explantat	Entität	Alter (Jahre)	Geschlecht	Gelenk
1	OA	76	W	Knie
2	OA	77	W	Hüfte
3	OA	75	W	Knie
4	RA	70	W	Hüfte
5	OA	81	W	Knie
6	OA	76	W	Hüfte
7	OA	76	M	Knie
8	OA	56	M	Knie
9	OA	76	M	Knie
10	OA	68	M	Knie
11	OA	64	W	Hüfte
12	RA	82	W	Hüfte
13	RA	53	W	Hüfte
14	RA	53	W	Knie
15	RA	72	W	Knie
16	RA	69	W	Knie
17	RA	64	W	Hüfte
18	RA	71	M	Knie
19	RA	54	W	Knie

**Tab. 3.1:** In der linken Spalte ist die laufende Gewebenummer zu sehen, daneben ist aufgeschlüsselt, ob es sich um OA- oder RA-Gewebe handelt. Außerdem sind das Alter in Jahren, das Geschlecht (W = weiblich, M = männlich) sowie das ersetzte und somit untersuchte Gelenk (Hüfte oder Knie) angegeben.

#### 3.1.2 Anzahl der Messungen pro Färbung

Zunächst wurde analysiert, wie viele Messungen pro Färbung vorhanden waren. Vorhanden bedeutete dabei, dass das entsprechende Gewebe in dem Ansatz vorlag und angefärbt wurde, unabhängig davon, ob es auch auswertbar war. Gründe, die eine Auswertung unmöglich machten, waren in den meisten Fällen eine zu schlechte Gewebequalität oder eine zu geringe Zellularität des Gewebes. Die Gewebe lagen zu bestimmten Zeitpunkten nicht vor, da z.B. die

Auswertung nach Tag 7 und 15 nach einer gewissen Zeit eingestellt wurde. In anderen Fällen lag nicht genügend Gewebe für alle Ansätze vor. Anschließend wird in Tab. 3.7 erläutert, welche Gründe für die fehlende Auswertbarkeit vorlagen.

### 3.1.2.1 HE-Färbung

In der nachfolgenden Tabelle sind, unabhängig von der letztlichen Auswertbarkeit, die in Ansatz a vorhandenen Gewebe für die HE-Färbung dargestellt. Die Aufschlüsselung erfolgt nach Erntezeitpunkt und Stimulation.

**Tabelle 3.2: Vorhandene Gewebe HE-Färbung**

E x	Ta g 0	Tag 7						Tag 15						Tag 28						Tag 42					
		Mono			Co			Mono			Co			Mono			Co			Mono			Co		
		U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C
1	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
3	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+

Tab. 3.2: Übersicht über vorhandene Gewebe der HE-Färbung. Mit einem fett gedruckten Plus sind vorhandene Gewebe gekennzeichnet, mit einem Minus nicht vorhandene. Mono: Monokultur. Co: Co-Kultur. U: unstimuliert. M: Monostimulation (TNF $\alpha$ ). C: Costimulation (TNF $\alpha$  + IL-1 $\beta$ ).

3.1.2.2 S/O-Färbung

In der nachfolgenden Tabelle sind, unabhängig von der letztlichen Auswertbarkeit, die in Ansatz a vorhandenen Gewebe für die S/O-Färbung dargestellt. Die Aufschlüsselung erfolgt nach Erntezeitpunkt und Stimulation.

Tabelle 3.3: Vorhandene Gewebe S/O-Färbung

E x	Ta g 0	Tag 7						Tag 15						Tag 28						Tag 42					
		Mono			Co			Mono			Co			Mono			Co			Mono			Co		
		U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
3	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-

Tab 3.3: Übersicht über vorhandene Gewebe der S/O-Färbung. Mit einem fett gedruckten Plus sind vorhandene Gewebe gekennzeichnet, mit einem Minus nicht vorhandene. Mono: Monokultur. Co: Co-Kultur. U: unstimuliert. M: Monostimulation (TNF $\alpha$ ). C: Costimulation (TNF $\alpha$  + IL-1 $\beta$ ).

## 3.1.2.3 CD55

In der nachfolgenden Tabelle sind, unabhängig von der letztlichen Auswertbarkeit, die in Ansatz a vorhandenen Gewebe für die CD55-Färbung dargestellt. Die Aufschlüsselung erfolgt nach Erntezeitpunkt und Stimulation.

Tabelle 3.4: Vorhandene Gewebe CD55-Färbung

E x	Ta g 0	Tag 7						Tag 15						Tag 28						Tag 42					
		Mono			Co			Mono			Co			Mono			Co			Mono			Co		
		U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C
1	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
3	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+

Tab 3.4: Übersicht über vorhandene Gewebe der CD55-Färbung. Mit einem fett gedruckten Plus sind vorhandene Gewebe gekennzeichnet, mit einem Minus nicht vorhandene. Mono: Monokultur. Co: Co-Kultur. U: unstimuliert. M: Monostimulation (TNF $\alpha$ ). C: Costimulation (TNF $\alpha$  + IL-1 $\beta$ ).

## 3.1.2.4 CD68

In der nachfolgenden Tabelle sind, unabhängig von der letztlichen Auswertbarkeit, die in Ansatz a vorhandenen Gewebe für die CD68-Färbung dargestellt. Die Aufschlüsselung erfolgt nach Erntezeitpunkt und Stimulation.

Tabelle 3.5: Vorhandene Gewebe CD68-Färbung

E x	Ta g 0	Tag 7						Tag 15						Tag 28						Tag 42					
		Mono			Co			Mono			Co			Mono			Co			Mono			Co		
		U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C	U	M	C
1	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
3	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+

Tab 3.5: Übersicht über vorhandene Gewebe der CD68-Färbung. Mit einem fett gedruckten Plus sind vorhandene Gewebe gekennzeichnet, mit einem Minus nicht vorhandene. Mono: Monokultur. Co: Co-Kultur. U: unstimuliert. M: Monostimulation (TNF $\alpha$ ). C: Costimulation (TNF $\alpha$  + IL-1 $\beta$ ).

### 3.1.3 Fehleranalyse

#### 3.1.3.1 Übersicht Fehlerzahl pro Färbung

Die nachfolgende Tabelle veranschaulicht, wie viele intendierte Analysen für die entsprechenden Färbungen nicht möglich waren. In der Immunhistochemie (CD55 und CD68) stehen die Kennzeichen 1-3, was die Messungen in den ROIs 1-3 repräsentiert.

**Tabelle 3.6: Fehleranzahl nach Färbung**

Ansatz	Fehler	Auswertbar	Prozentsatz Fehler
Gesamt-Krenn	88	72	55
<i>lining layer</i>	88	71	55,35
Infiltrate	45	114	28,3
Zelldichte	47	112	29,56
SO-Score	6	144	4
CD55 1	87	63	58
CD55 2	88	59	59,86
CD55 3	88	45	66,17
CD68 1	84	65	56,4
CD68 2	84	60	58,33
CD68 3	84	52	61,8

**Tab. 3.6:** In der Tabelle sind je nach Färbung die Anzahl der auswertbaren sowie der nicht auswertbaren Proben und der Prozentsatz der nicht auswertbaren Proben angegeben.

#### 3.1.3.2 Gründe für die Nichtauswertbarkeit

In Tabelle 3.7 sind die möglichen Gründe für die fehlende Auswertbarkeit aufgeführt. Ferner lag in einigen Fällen eine Kombination mehrerer der aufgeführten Gründe für die fehlende Auswertbarkeit vor.

**Tabelle 3.7: Definition Gründe für die fehlende Auswertbarkeit**

Fehler	Beschreibung
1	schlechte Gewebequalität
2	Gewebe zellarm
3	kein <i>lining layer</i> vorhanden
4	Sonstiges, z.B. nur Bindegewebe/ Gewebe nicht identifizierbar

**Tab. 3.7:** In der Tabelle sind die Gründe für die Nichtauswertbarkeit nummeriert und in der rechten Spalte spezifiziert.

#### 3.1.3.3 Nicht auswertbare Proben HE

Im folgenden Diagramm sind die Gründe für die fehlende Auswertbarkeit prozentual dargestellt.

Abbildung 4: Gründe für die fehlende Auswertbarkeit Krenn-Score

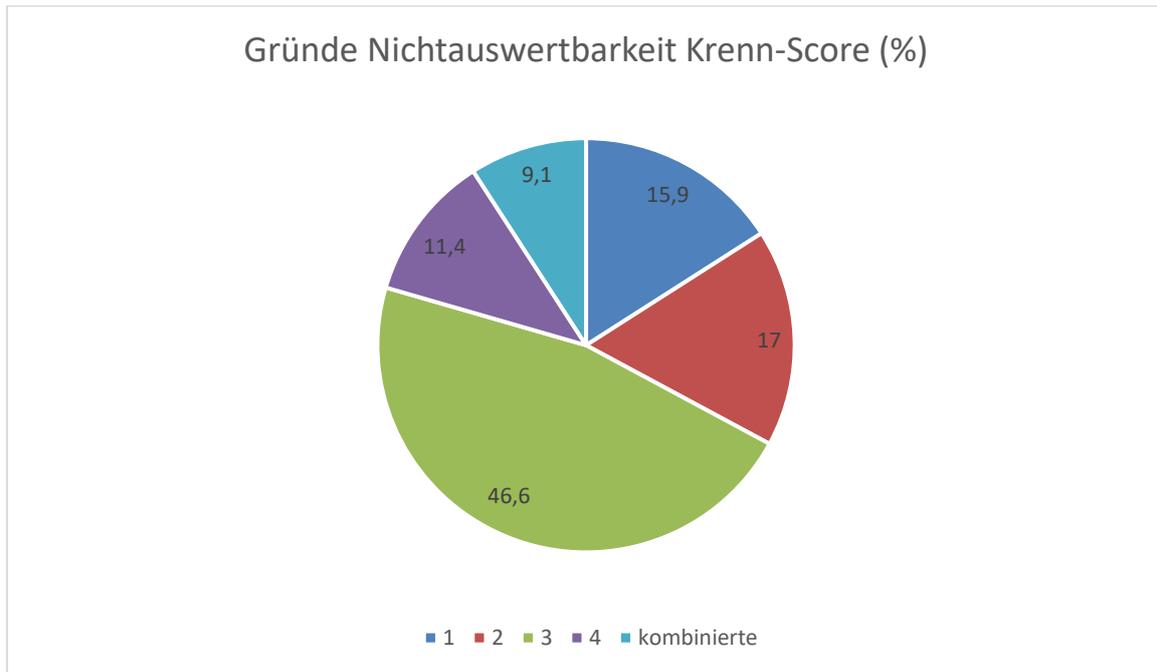


Abb. 4: Gründe für die Nichtauswertbarkeit des Gesamt-Krenn-Scores. 1: schlechte Gewebequalität, 2: Gewebe zellarm, 3: kein *lining layer* vorhanden, 4: sonstige. Wenn mehrere Gründe vorlagen, wurde dies als „kombinierte“ zusammengefasst.

### 3.1.3.4 Nicht auswertbare Proben S/O

In der S/O-Färbung waren lediglich sechs von 150 Schnitten (4%) nicht auswertbar, sodass hier auf eine weitere Aufschlüsselung verzichtet wird.

Tabelle 3.8: Anzahl der Gründe für die fehlende Auswertbarkeit in der S/O-Färbung

Fehler	Beschreibung	Anzahl
1	schlechte Gewebequalität	0
2	Gewebe zellarm	1
3	kein <i>lining layer</i> vorhanden	0
4	Sonstiges	5
gesamt		6

Tab. 3.8: In den linken Spalten sind die Gründe für die fehlende Auswertbarkeit angegeben und definiert, in der rechten Spalte die jeweilige Anzahl.

### 3.1.3.5 Nicht auswertbare Proben CD68

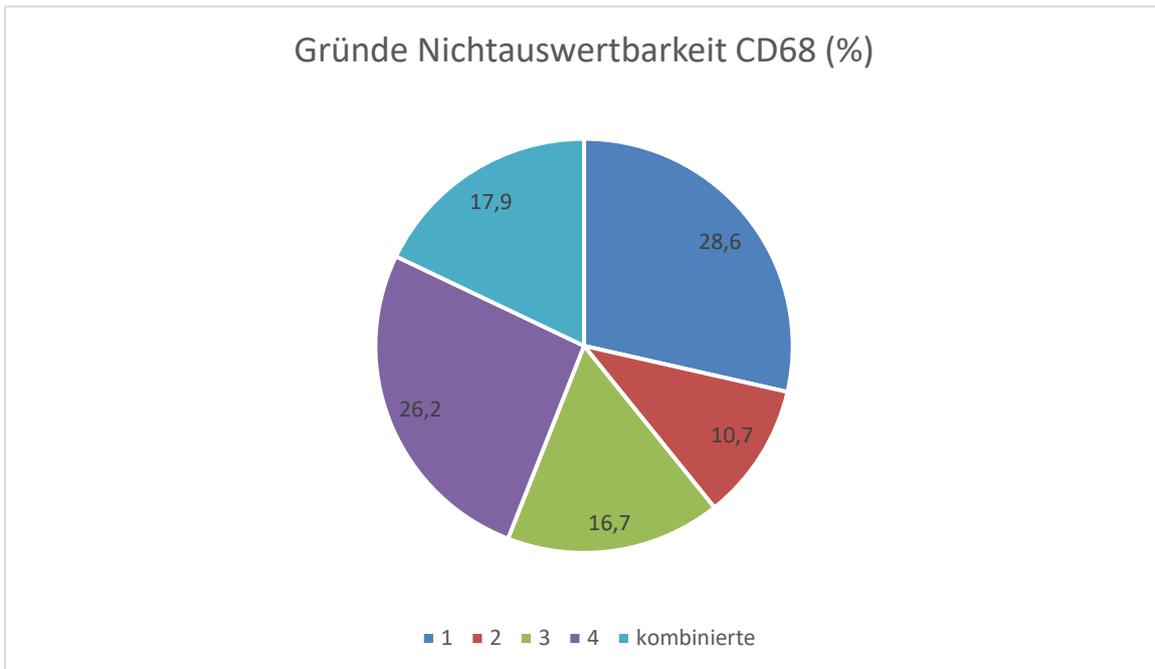
#### 3.1.3.5.1 Nicht auswertbare Schnitte nach Anzahl

In der immunhistochemischen Anfärbung von CD68 war das Gewebe in 84 von 149 Fällen (56,4%) gar nicht auswertbar. Das heißt, dass keine der im Idealfall drei definierten ROIs ausgewertet werden konnte. Wenn das Gewebe nicht ausgewertet werden konnte, war in den

meisten Fällen die Gewebequalität zu schlecht (1) oder es lag nur ein sehr kleiner Ausschnitt intakten Gewebes vor, sodass keine ROI in der vorgegebenen Größe erstellt werden konnte (4).

Im folgenden Diagramm sind die Gründe für die fehlende Auswertbarkeit der CD68-Färbung prozentual dargestellt.

**Abbildung 5: Gründe für die fehlende Auswertbarkeit CD68**



**Abb. 5 Gründe für die Nichtauswertbarkeit der CD68-Anfärbung. 1: schlechte Gewebequalität, 2: Gewebe zellarm, 3: kein *lining layer* vorhanden, 4: sonstige. Wenn mehrere Gründe vorlagen, wurde dies als „kombinierte“ zusammengefasst.**

### 3.1.3.6 Nicht auswertbare Proben CD55

Das folgende Diagramm stellt die Gründe für die fehlende Auswertbarkeit in der CD55-Färbung prozentual dar.

Abbildung 6: Gründe für die fehlende Auswertbarkeit CD55

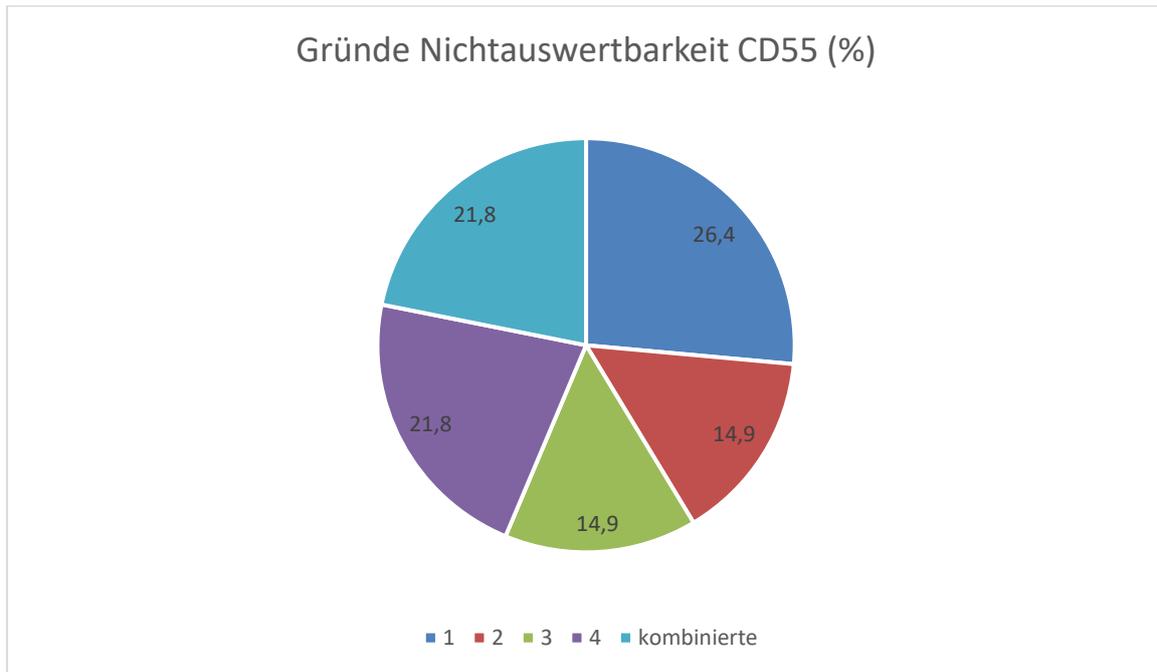


Abb. 6: Gründe für die Nichtauswertbarkeit der CD55-Anfärbung. 1: schlechte Gewebequalität, 2: Gewebe zellarm, 3: kein *lining layer* vorhanden, 4: sonstige. Wenn mehrere Gründe vorlagen, wurde dies als „kombinierte“ zusammengefasst.

