# Doppler-sonographische Darstellung synovialer Vaskularisierung bei gleichzeitiger Bestimmung des angiogenetischen Faktors VEGF - ein neues Modell zur Untersuchung der Angiogenese bei Rheumatoider Arthritis

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Elisabeth Bundke, geb. Heinemann
aus Jena

Gießen 2006

Aus der Abteilung Rheumatologie und klinische Chemie der
Kerckhoff-Klinik GmbH, Bad Nauheim
Leiter: Prof. Dr. med. U. Müller-Ladner

| | |
|---|---|
| Gutachter: | Prof. Dr. med. U. Lange |
| Gutachter: | PD Dr. med. H. Lehmann |
| Betreuer: | Dr. med. J. Strunk |
| Tag der Disputation: | 21.11.2006 |

# Inhaltsverzeichnis


**1 Einleitung und Fragestellung** **1**

**2 Grundlagen** **3**

2.1 Rheumatoide Arthritis . . . . . 3

2.1.1 Klinik der Rheumatoiden Arthritis . . . . . 3

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis 4

2.1.3 Stellenwert der synovialen Angiogenese im inflammatorischen Prozess der Rheumatoiden Arthritis . . . . . 8

2.1.4 Neue Therapiestrategien und ihre Bedeutung für die Rheumatoide Arthritis . . . . . 14

2.2 Ultraschall und Power Doppler-Sonographie . . . . . 16

2.2.1 Physikalische Grundlagen und Grundbegriffe des Ultraschalls und der Doppler-Sonographie . . . . . 16

2.2.2 Power Doppler-Sonographie . . . . . 18

2.2.3 Stellenwert der (Doppler-)Sonographie für Diagnostik und Therapiekontrolle für die Rheumatoide Arthritis . 20

**3 Probandengruppen und Methoden** **23**

3.1 Patienten und Kontrollgruppe . . . . . 23

3.2 Versuchsablauf . . . . . 26

3.2.1 Sonographie . . . . . 28

3.2.2 Bestimmung der VEGF-Konzentration . . . . . 34

3.3 Statistik . . . . . 35

**4 Ergebnisse** **37**

4.1 Zusammenhang zwischen der Power Doppler-sonographisch bestimmten synovialen Vaskularisierung und der VEGF-Konzentration . . . . . 38

4.2 Zusammenhang zwischen PD bestimmten synovialen Vaskularisierung und dem klinischen Befund der Carpusarthritis . . 39

4.3 VEGF-Konzentrationen bei unbehandelten und behandelten Patienten sowie gesunden Probanden . . . . . 40
4.4 Änderung der VEGF-Konzentration während einer Therapie mit Prednisolon bzw. Infliximab . . . . . 41
4.5 Weitere Ergebnisse . . . . . 45

**5 Diskussion** **51**

**6 Zusammenfassung** **63**

**7 Summary** **65**

**Verzeichnis der Abbildungen** **67**

**Tabellenverzeichnis** **71**

**Abkürzungsverzeichnis** **73**

**Literaturverzeichnis** **75**

# Kapitel 1

# Einleitung und Fragestellung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) gehört zu den chronisch entzündlich destruktiven Gelenkerkrankungen. Mit einer Prävalenz von etwa 1% zählt sie zu den großen Volkskrankheiten unserer Gesellschaft. Die Erkrankung führt zu erheblichen körperlichen Einschränkungen und damit auch zu Einschränkungen der Lebensqualität. Etwa jeder fünfte Patient mit RA wird innerhalb der ersten drei Jahre seiner Erkrankung zumindest teilweise arbeitsunfähig [*Mau et al.*, 2001]. Somit führt die RA neben starken persönlichen Einschränkungen auch zu enormen volkswirtschaftlichen Belastungen. Nach Angaben des Bundesgesundheitsministeriums werden die Kosten durch Behandlung, Arbeitsunfähigkeit und vorzeitige Verrentung auf circa 3,5 bis 5 Mrd. Euro pro Jahr geschätzt.

Die aktuellen Forschungen zielen, aufbauend auf einem verbesserten Verständnis der Pathogenese der RA, auf eine möglichst frühe Diagnostik der entzündlichen und destruktiven Veränderungen der aktiven Arthritis. Dadurch kann mit einer frühen gezielten Therapie begonnen werden, die die Prognose positiv beeinflussen kann. Das große wissenschaftliche Interesse begründet sich neben den oben genannten volkswirtschaftlichen Gesichtspunkten auch über das Ziel die pathogenetischen Zusammenhänge der RA besser zu verstehen und neue Therapieansätze zu finden, um die negativen Auswirkungen der Erkrankung in den „Griff“ zu bekommen. Mit den seit einigen Jahren auf dem Markt vorhanden Antagonisten von Tumor Necrosis Factor (TNF)-$\alpha$ und Interleukin (Il)-1, den so genannten Biologika, stehen inzwi-

schen neben älteren Therapeutika, wie z.B. Methotrexat, potente und die Krankheit modifizierende Medikamente zur Verfügung. Einer der Angriffspunkte insbesondere der neuen Therapeutika ist die synoviale Angiogenese, die ein wesentlicher Faktor in der Pathogenese der RA ist und entscheidend zur destruktiven Potenz der RA beiträgt. Sie wird von verschiedenen Faktoren gesteuert, von denen der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mit am besten untersucht ist.

Vollkommen neue Möglichkeiten zur bildlichen Darstellung des entzündlichen Geschehens innerhalb des Gelenkes bietet die Anfang der 1990er Jahre von *Rubin & Adler* [1993] eingeführte Power Doppler-Sonographie. Ausgehend von der Messung des pro-angiogenetischen VEGF und der Visualisierung des Ergebnisses der synovialen Angiogenese im entzündlichen Prozess, dem vermehrten synovialen Blutfluss, mittels der Power Doppler-Sonographie entsteht im Rahmen dieser klinischen Arbeit ein neues Modell und ein neuer Zugang zur Untersuchung der Entwicklung vaskulärer synovialer Veränderungen und ihrer Auswirkungen im Rahmen des chronischen destruierenden Prozesses. Dieses Modell erleichtert das frühe Erkennen der entzündlichen Aktivität und damit die geforderte frühe Therapie. Dieser neue Zugang ermöglicht außerdem die Beobachtung der Erkrankung unter verschiedenen Bedingungen und dadurch eventuell neue pathogenetische Erkenntnisse.

Neben der Entwicklung des beschriebenen Modells beschäftigt sich die Studie mit Verlaufsbeobachtungen der VEGF-Konzentration während der Therapie mit dem Glukokortikoid Prednisolon bzw. dem TNF-$\alpha$-Antagonisten Infliximab. Zusätzlich werden auch Korrelationen zwischen der VEGF-Konzentration und der Erkrankungsdauer jedes einzelnen Patienten untersucht. Mit Hilfe der daraus gewonnen Daten entsteht ein neues Gesamtbild der Bedeutung der synovialen Angiogenese und es können Rückschlüsse auf die klinische Bedeutung des proangiogenetischen Faktors VEGF als Aktivitätsparameter der RA gezogen werden.

# Kapitel 2

# Grundlagen

## 2.1 Rheumatoide Arthritis

### 2.1.1 Klinik der Rheumatoiden Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) hat, wie schon erwähnt, mit einer Prävalenz von 1% und aufgrund ihres chronischen Verlaufs eine nicht zu unterschätzende volkswirtschaftliche Bedeutung in unserer Gesellschaft. Das Verhältnis von Männern zu Frauen beträgt etwa 1 zu 3, das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem dritten und fünften Lebensjahrzehnt, eine Erkrankung in jedem anderen Lebensalter ist jedoch möglich [*Schmidt*, 2000].

Zur Klassifikation der RA entwickelte das American College of Rheumatology (ACR) einen Katalog mit sieben Kriterien (siehe Tabelle S. 4), für das sichere Vorhandensein der RA müssen mindestens vier der sieben Kriterien auftreten. Die RA hat zumeist einen schleichenden Beginn, mit einem polyartikulären, symmetrischen Befall der kleinen peripheren Gelenke. Die Gelenke zeigen eine mit Morgensteifigkeit einhergehende schmerzhafte synovitische Schwellung. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Atrophie der Musculi interossei der Hände. Die typischen deformierenden irreversiblen ossären Veränderungen, wie Schwanenhals- und Knopflochdeformitäten der Finger und die Ulnardeviation, führen zu starken Funktionseinschränkungen der betroffenen Extremität. Radiologisch lassen sich die destruktiven Prozesse am Knochen durch Pseudozysten, Usuren und Ankylosen nachweisen. Ein extraartikulärer Befall ist bei Nachweis von Rheumafaktoren häufig. Da-

| ACR-Klassifikationskriterien der Rheumatoiden Arthritis | |
|---|---|
| **1.** | Morgensteifigkeit für mindestens eine Stunde |
| **2.** | Arthritis in drei oder mehr Gelenkbereichen (von einem Arzt beobachtet) |
| **3.** | Arthritis der Hand- und/oder Fingergelenke |
| **4.** | Symmetrische Schwellung (Arthritis) |
| **5.** | Rheumaknoten |
| **6.** | Nachweisbare Rheumafaktoren im Serum |
| **7.** | Radiologische Veränderungen der Gelenke (Erosionen und/oder gelenknahe Osteoporose) |
| Kriterien 1. bis 4. müssen für mind. sechs Wochen bestehen<br>Sichere RA: mindestens vier Kriterien müssen erfüllt sein<br>*Quelle: Arnett et al.* [1988] | |

*Tabelle 2.1:* ACR - Kriterien

zu zählen die typischen an den Streckseiten der Extremitäten entstehenden so genannten Rheumaknoten, ferner Vaskulitiden, Pleuritis, Perikarditis und ein sekundäres Sjögren-Syndrom, selten treten eine Myokarditis oder Lungenfibrose auf. Die RA geht mit einem erhöhtem Herzinfarktrisiko einher [*Burmester*, 1998]. Als wichtige Laborparameter dienen das C-reaktive Protein (CRP) und die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) [*Schmidt*, 2000].

### 2.1.2 Ätiologie und Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis

Der primäre Manifestationsort der RA ist trotz vieler klinischer Aspekte einer systemischen Erkrankung die Membrana Synovialis der Gelenke. Im Zentrum der Pathogenese der RA steht die synoviale Hyperplasie und Pannusbildung, die mit ausgeprägter synovialer Angiogenese einhergeht [*Koch*, 1998; *Paleolog*, 1996] (siehe Kapitel 2.1.3). Weitere Charakteristika der RA sind pathologische Immunphänomene (u.a. Auto-Antikörperbildung) und im weiteren Verlauf der Erkrankung die progressive Gelenkzerstörung [*Seemayer et al.*, 2001]. Die besonders in der Frühphase der Erkrankung starke Entzündungsreaktion ist geprägt durch Gefäßdilatation und Ödembildung sowie Infiltration von Entzündungszellen, so dass es zur erheblichen Verbreiterung

und zottenartigen Auftreibung der normalerweise glatten Synovialmembran kommt. Dieses stark vaskularisierte und sich ständig proliferierende Gewebe, der Pannus, dringt ähnlich einem Tumorgewebe in die Knorpel- und Knochenstrukturen des Gelenkes ein und zerstört diese irreversibel [*Burmester*, 1998; *Nagashima et al.*, 1995]. Besonders die Deckzellschicht der Synovialis, auch synoviale Intima genannt, ist verbreitert. Sie besteht aus aktivierten synovialen Makrophagen (Typ-A-Zellen) und aktivierten synovialen Fibroblasten (Typ-B-Zellen), sowie lymphozytären Infiltraten mit CD[1]4$^+$ T-Zellen und diffus das Bindegewebe infiltrierenden CD8$^+$ T-Zellen. Außerdem finden sich in der Synovialis aktivierte B-Zellen, Rheumafaktoren sezernierende Plasmazellen und die aus dem Blut stammenden Monozyten/Makrophagen. In der Gelenkflüssigkeit (Synovia) befinden sich vorwiegend neutrophile Granulozyten.