## 3.2 Korrelation zwischen den Ansätzen a und b

Sofern von einem Gewebe zwei identische, das heißt in den Punkten Mono- bzw. Co-Kultur, Zeitpunkt der Ernte und Stimulation übereinstimmende Paare a und b vorhanden waren, wurde die Übereinstimmung derselben überprüft. Dazu wurde der Mittelwert des jeweiligen Parameters aus den Messungen a und b gebildet und die absolute sowie die prozentuale Differenz berechnet.

### 3.2.1 HE

#### 3.2.1.1 *lining layer*

Für den Parameter *lining layer*, also Deckzellschicht des Krenn-Scores lagen 21 Paare vor. Der Durchschnitt der Werte für das *lining layer* lag bei 1,95 (Werte von 0-3 möglich). Die mittlere absolute Differenz lag bei 0,29 Punkten bei beobachteten Werten von -2 bis 1. Dabei bedeutet eine negative Zahl, dass der Wert des *lining layers* in Ansatz b um die entsprechende Zahl geringer ist als in Ansatz a, ebenso verhält es sich mit der prozentualen Differenz. Die mittlere prozentuale Differenz lag bei 20,95 mit einer Standardabweichung von 62,01.

Tabelle 3.9: *lining layer* Vergleich Ansatz a und b

Paar	Durchschnitt	Abweichung absolut	Abweichung prozentual
1	2,0	0	0

2	2,0	0	0
3	2,0	0	0
4	2,5	1	40
5	2,5	1	40
6	0,5	1	200
7	2,0	0	0
9	2,5	-1	-40
10	1,5	1	66,67
11	2,5	1	40
12	1,5	1	66,67
13	2,0	-2	-100
14	2,5	1	40
15	2,5	1	40
16	2,5	1	40
17	3,0	0	0
18	2,0	-2	-100
19	1,0	0	0
20	2,5	1	40
21	1,5	1	66,67

**Tab. 3.9:** In 21 Fällen war von beiden Ansätzen ein *lining layer* vorhanden. In der zweiten Spalte ist der durchschnittliche Wert von Ansatz a und b angegeben, hieraus ergeben sich auch die halben Werte. Die dritte Spalte zeigt die absolute Abweichung der Ansätze, wobei bei positivem Vorzeichen in Ansatz a ein geringerer Wert ermittelt wurde, bei negativem Vorzeichen war der Score in Ansatz b niedriger. Ebenso verhält es sich in der letzten Spalte mit der prozentualen Abweichung zwischen den Ansätzen.

### 3.2.1.2 Infiltrate

Für den Parameter Infiltrate des Krenn-Scores lagen 54 Paare vor. Der Durchschnittswert betrug bei einer Spanne von 0-3 Punkten 0,88 Punkte. Die mittlere absolute Differenz lag bei 0,056 Punkten bei einer Spanne von -1 bis 1. Die mittlere prozentuale Differenz lag bei 2,52% mit einer Standardabweichung von 96.

**Tabelle 3.10: Infiltrate Vergleich Ansatz a und b**

Paar	Durchschnitt	Abweichung absolut	Abweichung prozentual
1	1,5	-1	-66,67
2	1,5	-1	-66,67
3	2,0	0	0
4	0,5	-1	-200
5	1,0	0	0
6	1,0	0	0

7	1,5	1	66,67
8	1,0	0	0
9	1,5	1	66,67
10	1,0	0	0
11	0,0	0	NaN
12	0,5	1	200
13	0,0	0	NaN
14	0,5	-1	-200
15	1,0	0	0
16	1,5	1	66,67
17	0,5	1	200
18	1,0	0	0
19	1,5	1	66,67
20	2,0	0	0
21	1,5	1	66,67
22	1,0	0	0
23	1,5	1	66,67
24	1,0	0	0
25	1,0	0	0
26	1,0	0	0
27	1,0	0	0
28	1,5	-1	-66,67
29	1,0	0	0
30	0,5	1	200
31	0,5	-1	-200
32	0,5	1	200
33	0,0	0	NaN
34	0,0	0	NaN
35	2,0	0	0
36	1,5	1	66,67
37	1,0	0	0
38	0,5	-1	-200
39	1,0	0	0
40	1,0	0	0
41	0,5	1	200
42	1,0	0	0
43	1,5	1	66,67

44	0,0	0	NaN
45	0,5	-1	-200
46	0,0	0	NaN
47	1,0	0	0
48	0,5	-1	-200
49	0,0	0	0
50	0,0	0	NaN
51	1,0	0	0
52	0,0	0	NaN
53	1,0	0	0
54	0,5	-1	-200

**Tab. 3.10:** In 54 Fällen konnten in beiden Ansätzen Werte für das Vorhandensein von Infiltraten erhoben werden. In der zweiten Spalte ist der durchschnittliche Wert von Ansatz a und b angegeben, hieraus ergeben sich auch die halben Werte. Die dritte Spalte zeigt die absolute Abweichung der Ansätze, wobei bei positivem Vorzeichen in Ansatz a ein geringerer Wert ermittelt wurde, bei negativem Vorzeichen war der Score in Ansatz b niedriger. Ebenso verhält es sich in der letzten Spalte mit der prozentualen Abweichung zwischen den Ansätzen.

### 3.2.1.3 Zelldichte

Es lagen 54 Paare für den Parameter Zelldichte des Krenn-Scores vor. Der Durchschnitt der Werte lag bei 0,44 bei einer Spannweite von 0-3 Punkten. Die mittlere absolute Differenz lag bei 0,074 bei Werten von -1 bis 2. Die mittlere prozentuale Differenz lag bei 3,7% bei einer Standardabweichung von 121,1.

**Tabelle 3.11: Zellularität Vergleich Ansatz a und b**

Paar	Durchschnitt	Abweichung absolut	Abweichung prozentual
1	0,5	-1	-200
2	1,0	0	0
3	1,0	0	0
4	0,5	-1	-200
5	0,0	0	NaN
6	0,0	0	NaN
7	0,5	1	200
8	0,0	0	NaN
9	1,0	0	0
10	1,0	0	0
11	0,0	0	NaN
12	1,0	0	0
13	0,5	-1	-200

14	0,5	-1	-200
15	0,5	1	200
16	1,5	1	66,67
17	0,5	1	200
18	0,0	0	NaN
19	0,5	1	200
20	1,5	-1	-66,67
21	1,0	0	0
22	0,0	0	NaN
23	0,5	1	200
24	0,0	0	NaN
25	1,5	1	66,67
26	0,5	-1	-200
27	0,0	0	NaN
28	0,5	-1	-200
29	0,0	0	NaN
30	0,5	1	200
31	0,0	0	NaN
32	0,5	1	200
33	0,0	0	NaN
34	0,0	0	NaN
35	1,5	-1	-66,67
36	1,0	2	200
37	0,0	0	NaN
38	0,5	-1	-200
39	0,0	0	NaN
40	0,5	-1	-200
41	0,0	0	NaN
42	0,0	0	NaN
43	1,0	2	200
44	0,0	0	NaN
45	0,0	0	NaN
46	0,0	0	NaN
47	0,0	0	NaN
48	0,0	0	NaN
49	0,0	0	NaN
50	0,0	0	NaN

51	1,0	2	200
52	0,0	0	NaN
53	1,0	0	0
54	0,5	-1	-200

**Tab. 3.11:** In 54 Fällen konnten in beiden Ansätzen Werte für die Zellularität des Gewebes erhoben werden. In der zweiten Spalte ist der durchschnittliche Wert von Ansatz a und b angegeben, hieraus ergeben sich auch die halben Werte. Die dritte Spalte zeigt die absolute Abweichung der Ansätze, wobei bei positivem Vorzeichen in Ansatz a ein geringerer Wert ermittelt wurde, bei negativem Vorzeichen war der Score in Ansatz b niedriger. Ebenso verhält es sich in der letzten Spalte mit der prozentualen Abweichung zwischen den Ansätzen.

### 3.2.2 S/O-Färbung

In der S/O-Färbung lagen 90 Paare vor. Der durchschnittliche Wert lag bei einer Spannweite von 0-3 Punkten bei 1,34. Die mittlere absolute Differenz lag bei einer Spannweite von -3 bis 2 bei einem Wert von -0,078. Die mittlere prozentuale Differenz lag bei -1,41% bei einer Standardabweichung von 101,13.

**Tabelle 3.12: SO Vergleich Ansatz a und b**

Paar	Durchschnitt	Abweichung absolut	Abweichung prozentual
1	1,0	0	0
2	1,0	2	200
3	2,0	0	0
4	0,5	1	200
5	1,0	0	0
6	1,5	-1	-66,67
7	1,5	1	66,67
8	1,5	-1	-66,67
9	1,5	1	66,67
10	2,0	0	0
11	1,0	0	0
12	1,5	1	66,67
13	0,0	0	NaN
14	0,0	0	NaN
15	2,0	0	0
16	1,0	0	0
17	0,0	0	NaN
18	0,5	1	200
19	2,0	0	0
20	0,5	1	200

21	3,0	0	0
22	1,0	0	0
23	0,5	1	200
24	1,5	-1	-66,67
25	1,0	0	0
26	0,0	0	NaN
27	2,5	-1	-40
28	1,0	0	0
29	0,5	-1	-200
30	1,0	0	0
31	1,0	0	0
32	0,5	1	200
33	2,0	2	100
34	1,0	-2	-200
35	2,0	0	0
36	1,0	2	200
37	0,0	0	NaN
38	1,5	-1	-66,67
39	3,0	0	0
40	3,0	0	0
41	2,5	-1	-40
42	2,5	-1	-40
43	2,5	1	40
44	1,0	0	0
45	1,5	-3	-200
46	2,5	-1	-40
47	2,5	-1	-40
48	2,0	0	0
49	2,5	1	40
50	3,0	0	0
51	2,0	0	0
52	1,5	1	66,67
53	1,0	0	0
54	1,0	0	0
55	1,0	-2	-200
56	0,5	1	200
57	0,5	-1	-200

58	1,0	0	0
59	0,5	-1	-200
60	1,5	1	66,67
61	1,0	0	0
62	1,5	1	66,67
63	1,5	1	66,67
64	0,5	1	200
65	1,5	-1	-66,67
66	2,5	1	40
67	1,0	-2	-200
68	1,5	1	66,67
69	1,0	0	0
70	0,0	0	NaN
71	0,5	-1	-200
72	1,0	0	0
73	1,5	-3	-200
74	1,0	0	0
75	2,0	0	0
76	1,5	-1	-66,67
77	1,5	1	66,67
78	1,0	2	200
79	2,0	0	0
80	2,5	-1	-40
81	1,5	-1	-66,67
82	2,5	-1	-40
83	1,0	0	0
84	1,0	0	0
85	1,0	0	0
86	1,5	-1	-66,67
87	1,5	-1	-66,67
88	0,0	0	NaN
89	0,5	-1	-200
90	1,5	-1	-66,67

Tab. 3.12: In 90 Fällen lagen zwei auswertbare Ansätze in der S/O-Färbung vor. In der zweiten Spalte ist der durchschnittliche Wert von Ansatz a und b angegeben, hieraus ergeben sich auch die halben Werte. Die dritte Spalte zeigt die absolute Abweichung der Ansätze, wobei bei positivem Vorzeichen in Ansatz a ein geringerer Wert ermittelt wurde, bei negativem Vorzeichen war der Score in Ansatz b niedriger. Ebenso verhält es sich in der letzten Spalte mit der prozentualen Abweichung zwischen den Ansätzen.

### 3.2.3 CD68

In der CD68-Färbung lagen 21 Paare vor. Bei einer Spannweite von 1249,5 bis 40432,5 lag der durchschnittliche Wert der angefärbten Fläche bei 13312,86 Pixeln. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass absolute Werte nur bedingt aussagekräftig sind, da die ROIs aufgrund möglicherweise vorhandener Gefäße unterschiedlich groß sein können. Der Mittelwert lag bei einer Spannweite von 1249,5-40432,5 Punkten bei 13312,86. Die mittlere absolute Differenz lag bei einer Spannweite von -20163 bis 22275 bei einem Wert von -1703,43. Die mittlere prozentuale Differenz lag bei -21,491 bei einer Standardabweichung von 85,304.

**Tabelle 3.13: CD 68 Vergleich Ansatz a und b**

Paar	Durchschnitt (Pixel)	Abweichung absolut (Pixel)	Abweichung prozentual
1	1249,5	-1923	-153,902
2	15669,5	-9577	-61,119
3	5522,5	2809	50,865
4	24118,0	-6178	-25,616
5	15289,0	7212	47,171
6	9482,0	7622	80,384
7	23977,5	-18771	-78,286
8	17876,5	-20163	-112,791
9	4388,0	-6674	-152,097
10	40432,5	22275	55,092
11	11076,5	-2909	-26,263
12	2481,0	3240	130,593
13	11257,0	-15578	-138,385
14	13085,0	-6626	-50,638
15	27141,0	10384	35,259
16	13339,5	6363	47,700
17	17002,5	-9919	-58,338
18	9356,5	5457	58,323
19	3805,5	-5339	-140,297
20	6353,5	251	3,951
21	6667,0	2272	34,078

**Tab. 3.13:** In 21 Fällen lagen in der Anfärbung des Markers CD68 ROIs in beiden Ansätzen vor. In der zweiten Spalte ist der durchschnittliche Wert der beiden Ansätze angegeben. Die dritte Spalte zeigt die absolute Abweichung der beiden Ansätze, wobei bei positivem Vorzeichen in Ansatz a ein geringerer Wert ermittelt wurde, bei negativem Vorzeichen war der Score in Ansatz b niedriger. Ebenso verhält es sich in der letzten Spalte mit der prozentualen Abweichung zwischen den Ansätzen.

### 3.2.4 CD55

In der CD55-Färbung lagen 17 Paare vor. Der Mittelwert lag bei einer Spannweite von 1281,5-28552,5 Punkten bei 10061,03 Pixeln. Die mittlere absolute Differenz lag bei einer Spannweite von -10155 bis 38255 bei einem Wert von 2278,88. Die mittlere prozentuale Differenz lag bei -26,79 bei einer Standardabweichung von 96,77.

**Tabelle 3.14: CD55 Vergleich Ansatz a und b**

Paar	Durchschnitt (Pixel)	Abweichung absolut (Pixel)	Abweichung prozentual
1	5763,5	-10155	-176,195
2	22350,5	-2747	-12,291
3	28506,0	-3788	-13,288
4	2850,5	617	21,645
5	5527,5	-359	-6,495
6	28552,5	38255	133,981
7	11122,0	-938	-8,434
8	6915,5	-4581	-66,242
9	9017,5	-127	-1,408
10	2172,0	-4032	-185,635
11	19347,5	35167	181,765
12	8790,5	-7625	-86,741
13	11633,0	2540	21,834
14	2469,5	-1207	-48,876
15	1346,5	-1041	-77,312
16	1281,5	-1961	-153,024
17	3391,5	723	21,318

**Tab 3.14:** In 21 Fällen lagen in der Anfärbung des Markers CD55 ROIs in beiden Ansätzen vor. In der zweiten Spalte ist der durchschnittliche Wert der beiden Ansätze angegeben. Die dritte Spalte zeigt die absolute Abweichung der beiden Ansätze, wobei bei positivem Vorzeichen in Ansatz a ein geringerer Wert ermittelt wurde, bei negativem Vorzeichen war der Score in Ansatz b niedriger. Ebenso verhält es sich in der letzten Spalte mit der prozentualen Abweichung zwischen den Ansätzen.

### 3.3 Gemischte lineare Modelle

Im Folgenden wurde der Einfluss der variablen Faktoren „Krankheitsentität“, „Kulturdauer“, „Stimulation“ und „Mono- bzw. Co-Kultur“ auf die histologischen und immunhistochemischen Veränderungen der Gewebeexplantate untersucht. Um eine Berechnung als statistisch signifikant zu bezeichnen, wurde ein p-Wert  $\leq 0,05$  festgelegt.

### 3.3.1 HE-Färbung

#### 3.3.1.1 Krenn gesamt

##### 3.3.1.1.1 Univariate Analyse

Beim Gesamt-Krenn-Score ergaben sich in der univariaten Analyse (Adjustierung nur für Alter und Geschlecht, keine Berücksichtigung der anderen Variablen) signifikante Korrelationen des Scores mit dem Zeitpunkt sowie der Synovialis-Monokultur. Dies bedeutet bei einem negativen Schätzwert eine negative Korrelation des Krenn-Scores mit dem Zeitpunkt der Ernte. Je länger das Gewebe also in Kultur gehalten wurde, desto niedriger war der Krenn-Score. Eine Verlängerung der Kultur um eine Einheit (Tage) senkte den Gesamt-Krenn-Score also um 0,67 Punkte. Ein umgekehrtes Bild ergab sich bei Berücksichtigung der Synovialis-Monokultur. In dem Fall war der Gesamt-Krenn-Score um 1,34 Punkte höher als in Co-Kultur.

**Tabelle 3.15: Krenn univariat**

Variable	Schätzwert	Standardabweichung	t-Wert	p-Wert
Entität	-0,95	0,66	-1,44	0,15
Zeitpunkt	-0,67	0,18	-3,75	<b>&lt;0,01</b>
TNF mono	-0,45	0,49	-0,92	0,36
TNF + IL1	-0,35	0,44	-0,80	0,42
Synovialis mono	1,34	0,44	3,09	<b>&lt;0,01</b>

**Tab. 3.15: Univariate Analyse des Gesamt-Krenn-Scores. Ein negativer Schätzwert bedeutet einen um diesen Faktor geringeren Krenn-Score. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.**

##### 3.3.1.1.2 Multivariable Analyse

Die multivariable Analyse beinhaltete die in der Tabelle genannten Faktoren sowie die Confounder Alter und Geschlecht. Lediglich beim Zeitpunkt ergab sich ein signifikanter Zusammenhang mit einem negativen Estimate-Wert, sodass der Krenn-Score umso niedriger war, je länger das Gewebe kultiviert worden war. Der Krenn-Score in Monokultur lag auch bei dieser Berechnung höher, jedoch war dies unter Berücksichtigung der anderen Variablen nicht mehr signifikant. Es fand sich kein Einfluss oder Zusammenhang zwischen Krenn-Score und Entität.

**Tabelle 3.16: Krenn multivariabel**

Variable	Schätzwert	Standardabweichung	t-Wert	p-Wert
Entität	-1,29	0,71	-1,83	0,07
Zeitpunkt	-0,52	0,20	-2,57	<b>0,01</b>
TNFmo	-0,21	0,51	-0,42	0,68
TNF + IL1	-0,24	0,43	-0,56	0,57
Alter	-0,04	0,03	-1,20	0,23
Geschlecht	0,72	0,62	1,15	0,25

Synovialis mono	0,75	0,51	1,49	0,14
-----------------	------	------	------	------

Tab. 3.16: Multivariable Analyse des Gesamt-Krenn-Scores. Ein negativer Schätzwert bedeutet einen um diesen Faktor geringeren Krenn-Score. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

### 3.3.1.2 *lining layer*

#### 3.3.1.2.1 Univariate Analyse

Für das *lining layer* ergaben sich bei der univariaten Analyse signifikante Zusammenhänge beim Zeitpunkt sowie der Synovialis-Monokultur. Der Zeitpunkt der Ernte korrelierte negativ mit dem Score des *lining layers*, sodass eine späte Ernte pro Erhöhung des Erntezeitpunktes um eine Einheit einen um 0,21 Punkte geringeren Score bedeutete. Die Synovialis-Monokultur wies einen um 0,547 Punkte höheren Teilscore auf als die Co-Kultur.

Tabelle 3.17: *lining layer* univariat

Variable	Schätzwert	Standardabweichung	t-Wert	p-Wert
Entität	0,02	0,38	0,04	0,97
Zeitpunkt	-0,21	0,09	-2,41	<b>0,02</b>
TNFmo	0,22	0,22	0,99	0,32
TNF + IL1	-0,24	0,19	-1,23	0,22
Synovialis mono	0,47	0,20	2,33	<b>0,02</b>

Tab. 3.17: Univariate Analyse des Teil-Scores *lining layer*. Ein negativer Schätzwert bedeutet einen um diesen Faktor geringeren Teil-Score. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

#### 3.3.1.2.2 Multivariable Analyse

In der multivariablen Analyse unter Berücksichtigung aller Variablen waren o.g. Tendenzen in Bezug auf das *lining layer* zwar immer noch erkennbar, aber nicht mehr signifikant. Auch alle übrigen Korrelationen lagen unterhalb des Signifikanzniveaus von 0,05.

Tabelle 3.18: *lining layer* multivariabel

Variable	Schätzwert	Standardabweichung	t-Wert	p-Wert
Entität	-0,06	0,41	-0,15	0,88
Zeitpunkt	-0,14	0,10	-1,44	0,15
TNFmo	0,41	0,24	1,69	0,09
TNF + IL1	-0,03	0,20	-0,14	0,89
Alter	-0,005	0,02	-0,28	0,78
Geschlecht	0,27	0,37	0,73	0,46
Synovialis mono	0,45	0,24	1,88	0,06

**Tab. 3.18: Multivariable Analyse des Teil-Scores *lining layer*. Ein negativer Schätzwert bedeutet einen um diesen Faktor geringeren Krenn-Score. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.**

### 3.3.1.3 Infiltrate

#### 3.3.1.3.1 Univariate Analyse

Bei Berücksichtigung des Krenn-Teilscores Infiltrate ergaben sich negative Korrelationen für die Variablen Entität und Zeitpunkt. In Bezug auf die Entität bedeutet dies eine Erhöhung des Teilscores Infiltrate bei der OA um 0,62 Punkte im Vergleich zur RA. Der spätere Erntezeitpunkt war wie in den vorstehenden Analysen mit einem pro Zeiteinheit um 0,29 Punkte geringeren Teilscore verbunden.

**Tabelle 3.19: Infiltrate univariat**

Variable	Schätzwert	Standardabweichung	t-Wert	p-Wert
Entität	-0,62	0,20	-3,10	<b>&lt;0,01</b>
Zeitpunkt	-0,29	0,06	-4,85	<b>&lt;0,01</b>
TNFmo	0,15	0,14	1,07	0,28
TNF + IL1	-0,22	0,13	-1,75	0,08
Synovialis mono	0,21	0,14	1,51	0,13

**Tab. 3.19: Univariate Analyse des Teil-Scores Infiltrate. Ein negativer Schätzwert bedeutet einen um diesen Faktor geringeren Krenn-Score. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.**

#### 3.3.1.3.2 Multivariable Analyse

Die vorgenannten Korrelationen in Bezug auf die Infiltrate bestätigten sich in der multivariablen Analyse, insbesondere die Entität zeigte einen hochsignifikanten Zusammenhang, sodass bei der RA der Teilscore Infiltrate im Vergleich zu OA um 0,56 Punkte erniedrigt war.

**Tabelle 3.20: Infiltrate multivariabel**

Variable	Schätzwert	Standardabweichung	t-Wert	p-Wert
Entität	-0,56	0,20	-2,71	<b>&lt;0,01</b>
Zeitpunkt	-0,28	0,07	-4,23	<b>&lt;0,01</b>
TNFmo	0,20	0,15	1,34	0,18
TNF + IL1	-0,08	0,13	-0,62	0,54
Alter	0,02	0,01	-1,66	0,10
Geschlecht	0,15	0,21	0,72	0,47
Synovialis mono	0,01	0,15	0,10	0,92

**Tab. 3.20: Multivariable Analyse des Teil-Scores Infiltrate. Ein negativer Schätzwert bedeutet einen um diesen Faktor geringeren Krenn-Score. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.**

### 3.3.1.4 Zelldichte

#### 3.3.1.4.1 Univariate Analyse

Unter Berücksichtigung des Krenn-Teilscores Zelldichte bestand lediglich eine signifikante negative Korrelation mit dem Zeitpunkt, d.h. bei späterer Ernte des Gewebes war der Score pro Zeiteinheit um 0,19 Punkte niedriger.

**Tabelle 3.21: Zelldichte univariat**

Variable	Schätzwert	Standardabweichung	t-Wert	p-Wert
Entität	-0,29	0,16	-1,76	0,08
Zeitpunkt	-0,19	0,06	-3,02	<b>&lt;0,01</b>
TNFmo	0,19	0,14	1,31	0,19
TNF + IL1	-0,17	0,13	-1,32	0,19
Synovialis mono	0,09	0,15	0,61	0,54

**Tab. 3.21: Univariate Analyse des Krenn-Teilscore Zelldichte. Ein negativer Schätzwert bedeutet einen um diesen Faktor geringeren Krenn-Score. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.**

#### 3.3.1.4.2 Multivariable Analyse

Die erwähnte negative Korrelation mit dem Erntezeitpunkt, d.h. mit zunehmender Zeit in Kultur erniedrigte sich der Teilscore Zelldichte, bestätigte sich in der multivariablen Analyse mit dem gleichen Schätzwert.

**Tabelle 3.22: Zelldichte multivariabel**

Variable	Schätzwert	Standardabweichung	t-Wert	p-Wert
Entität	-0,24	0,15	-1,67	0,10
Zeitpunkt	-0,19	0,07	-2,82	<b>&lt;0,01</b>
TNFmo	0,22	0,17	1,30	0,19
TNF + IL1	-0,04	0,15	-0,27	0,79
Alter	-0,007	0,01	-1,03	0,30
Geschlecht	0,26	0,15	1,66	0,10
Synovialis mono	-0,02	0,17	-0,09	0,93

**Tab. 3.22: Multivariable Analyse des Teil-Krenn-Scores Zellularität. Ein negativer Schätzwert bedeutet einen um diesen Faktor geringeren Krenn-Score. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.**

### 3.3.2 S/O

#### 3.3.2.1 Univariate Analyse

In der univariaten Analyse des S/O-Scores, der den Proteoglycangehalt des Gewebes widerspiegelt, zeigten sich signifikante Werte für die Parameter Zeitpunkt, Monostimulation mit TNF $\alpha$  sowie für die Knorpel-Monokultur. Dabei bestand eine negative Korrelation für den Zeitpunkt, d.h. je länger das Gewebe kultiviert worden war, desto niedriger war der Proteoglycangehalt, und zwar sank dieser um 0,2 Punkte je Änderung der Zeiteinheit (Tage). Ebenfalls sank der Proteoglycangehalt unter TNF $\alpha$ -Monostimulation um 0,56 Punkte. Er war jedoch hochsignifikant um 0,74 Punkte erhöht bei Knorpel-Monokultur, im Umkehrschluss war also die Co-Kultur mit Synovialis ein Faktor, der den Proteoglycangehalt negativ beeinflusste.

**Tabelle 3.23: S/O univariat**

Variable	Schätzwert	Standardabweichung	t-Wert	p-Wert
Entität	-0,38	0,26	-1,45	0,15
Zeitpunkt	-0,20	0,09	-2,34	<b>0,02</b>
TNFmo	-0,56	0,16	-3,40	<b>&lt;0,01</b>
TNF + IL1	-0,10	0,16	-0,62	0,53
Knorpel mono	0,74	0,71	4,33	<b>&lt;0,01</b>

**Tab. 3.23: Univariate Analyse des S/O-Scores. Ein negativer Schätzwert bedeutet einen um diesen Faktor geringeren S/O-Score. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.**

#### 3.3.2.2 MultivariableAnalyse

Die in der univariaten Analyse beobachtete signifikant negative Korrelation mit der Kulturzeit verlor das Signifikanzniveau in der multivariablen Analyse. Jedoch zeigte sich in der multivariablen Analyse, dass eine Stimulation des Gewebes sowohl mit TNF $\alpha$  als auch mit TNF $\alpha$  plus IL-1 $\beta$  den Proteoglycangehalt des Knorpels um 0,6 bzw. 0,37 Punkte reduzierte. Die hochsignifikante Erhöhung des Proteoglycangehalts bei Knorpel-Monokultur war weiterhin mit 0,61 Punkten nachweisbar.

**Tabelle 3.24: S/O multivariabel**

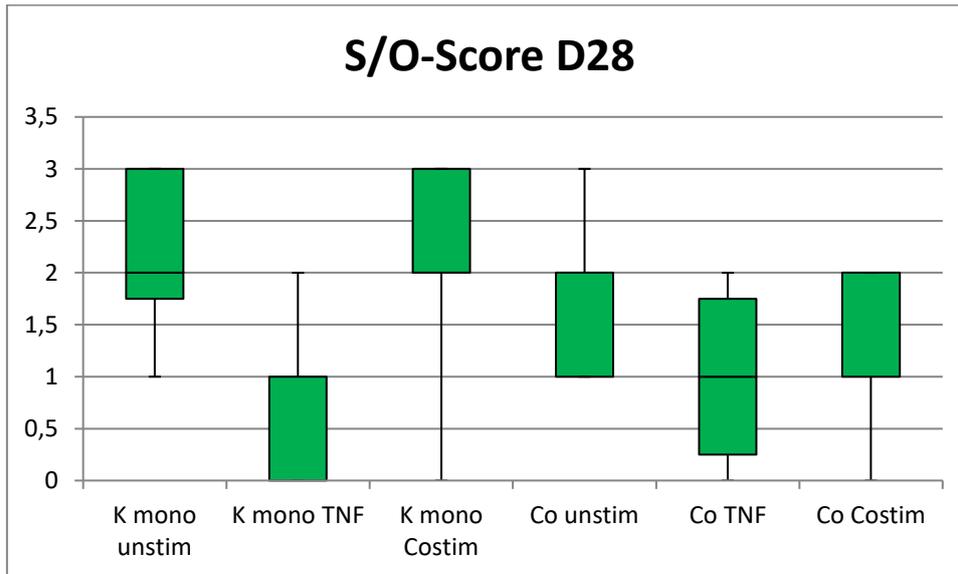
Variable	Schätzwert	Standardabweichung	t-Wert	p-Wert
Entität	-0,37	0,26	-1,46	0,15
Zeitpunkt	0,002	0,09	0,02	0,98
TNFmo	-0,60	0,18	-3,31	<b>&lt;0,01</b>
TNF + IL1	-0,37	0,17	-2,22	<b>0,03</b>
Alter	-0,01	0,01	-0,94	0,35
Geschlecht	0,06	0,27	0,24	0,81

Knorpel mono	0,61	0,19	3,30	<b>&lt;0,01</b>
--------------	------	------	------	-----------------

**Tab. 3.24: Multivariable Analyse des S/O-Scores. Ein negativer Schätzwert bedeutet einen um diesen Faktor geringeren S/O-Score. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.**

Die folgende Graphik veranschaulicht die gezeigten Werte mittels einer Darstellung des Proteoglycangehalts des Knorpels an Tag 28 abhängig von Mono- oder Co-Kultur und Stimulation.

**Abbildung 7: S/O-Score Tag 28**



**Abb. 7: Dargestellt ist der Wert des S/O-Scores an Tag 28 abhängig davon, ob eine Knorpel-Mono- oder eine Co-Kultur vorlag und von der Stimulation. Die Satelliten zeigen die Minimal- bzw. Maximalwerte an. Die Boxen des Boxplot-Diagramms stellen das erste bis dritte Quartil dar. Die horizontalen Striche in den Boxen stehen für den Median. Bei K mono TNF liegt der Median bei 0, bei K mono Costim bei 3, Bei Co unstim bei 2 und bei Co Costim bei 1.**

Deutlich zu sehen ist der höhere Proteoglycangehalt der Knorpel-Mono- im Vergleich zur Co-Kultur. Auch der negative Einfluss der Stimulation auf den Proteoglycangehalt wird deutlich, v.a. bei der mit TNF $\alpha$  stimulierten Knorpel-Monokultur. Es fällt auf, dass bei den unstimulierten Proben in keinem Fall ein S/O-Score von 0 erhoben wurde, bei den stimulierten Geweben jedoch schon, und zwar unabhängig davon, ob es sich um eine Mono- oder Co-Kultur handelte oder der Art der Stimulation.

### 3.3.3 CD68

#### 3.3.3.1 Univariate Analyse

Bei der Analyse der immunohistochemischen Auswertung wurde der mittlere Prozentwert berücksichtigt. In der Darstellung von CD68 fanden sich in der für Alter und Geschlecht bereinigten Analyse signifikante Zusammenhänge in Bezug auf die Parameter Zeitpunkt sowie Synovialis-Monokultur. Eine längere Kulturzeit hatte einen bei einem Schätzwert von -0,01

moderaten, aber hochsignifikanten negativen Einfluss auf die CD68-Expression, die Monokultur hingegen einen leicht positiven.

**Tabelle 3.25: CD68 univariat**

Variable	Schätzwert	Standardabweichung	t-Wert	p-Wert
Entität	0,02	0,02	0,70	0,48
Zeitpunkt	-0,01	0,005	-3,08	<b>0,003</b>
TNFmo	-0,02	0,01	-1,59	0,11
TNF + IL1	-0,003	0,01	-0,21	0,83
Synovialis mono	0,03	0,01	2,33	<b>0,02</b>

**Tab. 3.25: Univariate Analyse der CD68-Expression. Ein negativer Schätzwert bedeutet einen um diesen Faktor geringeren mittleren Prozentwert der Anfärbung des Markers CD68. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.**

### 3.3.3.2 Multivariable Analyse

In der multivariablen Analyse fanden sich noch beide Korrelationen, sie lagen allerdings unterhalb des Signifikanzniveaus, ebenso wie die übrigen untersuchten Variablen.

**Tabelle 3.26: CD68 multivariabel**

Variable	Schätzwert	Standardabweichung	t-Wert	p-Wert
Entität	0,01	0,02	0,51	0,61
Zeitpunkt	-0,01	0,006	-1,87	0,06
TNFmo	-0,01	0,01	-0,82	0,41
TNF + IL1	-0,004	0,01	-0,30	0,77
Alter	0,001	0,001	0,80	0,43
Geschlecht	0,02	0,02	0,85	0,40
Synovialis mono	0,009	0,02	0,55	0,58

**Tab. 3.26: Multivariable Analyse der CD68-Expression. Ein negativer Schätzwert bedeutet einen um diesen Faktor geringeren mittleren Prozentwert der Anfärbung des Markers CD68. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.**

### 3.3.4 CD55

#### 3.3.4.1 Univariate Analyse

Die CD55-Expression wurde in der univariaten Analyse lediglich durch den Erntezeitpunkt signifikant beeinflusst. Dabei bestand eine negative Korrelation, d.h. ein späterer Erntezeitpunkt verringerte die CD55-Expression leicht.

**Tabelle 3.27: CD55 univariat**

Variable	Schätzwert	Standardabweichung	t-Wert	p-Wert
Entität	0,005	0,02	0,30	0,76

Zeitpunkt	-0,01	0,004	-2,26	<b>0,04</b>
TNFmo	-0,01	0,01	-0,67	0,50
TNF + IL1	-0,01	0,01	-0,63	0,53
Synovialis mono	0,004	0,01	0,39	0,69

Tab. 3.27: Univariate Analyse der CD55-Expression. Ein negativer Schätzwert bedeutet einen um diesen Faktor geringeren mittleren Prozentwert der Anfärbung des Markers CD55. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

### 3.3.4.2 Multivariable Analyse

Die signifikant negative Korrelation des Erntezeitpunktes mit der CD55-Expression konnte in der multivariablen Analyse bestätigt werden. Alle weiteren Variablen wiesen keine signifikante Korrelation mit der Expression von CD55 auf.