Die an der Synovialis stattfindende Entzündungsreaktion ist T-Zell vermittelt, ihr auslösendes Agens bis heute jedoch unbekannt [*Firestein*, 1998; *Renz*, 2003]. Durch die T-Zell-Aktivierung kommt es zur Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut und deren Differenzierung zu Makrophagen sowie zur Aktivierung der im Gelenk vorhandenen Typ A (Makrophagen) und B (Fibroblasten) Synoviozyten [*Burmester*, 1998]. Parallel dazu differenzieren sich durch die T-Zell-Aktivierung B-Zellen zu Immunglobulin(Ig)-produzierenden Plasmazellen . Die u.a. produzierten IgG-Antikörper bilden mit Antigenen große Immunkomplexe, die ihrerseits zur Aktivierung des Komplementsystems führen [*Renz*, 2003]. Bei der oben beschriebenen Immunkomplexbildung kann es zur Veränderung der Tertiärstruktur des IgG kommen, so dass der Antikörper selbst zum Antigen wird. Bei der nun einsetzenden Auto-Antikörperproduktion gegen die freigesetzten Fc-Fragmente werden Immunglobuline der Klasse M gebildet, sogenannte Rheumafaktoren [*Renz*, 2003; *Burmester*, 1998].

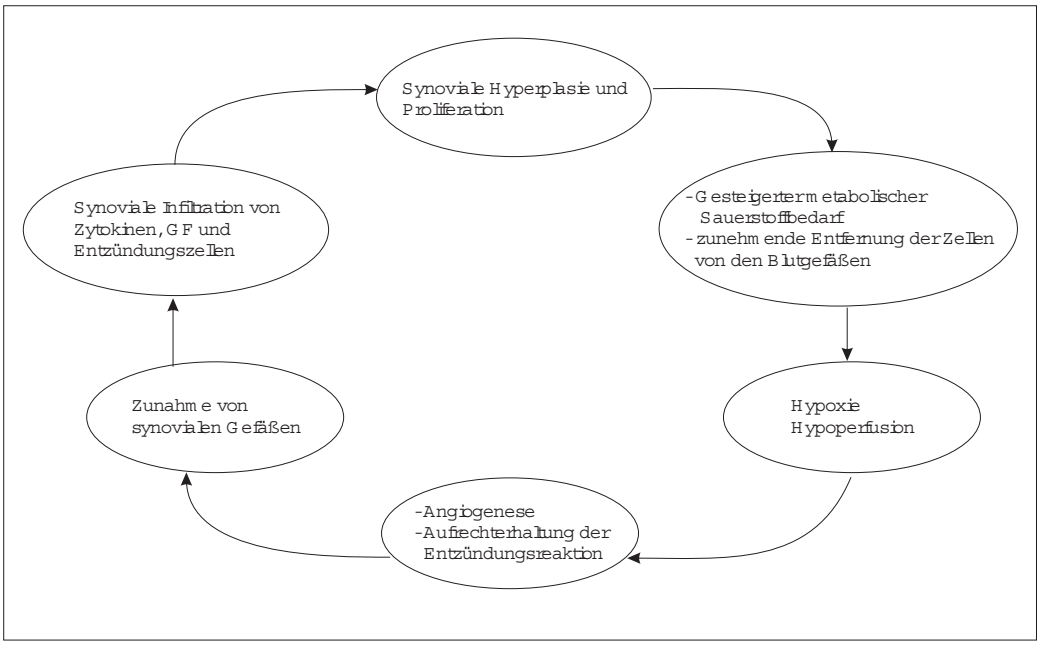
Für den T-Zell unabhängigen Pathogeneseweg der RA sind aktivierte (synoviale) Makrophagen und synoviale Fibroblasten die zentralen Zellelemente. Ihre Zytokine werden in der Synovialmembran deutlich häufiger als lypmphozytäre Zytokine gefunden [*Firestein*, 1998]. Zu den von den (syn-

[1] **CD:** Cluster of Differentiation

ovialen) Makrophagen produzierten Zytokinen gehören u.a. die stark pro-inflammatorisch wirkenden und in der Pathogenese der RA eine Schlüsselrolle einnehmenden Tumor Necrosis Factor (TNF)-$\alpha$ (siehe S. 13), Interleukin (Il)-1 - Moleküle [*Firestein*, 1998] und der pro-angiogenetische Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF). TNF-$\alpha$ und Il-1 führen ihrerseits zur Proliferation und Aktivierung der synovialen Fibroblasten und Makrophagen [*Firestein*, 1998] sowie zur Aktivierung von Osteoklasten und Chondrozyten, die wesentlich an der Zerstörung von Knorpel und Knochen beteiligt sind [*Burmester*, 1998]. Die durch die Destruktion freigesetzten Antigene aktivieren im Gelenk wiederum neu eingewanderte Monozyten und synoviale Makrophagen, so dass der Kreislauf aufrecht erhalten wird [*Renz*, 2003]; [*Burmester*, 1998]. TNF-$\alpha$ und Il-1 sind jedoch auch an der Matrixdegeneration durch die Aktivierung von Matrix Metallproteinasen (MMPs) [*Seemayer et al.*, 2001] und der Stimulation von Adhäsionsmechansimen beteiligt [*Müller-Ladner et al.*, 2000]. Aktivierte synoviale Fibroblasten scheinen außerdem durch den Verlust der Wachstumskontrolle maßgeblich an der synovialen Hyperplasie und dem invasiven Wachstum des Pannus beteiligt und damit für die von Entzündungszellen unabhängige Destruktion der Gelenke verantwortlich zu sein [*Firestein*, 1998; *Seemayer et al.*, 2001].

Die aktivierten Synoviozyten produzieren (vermutlich frustran) auch gegenregulatorische Moleküle u.a. Transforming Growth Factor(TGF)-beta und Il-10 [*Burmester*, 1998], sowie Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMPs) zur Hemmung der MMPs oder den Il-1 Rezeptorantagonist Il-1-Ra [*Firestein*, 1998]. Kommt es zum Sistieren der Entzündungsreaktion, kann das intraartikuläre Pannusgewebe in ein fibröses und von Knorpel durchsetztes Narbengewebe übergehen [*Nagashima et al.*, 1995; *Mohr*, 1996].

Die hier nur angedeuteten Prozesse lassen erahnen, dass es sich bei der Aufrechterhaltung des inflammatorischen Prozesses der RA um einen Circulus vitiosus handelt, die ein sehr komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren erfordert und noch nicht bis ins letzte Detail verstanden ist (siehe auch Abb. 2.1).




*Quelle: Paleolog* [2002]

*Abbildung 2.1:* Circulus vitiosus der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis: Die synoviale Hyperplasie und Proliferation führt zum gesteigerten metabolischen und Sauerstoffbedarf bei gleichzeitiger Entfernungszunahme der Zellen von den Blutgefäßen. Die dadurch bedingte Hypoxie stellt einen entscheidenden Stimulus für die Angiogenese dar. Die Zunahme der Gefäße erleichtert die Infiltration von Zytokinen, Wachstumsfaktoren (GF = Growth Factor) und Entzündungszellen und sorgt somit für die Aufrechterhaltung der synovialen Hyperplasie.

| **Stimulatoren der Angiogenese** | | |
|---|---|---|
| Entzündungszellen | Wachstumsfaktoren | Zytokine / Mediatoren |
| Monozyten/Makrophagen | VEGF | Hypoxie |
| Lymphozyten | FGF | TNF-$\alpha$ |
| Mastzellen | PDGF | HIF-1 |
| synoviale Fibroblasten | TGF-$\beta$ | Il-1 |
| synoviale Makrophagen | HGF | Il-10 |
| Polymorhpkernige Leukozyten | PD-ECGF | Thrombospondin |
| | | Angiopoetin |
| | | Il-8 |
| | | V-CAM 1 |
| | | E-Selektin |
| | | Il-2 |
| | | ECM |
| | | Integrine |
| | | NO |

*Quelle: Koch* [1998]; *Schrieber & Jackson* [1998]; *Paleolog* [2002]
*Abkürzungen:* VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor; FGF = Fibroblast Growth Factor; PDGF = Platelet Derived Growth Factor; TGF = Transforming Growth Factor; PD-ECGF = Platelet Derived Endothelial Growth Factor; TNF = Tumor Necrosis Factor; HIF = Hypoxia Inducible Factor; Il = Interleukin; HGF = Hepatocyte Growth Factor; V-CAM = Vascular Cell Adhesion Molecules; ECM = Extracelluläre Matrix; NO = Stickstoffmonoxid

*Tabelle 2.2:* Übersicht über stimulierende Faktoren der Angiogenese

### 2.1.3 Stellenwert der synovialen Angiogenese im inflammatorischen Prozess der Rheumatoiden Arthritis

Als Angiogenese wird die Entstehung neuer Gefäße aus einem bereits bestehendem Kapillarsystem bezeichnet. Physiologisch spielt sie eine entscheidende Rolle z.B. bei der Wundheilung oder dem weiblichen Zyklus. Aber auch bei pathologischen Prozessen wie bei Malignomentstehung und Malignomwachstum, der diabetischen Retinopathie oder auch der RA. Die Angiogenese ist ein gut koordinierter und komplexer Prozess, an dem viele Faktoren beteiligt sind [*Walsh*, 1999] (siehe Tab. 2.2 und 2.3). Sie wird durch die von hypoxischem oder verletztem Gewebe ausgeschütteten pro-angiogenetischen Moleküle getriggert. Zunächst kommt es zur Degradation der Basalmembran

| **Inhibitoren der Angiogenese** | | |
|---|---|---|
| Zytokine / Mediatoren | Proteinfragmente | Medikamente |
| TNF-$\alpha$ | Angiostatin | DMARDs |
| Il-1 | Endostatin | GC |
| IFN-$\gamma$ | Fibronektin | NSAID |
| Il-12 | | |
| Thrombospondin | | |
| TIMPs | | |
| Platelet-factor 4 | | |
| sFlt-1 | | |

*Quelle: Koch* [1998]; *Schrieber & Jackson* [1998]; *Paleolog* [2002]
*Abkürzungen:* TNF = Tumor Necrosis Factor; Il = Interleukin; IFN = Interferon; TIMPs = Tissue Inhibitor of Metalloproteinases; sFlt-1 = soluble Flt-1; DMARD = Disease Modifying Antirheumatic Drugs; GC = Glukokortikoide; NSAID = Nonsteroidale Anti-Inflammatory Drugs

*Tabelle 2.3:* Übersicht über inhibierende Faktoren der Angiogenese

(BM), gefolgt von der Migration von Endothelzellen durch die degenerierte BM und Ausbildung eines neuen Gefäßsprosses. Die Endothelzellen an der Spitze des Sprosses dringen weiter ins Gewebe ein und gehen im Gegensatz zu denen in der Mitte des Sprosses nicht in Mitose. Ein neues Lumen entwickelt sich. Durch Anastomosierung mit bereits bestehenden und anderen neu gebildeten Gefäßen entsteht ein neues Gefäßnetz. Eine neue BM bildet sich, Perizyten wandern entlang des neuen Gefäßes ein und das Blut beginnt zu fließen [*Schrieber & Jackson*, 1998; *Paleolog*, 2002].