Tabelle 3.28: CD55 multivariabel

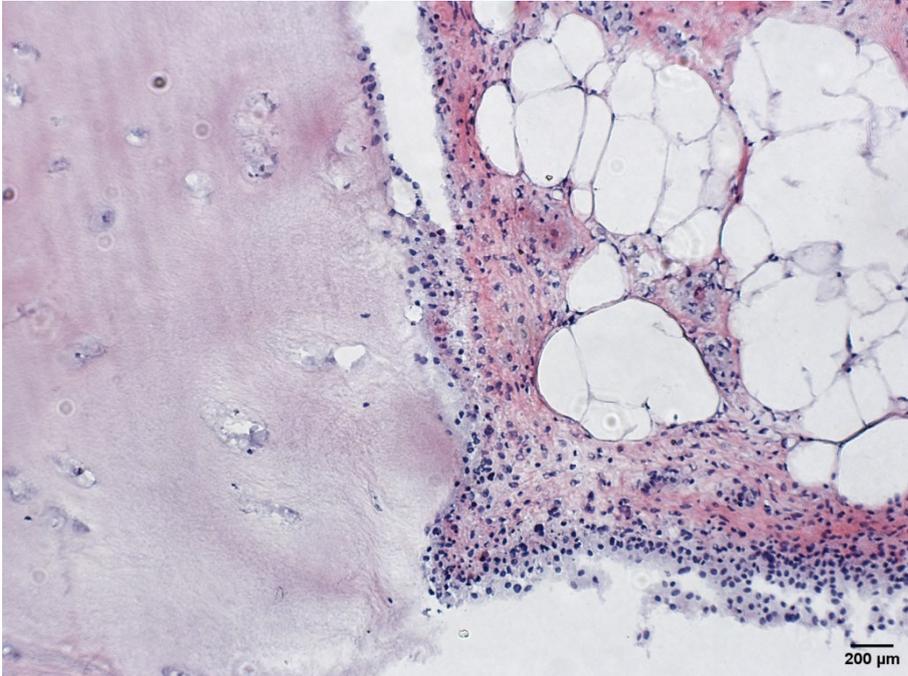
Variable	Schätzwert	Standardabweichung	t-Wert	p-Wert
Entität	0,00480959	0,02	0,30	0,77
Zeitpunkt	-0,01	0,01	-2,15	<b>0,03</b>
TNFmo	-0,01	0,01	-0,61	0,54
TNF + IL1	-0,004	0,01	-0,34	0,73
Alter	0,001	0,001	0,71	0,48
Geschlecht	-0,02	0,02	-1,21	0,23
Synovialis mono	-0,01	0,01	-1,00	0,32

Tab. 3.28: Multivariable Analyse der CD55-Expression. Ein negativer Schätzwert bedeutet einen um diesen Faktor geringeren mittleren Prozentwert der Anfärbung des Markers CD55. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

## 3.4 Interaktion von Knorpel und Synovialis

In einigen Fällen konnte eine Interaktion zwischen Knorpel- und Synovialisgewebe im Sinne einer Adhäsion oder sogar Invasion von synovialen Zellen in den Knorpel beobachtet werden. Abbildung 8 zeigt die Adhäsion synovialer Zellen an die zugewandte Knorpeloberfläche.

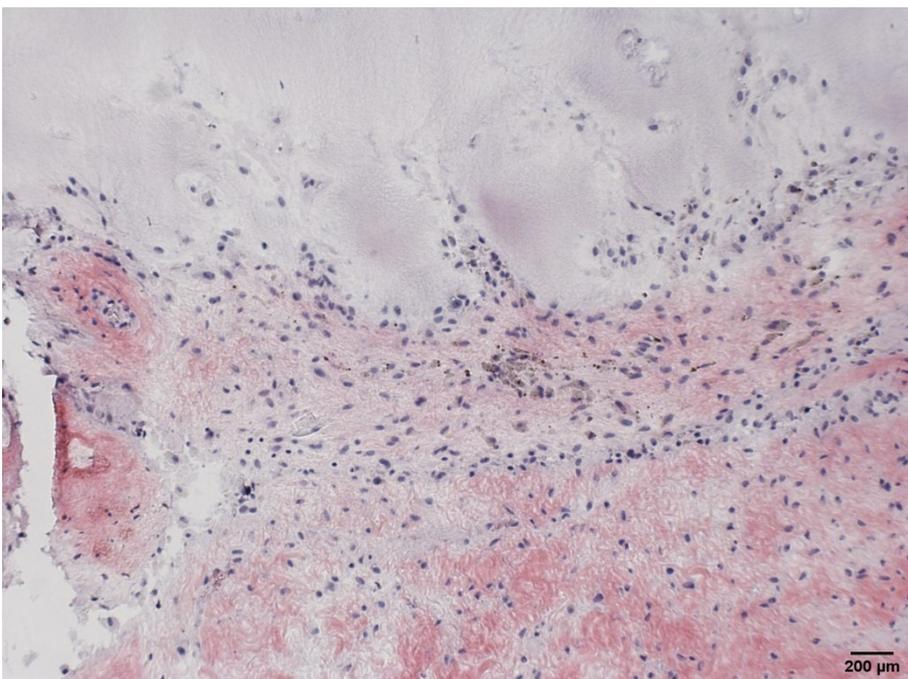
**Abbildung 8: Adhäsion**



**Abb. 8: HE, Vergrößerung 100x. Adhäsion synovialer Zellen an den Knorpel.**

In Abbildung 9 ist demgegenüber bereits eine Invasion des Knorpels vonseiten der Synovialis zu erkennen.

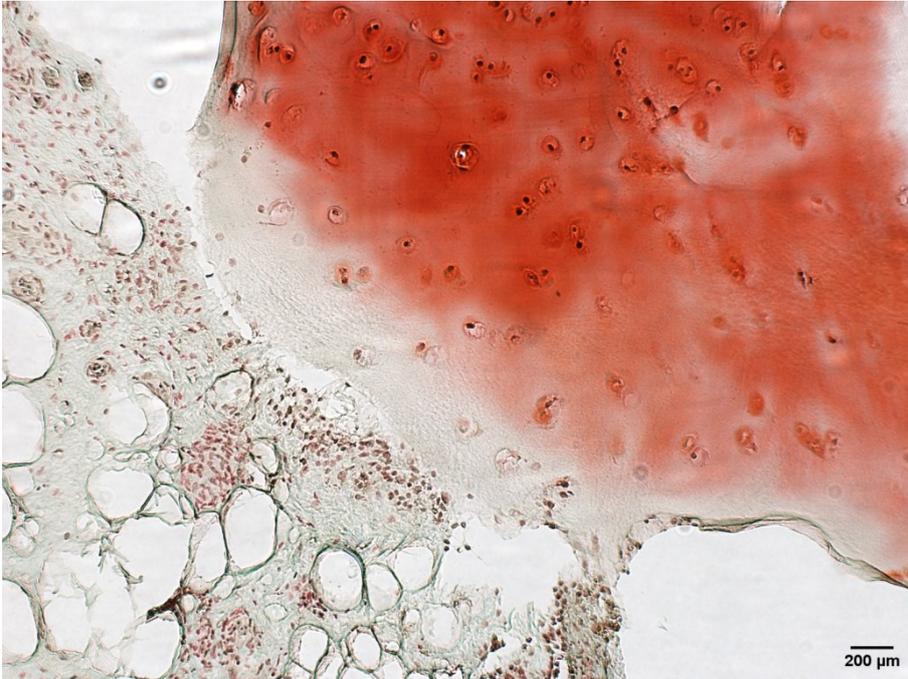
**Abbildung 9: Invasion**



**Abb. 9: HE, Vergrößerung 100x. Invasion synovialer Zellen in den Knorpel.**

In der S/O-Färbung (Abb. 10) ist ausgehend von der der Synovialis zugewandten Seite des Knorpels eine Abnahme des Proteoglycangehalts erkennbar. Dieses Muster zog sich durch die Auswertung der S/O-gefärbten Präparate, sofern Knorpel und Synovialis nah genug beieinander lagen.

**Abbildung 10: Proteoglycanverlust**



**Abb. 10: S/O, Vergrößerung 100x. Abnahme des Proteoglycangehalts des Knorpels an der Stelle, an der eine Interaktion mit der Synovialis auftritt.**

Deutlich zu erkennen ist weißer Knorpel mit geringem bis fehlendem Proteoglycangehalt mit Bezug zur Synovialis. An den Knorpelrändern ohne Kontakt zur Synovialis geht der Proteoglycanverlust langsamer vonstatten. Zentral ist der Proteoglycangehalt noch hoch.

In der immunhistochemischen Färbung sind Zelltypen dargestellt, die an der Adhäsion und Invasion beteiligt sind.

Abbildung 11: CD55

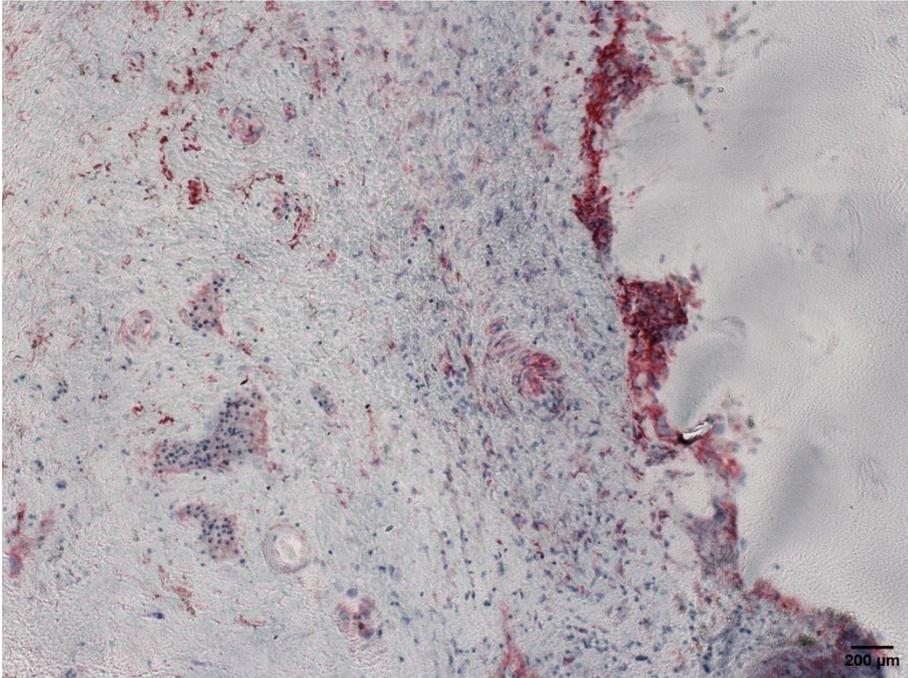


Abb. 11: CD55, Vergrößerung 100x. Die CD55-positiven Zellen sind an der Adhäsion beteiligt.

Abbildung 12: Invasion CD68

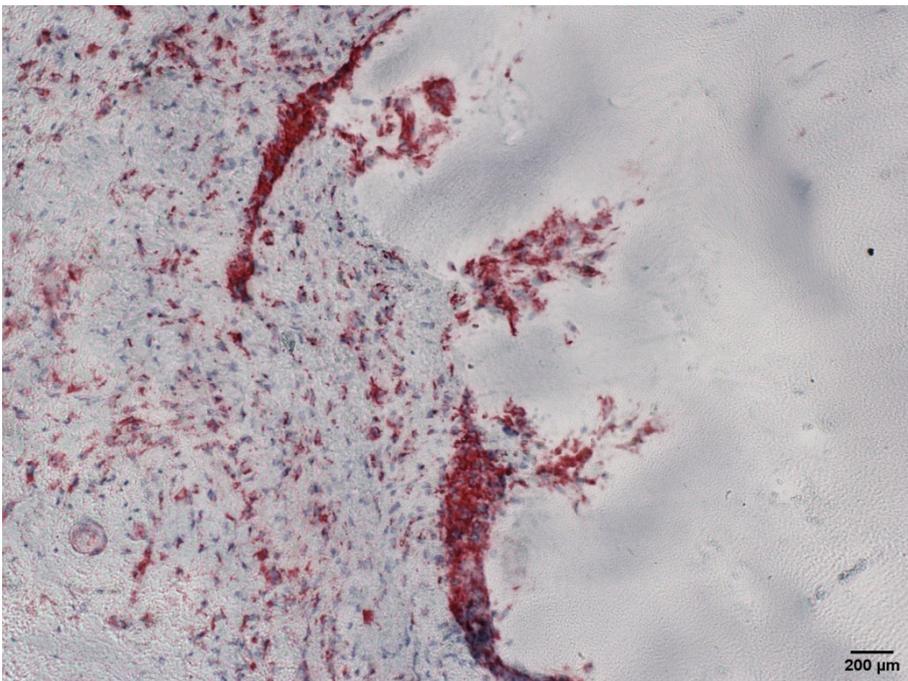


Abb. 12: CD68, Vergrößerung 100x. Die CD68-positiven Zellen der Synovialis sind weniger an der Adhäsion und mehr an der Invasion in den Knorpel beteiligt.

In den Abbildungen 11 und 12 sind CD55- bzw. CD68-exprimierende Zellen dargestellt. Diese sind jeweils rot angefärbt. Bei den CD55-positiven Zellen handelt es sich um synoviale Fibroblasten, bei den CD68-exprimierenden Zellen vorrangig um Makrophagen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung eines einfachen, humanen chondrosynovialen Explantationsmodells

#### 4.1.1 Zusammenfassung Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines humanen chondrosynovialen Explantationsmodells als *in vitro*-Modell zur Simulation des Destruktionsprozesses bei RA und OA sowie die Untersuchung von Auswirkungen der Kultur auf die beiden Gewebetypen und den Einfluss der Ursprungs-Entitäten RA und OA. Die Kultur der Gewebe nach dem beschriebenen Protokoll konnte für bis zu 42 Tage aufrechterhalten werden. Es konnte eine Gewebeschädigung mit zunehmender Kulturdauer beobachtet werden. So fand sich in nahezu allen Analysen eine Abnahme der untersuchten Parameter. Der Krenn-Score einschließlich seiner Teil-Scores sowie die CD55- und CD68-Expression stehen hierbei für eine Abnahme der Zellzahl über die Zeit, der abnehmende Proteoglycangehalt für eine Schädigung auch der Gewebematrix. Anhand von gemischten linearen Modellen konnte gezeigt werden, dass die Gewebeschädigung in der Co-Kultur von Knorpel und Synovialis stärker ausgeprägt war als in der Monokultur. So zeigte sich eine signifikant größere Abnahme des Proteoglycangehalts in der Co-Kultur im Vergleich zur Knorpel-Monokultur. Bezüglich der Synovialis fand sich ein Trend hin zu höheren Krenn-Scores, v.a. auf den Sub-Score *lining layer* bezogen, in der Synovialis-Monokultur. Ebenso war die Expression von CD68 in der Monokultur höher. In Verbindung mit mikroskopischen Beobachtungen von Invasion von Synovialis in den Knorpel kann somit auf eine Interaktion der beiden Gewebetypen geschlossen werden. Bezüglich der Stimulation fand sich interessanterweise lediglich für den Proteoglycangehalt eine signifikante Abnahme bei Stimulation der Gewebe mit TNF $\alpha$  bzw. TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Im Folgenden werden diese Ergebnisse sowie Limitierungen des Modells und deren mögliche Ursachen diskutiert.

#### 4.1.2 Modell

Es handelt sich hierbei um das erste Modell, das die Interaktion von menschlichem Knorpel und Synovialisgewebe desselben Patienten unter kulturellen Bedingungen mit und ohne unterschiedliche Stimulation untersucht. In bisherigen Arbeiten wurden lediglich tierische Modelle bzw. die Kultur von bovinem Knorpel mit humanen synovialen Fibroblasten [85], jedoch nicht mit Synovialis untersucht. Insofern ist der Ansatz innovativ und herausfordernd. Durch eine große Standardisierung entstand ein einfaches, zu verschiedenen Zwecken abwandelbares Modell.

##### 4.1.2.1 Probengewinnung

Aufgrund der Verfügbarkeit und Praktikabilität wurden lediglich Proben aus Hüft- und Kniegelenken untersucht. Nur diese Lokalisationen boten eine ausreichende Menge an

Material. Zudem sind Hüfte und Knie die Gelenke, die am häufigsten endoprothetisch ersetzt werden. Gerade an diesen Gelenken der unteren Extremität ist die mechanische Belastung jedoch im Gegensatz zu beispielsweise Fingergelenken sehr hoch, was das Auftreten einer OA [5], ggf. zusätzlich zu einer bereits bestehenden RA, begünstigt. Ebenso trägt der Umstand, dass bei einer bereits bestehenden Notwendigkeit des Gelenkersatzes bereits ein spätes Erkrankungsstadium vorliegt, zu einer erhöhten Koinzidenz der beiden Entitäten bei.

Eine Stärke der vorliegenden Studie ist, dass standardisiert Knie- und Hüftgelenke untersucht worden sind und Proben aus zumindest makroskopisch geeigneten Arealen entnommen wurden, statt „blind“ und zufällig entnommener Biopsien. Die makroskopische Beurteilung der Proben diente dazu, die Ausbeute zu erhöhen, indem möglichst intaktes, für die weiteren Untersuchungen geeignet erscheinendes Gewebe entnommen wurde. Diese Eignung konnte mikroskopisch jedoch nicht in jedem Fall bestätigt werden, was eine teilweise hohe Rate an nicht auswertbarem Gewebe, vor allem Synovialis, erklärt, da beispielsweise lediglich periartikuläres Fettgewebe statt Synovialis vorhanden war oder das Gewebe durch Entnahme, Transport und Verarbeitung mechanisch bereits stark beansprucht war. Der Gesamt-Krenn-Score konnte lediglich in 45% der Fälle erhoben werden, was hauptsächlich auf das Fehlen eines abgrenzbaren *lining layer* zurückzuführen war. Somit gilt die gleiche Prozentangabe für den Subscore *lining layer*. Die Teilscores Infiltrate und Zelldichte konnten in 72% bzw. 70% erhoben werden. Der S/O-Score konnte in 96% erhoben werden. Mindestens eine ROI in der CD55-Anfärbung konnte in 42% untersucht werden, in der CD68-Anfärbung in 46% (Angaben auf ganze Prozentzahlen gerundet).

#### 4.1.2.2 Kultur

Beim Ansetzen der Kulturen wurde das vorhandene Gewebe nochmals makroskopisch auf seine Qualität und voraussichtliche Eignung geprüft. Jedoch konnte auch die doppelte Kontrolle nicht sicher gewährleisten, dass das Gewebe auch zur histologischen Auswertung geeignet war. Zu diskutieren wäre, ob es praktikabel und sinnvoll wäre, repräsentative Gewebeprobe vorher auch mikroskopisch auf ihre Eignung hin zu untersuchen. Jedoch müssten die Proben hierfür zunächst schockgefroren und anschließend behutsam auf die Schneidetemperatur von  $-25^{\circ}\text{C}$  gebracht werden. Anschließend wäre eine Fixierung der Schnitte auf den Objektträgern und eine HE-Färbung notwendig. All dies kostet jedoch Zeit, in der sich die Qualität des unverarbeiteten Gewebes kontinuierlich verschlechtert. Außerdem wäre dennoch nicht gewährleistet, dass die übrigen Proben ebenso geeignet sind, da die Zusammensetzung der Synovialis und deren Qualität auch innerhalb eines Probanden bisweilen stark differierte. Eine weitere mögliche Lösung wäre es, gerade wenn lediglich kleine geeignet erscheinende Synovialisproben eines Probanden vorliegen, mehrere hiervon gemeinsam in einem Ansatz zu kultivieren. Dies würde die Wahrscheinlichkeit erhöhen,

auswertbare Anschnitte zu gewinnen. In unserer Untersuchung lag jedoch selten ein Überschuss an Synovialisgewebe vor, sodass wir diese Möglichkeit nicht explorieren konnten.