Im Gegensatz zur physiologisch vorkommenden Angiogenese, die durch ein Übergewicht von Inhibitoren stark reguliert und limitiert wird, kommt es bei der RA zu einem Übergewicht der Stimulatoren [*Koch*, 1998]. Damit kann die Angiogenese länger aufrecht erhalten werden und sich verselbstständigen [*Koch*, 1998]. Das neu entstehende Gefäßnetz ist sowohl in seiner Gefäßdichte als auch durch seine Gefäßverzweigung anormal und schlecht organisiert [*Firestein*, 1998; *Distler et al.*, 2004]. Obwohl es den lokalen Ansprüchen im entzündeten Gelenk nicht nachkommen kann [*Distler et al.*, 2004], da es im Vergleich zum Pannus zu langsam wächst, ermöglichen die neu gebildeten Gefäße die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie das Vordringen von

Entzündungszellen in das synovitische Gelenk und somit die Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses (siehe auch Abb. 2.1) [*Schrieber & Jackson*, 1998; *Walsh*, 1999], [*Taylor*, 2005]. Die Angiogenese spielt also in der Pathogenese der RA eine zentrale Rolle und ist als pathogenetische Antwort auf den gesteigerten metabolischen Bedarf und der damit verbundenen lokalen Hypoxie der synovialen Zellen im Gelenk zu sehen [*Afuwape et al.*, 2002]. Experimentelle in vitro Studien an Arthritismodellen lassen die Vermutung zu, dass die Knochen- und Knorpeldestruktion eher an die Angiogenese als an das Pannuswachstum gekoppelt ist [*Taylor*, 2005].

Es sind zahlreiche pro-angiogenetische Faktoren bekannt (siehe Tab. 2.2). Dazu zählen z.B. Entzündungszellen (Makrophagen, Fibroblasten, Lymphozyten, Mastzellen) mit ihren Sekretionsprodukten, hier gehören die Zytokine TNF-$\alpha$ und Il-1 dazu, die die Angiogenese direkt über die Interaktion mit Endothelzellen und indirekt über eine weitere Aktivierung von z.B. Makrophagen und synovialen Fibroblasten stimulieren. Weiter gehören dazu Wachstumsfaktoren wie der VEGF, Zytokine sowie andere Mediatoren wie Stickstoffmonoxid, die Hypoxie oder nicht lösliche Faktoren wie z.B. Extrazelluläre-Matrix-Proteine (z.B. Proteoglykane und Kollagene) und die Integrine.

Einer der wesentlichsten Faktoren zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion und zur Angiogenese ist die bereits schon genannte Hypoxie (siehe Abb. 2.1). Sie wird durch das entzündungsbedingte saure Milieu im Gelenk und das Ungleichgewicht zwischen erhöhtem intraartikulären Druck und dem geringeren Perfusionsdruck der Kapillaren ausgelöst. Außerdem spielen die erhöhten metabolischen Ansprüche durch Hyperplasie und Proliferation der Synovialiszellen eine Rolle [*Paleolog*, 2002; *Schrieber & Jackson*, 1998; *Koch*, 1998; *Distler et al.*, 2004]. Die Hypoxie im Gelenk führt zur vermehrten Stimulation und Ausschüttung des pro-inflammatorischen Moleküls Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1, und zur weiteren Stimulation der TNF-$\alpha$- und Il-1-Sekretion [*Distler et al.*, 2004]. Sowohl HIF-1 als auch TNF-$\alpha$ und Il-1 führen zur Stimulation von VEGF, dem wohl am besten charakterisierten und endothelspezifischsten Mitogen (siehe S. 11) [*Distler et al.*, 2004].

Inhibitoren (siehe Tab. 2.3) der Angiogenese sind bis heute nur spärlich

bekannt und untersucht. Sie sind jedoch hinsichtlich neuer therapeutischer Ansätze Gegenstand der aktuellen Forschung. Bisher bekannte Inhibitoren sind Thrombospondin, IFN-gamma und TIMPs, aber auch verschiedene Medikamente wie Glukokortikoide und Bucillamin [*Nagashima et al.*, 2000] oder der TNF-$\alpha$ Inhibitor Infliximab [*Taylor et al.*, 2000] (siehe Tabelle 2.3).

**VEGF**

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), ein Heparin-bindendes Glykoprotein, ist der am besten charakterisierte und einer der stärksten sowie endothelspezifischste Stimulator der Angiogenese. Es sind verschiedene Isoformen dieses Proteins, die durch alternatives Splicing der mRNA entstehen, bekannt [*Taylor & Sivakumar*, 2005]. Der VEGF, ursprünglich als Gefäßpermeabilitätsfaktor von Tumorzellen entdeckt, spielt sowohl bei wichtigen physiologischen Prozessen wie der Wundheilung und dem weiblichen Zyklus als auch bei pathologischen Prozessen mit angiogeneseabhängigen Erkrankungen wie Malignomen oder der RA eine wichtige Rolle [*Paleolog*, 2002]. Inzwischen ist bekannt, dass der VEGF duale Funktionen als Gefäßpermeabilitätregulator und als sehr potentes Endothelzellmitogen besitzt [*Koch et al.*, 1994; *Paleolog*, 2002]. Aufgrund dieser Eigenschaften reguliert der VEGF verschiedene Schritte der frühen entzündlichen Veränderungen im Gelenk, die in der Folge die Angiogenese stimulieren. Dazu gehören die initiale Vasodilatation durch Induktion von Stickstoffmonoxid (NO), die Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit Ausbildung von Ödem und Schwellung und die Aktivierung der Synthese von Plasminogenaktivatoren und MMP-1 in Endothelzellen, die zum Remodeling der perivaskulären Matrix führen [*Distler et al.*, 2004]. Der VEGF stimuliert auf parakrinem Weg die Proliferation und Migration von Endothelzellen [*Nagashima et al.*, 1995] und schützt diese vor der Apoptose [*Distler et al.*, 2004]. *Koch et al.* [1994] vermuten, dass die VEGF-produzierenden Zellen des synovialen Gewebes chemotaktisch auf andere Zellen wirken, damit diese im entzündeten Gelenk ebenfalls VEGF sezernieren. Eine weitere wichtige Rolle spielt der VEGF bei der für die RA typischen Knorpeldestruktion und der dadurch bedingten Gelenkzerstörung [*Ballara et al.*, 2001; *Afuwape et al.*, 2002].

Der VEGF ist sowohl in der Synovialmembran, der Synovialflüssigkeit als auch im Serum (i.S.) bei Patienten mit RA im Vergleich zu Gesunden deutlich erhöht [*Koch et al.*, 1994; *Nagashima et al.*, 1995; *Harada et al.*, 1998; *Strunk et al.*, 2004]. In der Synovialmembran wird der VEGF hauptsächlich von Synoviozyten, subintimalen Makrophagen, aber auch von perivaskulären glatten Muskelzellen der Gefäße [*Koch et al.*, 1994; *Nagashima et al.*, 1995] und von Endothelzellen des Pannusgewebes gebildet [*Paleolog*, 2002]. In der Synovialflüssigkeit wird der VEGF durch die dort befindlichen neutrophilen Granulozyten exprimiert [*Paleolog*, 2002].

Dahingegen ist der Ursprung des VEGF im Serum bis heute nicht genau bekannt. In vitro wurde der VEGF auf Thrombozyten nachgewiesen [*Mohle et al.*, 1997]. *Bottomley et al.* [1999] zeigten, dass mononukleäre Zellen des peripheren Blutes nach Stimulation von z.B. TNF-$\alpha$ vermehrt VEGF ausschütten. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass der VEGF i.S. aus vielen unterschiedlichen Quellen stammt. *Harada et al.* [1998] vermuten, dass die Serumkonzentration des VEGF die synovitische Angiogenese in vielen Gelenken repräsentiert.

Die Expression des VEGF ist über mehrere Mechanismen geregelt. Den stärksten Stimulus stellt die im Gelenk bestehende Hypoxie dar (siehe vorne). Durch sie wird der sogenannte HIF-1, ein durch Hypoxie induzierbarer Transkriptionsfaktor, vermehrt aktiviert. Seine Überexpression führt zur Steigerung der VEGF-mRNA-Produktion und damit zur Initiation der Angiogenese [*Distler et al.*, 2004], aber auch zur Aktivierung eines Genprogramms zur Aufrechterhaltung der Synovitis [*Taylor & Sivakumar*, 2005]. Synoviale Fibroblasten exprimieren VEGF nach Stimmulation von TNF-$\alpha$, Il-1 [*Fava et al.*, 1994] und TGF-$\beta$ [*Berse et al.*, 1999], sowie nach der physikalischen Interaktion von aktivierten Leukozyten mit synovialen Fibroblasten [*Kasama et al.*, 2001]. Auch Platelet direved growth factor (PDGF) und Fibroblast Growth Factor (FGF) gehören zu den VEGF-Stimulatoren [*Paleolog*, 1996; *Afuwape et al.*, 2002].

Zu den Inhibitoren des VEGF gehört sein löslicher Rezeptor sFlt-1, der sich im Gelenk der RA ebenfalls deutlich erhöht zeigt [*Ballara et al.*, 2001] sowie das Molekül Endostatin [*Taylor & Sivakumar*, 2005]. *Nagashima et al.*

[2000] zeigten in in vitro Studien, dass Basistherapeutika, die so genannten Disease Modifying Antirheumatic Drugs (DMARDs), sehr effektiv die VEGF-Produktion in Synoviozyten hemmen. Mehrere klinische Studien inklusive der hier vorliegenden Arbeit zeigten nach der Gabe von Anti-TNF-$\alpha$-Antikörpern eine deutliche Reduktion der Konzentration des VEGF (i.S.) [*Paleolog*, 2002; *Strunk et al.*, 2006]. Auch andere DMARDs wie MTX oder Sulfasalazin [*Paleolog*, 2002] oder auch die Glukokortikoide [*Strunk et al.*, 2006; *Nagashima et al.*, 2000] haben einen inhibitorischen Effekt auf die VEGF-Konzentration.

**TNF-$\alpha$**

Wie bereits mehrfach erwähnt, zählt der Tumor Necrosis Factor-$\alpha$ zu den Schlüsselenzymen der Pathogenese der RA, da er in der Entzündungs- und Angiogenesekaskade weit oben steht [*Paleolog*, 1996]. Es ist ein stark proinflammatorisch und in vivo angiogenetisch [*Koch et al.*, 1994] wirkendes Polypeptid, dass hauptsächlich von Makrophagen, zu einem geringeren Teil auch von Lymphozyten, gebildet wird. TNF-$\alpha$ findet sich hauptsächlich in den Synoviozyten und zu geringeren Teilen in der synovialen Subintima [*Firestein*, 1998]. Es konnte, wie auch der VEGF, in der Gelenkflüssigkeit von RA-Patienten nachgewiesen werden [*Firestein*, 1998]. TNF-$\alpha$ scheint insbesondere die proliferative Phase und die entzündlichen Aspekte der RA zu verursachen [*Firestein*, 1998]. In vitro Studien zeigen, dass nach der Zugabe von TNF-$\alpha$ und Il-1$\beta$ zu synovialen Fibroblasten-Kulturen die HIF-1$\alpha$ mRNA hochreguliert [*Taylor & Sivakumar*, 2005] und über diesen Weg auch die VEGF-Synthese stimuliert wird (siehe oben). TNF-$\alpha$ induziert somit auch indirekt die Synthese von VEGF. Außerdem stimuliert TNF-$\alpha$ die Synthese von MMPs, Il-1, Il-6, Il-8 und führt zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen. TNF-$\alpha$ wird durch IFN-$\gamma$ gehemmt, welches im RA-Gelenk jedoch in nur sehr geringen Konzentrationen vorhanden ist, so dass es zu keiner effektiven Hemmung kommt [*Firestein*, 1998; *Sule & Bathon*, 2004].

### 2.1.4 Neue Therapiestrategien und ihre Bedeutung für die Rheumatoide Arthritis

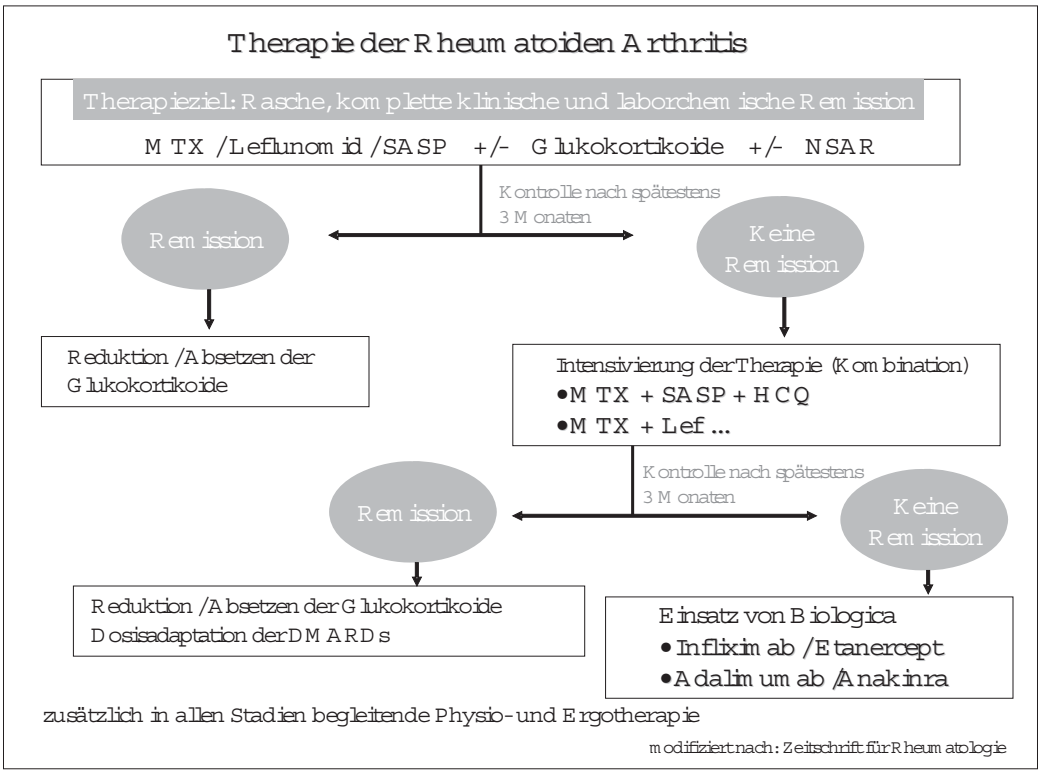
Im Zentrum der therapeutischen Bemühungen stehen die Linderung und die Verhinderung der gelenkspezifischen Beschwerden der RA: Schmerz, Schwellung und als Folge der Entzündung Destruktion und Funktionseinschränkungen des Gelenkes. Obwohl sich die Therapieprinzipien in den letzten fünf Jahren Dank des besseren Verständnisses der Pathogenese der RA sowie Zulassung neuer und besseren Kenntnis alter Medikamente maßgeblich verändert haben, sind die Ziele der Therapie erhalten geblieben:

1. Aufhalten der Gelenkzerstörung (DMARDs)
2. Linderung des Schmerzes (NSAR, Analgetika, nicht medikamentöse Therapie)
3. Erhalt der Funktionalität der Gelenke (Physio- und Ergotherapie)

   [*Strunk et al.*, 2005]

Wurde in der Vergangenheit eher vorsichtig und abwartend mit einer medikamentösen Basistherapie begonnen, wird heute so früh und aggressiv wie möglich therapiert. Damit soll eine persistierende Entzündung im Gelenk, die kaum noch zu beheben ist [*Miossec*, 2000] und irreversible Schäden an Knorpel und Knochen verursacht, verhindert werden. Daher wird heute nach Sicherung der Diagnose RA unverzüglich mit einem Basistherapeutikum (BT) in Monotherapie begonnen. Nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh) kommen dafür Methotrexat (MTX), Leflunomid und Sulfasalzin in Betracht. Die BT spielen die eigentlich tragende und krankheitsmodifizierende Rolle in der Behandlung der RA [*Strunk et al.*, 2005]. Meist ist trotzdem eine Kombination von einem BT mit einem Nicht Steroidalen Antirheumatikum (NSAR)/Analgetika zur schnellen Schmerzbehandlung und mit oralen Glukokortikoiden zur zügigen Entzündungshemmung nötig. Studien zeigen zudem, dass sich allein durch die orale Gabe von Prednisolon Gelenkmakrophagen und ihre Sekretionsprodukte, darunter TNF-$\alpha$ und VEGF, effektiv hemmen lassen und somit die Angiogenese und

Destruktion im synovitischen Gelenk verlangsamt wird [*Kirwan*, 1997; *Gerlag et al.*, 2004]. Zu jeder RA-Therapie gehören eine, vom Stadium unabhängige, begleitende Physio- und Ergotherapie, die die Funktionalität der betroffenen Gelenke erhalten sollen [*Strunk et al.*, 2005]. Das weitere therapeutische Vorgehen ist der Abbildung 2.2 zu entnehmen.




**Abk.:** MTX = Methotrexat, SASP = Sulfasalazin, Lef = Leflunomid, HCQ = Hydroxychloroquin, NSAR = nicht steroidale Antirheumatika, DMARDs = disease modifying drugs

*Abbildung 2.2:* Therapieschema zur Behandlung der Rheumatoiden Arthritis nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie

Die Zytokine TNF-$\alpha$ und Il-1 sind die Angriffspunkte der neuesten Medikamente, den so genannten Biologika. Bisher zugelassen sind die anti-TNF-$\alpha$ Antikörper Infliximab und Adalimumab, der lösliche TNF-$\alpha$-Rezeptor des Fc-Fusionsproteins Etanercept, sowie der Il-1 Rezeptor Antagonist Anakinra. Alle Biologika sind von der DGRh in Mono- oder Kombinationstherapie mit konventionellen BTs nach frühestens sechs Monaten erfolgloser oder nicht

ausreichender Therapie empfohlen (siehe Abb. 2.2). Die TNF-$\alpha$ Blocker zeigen in Kombination mit MTX eine sehr effektive Hemmung der Synovitis durch Blockade von TNF-$\alpha$ und anderer Zytokine wie dem VEGF oder Il-1 sowie Hemmung der Migration von Entzündungszellen [*Taylor et al.*, 2000, 2004; *Quinn et al.*, 2005]. Die Hinweise auf eine Knorpel-und Knochenprotektion, bis hin zum leichten Knochenaufbau durch die therapiebedingte Hemmung der Angiogenese verdichten sich [*Taylor et al.*, 2004]. *Tak et al.* [1996] zeigten einen positiven, wenn auch nur übergangsweise vorhandenen, Effekt von Infliximab auf die endothelabhängige Vasodilatation. Die Wirkung des anti-TNF-$\alpha$-Antikörpers Infliximab und die Wirkung von Prednisolon auf die Konzentration des Angiogenesefaktors VEGF wird im Rahmen dieser Arbeit, wie schon von *Strunk et al.* [2006] veröffentlicht, vorgestellt.

Als weiterer Therapieansatz ist auch ein VEGF-Antagonist in der Diskussion, wie er für das metastasierte Colon - Karzinom seit Februar 2005 (Bevacizumab) bereits zugelassen ist. Das Nutzen-Risiko-Profil für die RA erscheint jedoch sehr ungünstig, so dass nicht mit einer baldigen klinischen Anwendung zu rechnen ist.

## 2.2 Ultraschall und Power Doppler-Sonographie

### 2.2.1 Physikalische Grundlagen und Grundbegriffe des Ultraschalls und der Doppler-Sonographie

#### Sonographie

Die Sonographie nutzt die Eigenschaften des Ultraschalls (US) aus, der physikalisch gesehen zu den Schallwellen gehört und in Frequenzbereichen oberhalb der Hörschwelle liegt. Er wird in der Medizin zur Untersuchung und nebenwirkungsfreien Bilddarstellung von inneren Körperorganen eingesetzt, wobei die an den Gewebsgrenzflächen und Bereichen höherer Dichte unterschiedlich stark reflektierten Wellen registriert werden [*Paus*, 1995]. Als Sender und gleichzeitig als Empfänger fungiert ein piezoelektrischer Kristall, von dem ein kurzer Ultraschallimpuls ins Gewebe ausgesendet wird und anschlie-

ßend die an den Grenzflächen reflektierten Schallwellen in Abhängigkeit von der Zeit registriert werden. Die Tiefenlokalisation $s$ einer Grenzfläche ist über die Laufzeit $t$ und die Geschwindigkeit $v$ gegeben, wobei gilt:

$$s = \frac{vt}{2} \tag{2.1}$$

Als Bildinformation wird die Schallintensität in Abhängigkeit von $s$ in einem Horizontalschnitt aufgetragen, so dass die anatomische Struktur eines Organs im sogenannten Grau-Skalen-Bild oder B-Bild erkennbar wird. Je heller der Punkt, desto höher die Dichte des reflektierenden Mediums. Am Knochen findet eine Totalreflektion des Ultraschalls statt, so dass dieser auf dem Bildschirm weiß mit dahinter liegendem Schallschatten dargestellt wird; Wasser dient kaum als Reflektor, so dass es im Bild schwarz erscheint [*Schmidt*, 1997].

### Doppler-Sonographie

Bei der bisherigen Darstellung wurde angenommen, dass sowohl die Schallquelle als auch der Schallempfänger sowie das Medium (das Gewebe) ruhen. Wenn das nicht der Fall ist, registriert man Frequenzänderungen, ein als Doppler-Effekt[2] bekanntes physikalisches Phänomen. Die Frequenz des reflektierten Schalls ist höher bei Bewegungen auf die Schallquelle zu und niedriger bei Bewegungen von der Schallquelle weg [*Paus*, 1995]. Damit lassen sich Gefäße identifizieren und Fließgeschwindigkeiten bestimmen [*Schmidt*, 1997; *Ruland*, 2000].

Die Differenz zwischen der ausgesendeten Ultraschallfrequenz (Arbeitsfrequenz) und der empfangenen reflektierten Ultraschallfrequenz nennt man die Doppler-Frequenz oder auch Doppler-Shift [*Ruland*, 2000]. Als Differenzenfrequenz liegt sie bei den physiologischen Geschwindigkeiten im hörbaren Schallwellenbereich und lässt sich somit auch über Lautsprecher wiedergeben.

Die heutigen Sonographiegeräte verwenden im allgemeinen den gepulsten Doppler (pulsed wave = PW-Doppler), bei dem der Ultraschall nicht mehr kontinuierlich wie beim CW-Doppler (continues wave), sonder in Form

[2] **Doppler-Effekt:** benannt nach dem Physiker Christian Doppler (1803-1853)

einzelner Ultraschallpakete rhythmisch mit einer bestimmten Frequenz (= pulse repetition frequency, PRF) ausgesendet wird. Dadurch ist eine Tiefenbestimmung des Messvolumens möglich (diese Information ist mit dem CW-Doppler nicht erhältlich) [*Schmidt*, 1997]. Es entsprechen höher detektierte Frequenzen höheren Geschwindigkeiten, niedrigere Frequenzen niedrigeren Geschwindigkeiten sich bewegender Grenzflächen (z.B. Erythrozyten) [*Ruland*, 2000]. Für die Darstellung der Doppler-Frequenzen ist eine farbliche Kodierung gebräuchlich. Hiermit kann innerhalb des B-Bildes und damit in der Zuordnung zu den anatomischen Strukturen Lage und Richtung der erfassten Blutströmung abgebildet werden.

Die farbliche Kodierung gibt entweder eine mittlere Frequenzverschiebung (Farb-Doppler (CD[3])) oder die Integration über das Frequenzspektrum (Power Doppler (PD), siehe Abschnitt 2.2.2) an. Diese Verfahren stellen lediglich unterschiedliche Analyseverfahren der einmal gewonnenen Doppler-Information dar [*Rubin et al.*, 1995].