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, für jeden Ansatz auswertbares Material zu erhalten, wurden, wenn seitens der Materialausbeute möglich, Doppelansätze gefertigt. Das heißt, dass von den Mono- und Co-Kulturen, die unterschiedlich stimuliert wurden und an einem bestimmten Tag geerntet werden sollten, möglichst zwei Ansätze pro Kultur, Stimulation und Erntezeitpunkt angelegt wurden. Da für den ersten Ansatz (a) das besser geeignet erscheinende Probenmaterial verwendet wurde, waren viele Proben in Ansatz b aufgrund der schlechten Gewebequalität nicht auswertbar. Aus diesem Grund und weil aus Mangel an ausreichend Probenmaterial nicht in allen Fällen zwei Ansätze angelegt werden konnten, beschränkte sich die finale Auswertung schließlich auf den Ansatz a.

Zu Beginn der Studie wurde beim zweitäglichen Wechsel des Kulturmediums das komplette Volumen ausgetauscht. Dabei wurden jedoch in den Co-Kulturen die Synovialis- und Knorpelfragmente akzidentell voneinander abgehoben, sodass die zu untersuchende Interaktion derselben bei jedem Mediumwechsel gestört wurde. Nach den ersten mikroskopischen Analysen wurde das Vorgehen deshalb angepasst und es wurde nur das halbe Volumen des Nährmediums ersetzt. Hierdurch kam es nicht mehr zu einer Trennung der Gewebe während des Mediumwechsels. In Bezug auf die mehrjährige Krankheitsdauer *in vivo* war die Kulturdauer von maximal 42 Tagen sehr kurz, jedoch wurden während dieses Zeitraums konstante Bedingungen und Konzentrationen an Entzündungsmediatoren eingehalten. Einschränkend muss erwähnt werden, dass sich die Qualität des Gewebes proportional mit zunehmender Kulturdauer verschlechterte. Das Gewebe wurde fragil und riss bei der weiteren Verarbeitung ein oder die Zellularität des Gewebes sank. Dabei handelt es sich um eine interessante Erkenntnis, da bisher vor allem einzelne Gewebe kultiviert worden sind und dies die erste Studie ist, in der Synovialis- und Knorpelgewebe desselben Patienten gemeinsam kultiviert und stimuliert wurde (Vgl. [89]) und somit auch die Schwierigkeiten einer solchen Co-Kultur aufgedeckt werden können. Der Grund für diese Veränderungen kann an den hohen Konzentrationen der Entzündungsmediatoren bei den stimulierten Ansätzen sowie der trotz allem unphysiologischen Umgebung für die Gewebe liegen. Hier liegt ein Ansatzpunkt für weitere Forschungsarbeit, um mit Anpassungen der äußeren Bedingungen die Kulturdauer und damit die Aussagekraft des Modells für die Bedingungen *in vivo* zu erhöhen. Ein Ansatz hierzu ist in der Studie von *Schultz* [89] beschrieben, in der ein Modell zur kontinuierlichen Perfusion der Kulturen beschrieben wird, mit dem eine Kulturdauer von bis zu zehn Wochen ermöglicht wurde. In der Studie wurden die Gewebe allerdings lediglich ernährt; eine Stimulation mit Entzündungsmediatoren wie in der vorliegenden Arbeit blieb aus. Dennoch wäre eine Kombination beider Verfahren, ggf. verbunden mit einer Reduktion der Konzentration der Entzündungsmediatoren, ein vielversprechender Ansatz für weitere

Untersuchungen. Ebenfalls in der Studie von *Schultz et al.* [89] wurde die Vitalität der Gewebe anhand des Vorhandenseins oder Fehlens von Nekrosen beurteilt. Auf eine solche explizite Auswertung von Nekrosen wurde hier verzichtet. Allerdings könnte die erniedrigte Zelldichte mit zunehmender Kulturdauer einen Anhalt für Nekrosen und somit eine verringerte Vitalität der Synovialis bieten.

In einem Modell wie dem vorliegenden kann aus praktischen Gründen nicht das komplexe Zusammenspiel physiologischer Entzündungsmediatoren abgebildet werden, was auch nicht Zweck eines möglichst einfach zu haltenden Modells zur Bereitstellung von entzündlich verändertem Gewebe zu weiteren Untersuchungszwecken ist. Wir beschränkten uns auf zwei für die Pathogenese der RA stark relevante Mediatoren, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  [7, 8, 36, 47, 85, 88], und kombinierten diese. Dies wurde verglichen mit der Kultur von unstimuliertem Gewebe, um den Effekt der intrinsischen Mediatoren sowie der Kultur an sich auf die Reaktion der Gewebe beurteilen zu können. Insofern sind sowohl Vorteile des einfachen und standardisierten Modells zu verzeichnen als auch Nachteile, die sich aus der Vereinfachung ergeben. Da das Modell das erste seiner Art und somit gewissermaßen ein Prototyp ist, wurde die Anzahl der Proben mit 19 sehr gering gewählt. Dies hatte den Zweck, zunächst mit überschaubarem Aufwand die generelle Durchführbarkeit zu überprüfen. So konnten auch noch nach der Auswertung eines Teils der Proben Optimierungen vorgenommen werden, beispielsweise wie oben erwähnt der Austausch nur der Hälfte des Kulturmediums, um die Gewebefragmente nicht unbeabsichtigt zu trennen und so eine Interaktion zu verhindern. Auf der anderen Seite ergeben sich aus einer relativ kleinen Stichprobe auch Nachteile, was die statistische Auswertung, Aussagekraft und Übertragbarkeit angeht. So verfehlten einige Berechnungen nur knapp die Signifikanz, was bei einer größeren Stichprobe womöglich eindeutigere Ergebnisse in die eine oder andere Richtung ergeben hätte.

### 4.1.3 Färbungen und Auswertung

#### 4.1.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ist eine einfache, zeit- und kosteneffiziente Standardfärbung. Trotz teilweise leicht unterschiedlicher Färbeintensität der Gewebe ist sie aufgrund der stets möglichen Differenzierung zwischen Zellkernen und Cytoplasma und Kollagenfasern auswertbar und vergleichbar. Sowohl innerhalb eines Gewebes als auch teilweise innerhalb eines Präparates war die Qualität der Synovialis sehr unterschiedlich. Wenn dies der Fall war, wurde ein möglichst repräsentatives Areal ausgewählt. In einigen Fällen enthielt das komplette Präparat lediglich Fett- oder azelluläres Bindegewebe, sodass keine Auswertung möglich war.

Mittels der HE-Färbung wurde zum einen der Krenn-Score [9] erhoben, der als bisher einziger Score zur Quantifizierung der entzündlichen Aktivität der Synovialis gilt. Dieser wurde immer durch dieselbe Person erhoben. In der Originalpublikation [9] wird von einer Intra-Beobachter-

Reproduzierbarkeit von 72% ausgegangen. Dieser Wert wurde in der vorliegenden Arbeit in Stichproben deutlich überschritten. Die Inter-Beobachter-Reproduzierbarkeit von 83% in der Arbeit von Krenn wurde als hinreichend hoch erachtet, sodass hier darauf verzichtet wurde. Es ist davon auszugehen, dass bei aller Subjektivität des Krenn-Scores die Abweichung immer in dieselbe Richtung geht, wenn die Auswertung immer durch dieselbe Person erfolgt, sodass die Vergleichbarkeit innerhalb der Studie gewährleistet bleibt. In zurückliegenden Studien wurde außerdem bereits gezeigt, dass das Erlernen der Anwendung des Scores anhand von Beispielbildern auch für Ungeübte einfach ist und sich hohe Übereinstimmungen mit den Scores von Krenn ergeben [101]. In der univariaten Analyse des Krenn-Scores und aller Teil-Scores ergab sich eine signifikante Abnahme des Gesamt- bzw. der Teil-Scores mit zunehmender Kulturdauer. In der multivariablen Analyse konnte dies bis auf den Teil-Score *lining layer* bestätigt werden. Sowohl in der uni- als auch in der multivariablen Analyse fand sich bei OA-Präparaten ein höherer Anteil an Infiltraten als bei RA-Präparaten. In Kapitel 4.1.4 wird näher auf diesen scheinbaren Widerspruch eingegangen.

Zum anderen diente die Standardfärbung der generellen Übersicht des Gewebes. Anhand dieser wurde so auch die Interaktion von Knorpel und Synovialis beurteilt. In unserer Stichprobe konnte nur in wenigen Fällen eine Invasion von synovialen Zellen in den Knorpel beobachtet werden. Dies mag außer an der kleinen Stichprobe auch an den bereits zuvor genannten Gegebenheiten liegen, dass bei einigen Geweben anfangs Synovialis und Knorpel bei jedem Mediumwechsel voneinander getrennt wurden. Auch die unphysiologische Umgebung könnte eine Rolle spielen. Ebenso hierzu beigetragen haben dürfte der Umstand, dass die Orientierung der Gewebe zueinander nicht immer der im Gelenk entsprach. Wenn davon ausgegangen wird, dass die Invasion von Zellen des *lining layers* ausgeht, war in einigen Fällen gar keine Interaktion der beiden Gewebe möglich, da das *lining layer* dem Knorpel abgewandt war. Dies war der Fall, da makroskopisch nicht die Orientierung beurteilt werden kann. Eine vorherige mikroskopische Untersuchung kostet zum einen Zeit, in der die Qualität des unverarbeiteten Gewebes sinkt, zum anderen wird die ohnehin knappe Menge verfügbaren Materials reduziert und schließlich ist in einer dreidimensionalen Probe die Orientierung nicht anhand eines Schnittes sicher für die restliche Probe vorhersagbar. In einer Studie von *Tolboom et al.* [102] konnte gezeigt werden, dass Synoviozyten von RA-Patienten ein signifikant höheres Potential zur Invasion haben als die von OA-Patienten. Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Untersuchung, bei allerdings sehr geringer Fallzahl, nicht beobachtet werden. Eine Invasion trat sowohl bei RA als auch bei OA auf. In der genannten Studie wurde jedoch die Invasion isolierter synovialer Fibroblasten in eine Gel-Matrix untersucht. Somit ist keine direkte Vergleichbarkeit zu den Bedingungen *in vivo* sowie zu den in der vorliegenden Arbeit gegeben. Allerdings wurden die Ergebnisse mit radiologischen Aufnahmen der Patienten verglichen, wobei festgestellt wurde, dass bei den

Patienten mit hoher Invasivität auch radiologisch ein höherer Grad an Gelenkdestruktion vorhanden war, was eine Übertragbarkeit auf die Klinik nahelegt.

#### 4.1.3.2 Safranin-O-Lichtgrün-Färbung

In der univariaten, also nur für Alter und Geschlecht adjustierten Analyse zeigten sich signifikante Ergebnisse in Bezug auf den semiquantitativ bestimmten Proteoglycangehalt des Knorpels für die Faktoren Zeitdauer der Kultur, Monostimulation mit TNF $\alpha$  und Knorpel-Monokultur. Je länger das Gewebe kultiviert wurde, desto geringer war der Proteoglycangehalt. Eine Monostimulation mit TNF $\alpha$  verringerte ebenfalls signifikant den Proteoglycangehalt. Im Gegensatz dazu schien eine Knorpel-Monokultur einen protektiven Effekt zu haben; der Proteoglycangehalt war deutlich erhöht. In der multivariablen Analyse zeigte sich keine Signifikanz mehr für einen erniedrigten Proteoglycangehalt nach Zeitdauer der Kultur. Sowohl die Monostimulation mit TNF $\alpha$  als auch die Costimulation mit TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  verringerten den Proteoglycangehalt signifikant. Bestätigt werden konnte die hochsignifikante Erhöhung des Proteoglycangehalts bei Knorpel-Monokultur. Setzt man einen geringeren Proteoglycangehalt gleich mit zunehmender Degradation des Knorpels, ergibt sich hieraus vor allen Dingen, dass die Synovialis bzw. Faktoren hieraus zu einer vermehrten Knorpeldegradation führen. Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Arbeitsgruppe von *Wang et al.* 2018 [103]. Hier wurde ein Effekt der Synovialis auf den Gelenkknorpel bei OA festgestellt. Einschränkung ist eine nicht 1:1 zu gewährleistende Übertragbarkeit zu erwähnen, da Wang et al. sich mit einem Rattenmodell befassten. Hier liegt wiederum eine Stärke der vorliegenden Studie, da es sich wie bereits erwähnt um die erste Studie dieser Art handelt, die die Zusammenhänge und Wechselwirkungen von Knorpel und Synovialis in einem humanen Modell untersucht. Erwartungsgemäß sorgte eine Stimulation mit Entzündungsmediatoren sowohl einzeln als auch in Kombination für eine Knorpeldegradation. In der univariaten Analyse war eine längere Kulturdauer mit einem höheren Proteoglycanverlust assoziiert, was zunächst logisch erscheint, jedoch in der multivariablen Analyse nicht bestätigt werden konnte. Die Gründe hierfür müssten gesondert evaluiert werden, da sich auch in den übrigen Färbungen zumindest ein Trend hin zur Verschlechterung der Gewebequalität und somit einem niedrigeren Krenn-Score sowie einer verminderten Expression von CD55 und CD68 mit zunehmender Kulturdauer zeigte. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass das Knorpelgewebe äußeren (mechanischen) Einflüssen gegenüber stabiler ist als das fragile Synovialisgewebe und somit eine Degradation weiterer Faktoren bedarf. Die Synovialis wurde bei zunehmender Kulturdauer fragil und brüchig, was auf den Knorpel weniger zutraf; das Gewebe blieb stets im Verbund bestehen, was sicherlich auf die physiologisch höhere mechanische Belastbarkeit von Knorpel zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zum Krenn-Score bei der HE-Färbung der Synovialis existiert bisher kein Score zur Quantifizierung des Proteoglycangehalts des Knorpels in der S/O-Färbung. Der

Einfachheit halber wurde hier ein vierstufiger, semiquantitativer Score ähnlich des Krenn-Scores verwendet. Fehlender Proteoglycangehalt entsprach dem Score 0, geringer 1, moderater 2 und hoher Proteoglycangehalt 3. Aufgrund der Größe der Knorpelfragmente und des je nach Färbung leicht unterschiedlichen Rottons/ der unterschiedlichen Rotintensität war ohne größeren technischen Aufwand, der für ein möglichst einfaches Modell nicht gewünscht ist, keine standardisierte, computergestützte Auswertung mittels eines Bildbearbeitungsprogramms wie bei den immunhistochemischen Färbungen möglich. Wenn die Knorpelfragmente sehr groß waren und mehrere Gesichtsfelder unter dem Mikroskop ausfüllten, fand sich teilweise ein sehr heterogener Proteoglycangehalt. In diesen Fällen wurde durch den Untersucher eine möglichst repräsentative Region ausgewählt, was jedoch immer auch eine gewisse Subjektivität beinhaltet. Diese wurde dadurch ausgeglichen, dass die Auswertung stets durch den gleichen Untersucher erfolgte. Stichprobenartige Qualitätskontrollen ergaben eine fast einhundertprozentige Intra-Beobachter-Reproduzierbarkeit.

Insgesamt war die S/O-Färbung fehleranfälliger als die HE-Färbung und Unterschiede in der Qualität der Anfärbung führten eher zu Problemen bei der Auswertung. Sofern Zweifel bestanden, wurde die Färbung für die entsprechenden Präparate wiederholt. Die Probleme äußerten sich in je nach Färbvorgang unterschiedlichen Rottönen und -intensitäten des proteoglycanhaltigen Knorpels sowie in der Anfärbung der proteoglycanfreien Bereiche. Diese sollten durch den Farbstoff Lichtgrün grünlich-türkis angefärbt werden, stellten sich allerdings in einigen Fällen, auch bei sicher fehlendem Proteoglycangehalt, z. B. bei Betrachten der Synovialis in der Co-Kultur, weiß dar. Positiv hervorzuheben ist, dass der Knorpel fast immer beurteilt werden konnte und die Hauptfehlerquelle darin lag, dass makroskopisch fälschlicherweise Synovialis- für Knorpelgewebe gehalten wurde und sich somit die Auswertung in wenigen Fällen erübrigte.

#### 4.1.3.3 Immunhistochemische Färbungen

Es fand sich in der immunhistochemischen Färbung sowohl für CD55 (synoviale Fibroblasten) als auch für CD68 (Makrophagen) in der univariaten Analyse eine negative Korrelation der Expression dieser Marker abhängig von der Kulturdauer. In der multivariablen Analyse konnte dies lediglich für CD55 bestätigt werden. Dies deutet darauf hin, dass mit zunehmender Kulturdauer in einer experimentellen Umgebung, die nicht den natürlichen Verhältnissen im Gelenk entspricht, Zellen zugrunde gehen. Unterstützt wird diese Deutung des Ergebnisses durch die Beobachtung, dass auch in der HE-Färbung der Krenn-Score mit zunehmender Kulturdauer abnahm, was bei einer Stimulation mit Entzündungsmediatoren nicht intuitiv erscheint, da mit zunehmender Exposition die Inflammation zunehmen müsste. Jedoch ist eine mögliche Erklärung hierfür, dass die experimentellen Verhältnisse nicht den physiologischen Gegebenheiten entsprechen. Durch die unphysiologisch hohen Konzentrationen an TNF- $\alpha$

und IL-1 und die fehlende Substitution weiterer Faktoren über das Nährmedium hinaus wurde statt einer proportional zur Kulturdauer zunehmenden Inflammation ein Absterben der Zellen induziert. Die Auswahl der untersuchten Zelltypen entspricht den für die Diagnostik und Pathophysiologie bedeutsamsten Spezies. Synoviale Fibroblasten erlangen im Rahmen der Synovialitis die Fähigkeit zur Migration und Invasion des Knorpels und nehmen somit eine herausragende Rolle in der Pathogenese der RA ein [36, 52, 55-57, 96, 104]. Makrophagen hingegen sind bei vielen entzündlichen Prozessen beteiligt und sind speziell bei der RA als Marker für die Krankheitsaktivität und das Therapieansprechen, das in bestimmten Fällen anhand synovialer Biopsien beurteilt wird, etabliert [96, 105, 106].