### 2.2.2 Power Doppler-Sonographie

Die Power Doppler-Sonographie (PD-Songraphie) wurde Anfang der 1990er Jahre von Rubin und Adler vorgestellt [*Rubin & Adler*, 1993]. Sie gehört ebenso wie der Farb-Doppler zu den Doppler-sonographischen Verfahren. Sowohl für den Power Doppler (PD) als auch den Farb-Doppler (CD) werden die Informationen durch Messung der Doppler-Frequenz gewonnen und im Real-Time-Verfahren auf dem Display dargestellt. Die Weiterverarbeitung und Analyse der Signale geschieht jedoch auf unterschiedlichen Wegen. Im PD-Modus werden die empfangenen Doppler-Frequenzen integriert und auf einer monochromatischen Skala wiedergegeben. Durch die Integration gehen die Informationen über Geschwindigkeit und Flussrichtung zunächst verloren (sie können durch Differenzierung zurückgewonnen werden). Im PD-Modus wird die integrierte Power der Doppler-Signale farblich kodiert, die abhängig von der Anzahl der sich bewegenden Korpuskel/Reflektoren ist, anstelle der mittleren Frequenzverschiebung der Doppler-Frequenzen in der CD-Sonographie

[3] **CD**: Color Doppler

(siehe oben) [*Rubin et al.*, 1994]. Die Anzahl der Reflektoren wird durch ein komplexes Zusammenspiel aus Hämatokrit, Erythrozytenaggregation, Gefäßdurchmesser und Flußgeschwindigkeit bestimmt [*Rubin et al.*, 1994; *Martinoli et al.*, 1998]. So wie in der CD-Sonographie kann auch im PD-Modus eine Tiefennormalisierung erfolgen [*Rubin et al.*, 1995].

### Vor- und Nachteile der Power Doppler-Sonographie im Vergleich zum Farb-Doppler

Die zwei klinisch bedeutsamsten Vorteile des PD gegenüber des CD sind der erweiterte dynamische Bereich, der eine drei- bis fünffach erhöhte Sensitivität zulässt, und die weitestgehende Winkelunabhängigkeit des Power Doppler-Signals, welches u.a. die Darstellung von geschlängelten Gefäßen deutlich verbessert [*Rubin & Adler*, 1993].

Der erweiterte dynamische Bereich macht sich durch den erweiterten Doppler-Bereich bemerkbar, der bis an das Hintergrundrauschen heran reicht. Das Hintergrundrauschen im US-System ist ein zufälliges Ereignis mit einer zufälligen Frequenz und niedriger, gleichmäßiger Power, welches sich in der CD-Sonographie als Fluss aus einer beliebigen Richtung darstellen und echte Gefäßsignale maskieren kann. Im Gegensatz dazu ist das Integral (im PD-Modus) des Hintergrundrauschens wesentlich kleiner als das Integral von echtem Fluss. Deshalb hebt sich echter Fluss deutlich von dem Hintergrundrauschen ab [*Rubin & Adler*, 1993].

Die Sensitivität der PD-Sonographie wird weiter gesteigert durch eine fast vollständige Winkelunabhängigkeit, da sich die Power eines Korpuskels/Reflektors nicht ändert, solange der Doppler-Effekt beobachtbar ist. So ändert sich zwar die Form der Intensitäts-Spektral-Dichte-Kurve, nicht aber die darunterliegende Fläche und somit auch nicht das wiedergegebene Signal [*Rubin & Adler*, 1993; *Rubin et al.*, 1994, 1995].

Ein weiterer Vorteil der PD-Sonographie besteht darin, dass es nicht zu dem für den CD typischen Aliasing Phänomen kommt. Der Grund dafür liegt in der Repräsentation des sich nicht ändernden Integrals der gesamten Power des Doppler Signals [*Rubin & Adler*, 1993].

Die größte Einschränkung der PD-Sonograpie ist durch ihre extreme Emp-

findlichkeit gegenüber kleinsten Bewegungen gegeben, was zu Artefakten führt [*Rubin & Adler*, 1993]. Damit ist die PD-Sonographie nicht tauglich, um z.B. Herz oder Leber zu untersuchen. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass es durch die Integration zum Verlust der Fluss- und Geschwindigkeitsinformationen kommt [*Rubin et al.*, 1994], was die Geräte jedoch durch die Möglichkeit der Differenzierung der Daten ausgleichen können [*Martinoli et al.*, 1998].

Die PD-Sonographie erreicht eine hohe Sensitivität insbesondere für niedrige Blutflussgeschwindigkeiten, wie sie in kleinsten Gefäßen zu finden sind. Damit ist sie die geeignete Methode zur Darstellung synovialer Vaskularisierung an entzündeten Gelenken. Durch die Kombination von Grau-Skalen-Sonographie mit der PD-Sonographie ist neben der Detektion von Gefäßen auch deren genaue Lokalisation möglich.

### 2.2.3 Stellenwert der (Doppler-)Sonographie für Diagnostik und Therapiekontrolle für die Rheumatoide Arthritis

Die rasanten Entwicklungen von US-Geräten mit hochfrequenten Schallköpfen und leistungsstarken Computern in den letzten 10 Jahren verhalf der Sonographie von muskuloskeletalen Strukturen und von kleinsten Gefäßen im entzündeten Gelenk zu einer inzwischen etablierten bildgebenden Methode für die Diagnostik und Verlaufsbeobachtung in der Rheumatologie. Besonders in Ergänzung zu Anamnese und zur klinischen Untersuchung spielt die Darstellung von oberflächlichen Strukturen und Weichteilgeweben, wie Sehnen, Bursen und Gelenken mit ihren Veränderungen, eine wichtige Rolle für die Diagnostik. So lassen sich durch die Kombination von Grau-Skalen-Sonographie mit PD-Sonographie neben Tenosynovitiden, Gelenkergüssen und Pannus sogar oberflächliche Knorpel- und Knochenveränderungen darstellen (soweit die knöchernen Läsionen der sonographischen Untersuchung zugänglich sind), die z.T. noch nicht mit konventionellen Röntgenuntersuchungen erkennbar sind [*Newman et al.*, 1996]. Diese Möglichkeit stellt insbesondere für die Diagnosestellung der early-RA (bis sechs Monate nach Er-

krankungsbeginn) und very-early-RA (VERA)(bis drei Monate nach Erkrankungsbeginn) und somit für den Zeitpunkt des Therapiebeginns eine deutliche Verbesserung dar. So erklären sich auch Forderungen, die ACR-Kriterien von 1987 [*Arnett et al.*, 1988] hinsichtlich der geforderten Röntgen radiologisch nachgewiesenen Destruktionen durch die mit MRT und Sonographie früher nachweisbaren Veränderungen zu ersetzen [*Schmidt*, 2001] oder zumindest zu ergänzen. Nur durch eine frühe und sichere Diagnosestellung ist auch ein frühes und aggressives therapeutisches Eingreifen, wie es heute gefordert ist (siehe Kapitel 2.1.4), und damit eine deutliche Verbesserung der Prognose möglich.

# Kapitel 3

# Probandengruppen und Methoden

In diesem Kapitel wird im ersten Teil die Zusammensetzung der einzelnen Probandengruppen vorgestellt. Im zweiten Teil dieses Kapitels werden die Untersuchungsabläufe für die einzelnen Gruppen und im dritten Teil die Auswertungsmethoden (der ELISA[1] zur Bestimmung der VEGF-Konzentrationen und die zur Anwendung gekommenen statistischen Tests) beschrieben. Im Folgenden wird zur Vereinfachung der VEGF i.S. nur noch als VEGF benannt.

## 3.1 Patienten und Kontrollgruppe

Stationär aufgenommene Patienten in der Zeit von August 2002 bis März 2003 der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim mit gesicherter Rheumatoider Arthritis wurden bezüglich der Ein- und Ausschlußkriterien zur Aufnahme in die Patientengruppe geprüft (siehe Tab. 3.1). Bei allen Patienten war klinisch eine aktive Carpusarthritis nachweisbar: auslösbarer Volarbeugeschmerz und deutlich sichtbare Schwellung im Carpus. Ausschlusskriterien waren andere rheumatische Erkrankungen, eine Schwangerschaft, solide Tumorerkrankungen und größere Wunden. Insgesamt konnten 24 Patienten (davon 19 Frauen und 5 Männer) in die Studie aufgenommen werden. Das Durchschnittsalter betrug (Median =) 64,5 Jahre (38 bis 79 Jahre).

[1] **ELISA**: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

| **Einschlusskriterien** | **Ausschlusskriterien** |
|---|---|
| gesicherte RA gemäß ACR-Kriterien | andere rheumatische Erkrankungen |
| *aktive Carpusarthritis:* | Schwangerschaft |
| Volarbeugeschmerz | Tumorerkrankungen |
| Schwellung im Carpus | große Wunden |
| | *zusätzlich für die Kontrollgruppe:* |
| | Autoimmunerkrankungen |
| | Einnahme von immunsuppressiven Medikamenten |

*Tabelle 3.1:* Ein- und Ausschlusskriterien

Die 24 Patienten ließen sich zwei Untergruppen zugeordnen, die nach unterschiedlichen Gesichtspunkten ausgewertet wurden (im Folgenden näher beschrieben). Dabei ließen sich fünf Patienten (Nr. 1, 5, 6, 13, 16) beiden Gruppen zuteilen (siehe auch Abb. 3.1).

In der Gruppe A wurden 21 Patienten (16 Frauen und 5 Männer; mittleres Alter 64 Jahre) untersucht. Die Gruppe A setzte sich aus 10 bisher vollkommen unbehandelten, d.h. therapienaiven Patienten und 11 Patienten, die trotz einer Prednisolon- und/oder einer Basistherapie an einem Rezidiv litten, zusammen. Mit den erhobenen Daten der Gruppe A wurde nach einem möglichen Zusammenhang zwischen der Höhe der aktuellen VEGF-Konzentration und den zum gleichen Zeitpunkt nachweisbaren intraartikulären Power Doppler-Signalen, die qualitativ (bezüglich ihrer Intensität) auf einer dreistufigen Skala eingeteilt wurden (siehe unten), gesucht. Außerdem wurden gesunde Probanden bezüglich der Unterschiede der VEGF-Konzentration und der Doppler-Intensität am untersuchten Handgelenk mit den RA-Patienten verglichen (siehe Tab. 3.2).

Für die acht Patienten der Gruppe B wurde der Verlauf der VEGF-Konzentration und des CRP unter einer neu eingeleiteten Prednisolon- (fünf Patienten) bzw. Infliximab- (drei Patienten) Therapie beleuchtet. Die Gruppe der fünf bisher vollkommen therapienaiven Patienten (Erstdiagnose einer RA) besteht aus vier Frauen mit einer Erkrankungsdauer von bis zu einem Jahr und einem Mann, mit einer bereits langen Krankheitsgeschichte von circa zehn Jahren. Das mittlere Alter betrug 64 Jahre (55 bis 69 Jahre). Die zweite Untergruppe (Infliximab-Therapie) setzte sich aus drei Frauen mit

| Patient | Alter | Geschlecht | Gruppe | VEGF | PD-Signal innen | Fluss max. syst. | Kapselabhebung | PD-Grading | CRP | Therapie b. Aufnahme | RF | Erkrankungsdauer | ED |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | [J] | | | [pg/ml] | | [cm/s] | [mm] | [mm] | | [mg/dl] | | | [J] |
| 1 | 70 | w | A;B | 792 | 1 | 10 | 2,6 | 3 | 5,8 | keine | 0 | 0,5 | 1 |
| 2 | 70 | w | A | 211 | 1 | 7 | 2,5 | 2 | 0,4 | keine | 0 | 4 | 1 |
| 3 | 50 | w | A | 1468 | 0 | 0 | 1,5 | 1 | 2 | NSAR | 0 | 0,25 | 1 |
| 4 | 66 | w | A | 853 | 0 | 0 | 2,2 | 1 | 2,2 | NSAR | 0 | 6 | 1 |
| 5 | 64 | w | A;B | 1160 | 1 | 7 | 2,3 | 2 | 0,6 | keine | 0 | 0,25 | 1 |
| 6 | 64 | w | A;B | 1183 | 1 | 20 | 3,6 | 2 | 2,9 | NSAR | 0 | 1 | 1 |
| 7 | 75 | w | A | 1151 | 1 | 30 | 2,1 | 2 | 10,8 | NSAR | 1 | 0,75 | 1 |
| 8 | 65 | w | A | 737 | 0 | 20 | 2,9 | 1 | 7,7 | keine | 0 | | 1 |
| 9 | 75 | m | A | 795 | 1 | 20 | 4,6 | 2 | 2,7 | NSAR | 0 | 2 | 1 |
| 10 | 45 | w | A | 567 | 1 | 25 | 5 | 2 | 2,7 | keine | | | 0 |
| 11 | 73 | w | A | 1974 | 1 | 20 | 3,3 | 3 | 8,2 | MTX | 1 | 3 | 0 |
| 12 | 74 | w | A | 1700 | 0 | 0 | 1,65 | 1 | 1 | GC | 0 | 1,5 | 0 |
| 13 | 55 | w | A;B | 315 | 1 | 18 | 3,4 | 3 | 3 | GC | 1 | 3 | 0 |
| 14 | 63 | m | A | 1410 | 1 | 20 | 3,5 | 3 | 5,1 | GC / MTX | 1 | 9 | 0 |
| 15 | 73 | w | A | 987 | 1 | 12 | 4,5 | 2 | 2,7 | Aza | 1 | 0,25 | 0 |
| 16 | 55 | m | A;B | 315 | 1 | 45 | 4 | 3 | 15,6 | keine | 1 | 10 | 1 |
| 17 | 77 | m | A | 364 | 1 | 20 | 4 | 3 | 5,2 | GC / Lef | 1 | 17 | 0 |
| 18 | 79 | w | A | 977 | 1 | 9 | 4,2 | 2 | 1,7 | GC / Lef | 0 | 6 | 0 |
| 19 | 59 | m | A | 692 | 1 | 17 | 2,9 | 3 | 0,5 | GC / MTX | 1 | 4 | 0 |
| 20 | 38 | w | A | 354 | 1 | 14 | 2,3 | 3 | 0,7 | GC | 1 | | 0 |
| 21 | 47 | w | A | 435 | 1 | 20 | 3,1 | 3 | 0,3 | GC/ MTX / Lef | 1 | 2 | 0 |
| **Median** | **65** | | | **795** | | **18** | **3,15** | | **2,7** | | | | |

*Abkürzungen:* PD = Power Doppler; RF = Rheumafaktor; ED = Erstdiagnose; 1 = ja; 0 = nein (für PD-Signal innen und ED)

*Tabelle 3.2:* Übersicht der Ergebnisse der Patienten der Gruppe A

einem mittleren Alter von 55 Jahren (46 bis 63 Jahre) zusammen. Die Erkrankungsdauer betrug zwischen 2 und 36 Jahren. Bei ihnen hatte mehr als eine Therapie mit DMARDs versagt, so dass jetzt eine Einstellung auf den anti-TNF-$\alpha$-Antikörper Infliximab erfolgte (siehe Tab. 3.3).

Außerdem wurde eine immunologisch gesunde Kontrollgruppe aufgestellt, die 11 Probanden (fünf Frauen und sechs Männer) im Alter von 20 bis 58 Jahren (im Mittel 38 Jahre) umfasste. Auch für diese Gruppe galten dieselben Ausschlußkriterien (Schwangerschaft, Tumorerkrankung und größere Wunden). Zusätzlich durften sie nicht an einer autoimmunologischen Erkrankung leiden, sowie keine immunsuppressiven Medikamente, wie z.B. Glukokortikoide, einnehmen (siehe Tab. 3.4) .

## 3.2 Versuchsablauf

Für alle Probanden, unabhängig von ihrer Gruppenzuteilung, erfolgte die Blutentnahme zur Bestimmung der VEGF-Konzentration sowie zur Ermittlung von Entzündungswerten (CRP[2], BSG[3] und Leukozytenzahl) und des Rheumafaktors vor Beginn der Prednisolontherapie (Gruppe A und Prednisolon - Untergruppe der Gruppe B), respektive vor Beginn der Therapie mit Infliximab (drei Patienten der Gruppe B). Im Regelfall fand die Blutentnahme von zwei Serumröhrchen für die VEGF-Konzentrationsbestimmung sowie ein Röhrchen für die Entzündungswerte und den Rheumafaktor vor dem Frühstück statt. Die weitere Verarbeitung der Proben für die VEGF-Konzentrationsbestimmung wird unter 3.2.2 beschrieben. Die restlichen Werte wurden im Rahmen der Routinediagnostik bestimmt.

Die Ultraschalluntersuchung (siehe unten, Abschnitt 3.2.1) der Patienten der Gruppe A wurde noch am selben Tag, spätestens aber am darauf folgenden Tag durchgeführt. Für die Probanden der Gruppe A endete damit der Versuchsablauf.

Bei den Probanden der Gruppe B, die nicht sonographisch untersucht wurden (ausgenommen der gleichzeitig der Gruppe A zugeordneten Pa-

[2]**CRP:** C reaktives Protein
[3]**BSG:** Blutsenkunsgeschwindgkeit

| Patient | Alter | Geschlecht | Erkrankungsdauer | Therapie | VEGF Basiswert | VEGF Folgewert | Änderung | CRP Basiswert | CRP Folgewert | RF | bish. Therapie |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | J] | | [J] | | [pg/ml] | [pg/ml] | [%] | [mg/dl] | [mg/dl] | | |
| 1 | 69 | w | 0,5 | GC | 792 | 446 | 43 | 5,8 | 0,8 | 0 | keine |
| 5 | 64 | w | 0,25 | GC | 1106 | 559 | 49 | 0,6 | 0,4 | 0 | keine |
| 6 | 64 | w | 1 | GC | 1183 | 837 | 29 | 2,9 | 1,1 | 0 | keine |
| 16 | 55 | m | 10 | GC | 315 | 155 | 50 | 15,6 | 1 | 1 | keine |
| 22 | 65 | w | 0,5 | GC | 1142 | 623 | 45 | | 0,6 | 0 | keine |
| 13 | 55 | w | 3 | Inf. | 315 | 40 | 87 | 3 | 0,8 | 1 | GC, MTX, Lef, Anakinra |
| 23 | 46 | w | 2 | Inf. | 730 | 423 | 42 | 1,1 | 0,3 | 1 | GC, MTX, Lef, SASP, CQ |
| 24 | 63 | w | 36 | Inf. | 113 | 92 | 18 | 1,4 | 0,3 | 1 | GC, Gold, D-Pen, MTX, SASP |
| **Median** | **63,5** | | **1,5** | | **761** | **434,5** | **44** | **2,9** | **0,7** | | |
| **Median (GC)** | **64** | | **0,5** | | **1124** | **559** | **45** | **4,35** | **0,8** | | |
| **Median(TNF)** | **55** | | **3** | | **315** | **92** | **42** | **1,4** | **0,3** | | |

*Abkürzungen:* VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor; CRP = C-Reaktives Protein; RF = Rheumafaktor; J = Jahre; GC = Glukokortikoid; Inf. = Infliximab; MTX = Metotrexat; Lef = Leflunomid; CQ = Choloroquin; D-Pen = D-Penicillamin; SASP = Sulfasalazin

*Tabelle 3.3:* Übersicht der Ergebnisse der Gruppe B

| **Kontrollen** | **Alter** | **m/w** | **VEGF** | **PD-Signal innen** | **CRP** | **PD-Grading** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | [J] | | [pg/ml] | | [mg/dl] | |
| K1 | 58 | w | 881 | 0 | 0,4 | 1 |
| K2 | 32 | w | 753 | 0 | 0,3 | 1 |
| K3 | 38 | m | 566 | 0 | 0,1 | 1 |
| K4 | 34 | m | 573 | 0 | 2,3 | 1 |
| K5 | 36 | m | 704 | 0 | 0,2 | 1 |
| K6 | 33 | w | 213 | 0 | 0,1 | 1 |
| K7 | 58 | w | 140 | 0 | 0,6 | 1 |
| K8 | 20 | m | 70 | 0 | 0,5 | 1 |
| K9 | 40 | m | 250 | 1 | 0,6 | 2 |
| K10 | 59 | w | 268 | 0 | 0,6 | 1 |
| K11 | 42 | m | 971 | 0 | 0,3 | 1 |
| **Median** | **38** | | **566** | | | |

*Tabelle 3.4:* Übersicht der Ergebnisse der Kontrollgruppe

tienten), erfolgte eine zweite Blutentnahme zur Bestimmung der VEGF-Konzentration im Serum und der Entzündungswerte: Für die unter Prednisolontherapie stehende Gruppe 10 bis 13 Tage nach der ersten Blutentnahme (Reduktion des Prednisolon beginnend mit 20 mg/Tag um 2,5 mg alle vier Tage), bei der Gruppe unter 200 mg Infliximab 14 Tage nach der ersten Infusion und vor Gabe der zweiten Infusion. (siehe auch Abb. 3.1)

### 3.2.1 Sonographie

Die Sonographie des Carpus ermöglichte die Objektivierung und den direkten Vergleich zwischen den erhobenen klinischen, Labor- und bildgebenden Daten. Sonographisch wurden die Kapselabhebung, die Durchblutungsstärke, der Grad der Vaskularisierung und der Doppler-Fluss innerhalb der Gelenkkapsel bestimmt. Die Doppler-sonographischen Befunde sind auf die durch die Entzündung und Angiogenese hervorgerufene Vasodilatation und vermehrte Gefäßdicke zurückzuführen. Die Ultraschalluntersuchung erfolgte am selben Tag wie die Blutentnahme zur Bestimmung der VEGF-Konzentration und der anderen Werte, spätestens aber am darauf folgenden Tag.

Das Handgelenk wurde von dorsal und ventral mit einem 7,5 MHz Schall-

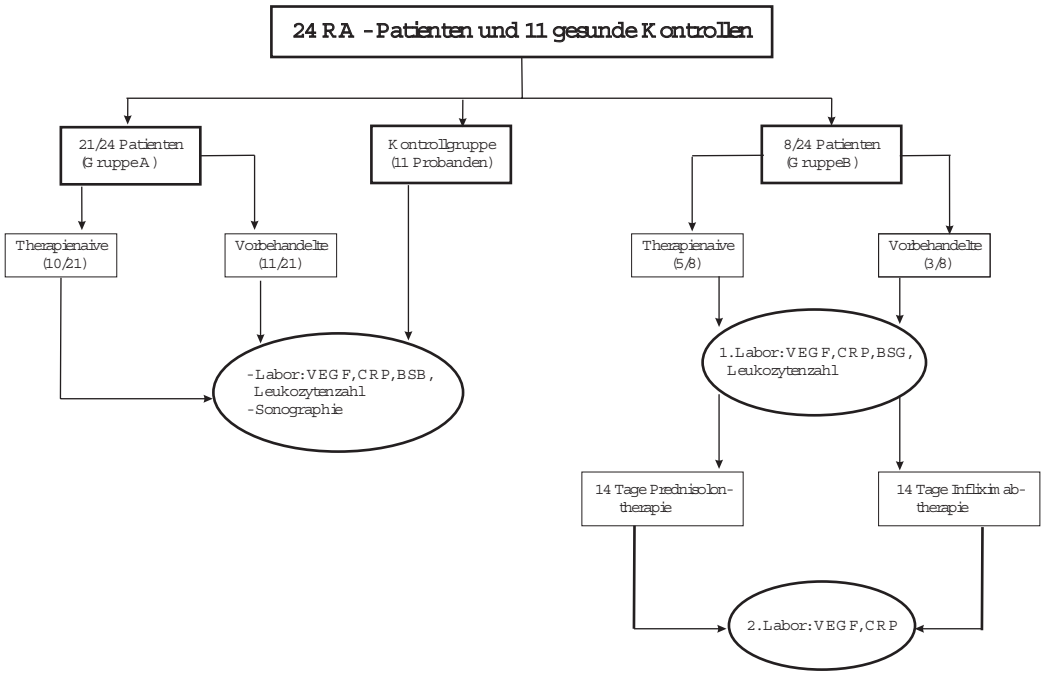



*Abbildung 3.1:* Gruppeneinteilung und Versuchsablauf

kopf (Image Point, Hewlett Packard, Bad Homburg, Deutschland) im Real-Time-Verfahren untersucht. Entsprechend den Empfehlungen von *Backhaus et al.* [2001] wurde zunächst im Longitudinalschnitt, der sich im besonderen Maße zur Darstellung der Kapselabhebung und einer möglichen begleitenden Tenosynovitis eignet, von radial nach ulnar geschallt, danach transversal von proximal nach distal. Damit ließ sich ein erster Überblick über das Gelenk und das Ausmaß der Kapselabhebung gewinnen.