Trotz der Verwendung eines standardisierten Testkits war die Immunhistochemie die fehleranfälligste Färbung in der vorliegenden Studie. Um mögliche Fehler zu erkennen und keine falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnisse zu produzieren, wurden von Anfang an konsequent in jeder Färbereihe Positivkontrollen mitgeführt. Dabei handelte es sich um Schnitte von Geweben, die bereits in früheren Versuchen verwendet wurden und das gesuchte Antigen nachweisbar exprimierten. Dadurch konnten Fehler in der Färbung oder Vorbehandlung der Proben in jedem Fall erkannt und schließlich identifiziert werden. Außerdem wurden für jeden Objektträger Negativkontrollen mittels Isotypenkontrollen bzw. Puffer (*Dako Antibody Diluent with background reducing components*) mitgeführt. Bei den primären Antikörpern handelte es sich um murine Antikörper gegen humanes CD55 bzw. CD68. Die Isotypkontrolle ist ebenfalls ein muriner Antikörper, der jedoch nicht gegen eine bestimmte Zielstruktur gerichtet ist und somit unspezifisch. Wichtig ist, dass der Antikörper derselben Spezies und Antikörperklasse entstammt wie der primäre Antikörper, dem er als Kontrolle dient, damit der sekundäre Antikörper, mithilfe dessen die Bindung an Strukturen in der Probe sichtbar gemacht wird, indem das Fluorochrom an ihn bindet, nicht nur an den primären Antikörper, sondern auch an den Kontroll-Antikörper bindet. Wenn Puffer als Negativkontrolle verwendet wird, dient dies dazu, Bindungen des Testkits an die Probe nachzuweisen [99].

Eine Zeitlang wurde zur Entwässerung der Schnitte nach der Fixierung in Paraformaldehyd eine doppelte Alkoholreihe verwendet, analog der Entwässerung nach der HE- bzw. S/O-Färbung. Auf die beiden anderen Färbungen hatte dies keinen Einfluss, jedoch wurden die beiden untersuchten Antigene in der immunhistochemischen Analyse nach dieser Vorbehandlung nicht angefärbt. In der Literatur gibt es widersprüchliche Ergebnisse zur Beeinflussung von immunhistochemischen Färbungen durch Alkoholreihen, wobei ein Maskieren der Epitope vermutet wird [107, 108]. Dieses konnte in der vorliegenden Arbeit nicht durch die Proteolyse mit Trypsin zur Wiederfindung der Epitope rückgängig gemacht werden. Präparate der gleichen Gewebe konnten jedoch angefärbt werden, wenn statt einer doppelten nur eine einfache aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung verwendet wurde.

Das Eindecken der Präparate mit einem wässrigen Medium war schwieriger und fehleranfälliger als das Eindecken nach den anderen Färbungen mit einem anderen Medium. Dieses Medium (*Roti-Histokitt*) ist jedoch nicht für wässrige Proben, wie sie bei der Immunhistochemie vorliegen, geeignet und konnte somit nicht verwendet werden. Die Objektträger mit den fertig angefärbten Schnitten durften vor dem Eindecken weder austrocknen noch zu feucht sein, da beides die Reaktion beeinflussen konnte. Auch die Zeit bis zur Trocknung und Aushärtung war deutlich länger als beim Eindecken mit *Roti-Histokitt*. All diesen Schwierigkeiten wurde versucht vorzubeugen, indem auf jedem Objektträger mit drei Schnitten je zwei Schnitte für die eigentliche Färbung verwendet wurden und der dritte für die Positiv- bzw. Negativkontrolle. War ein Schnitt nicht auswertbar, konnte in einigen Fällen der zweite herangezogen werden. Dennoch konnte, vor allem bei Problemen beim Eindecken, teilweise keine Auswertung erfolgen. Wenn noch ausreichend gefrorenes Gewebe zur Verfügung stand, wurde dieses im nächsten Zyklus erneut geschnitten, fixiert und gefärbt.

Bei der computergestützten Auswertung mittels *ImageJ* konnte das Verfahren im Gegensatz zur Auswertung der beiden anderen Färbungen mittels letztlich subjektiver Scores objektiviert werden. Allerdings ergaben sich auch hierbei Schwierigkeiten, die vor allem die Auswahl geeigneter Regionen (ROIs) bei eingeschränkter Gewebequalität oder kleinen Synovialisfragmenten betrafen. Die Auswahl der ROIs konnte sich in den Fällen nicht ausschließlich nach der Repräsentativität für das jeweilige Präparat richten, sondern es musste auch die Eignung des Gewebes berücksichtigt werden. Um mehrere (im Idealfall drei) ROIs pro Schnitt zu erhalten, musste das Synovialisfragment eine gewisse Größe haben und auf dieser gesamten Größe ein *lining layer* mit entsprechend erkennbarem *sublining* vorhanden sein. Die Größe bzw. Breite dieser Region war auch relevant, damit die ROIs sich nicht überlappten, was die Aussagekraft einschränken würde. Außerdem sollten möglichst wenig Gefäße und Risse im Gewebe vorliegen, die aufwändig von der Fläche subtrahiert werden mussten, um nur das tatsächlich vorhandene Gewebe zu untersuchen. All dies führte zu einer Reduktion der auswertbaren ROIs, sodass in vielen Fällen nicht wie geplant drei ROIs untersucht werden konnten, sondern nur eine oder zwei. Analog zur HE-Färbung, bei der Synovialis untersucht wurde, spielte auch hier im Gegensatz zum Knorpel die teils schlechte Gewebequalität bzw. das Vorliegen von Fett- oder zellarmem Bindegewebe anstelle von Synovialis eine Rolle, die die eher niedrige Rate an auswertbarem Gewebe erklärt.

#### 4.1.4 OA vs. RA

In der vorliegenden Studie wurden keine Unterschiede zwischen OA und RA bezüglich des Gesamt-Krenn-Scores festgestellt. Im Hinblick auf den Teilscore Infiltrate fanden sich sowohl in der uni- als auch in der multivariablen Analyse für OA sogar höhere Werte als für RA. Ebenso konnte kein Unterschied bezüglich des Proteoglycangehalts oder der Expression von CD55 bzw. CD68 zwischen OA- und RA-Präparaten festgestellt werden.

Diese Ergebnisse stehen zunächst einmal im Widerspruch zu Ergebnissen anderer, hier exemplarisch gegenübergestellter Studien, in denen ein höherer Krenn-Score bei RA im Vergleich zu OA [9, 96] bzw. eine höhere Zahl von CD68-exprimierenden Zellen im *sublining* [96, 97] festgestellt wurde. Es existieren jedoch eklatante Unterschiede bezüglich der Proben sowie deren Behandlung zwischen den zitierten und der vorliegenden Studie. In den Arbeiten von *Krenn et al.* [9] sowie *Kraan et al.* [97] wurden ausschließlich, in der Arbeit von *Mucke et al.* [96] zumindest teilweise Präparate aus Synovialisbiopsien bzw. Synovektomien untersucht. In einer Studie bleibt unklar, aus welchen Gelenken die Proben stammen [9], in einer weiteren stammen sie aus unterschiedlichen Gelenken der oberen und unteren Extremität [96] und in einer ausschließlich aus dem Kniegelenk [97]. Aufgrund der Verfügbarkeit und Praktikabilität wurden in der vorliegenden Studie lediglich Proben aus Hüft- und Kniegelenken untersucht, was zu einer diesbezüglichen Standardisierung beitrug, die hier hervorzuheben ist. Nur diese Lokalisationen boten, durch die Entnahme während Gelenkersatzoperationen, eine ausreichende Menge an Material. In der vorliegenden Studie, in der sowohl Knorpel als auch Synovialis desselben Probanden gemeinsam untersucht wurden, musste das humane Material in solchen Operationen entnommen werden, da nur so Knorpel und Synovialis entnommen werden konnten. In einem weiterhin bestehenbleibenden Gelenk würde die Entnahme v.a. des Knorpels dessen Funktion beeinträchtigen und die Entnahme wäre ethisch nicht vertretbar. Der Einfluss des Gelenks auf die Ausprägung der Synovialitis wurde bis dato noch nicht untersucht. Gerade an den großen Gelenken der unteren Extremität ist die mechanische Belastung im Gegensatz zu beispielsweise Fingergelenken sehr hoch, was das Auftreten einer OA [5], ggf. zusätzlich zu einer bereits bestehenden RA, begünstigt.

Eine weitere mögliche Ursache für die fehlenden Unterschiede zwischen RA und OA könnte in dem späten Krankheitsstadium begründet sein, das bei beiden Entitäten in dieser Studie betrachtet wurde, da schließlich nur Patienten untersucht wurden, bei denen bereits ein Gelenkersatz erforderlich war. Dies schließt auch eine mögliche Koinzidenz von RA und OA bei den untersuchten Patienten nicht aus, welche Unterschiede ebenfalls verkleinern würde. Beide Erkrankungen sind miteinander vergesellschaftet [23, 103, 109]. Das späte Erkrankungsstadium muss nicht von Nachteil sein, da es laut einer Arbeit von *Baeten et al.* [110] bis auf eine größere maximale Breite des *lining layers* bei später RA im Gegensatz zu früher RA bei gleicher Durchschnittsbreite keine signifikanten Unterschiede in der histologischen Auswertung gibt. In der Studie schien vor allem das Vorhandensein oder Fehlen eines Gelenkergusses ausschlaggebend für die entzündliche Aktivität zu sein. Dieser Faktor wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht erfasst. Auch bei der aktivierten OA kommt es wie oben erwähnt zur Entzündungsreaktion der Synovialis [111-116], was in der vorliegenden Arbeit belegt werden konnte und ebenfalls den fehlenden Unterschied zwischen den beiden Entitäten in Bezug auf den Krenn-Score erklären kann.

Ferner bleibt unklar, inwiefern Proben aus Synovialisbiopsien/ Synovektomien vergleichbar sind mit Proben, die im Rahmen von Gelenkersatzoperationen entnommen worden sind. Auch dies wurde bisher nicht explizit erforscht, jedoch könnte eine Studie von *Haywood et al.* [114] hier erste Hinweise liefern: In der Studie wurde Synovialis von 104 OA-Patienten untersucht. Die Proben wurden in 97 Fällen im Rahmen von Gelenkersatzoperationen und lediglich in sieben Fällen arthroskopisch gewonnen. Zur histologischen Beurteilung wurde ein Score herangezogen, der dem Krenn-Score sehr ähnlich ist und ebenfalls die Ausprägung des *lining layers*, der Zellularität im *sublining* sowie das Vorhandensein inflammatorischer Zellen beinhaltet. 68 von 104 Proben (rund 65%) wiesen eine moderate oder schwere Inflammation auf. Von den sieben arthroskopisch gewonnenen Proben wiesen jedoch nur zwei (rund 29%) eine moderate oder schwere Inflammation auf. Berücksichtigt man nur die bei Gelenkersatzoperationen gewonnenen Proben, ergibt sich somit bei 66 von 97 Proben ein Anteil von rund 68% mit moderater bis schwerer Entzündung. Trotz der geringen Fallzahl von sieben in der Arthroskopie-Gruppe ist ein eindeutiger Trend erkennbar hin zu einer ausgeprägteren Inflammation bei OA-Präparaten, die während Gelenkersatzoperationen entnommen werden im Gegensatz zu arthroskopisch gewonnenen. Dies ist ein möglicher Einflussfaktor für die Unterschiede zwischen der vorliegenden Studie und den vorgenannten mit abweichenden Ergebnissen und signifikant erhöhter entzündlicher Reaktion in RA- im Vergleich zu OA-Präparaten. Überdies wäre der hier postulierte Unterschied in der histologisch nachweisbaren inflammatorischen Reaktion je nach Art der Gewebeentnahme ein interessanter Ansatz für weitere Forschung. Da es sich um humane Proben handelt, die nur aufgrund sowieso notwendiger Eingriffe in die betreffenden Gelenke entnommen werden konnten, wäre auch zu diskutieren, ob nicht die Inflammation, die bei der OA zweifelsohne ebenfalls eine Rolle spielt [111-116], ausgeprägter ist bei Patienten, die einen Gelenkersatz benötigen als bei solchen, die sich einer Biopsie oder Synovektomie unterziehen.

Ein weiterer Grund für die Unterschiede zwischen den Studien liegt in der Kultivierung und Stimulation der Gewebe in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zur Untersuchung nativen Materials in vorherigen Studien. Bezüglich des Proteoglycangehalts des Knorpels beobachteten wir signifikante Unterschiede je nachdem, ob der Knorpel lediglich kultiviert oder auch stimuliert worden war. Sowohl die Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  als auch die Costimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  verringerten den Proteoglycangehalt sowohl in der uni- als auch in der multivariablen Analyse. Für die Synovialis und die Auswertung des Krenn-Scores sowie der Expression von CD55 und CD68 im *sublining* konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten Geweben festgestellt werden. Allerdings ist bei identischer Stimulation der Gewebe auch mit einer vergleichbaren Entzündungsreaktion zu rechnen.

Schließlich bleibt noch ein wichtiger Faktor zu erwähnen. In die vorliegende Studie wurden Patienten unabhängig von der Krankheitsdauer und der (medikamentösen) Vortherapie eingeschlossen. Insbesondere Therapeutika der RA (DMARDs und Glucocorticoide) dürften einen Einfluss auf die histologisch und immunhistochemisch dargestellte synoviale Entzündungsaktivität haben. Lediglich in der Veröffentlichung von *Kraan et al.* [97] wird eine Aussage zur medikamentösen Therapie der Studienpopulation getroffen. Es wurden nur Patienten eingeschlossen, die keine zytotoxischen DMARDs oder Glucocorticoide einnahmen. Dies steigert die entzündliche Aktivität v.a. der RA, wohingegen diese in der vorliegenden Studie durch die eventuelle Einnahme verschiedener DMARDs und Glucocorticoide unterdrückt werden konnte. Obwohl dies nicht explizit erhoben wurde, scheint eine verbreitete Einnahme dieser Medikamente in der Studienpopulation der vorliegenden Arbeit sehr wahrscheinlich, da vermutlich vor einem Gelenkersatz alle konservativen Maßnahmen bei den Probanden ausgeschöpft worden sind. Vor allem in Bezug auf den fehlenden Unterschied in der CD68-Expression im *sublining* sowie den höheren Anteil an Infiltraten bei OA-Patienten scheint die Erklärung mittels Medikation plausibel. In einer Arbeit von *Haringman et al.* [117] konnte gezeigt werden, dass der Anteil an CD68-positiven Makrophagen im *sublining* bei Therapieansprechen sinkt. Da diese auch einen Teil des entzündlichen Infiltrats ausmachen, kann so der scheinbare Widerspruch erklärt werden, dass in der vorliegenden Arbeit bei OA-Patienten signifikant mehr Infiltrate gefunden werden konnten als bei RA-Patienten. Bei vielen dieser kamen jedoch vermutlich DMARDs und Glucocorticoide zum Einsatz, sodass es histologisch zu weniger Infiltraten kam. Da sich die Infiltrate nicht ausschließlich aus Makrophagen, sondern v.a. aus eingewanderten Lymphozyten zusammensetzen, ist es durchaus plausibel, dass es lediglich im Krenn-Subscore Infiltrate zu einem signifikanten Ergebnis kam und nicht bei der CD68-Expression.

#### 4.1.5 Knorpeldegradation

In der vorliegenden Arbeit konnte in der multivariablen Analyse eine signifikante Abnahme des Proteoglycangehalts sowohl bei Monostimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  als auch bei Costimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  beobachtet werden. Im Gegenzug dazu hatte die Knorpel-Monokultur einen protektiven Effekt und der Proteoglycangehalt lag höher als in der Co-Kultur mit Synovialis. Hieraus lässt sich vermuten, dass Faktoren aus der Synovialis einen negativen Effekt auf den Proteoglycangehalt haben und zur Knorpeldegradation führen. Korrespondierend hierzu ist in der S/O-Färbung (Abb. 10) eine Abnahme des Proteoglycangehalts des Knorpels sichtbar, die von der Adhäsionsstelle der Synovialis ausgeht. Diese von der der Synovialis ausgehende Abnahme des Proteoglycangehalts konnte in der vorliegenden Studie häufig beobachtet werden. Auch wenn bei der geringen Probenzahl nicht auf die Gesamtsituation geschlossen werden kann, ist dies doch zumindest ein Hinweis darauf, dass die Adhäsion bzw. Invasion synovialer Zellen an den Knorpel einen Proteoglycanverlust bewirken könnte. Abbildung 11

zeigt CD55-positive Zellen, die den Knorpel nicht invadieren, aber maßgeblich an der Adhäsion beteiligt sind. Dies betrifft die rot angefärbten Zellen an der Grenze zum Knorpel. Die in den Knorpel eingewanderten Zellen sind in dieser Färbung hingegen nicht spezifisch angefärbt. Anders bei den CD68-positiven Zellen, die in Abbildung 12 dargestellt sind. Diese Zellen sind in dem abgebildeten Gewebe nicht nur an der Adhäsion, sondern auch an der Invasion in den Knorpel beteiligt. Zellen, die CD55 als Oberflächenmarker exprimieren, sind im genannten Kontext v.a. synoviale Fibroblasten, CD68-positive Zellen v.a. Makrophagen. Möglich wäre, dass die synovialen Fibroblasten die Knorpeloberfläche so weit degradieren, dass die weiteren Zellen überhaupt erst eindringen können. Diese Hypothese wird gestützt durch die bereits 1986 von *Okada et al.* beobachtete und seither immer wieder bestätigte Tatsache, dass aktivierte synoviale Fibroblasten Metallo-Proteinasen sezernieren [7, 8, 36, 118-121]. Weitere Zellen wie Makrophagen könnten somit in den Knorpel eindringen und dort ihrerseits für eine weitere Degradation sorgen. In der Literatur wird betont, dass Makrophagen im Kontext der RA verschiedene Funktionen erfüllen, teilweise sogar antiinflammatorische [48, 122-124]. Deren Präsenz in der Synovialis korreliert mit radiologisch nachweisbaren Erosionen [123]. Sie produzieren u.a. TNF $\alpha$  und IL-1, Zytokine, die an der Entstehung und Aufrechterhaltung der RA maßgeblich beteiligt sind und deren Hemmung eine Reduktion der Krankheitsaktivität zur Folge hat [123]. IL-1 induziert außerdem Matrix-Metallo-Proteinasen, die eine Destruktion der Knorpel- und Knochenmatrix bewirken [123]. Es besteht außerdem eine enge Verbindung zwischen synovialen Fibroblasten und Makrophagen. Makrophagen aktivieren mittels der Sekretion von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  synoviale Fibroblasten, sodass diese knorpel- und knochendegradierende Eigenschaften entwickeln und die aktivierten Fibroblasten wiederum aktivieren ihrerseits wieder Makrophagen, sodass der proinflammatorische Zustand sich selbst unterhält [123, 125]. Wahrscheinlich ist, dass hier nur eine Momentaufnahme dargestellt ist und sowohl synoviale Makrophagen als auch Fibroblasten mittels der genannten Mechanismen an der Knorpel- und letztlich auch Knochendegradation und -invasion beteiligt sind. Die Literatur konzentrierte sich bislang vor allem auf synoviale Fibroblasten als Hauptakteure der RA und Knorpeldegradation [85, 88, 104, 118, 121, 126-129]. Kürzlich sind jedoch Makrophagen in den Fokus der RA-Forschung gerückt und ihre große regulatorische Bedeutung wird zunehmend erkannt [48]. Es gibt Hinweise darauf, dass Makrophagen unterschiedlichen Ursprungs unterschiedliche Funktionen im Hinblick auf inflammatorische Reaktionen haben. Bezogen auf die Arthritis scheinen ortsständige Makrophagen eine gewisse Barrierefunktion zwischen synovialen Kapillaren und der Gelenkhöhle innezuhaben und somit antiinflammatorische Effekte zu entfalten. Im Rahmen einer Arthritis bricht diese Barriere zusammen. Eingewanderte Makrophagen hingegen tragen zur Inflammation bei. [48]