Zur Darstellung der Gefäße in der Synovialis des Handgelenkes wurde der Power Doppler-Modus verwendet. Zunächst erfolgte die Einstellung der Verstärkung (gain) nach den Empfehlungen von *Rubin et al.* [1995]: Der Schallkopf wird vor dem Aufsetzen auf die Haut in die Luft gehalten, die Verstärkung soweit herunter reguliert, dass keine Signale (Farbpixel) auf dem Monitor sichtbar sind und anschließend wieder hochgeregelt bis gerade die ersten Signale erscheinen. Anschließend wurde der Power Doppler entsprechend der zu erwartenden niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten auf eine Pulswiederhohlungsfrequenz (PRF) von 800 - 1100 Hz eingestellt. Mit Hilfe

der PD-Sonographie ließ sich der Blutfluss qualitativ erfassen. Der Ausschluss von Artefakten und die Erfassung der systolischen Spitzenflussgeschwindigkeit einzelner Gefäße erfolgte mit Hilfe des PW-Dopplers.

Die Untersuchung führte je einer von zwei Untersuchern durch, zeichnete die Ergebnisse auf ein Videoband auf und speicherte einzelne Bilder digital. Die Videoaufnahmen begutachtete zunächst jeder der beiden Untersucher unabhängig voneinander hinsichtlich der Lokalisation (innerhalb/außerhalb der Kapsel) und der Intensität der PD-Signale innerhalb der Gelenkkapsel in Relation zur Durchblutung des umgebenden Gewebes. Die Beurteilung der Intensität der PD-Signale erfolgte ausgehend von einem von *Newman et al.* [1996] und *Szkudlarek et al.* [2003] vorgestellten, heute häufig gebrauchten vierstufigen semiquantitativen Modell, wobei der Intensitätsgrad

- 1 = kein erkennbares Doppler-Signal(Farbpixel) / kein Fluss
- 2 = einzelne Doppler-Signale / wenig Fluss
- 3 = mehrere, konfluierende Signale / deutlicher Fluss
- 4 = nahezu komplette Ausfüllung des Gelenkbereichs mit konfluierenden Doppler-Signalen / starker Fluss

entspricht. Da das für diese Arbeit verwendete Ultraschallgerät nur über eine mäßige Auflösung verfügt, wurden zur Vereinfachung der Auswertung die Intensitätsgrade zwei und drei zu einem zusammengefasst. Daraus ergibt sich folgende modifizierte Intensitätsskala:

- 1 = keine bis minimale Doppler-Signale / kein bis minimaler Fluss
- 2 = geringe bis moderate Doppler-Signale / geringer bis moderater Fluss
- 3 = intensive Doppler-Signale / intensiver Fluss

Abschließend beurteilten zwei weitere unabhängige, bezüglich der Identität, der klinischen Befunde und Labordaten verblindete Untersucher die aufgenommenen Sequenzen nach ihrer Lokalisation (innerhalb/außerhalb der Kapsel) und nach ihrer Intensität anhand der dreistufigen Intensitätsskala. Zur Verdeutlichung siehe Abb. 3.2.1, 3.2.1 und 3.2.1.

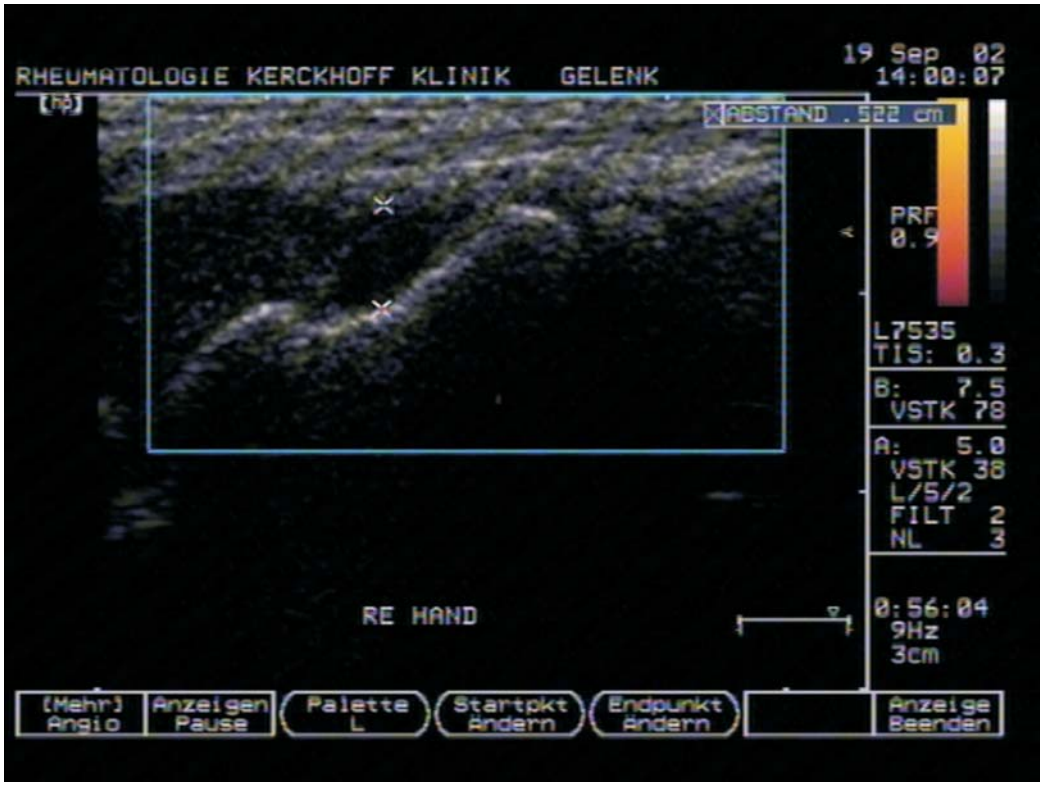



*Abbildung 3.2:* Dorsaler Longitudinalschnitt des Handgelenks: Der echoarme Raum zwischen den beiden Kreuzen repräsentiert den Gelenkerguss. Dieser Befund entspricht dem Grading 1.

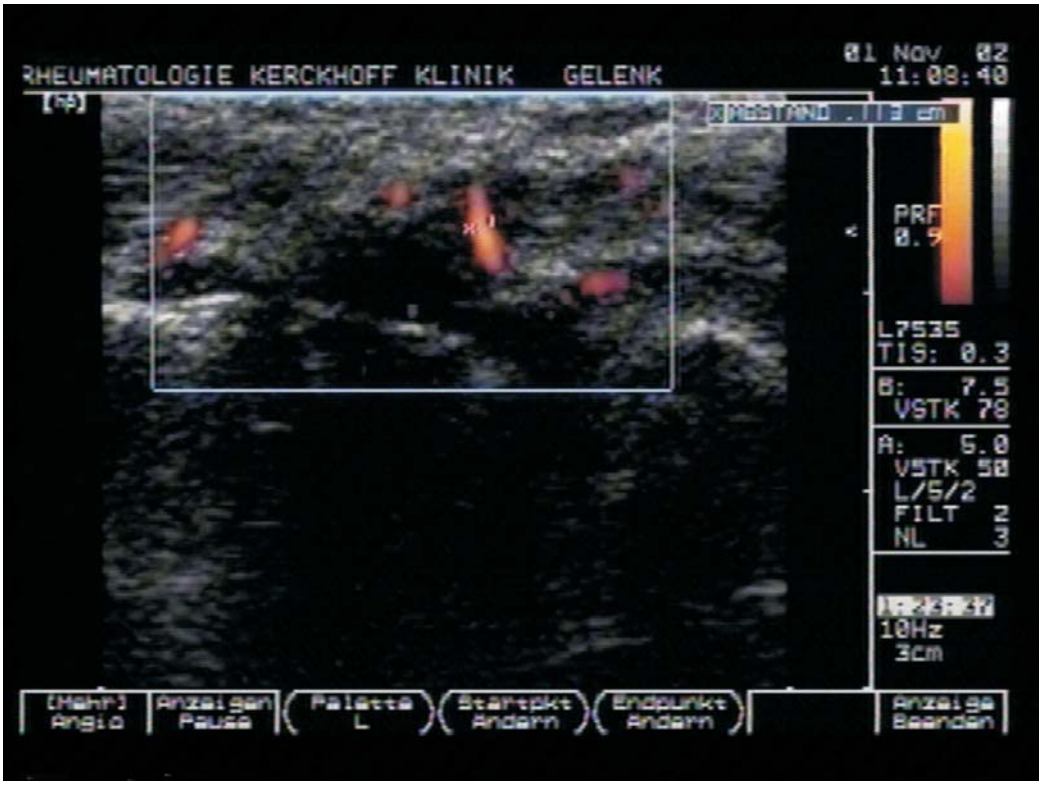



*Abbildung 3.3:* Visualisierung des intraartikulären Blutflusses mit Hilfe der Power Doppler-Sonographie.

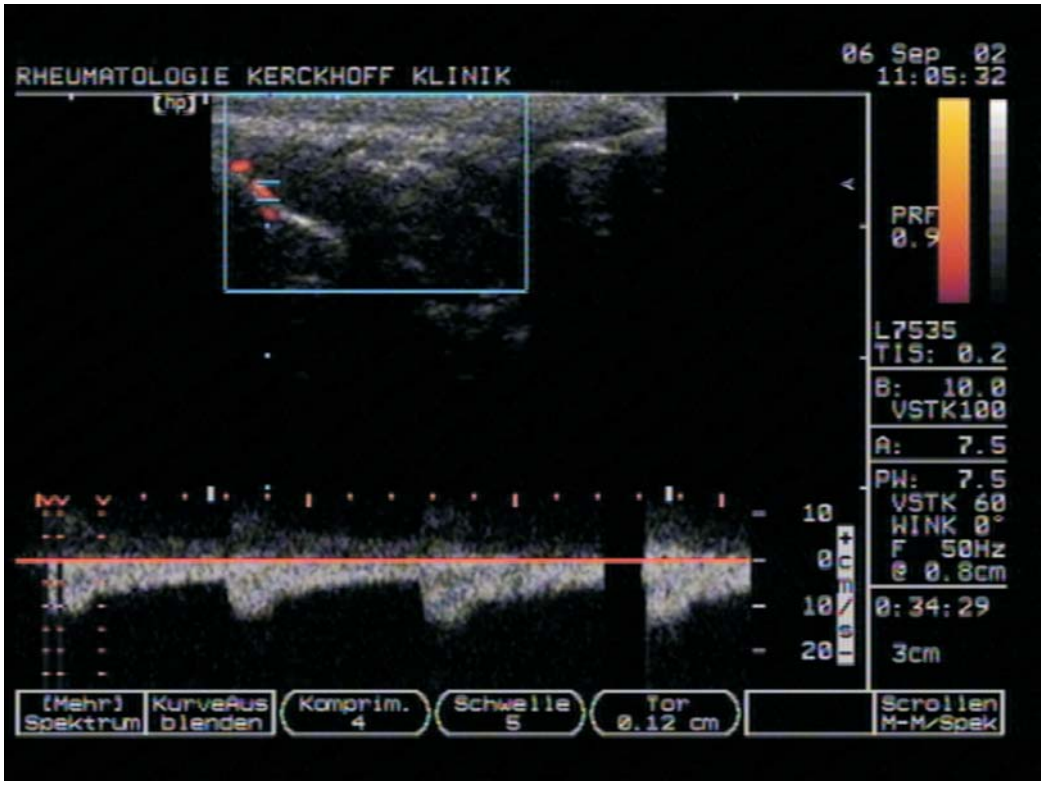



*Abbildung 3.4:* Doppler-Fluss durch eine kleine intraartikuläre Arterie.