Eine zeitabhängige Abnahme des Proteoglycangehalts konnte lediglich in der univariaten Analyse festgestellt werden. Die Beobachtung, dass eine Kultur gemeinsam mit Synovialis zu einer Abnahme des Proteoglycangehalts führt, machte auch die Arbeitsgruppe von *Pretzel et al.* [85]. Im Unterschied zur vorliegenden Studie wurde jedoch boviner Knorpel mit isolierten synovialen Fibroblasten von RA-Patienten kultiviert. Bei der unstimulierten Knorpel-Monokultur kam es über 14 Tage zu keinem signifikanten Proteoglycanverlust. Auch in der vorliegenden Arbeit kam es in der multivariablen Analyse zu keiner signifikanten Abnahme des Proteoglycangehalts mit zunehmender Kulturdauer. Dies könnte mit der größeren mechanischen Stabilität von Knorpel- im Gegensatz zu Synovialisgewebe erklärt werden im Hinblick auf die mechanischen Belastungen während der Kultur mit Mediumwechseln etc. Andererseits ist Knorpel ein bradytrophes Gewebe, das aufgrund dieser Eigenschaft intrinsisch resistenter gegenüber der unphysiologischen Umgebung des Modells sein könnte als die vulnerable Synovialis. Fraglich ist, ob hieraus Schlüsse auf die Situation *in vivo* gezogen werden können. Möglicherweise ist der Knorpel nicht aktiv an der Pathophysiologie der RA bzw. anderen entzündlichen Gelenkerkrankungen beteiligt, sondern lediglich eine passiv destruierte Struktur, die sowohl bei der *inside out*- als auch bei der *outside in*-Hypothese erst sekundär durch die primäre Schädigung von Knochen bzw. Synovialis affektiert wird. Hingegen nahm der Proteoglycangehalt bei *Pretzel et al.*, ebenfalls per Safranin-O-Lichtgrün-Färbung detektiert, in der Co-Kultur mit synovialen Fibroblasten auch ohne Stimulation signifikant ab. Die Co-Kultur vergrößerte die Proteoglycanabnahme auch in den stimulierten Kulturen, wobei sich die größte Abnahme bei doppelt stimulierter Co-Kultur fand. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  die Produktion von Metallo-Proteinasen in Chondrozyten und Synoviozyten stimulieren [7, 8, 36, 119-121]. Somit bestätigt sich der auch in der vorliegenden Studie nachgewiesene negative Effekt von inflammatorischer Synovialis und Stimulation auf den Knorpel. *Steenvoorden et al.* [121] konnten in einer Studie zeigen, dass Synoviozyten nur in Anwesenheit vitaler Chondrozyten dazu in der Lage waren, Knorpel zu degradieren. Da in der vorliegenden Studie die Co-Kultur mit Synovialis unabhängig von der Kulturdauer ebenfalls einen verminderten Proteoglycangehalt zur Folge hatte, legt dies nahe, dass die Bedingungen in Kultur ein Überleben der Chondrozyten möglich machen.

## 4.2 Anschließende Fragestellungen

Die vorliegende Studie kann als Ausgangspunkt weiterer Forschung dienen. Nach Modifikation des Modells könnten hieran weitere Untersuchungen vorgenommen werden.

Die Modifikationen könnten wie folgt aussehen: Vor Beginn der Kultur könnten bei ausreichender Verfügbarkeit nicht nur makro- sondern auch mikroskopische Kontrollen der Gewebe erfolgen. Dies dient zum einen der Identifikation geeigneter Bereiche, sodass beispielsweise nicht periartikuläres Fettgewebe anstelle von Synovialis verwendet wird. Zum

anderen kann in einer Co-Kultur so auch die richtige Polarität der Gewebe gewährleistet werden, sodass das *lining layer* dem Knorpel in jedem Fall zugewandt ist und eine Interaktion entsprechend der *in vivo* ermöglicht wird. Es könnte eine kontinuierliche Perfusion, wie von *Schultz et al.* [89] vorgeschlagen, etabliert werden, um eine längere Kulturdauer sowie weniger Manipulationen durch die Mediumwechsel zu erreichen. Es müssten vor Beginn der Kultur weitere Untersuchungen erfolgen, um die optimale Konzentration an zugefügten Entzündungsmediatoren, wie sie annähernd *in vivo* vorliegt, zu finden. Auch wäre es denkbar, das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen beteiligten Zytokine durch die Verwendung weiterer Zytokine differenzierter abzubilden. Bei allen Modifikationen darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich um ein *in vitro*-Modell handelt und nie exakt die gleichen Bedingungen wie im komplexen und individuell unterschiedlichen Zusammenspiel *in vivo* erreicht werden können.

Anhand eines solchen Modells könnten weitere Einblicke in den Entzündungsprozess der Arthritis im Allgemeinen, der sich zwischen OA und RA im Endstadium nicht diametral zu unterscheiden scheint, ermöglicht werden. Nicht zuletzt ist auch eine Untersuchung bezüglich der Reversibilität der beobachteten Veränderungen lohnenswert. Genügen ein Wechsel in eine „physiologischere“ Umgebung und die Abwesenheit von schädigenden Entzündungsmediatoren? Sind die Veränderungen überhaupt reversibel? Dies könnte mithilfe entsprechender Medikation überprüft werden, wobei auch neue Substanzen auf ihr diesbezügliches Potential getestet werden könnten.

### 4.3 Schlussfolgerungen

Es konnte ein Modell etabliert werden, in dem Knorpel und Synovialis einzeln und gemeinsam für bis zu 42 Tage kultiviert werden konnten.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Synovialis einen wesentlichen Faktor für die Degradation des Knorpels darstellt. Knorpel erwies sich in Monokultur als relativ stabil in Bezug auf den Proteoglycangehalt über die Zeit. Sowohl die Stimulation mit Entzündungsmediatoren als auch die Co-Kultur mit Synovialis konnten jedoch als voneinander unabhängige Risikofaktoren für eine Knorpeldegradation identifiziert werden. In einigen Fällen konnte eine direkte Interaktion von Synovialis und Knorpel beobachtet werden, zunächst in Form einer Adhäsion, anschließend als Invasion v.a. synovialer Makropagen in den Knorpel. Beide Gewebetypen scheinen sich gegenseitig negativ im Sinne einer entzündlichen Reaktion mit folgender Gewebedegradation zu beeinflussen, was sich in der vorliegenden Studie am verringerten Krenn-Score, verringerten Proteoglycangehalt und der verringerten CD68-Expression in Co-Kultur zeigte. Die initial ausgeprägte Entzündung bei den hochgradig symptomatischen Patienten mit hohen Zellzahlen entwickelte sich in unserem Modell unter

dem Einfluss der Co-Kultur und Dauer der Kultur zu einer zunehmenden Degradation der Gewebe mit Abnahme von Zellzahlen (Krenn-Score, CD68) und Proteoglycangehalt.

Sowohl die stimulierte Knorpel-Monokultur als auch die Co-Kultur von Knorpel und Synovialis stellen potentielle Modelle für verschiedene Erkrankungen dar, die mit einer Degradation des Knorpels einhergehen. Es sind weitere Untersuchungen vonnöten, um die Mechanismen aufzuklären, anhand derer die Synovialis das Potential hat, den Knorpel zu schädigen. Dies geschieht nicht nur im Rahmen der teilweise hier beobachteten Invasion, da es auch unabhängig davon zu Proteoglycanverlusten in der Co-Kultur kam. Diese und welche Faktoren hierzu beitragen, sind jedoch ebenfalls Aspekte, die einer genaueren Analyse lohnen.

In beiden Krankheitsentitäten konnte eine Abnahme der entzündlichen Aktivität der Synovialis mit zunehmender Kulturdauer beobachtet werden. Dies lässt sich vermutlich auf eine Schädigung des Gewebes zum einen durch die trotz allem unphysiologische Umgebung sowie zum anderen auf die unphysiologisch hohen Konzentrationen an Entzündungsmediatoren zurückführen. Hier liegt eine Limitation dieses Modells, an die in zukünftigen Untersuchungen angeknüpft werden kann, um die Aussagekraft und die Anwendungsmöglichkeiten des Modells zu erhöhen.

In diesem vereinfachten Modell konnte kein signifikanter Unterschied der Entzündungsaktivität zwischen OA und RA nachgewiesen werden. Direkt nach Explantation fand sich bei beiden Entitäten eine hohe entzündliche Aktivität. Diese nahm unabhängig von der Stimulation und Kultur zeitabhängig ab. Es konnte ein starker Einfluss der Synovialis auf die Knorpeldegradation gezeigt werden.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Sangha, O., *Epidemiology of rheumatic diseases*. Rheumatology, 2000. **39**(suppl\_2): p. 3-12.
2. Wasserman, A.M., *Diagnosis and management of rheumatoid arthritis*. Am Fam Physician, 2011. **84**(11): p. 1245-52.
3. Strahl, A., et al., *[Prevalence, comorbidity and interdisciplinary treatment of rheumatoid arthritis - Insurance data on outpatient and inpatient care in Baden-Wurtemberg]*. Z Rheumatol, 2018. **77**(2): p. 113-126.
4. Strand, V., et al., *Economic burden of fatigue or morning stiffness among patients with rheumatoid arthritis: a retrospective analysis from real-world data*. Curr Med Res Opin, 2020. **36**(1): p. 161-168.
5. Palazzo, C., et al., *Risk factors and burden of osteoarthritis*. Ann Phys Rehabil Med, 2016. **59**(3): p. 134-138.
6. Cleveland, R.J., A.E. Nelson, and L.F. Callahan, *Knee and hip osteoarthritis as predictors of premature death: a review of the evidence*. Clin Exp Rheumatol, 2019. **37 Suppl 120**(5): p. 24-30.
7. Hollander, A.P., et al., *Human cartilage is degraded by rheumatoid arthritis synovial fluid but not by recombinant cytokines in vitro*. Clin Exp Immunol, 1991. **83**(1): p. 52-7.
8. Burrage, P.S., K.S. Mix, and C.E. Brinckerhoff, *Matrix metalloproteinases: role in arthritis*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 529-43.
9. Krenn, V., *Grading of chronic synovitis--a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology*. Pathology, Research and Practice, 2002. **198**(5): p. 317-25.
10. Deane, K.D., et al., *Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2017. **31**(1): p. 3-18.
11. Gabriel, S.E., *The epidemiology of rheumatoid arthritis*. Rheum Dis Clin North Am, 2001. **27**(2): p. 269-81.
12. Silman, A.J. and J.E. Pearson, *Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S265-72.
13. Alamanos, Y. and A.A. Drosos, *Epidemiology of adult rheumatoid arthritis*. Autoimmun Rev, 2005. **4**(3): p. 130-6.
14. Kawatkar, A.A., S.E. Gabriel, and S.J. Jacobsen, *Secular trends in the incidence and prevalence of rheumatoid arthritis within members of an integrated health care delivery system*. Rheumatol Int, 2019. **39**(3): p. 541-549.
15. Kourilovitch, M., C. Galarza-Maldonado, and E. Ortiz-Prado, *Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis*. J Autoimmun, 2014. **48-49**: p. 26-30.
16. Clynes, M.A., et al., *Impact of Rheumatoid Arthritis and Its Management on Falls, Fracture and Bone Mineral Density in UK Biobank*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 817.
17. Walsh, D.A. and D.F. McWilliams, *Mechanisms, impact and management of pain in rheumatoid arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(10): p. 581-92.
18. Llopis, E., et al., *Conventional Radiology in Rheumatoid Arthritis*. Radiol Clin North Am, 2017. **55**(5): p. 917-941.
19. Ishikawa, H., *The latest treatment strategy for the rheumatoid hand deformity*. J Orthop Sci, 2017. **22**(4): p. 583-592.
20. Scott, D.L., F. Wolfe, and T.W. Huizinga, *Rheumatoid arthritis*. Lancet, 2010. **376**(9746): p. 1094-108.
21. Salaffi, F., et al., *Prevalence of frailty and its associated factors in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional analysis*. Clin Rheumatol, 2019. **38**(7): p. 1823-1830.
22. Maradit-Kremers, H., et al., *Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(2): p. 402-11.
23. Luque Ramos, A., et al., *Comorbidities in Patients with Rheumatoid Arthritis and Their Association with Patient-reported Outcomes: Results of Claims Data Linked to Questionnaire Survey*. J Rheumatol, 2019.
24. Aranega Gonzalez, R., et al., *The Increased Risk of Thromboembolic Events in Patients with Rheumatoid Arthritis*. J Rheumatol, 2019.
25. Nerurkar, L., et al., *Rheumatoid arthritis and depression: an inflammatory perspective*. Lancet Psychiatry, 2019. **6**(2): p. 164-173.
26. Marrie, R.A., et al., *Increased Burden of Psychiatric Disorders in Rheumatoid Arthritis*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2018. **70**(7): p. 970-978.
27. Reinhorn, I.M., et al., *Social phobia in immune-mediated inflammatory diseases*. J Psychosom Res, 2020. **128**: p. 109890.

28. Marrie, R.A., et al., *Rising incidence of psychiatric disorders before diagnosis of immune-mediated inflammatory disease*. *Epidemiol Psychiatr Sci*, 2019. **28**(3): p. 333-342.
29. Catrina, A.I., K.D. Deane, and J.U. Scher, *Gene, environment, microbiome and mucosal immune tolerance in rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2016. **55**(3): p. 391-402.
30. Lundstrom, E., et al., *Opposing effects of HLA-DRB1\*13 alleles on the risk of developing anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(4): p. 924-30.
31. Xue, Y., et al., *The HLA-DRB1 shared epitope is not associated with antibodies against cyclic citrullinated peptide in Chinese patients with rheumatoid arthritis*. *Scand J Rheumatol*, 2008. **37**(3): p. 183-7.
32. de Almeida, D.E., S. Ling, and J. Holoshitz, *New insights into the functional role of the rheumatoid arthritis shared epitope*. *FEBS Lett*, 2011. **585**(23): p. 3619-26.
33. Kampstra, A.S.B. and R.E.M. Toes, *HLA class II and rheumatoid arthritis: the bumpy road of revelation*. *Immunogenetics*, 2017. **69**(8-9): p. 597-603.
34. Demoruelle, M.K., K.D. Deane, and V.M. Holers, *When and where does inflammation begin in rheumatoid arthritis?* *Curr Opin Rheumatol*, 2014. **26**(1): p. 64-71.
35. Kleyer, A., et al., *Bone loss before the clinical onset of rheumatoid arthritis in subjects with anticitrullinated protein antibodies*. *Ann Rheum Dis*, 2014. **73**.
36. Ostrowska, M., et al., *Cartilage and bone damage in rheumatoid arthritis*. *Reumatologia*, 2018. **56**(2): p. 111-120.
37. Klareskog, L., et al., *A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(1): p. 38-46.
38. Frisell, T., et al., *Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: role of rheumatoid factor/anti-citrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age*. *Arthritis Rheum*, 2013. **65**(11): p. 2773-82.
39. de Vries, R.R., et al., *Genetics of ACPA-positive rheumatoid arthritis: the beginning of the end?* *Ann Rheum Dis*, 2011. **70 Suppl 1**: p. i51-4.
40. Mankia, K. and P. Emery, *Is localized autoimmunity the trigger for rheumatoid arthritis? Unravelling new targets for prevention*. *Discov Med*, 2015. **20**(109): p. 129-35.
41. Zaccardelli, A., et al., *Potential of Lifestyle Changes for Reducing the Risk of Developing Rheumatoid Arthritis: Is an Ounce of Prevention Worth a Pound of Cure?* *Clin Ther*, 2019. **41**(7): p. 1323-1345.
42. Anderson, R., et al., *Smoking and Air Pollution as Pro-Inflammatory Triggers for the Development of Rheumatoid Arthritis*. *Nicotine Tob Res*, 2016. **18**(7): p. 1556-65.
43. Ospelt, C., et al., *Carbamylation of vimentin is inducible by smoking and represents an independent autoantigen in rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2017. **76**(7): p. 1176-1183.
44. Boissier, M.C., et al., *Origins of rheumatoid arthritis*. *Joint Bone Spine*, 2019.
45. McInnes, I.B. and G. Schett, *The pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *N Engl J Med.*, 2011. **365**.
46. Steffen, U., G. Schett, and A. Bozec, *How Autoantibodies Regulate Osteoclast Induced Bone Loss in Rheumatoid Arthritis*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 1483.
47. Alam, J., I. Jantan, and S.N.A. Bukhari, *Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy*. *Biomed Pharmacother*, 2017. **92**: p. 615-633.
48. Culemann, S., et al., *Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint*. *Nature*, 2019. **572**(7771): p. 670-675.
49. Floudas, A., et al., *Loss of balance between protective and pro-inflammatory synovial tissue T-cell polyfunctionality predates clinical onset of rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2021.
50. Tu, J., et al., *A Tale of Two Immune Cells in Rheumatoid Arthritis: The Crosstalk Between Macrophages and T Cells in the Synovium*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 655477.
51. Abbas, M.S., E.E.A. El-Hakeem, and H.E. Kamel, *Three minutes propofol after sevoflurane anesthesia to prevent emergence agitation following inguinal hernia repair in children: a randomized controlled trial*. *Korean J Anesthesiol*, 2019. **72**(3): p. 253-259.
52. Schett, G. and G.S. Firestein, *Mr Outside and Mr Inside: classic and alternative views on the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2010. **69**(5): p. 787-9.
53. Buchbender, C., et al., *Synovitis and bone inflammation in early rheumatoid arthritis: high-resolution multi-pinhole SPECT versus MRI*. *Diagn Interv Radiol*, 2013. **19**(1): p. 20-4.
54. Smith, M.D., *The normal synovium*. *Open Rheumatol J*, 2011. **5**: p. 100-6.
55. Jimenez-Boj, E., et al., *Interaction between synovial inflammatory tissue and bone marrow in rheumatoid arthritis*. *J Immunol*, 2005. **175**(4): p. 2579-88.
56. Goldring, S.R., *Bone and joint destruction in rheumatoid arthritis: what is really happening?* *J Rheumatol Suppl*, 2002. **65**: p. 44-8.

57. Ritchlin, C.T., *Mechanisms of erosion in rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2004. **31**(7): p. 1229-37.
58. Sun, M., et al., *Anticitrullinated protein antibodies facilitate migration of synovial tissue-derived fibroblasts*. Ann Rheum Dis, 2019. **78**(12): p. 1621-1631.
59. Zerbini, C.A.F., et al., *Biologic therapies and bone loss in rheumatoid arthritis*. Osteoporos Int, 2017. **28**(2): p. 429-446.
60. Sokolove, J., et al., *Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(4): p. 813-21.
61. Harre, U., et al., *Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin*. J Clin Invest., 2012. **122**.
62. Barra, L., et al., *Serum cytokine profile of unaffected first-degree relatives of patients with rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2014. **41**(2): p. 280-5.
63. Catrina, A.I., et al., *Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2017. **13**(2): p. 79-86.
64. Sudol-Szopinska, I., et al., *Significance of bone marrow edema in pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Pol J Radiol, 2013. **78**(1): p. 57-63.
65. McQueen, F.M. and B. Ostendorf, *What is MRI bone oedema in rheumatoid arthritis and why does it matter?* Arthritis Res Ther, 2006. **8**.
66. McQueen, F.M., et al., *Bone edema scored on magnetic resonance imaging scans of the dominant carpus at presentation predicts radiographic joint damage of the hands and feet six years later in patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(7): p. 1814-27.
67. Ostendorf, B., et al., *Project REMISSION(PLUS): clinical and radiological remission: New treatment goals in the management of rheumatoid arthritis*. Zeitschrift Für Rheumatologie, 2008. **67**.
68. Østergaard, M., et al., *OMERACT Rheumatoid Arthritis Magnetic Resonance Imaging Studies. Core set of MRI acquisitions, joint pathology definitions, and the OMERACT RA-MRI scoring system*. J Rheumatol, 2003. **30**.
69. Bugatti, S., et al., *Involvement of subchondral bone marrow in rheumatoid arthritis: lymphoid neogenesis and in situ relationship to subchondral bone marrow osteoclast recruitment*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(11): p. 3448-59.
70. Tamai, M., et al., *A prediction rule for disease outcome in patients with undifferentiated arthritis using magnetic resonance imaging of the wrists and finger joints and serologic autoantibodies*. Arthritis Rheum, 2009. **61**(6): p. 772-8.
71. Kurdi, A.J., et al., *Rheumatoid Arthritis vs Osteoarthritis: Comparison of Demographics and Trends of Joint Replacement Data from the Nationwide Inpatient Sample*. Am J Orthop (Belle Mead NJ), 2018. **47**(7).
72. Aletaha, D., et al., *2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(9): p. 1580-8.
73. Fiehn, C., *S2e-Leitlinie: Therapie der rheumatoiden Arthritis mit krankheitsmodifizierenden Medikamenten*. 2018.
74. Smolen J.S., L.R.B.M., Bijlsma J.W.J., et al, *EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update*. 2019.
75. Verschueren, P., et al., *Methotrexate in combination with other DMARDs is not superior to methotrexate alone for remission induction with moderate-to-high-dose glucocorticoid bridging in early rheumatoid arthritis after 16 weeks of treatment: the CareRA trial*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(1): p. 27-34.
76. Keystone, E.C., et al., *Safety and Efficacy of Baricitinib Through 128 Weeks in an Open-label, Longterm Extension Study in Patients with Rheumatoid Arthritis*. J Rheumatol, 2018. **45**(1): p. 14-21.
77. Meier, F.M., et al., *Current immunotherapy in rheumatoid arthritis*. Immunotherapy, 2013. **5**(9): p. 955-74.
78. Kruger, K., *[Pharmacological treatment of rheumatoid arthritis and its comorbidities]*. Internist (Berl), 2018. **59**(4): p. 341-351.
79. Petro, A.D., et al., *Associations between an expanded autoantibody profile and treatment responses to biologic therapies in patients with rheumatoid arthritis*. Int Immunopharmacol, 2021. **91**: p. 107260.
80. Kida, D., et al., *A retrospective analysis of the relationship between anti-cyclic citrullinated peptide antibody and the effectiveness of abatacept in rheumatoid arthritis patients*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 19717.

81. Gottenberg, J.E., et al., *Positivity for anti-cyclic citrullinated peptide is associated with a better response to abatacept: data from the 'Orencia and Rheumatoid Arthritis' registry*. Ann Rheum Dis, 2012. **71**(11): p. 1815-9.
82. Harrold, L.R., et al., *Effect of Anticitrullinated Protein Antibody Status on Response to Abatacept or Antitumor Necrosis Factor- $\alpha$  Therapy in Patients with Rheumatoid Arthritis: A US National Observational Study*. J Rheumatol, 2018. **45**(1): p. 32-39.
83. Cassotta, M., F. Pistollato, and M. Battino, *Rheumatoid arthritis research in the 21st century: Limitations of traditional models, new technologies, and opportunities for a human biology-based approach*. Altex, 2019.
84. Noack, M. and P. Miossec, *Effects of Methotrexate Alone or Combined With Arthritis-Related Biotherapies in an in vitro Co-culture Model With Immune Cells and Synoviocytes*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2992.
85. Pretzel, D., et al., *In vitro model for the analysis of synovial fibroblast-mediated degradation of intact cartilage*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(1): p. R25.
86. Thudium, C.S., et al., *An Ex Vivo Tissue Culture Model of Cartilage Remodeling in Bovine Knee Explants*. J Vis Exp, 2019(153).
87. Broeren, M.G.A., et al., *A three-dimensional model to study human synovial pathology*. Altex, 2019. **36**(1): p. 18-28.
88. Peck, Y., et al., *Establishment of an in vitro three-dimensional model for cartilage damage in rheumatoid arthritis*. J Tissue Eng Regen Med, 2018. **12**(1): p. e237-e249.
89. Schultz, O., et al., *Development of in vitro model systems for destructive joint diseases: novel strategies for establishing inflammatory pannus*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(8): p. 1420-8.
90. Stundner, O., et al., *Perioperative outcomes in patients with rheumatoid versus osteoarthritis for total hip arthroplasty: a population-based study*. Clin Exp Rheumatol, 2013. **31**(6): p. 889-95.
91. Ravi, B., et al., *Increased risk of complications following total joint arthroplasty in patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(2): p. 254-63.
92. Altman, R., *Criteria for the Classification and Reporting of Osteoarthritis of the Hip*. Arthritis and Rheumatism, 1991. **34**.
93. Altman, R., *Osteoarthritis of the Knee*. Arthritis and Rheumatism, 1986. **29**.
94. *Gebrauchsanweisung Eosin G-Lösung 0,5% wässrig*. 2017, Carl Roth GmbH.
95. Hamann, J., et al., *Expression of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid synovial tissue*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(4): p. 650-8.
96. Mucke, J., et al., *Inhomogeneity of immune cell composition in the synovial sublining: linear mixed modelling indicates differences in distribution and spatial decline of CD68+ macrophages in osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2016. **18**: p. 170.
97. Kraan, M.C., et al., *Immunohistological analysis of synovial tissue for differential diagnosis in early arthritis*. Rheumatology (Oxford), 1999. **38**(11): p. 1074-80.
98. Neidhart, M., et al., *Functional characterization of adherent synovial fluid cells in rheumatoid arthritis: destructive potential in vitro and in vivo*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(7): p. 1873-80.
99. Lang, G., ed. *Histotechnik*. 2013, Springer: Vienna.
100. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 671-5.
101. Slansky, E., et al., *Quantitative determination of the diagnostic accuracy of the synovitis score and its components*. Histopathology, 2010. **57**(3): p. 436-43.
102. Tolboom, T.C., et al., *Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(7): p. 1999-2002.
103. Wang, H., et al., *Histomorphology and innate immunity during the progression of osteoarthritis: Does synovitis affect cartilage degradation?* J Cell Physiol, 2018. **233**(2): p. 1342-1358.
104. Huber, L.C., et al., *Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(6): p. 669-75.
105. Vordenbaumen, S., *Inflammation and vascularisation markers of arthroscopically-guided finger joint synovial biopsies reflect global disease activity in rheumatoid arthritis*. Clinical and Experimental Rheumatology, 2014. **32**(1): p. 117-20.
106. Bresnihan, B., et al., *Synovial tissue sublining CD68 expression is a biomarker of therapeutic response in rheumatoid arthritis clinical trials: consistency across centers*. J Rheumatol, 2009. **36**(8): p. 1800-2.
107. Otali, D., et al., *Combined effects of formalin fixation and tissue processing on immunorecognition*. Biotech Histochem, 2009. **84**(5): p. 223-47.
108. Scalia, C.R., et al., *Antigen Masking During Fixation and Embedding, Dissected*. J Histochem Cytochem, 2017. **65**(1): p. 5-20.

109. Lu, M.C., et al., *Higher incidence of rheumatoid arthritis in patients with symptomatic osteoarthritis or osteoarthritis-related surgery: a nationwide, population-based, case-control study in Taiwan*. *BMJ Open*, 2015. **5**(12): p. e008513.
110. Baeten, D., et al., *Comparative study of the synovial histology in rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, and osteoarthritis: influence of disease duration and activity*. *Ann Rheum Dis*, 2000. **59**(12): p. 945-53.
111. Sellam, J. and F. Berenbaum, *The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2010. **6**(11): p. 625-35.
112. Scanzello, C.R., *Chemokines and inflammation in osteoarthritis: Insights from patients and animal models*. *J Orthop Res*, 2017. **35**(4): p. 735-739.
113. Scanzello, C.R. and S.R. Goldring, *The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis*. *Bone*, 2012. **51**(2): p. 249-57.
114. Haywood, L., et al., *Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(8): p. 2173-7.
115. Vilá, S., *Inflammation in Osteoarthritis*. *P R Health Sci J*, 2017. **36**(3): p. 123-129.
116. Oehler, S., et al., *Subtyping of osteoarthritic synoviopathy*. *Clin Exp Rheumatol*, 2002. **20**(5): p. 633-40.
117. Haringman, J.J., et al., *Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2005. **64**(6): p. 834-8.
118. Okada, Y., H. Nagase, and E.D. Harris, Jr., *A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(30): p. 14245-55.
119. Alsalameh, S., et al., *Regulation of granulocyte macrophage colony stimulating factor production by human articular chondrocytes. Induction by both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1, downregulation by transforming growth factor beta and upregulation by fibroblast growth factor*. *J Rheumatol*, 1994. **21**(6): p. 993-1002.
120. Williams, J.D., et al., *An in vitro system for studying cartilage degradation by macrophages*. *Biomed Pharmacother*, 1987. **41**(2): p. 89-92.
121. Steenvoorden, M.M., et al., *Fibroblast-like synoviocyte-chondrocyte interaction in cartilage degradation*. *Clin Exp Rheumatol*, 2007. **25**(2): p. 239-45.
122. Udalova, I.A., A. Mantovani, and M. Feldmann, *Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2016. **12**(8): p. 472-85.
123. Siouti, E. and E. Andreakos, *The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis*. *Biochem Pharmacol*, 2019. **165**: p. 152-169.
124. Veale, D.J., C. Orr, and U. Fearon, *Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis*. *Semin Immunopathol*, 2017. **39**(4): p. 343-354.
125. McInnes, I.B. and G. Schett, *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(6): p. 429-42.
126. Bottini, N. and G.S. Firestein, *Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors*. *Nat Rev Rheumatol*, 2013. **9**(1): p. 24-33.
127. Bartok, B. and G.S. Firestein, *Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis*. *Immunol Rev*, 2010. **233**(1): p. 233-55.
128. Croft, A.P., et al., *Rheumatoid synovial fibroblasts differentiate into distinct subsets in the presence of cytokines and cartilage*. *Arthritis Res Ther*, 2016. **18**(1): p. 270.
129. Klein, K., R.E. Gay, and S. Gay, *[Synovial fibroblasts : Main players in rheumatoid arthritis]*. *Z Rheumatol*, 2016. **75**(6): p. 560-4.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema Kultur.....	19
Abbildung 2: S/O-Score .....	27
Abbildung 3: Bildprozessierung mittels ImageJ .....	28
Abbildung 4: Gründe für die fehlende Auswertbarkeit Krenn-Score.....	36
Abbildung 5: Gründe für die fehlende Auswertbarkeit CD68 .....	37
Abbildung 6: Gründe für die fehlende Auswertbarkeit CD55 .....	38
Abbildung 7: S/O-Score Tag 28 .....	53
Abbildung 8: Adhäsion .....	56
Abbildung 9: Invasion.....	56
Abbildung 10: Proteoglycanverlust.....	57
Abbildung 11: CD55.....	58
Abbildung 12: Invasion CD68.....	58

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 RA-Klassifikationskriterien .....	3
Tabelle 2.1: Geräte .....	13
Tabelle 2.2: Chemikalien .....	13
Tabelle 2.3: Antikörper .....	15
Tabelle 2.4: Verbrauchsmaterial .....	15
Tabelle 2.5: Patientenkollektiv .....	16
Tabelle 2.6: Schema Kultur .....	18
Tabelle 2.7: Zusammensetzung Kulturmedium .....	18
Tabelle 2.8: Verdünnungstabelle Antikörper .....	24
Tabelle 2.9: Krenn-Score .....	26
Tabelle 3.1 Explantatnummer und Entität .....	30
Tabelle 3.2: Vorhandene Gewebe HE-Färbung .....	31
Tabelle 3.3: Vorhandene Gewebe S/O-Färbung .....	32
Tabelle 3.4: Vorhandene Gewebe CD55-Färbung .....	33
Tabelle 3.5: Vorhandene Gewebe CD68-Färbung .....	34
Tabelle 3.6: Fehleranzahl nach Färbung .....	35
Tabelle 3.7: Definition Gründe für die fehlende Auswertbarkeit .....	35
Tabelle 3.8: Anzahl der Gründe für die fehlende Auswertbarkeit in der S/O-Färbung .....	36
Tabelle 3.9: <i>lining layer</i> Vergleich Ansatz a und b .....	38
Tabelle 3.10: Infiltrate Vergleich Ansatz a und b .....	39
Tabelle 3.11: Zellularität Vergleich Ansatz a und b .....	41
Tabelle 3.12: SO Vergleich Ansatz a und b .....	43
Tabelle 3.13: CD 68 Vergleich Ansatz a und b .....	46
Tabelle 3.14: CD55 Vergleich Ansatz a und b .....	47
Tabelle 3.15: Krenn univariat .....	48
Tabelle 3.16: Krenn multivariabel .....	48
Tabelle 3.17: <i>lining layer</i> univariat .....	49
Tabelle 3.18: <i>lining layer</i> multivariabel .....	49
Tabelle 3.19: Infiltrate univariat .....	50
Tabelle 3.20: Infiltrate multivariabel .....	50
Tabelle 3.21: Zelldichte univariat .....	51
Tabelle 3.22: Zelldichte multivariabel .....	51
Tabelle 3.23: S/O univariat .....	52
Tabelle 3.24: S/O multivariabel .....	52
Tabelle 3.25: CD68 univariat .....	54
Tabelle 3.26: CD68 multivariabel .....	54

Tabelle 3.27: CD55 univariat.....	54
Tabelle 3.28: CD55 multivariabel .....	55

## 8 Danksagung

Bei der Durchführung dieser Studie, den Auswertungen sowie der Verschriftlichung habe ich von vielen Personen Unterstützung erfahren, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Hierfür möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Matthias Schneider für die Ermöglichung der Studie in seiner Klinik sowie für die ausführliche Korrektur, konstruktive Kritik und die zahlreichen Verbesserungsvorschläge an der schriftlichen Fassung, die das Ergebnis entscheidend verbessert haben. Für seine immer wieder neuen Herangehensweisen, kritischen Fragen, die Motivation und großzügige Unterstützung bei der Auswertung der Daten sowie geduldige Erklärung derselben und Beantwortung aller meiner Fragen möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Stefan Vordenbäumen besonders danken. Ebenso gebührt meiner Betreuerin Frau Dr. Johanna Mucke ein herzlicher Dank für ihre Geduld, die sehr gute Einarbeitung, Klärung aller Fragen und Probleme fachlicher und organisatorischer Art, technische Unterstützung, Korrektur der schriftlichen Version und die viele schöne, gemeinsam im Labor verbrachte Zeit. Herrn PD Dr. Thomas Pauly und seinem Team möchte ich danken für die uneigennützigere Bereitstellung des Untersuchungsmaterials durch Aufklärung der Patienten, Entnahme geeigneten Materials, adäquate Verarbeitung und stete Gewährleistung eines zügigen Transports ins Labor, ohne die die vorliegende Studie nicht durchführbar gewesen wäre. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Ellen Bleck für ihre großartige Unterstützung im Labor, geduldigen Erklärungen, Einarbeitung, Troubleshooting, mentale Unterstützung und die vielen interessanten Gespräche.

Außerdem danke ich dem gesamten Team des Hiller-Forschungszentrums für Rheumatologie für die schöne gemeinsame Zeit im Labor, an die ich mich gerne erinnere, den fachlichen und persönlichen Austausch, grandiose musikalische Untermalung, die unzähligen Kekse und das Teilen von Erfolgs- und Misserfolgserlebnissen. Bleibt so wie ihr seid!