### 3.2.2 Bestimmung der VEGF-Konzentration

Die Blutentnahme erfolgte in der Regel vor dem Frühstück, in Ausnahmen unmittelbar danach. Das daraus gewonnene Serum (zentrifugiert bei 4 bis 8°C für 10 Minuten bei circa 3500 U/min) wurde in Eppendorfhütchen bis zur Weiterverarbeitung bei -22° C eingefroren (bis maximal vier Monate nach Probenahme).

Die Bestimmung der VEGF-Konzentration erfolgte mit einem Sandwich - ELISA („Human VEGF“, Bio Source International, Camarillo, CA, USA). Dieser Test beruht auf einer Kettenreaktion, bei der die zu bestimmenden Antigene an eine Trägersubstanz gebunden werden und in einem nächsten Schritt ein mit einem Enzym markierter Antikörper an den bereits bestehenden Komplex angelagert wird (Sandwich). Mit Hilfe eines chromogenen Substrats können die Antigenkonzentrationen in der Probe photometrisch bestimmt werden. Die Einzelheiten des hier verwendeten Testes werden im Folgenden näher beschrieben.

Der verwendete ELISA besteht aus Mikrotiterplatten, deren Wells mit einem spezifischen polyklonalen humanen VEGF-Antikörper beschichtet sind.

Die Testdurchführung fand nach Vorschrift statt. Für jede Analyse kamen 50 $\mu$l Serum zum Einsatz. Während der ersten Inkubation (zwei Stunden) band sich das VEGF-Antigen an den, an die Wells gebundenen, Antikörper an. Nach dem ersten Waschen wurden 100 $\mu$l Biotin Konjugat, das einen spezifischen monoklonalen Antikörper gegen das humane VEGF enthielt, hinzugegeben. Dieser Antikörper lagerte sich nun seinerseits während der darauf folgenden einstündigen Inkubation an das inzwischen bereits gebundene VEGF an. Nach erneutem Waschen wurden 100 $\mu$l des Enzyms Streptavidin - Peroxidase zu den gebundenen Stoffen in den Wells gegeben und somit das Vierer - Sandwich komplettiert. Nach einer dritten, dreißigminütigen Inkubation schloss sich ein drittes Waschen an, bevor 100 $\mu$l des stabilisierten Chromogens für die vierte Inkubation hinzugegeben werden konnten, welches erst die photometrische Bestimmung ermöglichte. Die anschließende vierte und letzte Inkubation sollte maximal 30 Minuten dauern. Durch das Hinzufügen der Stoplösung wurde sie nach 25 Minuten beendet.

Als „Washer“ kam der TECAN - Columbus-Washer (TECAN, Crailsheim, Deutschland) für Mikrotiterplatten zum Einsatz (August 1998, Firmware level 3.x). Bei jedem Waschvorgang wurde viermal mit 0,4 ml Waschpuffer gespült bei einer Einwirkzeit von je 30 Sekunden. Die photometrische Bestimmung erfolgte mit dem TECAN Spectra (Shell) & Rainbows (Shell) Reader (April 1998, Document revision 1.0, Firmware revision level 2.x), die Auswertung und Darstellung der photometrischen Daten mit SLT Easy - Fit, Version 7.35.

Den Test führte an drei verschiedenen Tagen jeweils dieselbe Person durch. Dabei erfolgte die Eichung der Standardkurven als Doppelbestimmung. Bei 10 der 35 Probanden wurde ebenfalls eine Doppelbestimmung der Serumproben durchgeführt, die eine sehr hohe Übereinstimmung der Werte zeigte. Die restlichen Serumproben wurden nur in einfacher Bestimmung bei einer Verdünnung von 1:2 ermittelt. Die bestimmten VEGF-Konzentrationen wurden in pg/ml angegeben.

Der Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizient dieses Tests beträgt 4,9 % respektive 6,5 % (Angaben des Herstellers).

## 3.3 Statistik

[4] Die grafische Analyse anhand von Boxplots ergab, dass die Verteilung der Patientenmerkmale nicht symmetrisch ist und damit auch keine Verträglichkeit der Daten mit einer Normalverteilung besteht. Deshalb wurden für die statistische Analyse metrischer Merkmale parameterfreie Testverfahren verwendet: für den Vergleich zweier Patientengruppen der Mann-Whitney-U-Test, für den Vergleich von drei Gruppen der Kruskal-Wallis-Test.

Die Korrelation des metrischen Merkmals VEGF-Konzentration und der Erkrankungsdauer, des Lebensalters, der Entzündungswerte wurde mit dem Spearman-Rho-Rangkorrelationkoeffizienten, eine auf monotonen Zusammenhang testende Analyse, berechnet. Die Angaben über die statistische Signifikanz der Reduktion der VEGF-Konzentration unter GC- bzw.

[4] Statistische Beratung durch Frau Dipl. Math. Antje Brandstädt, Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation des Klinikums der FSU Jena

Infliximab-Therapie wurden mit dem Wilcoxon-Rangtest berechnet, bei dem die jeweiligen Paardifferenzen betrachtet und ausgewertet werden.

Um die Frage nach einem Zusammenhang zwischen dem intrakapsulären Fluss und der bei allen Patienten beobachteten Carpusarthritis zu beantworten, wurde der $\chi^2$-Test für Vierfeldertafeln benutzt.

Die statistische Bewertung der Testergebnisse erfolgte anhand der errechneten p-Werte. Ein p-Wert unter 0,05 zeigte ein statistisch signifikantes Ergebnis an (als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde für die gesamte Untersuchung ein Wert von 0,05 festgelegt).

Da die Studie der Hypothesengenerierung dient, wurde generell zweiseitig getestet, um Unterschiede in beide Richtungen sichtbar machen zu können.

Für alle Berechnungen kam das Auswertungsprogramm SPSS zur Anwendung. Die Abbildungen wurden mit Microsoft Excel erstellt.

# Kapitel 4

# Ergebnisse

Ein Teil der in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse sind bereits in „Rheumatology“ [*Strunk et al.*, 2004], bzw. in „Rheumatology International“ [*Strunk et al.*, 2006] veröffentlicht.

Bei der Vorstellung der Ergebnisse wird folgenden Fragen im Einzelnen nachgegangen:

- Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Power Doppler-sonographischen Nachweis synovialer Durchblutung und der Höhe der VEGF-Konzentration[1]?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen den nachgewiesenen Power Doppler-Signalen und dem klinischen Befund der Carpusarthritis?
- Gibt es einen Unterschied zwischen der Höhe der VEGF-Konzentrationen von bisher unbehandelten und behandelten Patienten bzw. gesunden Probanden?
- Wie verhält sich die VEGF-Konzentration während einer Therapie mit Prednisolon bzw. Infliximab?
- Weitere Ergebnisse

Eine Übersicht über die Patientendaten geben die Tabellen 3.2, 3.3 und 3.4 in Kapitel 3.

[1] gemeint ist jeweils die VEGF-Konzentration im Serum

## 4.1 Zusammenhang zwischen der Power Doppler-sonographisch bestimmten synovialen Vaskularisierung und der VEGF-Konzentration

Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Intensität der PD-Signale (dreistufige Skala) und der Höhe der VEGF-Konzentration (p = 0,204; Kruskal-Wallis-Test) feststellen (siehe Abb. 4.1). Bemerkenswert sind jedoch folgende zwei Auffälligkeiten: Überraschenderweise fanden sich bei zwei Patienten (Patient 3 und 12) mit keinen sichtbaren PD-Signalen (Newman-Grading 1) sehr hohe VEGF-Werte (Werte größer 1400 pg/ml). Umgekehrt ließen sich bei drei Patienten (Patient 13, 16 und 20) mit intensiven PD-Signalen (Newman-Grading 3) nur sehr niedrige VEGF-Konzentrationen feststellen (VEGF kleiner 360 pg/ml). (Die Auswertung erfolgte für 21 Patienten.)

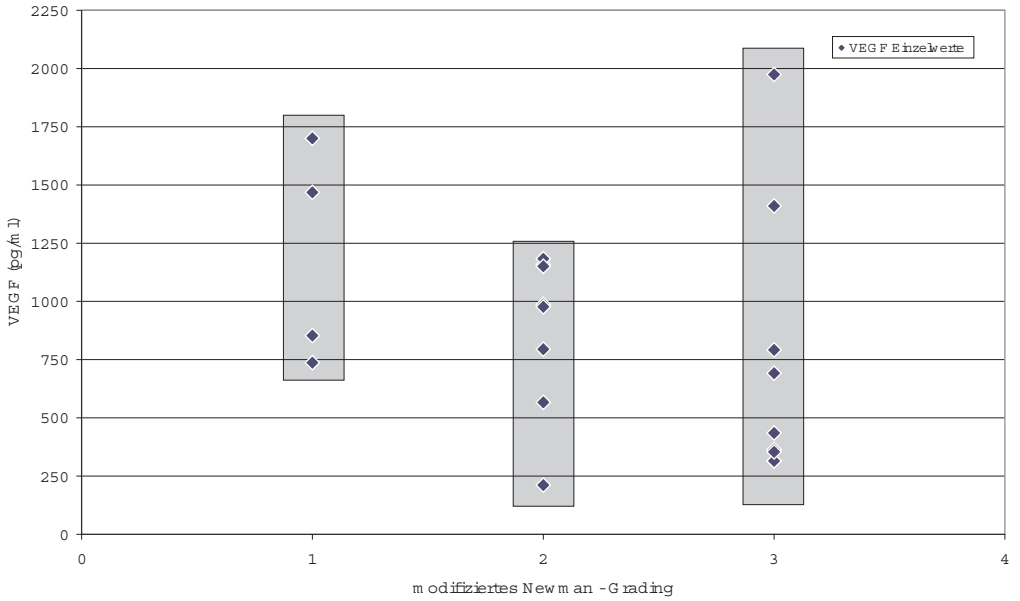



*Abbildung 4.1:* Verteilung der VEGF-Werte in Abhängigkeit der dreistufigen modifizierten Intensitätsskala (21 Patienten der Gruppe A): Es zeigt sich die große Streuung der einzelnen VEGF-Werte innerhalb der Grading - Gruppen. Die grau unterlegten Bereiche dienen nur der Verdeutlichung der Variabilität.

## 4.2 Zusammenhang zwischen der Power Doppler-sonographisch bestimmten synovialen Vaskularisierung und dem klinischen Befund der Carpusarthritis

Der bei allen Patienten, aber keinem der gesunden Probanden, nachgewiesene klinische Befund der Carpusarthritis (Merkmalsausprägung „Schmerz/Schwellung“ = 1, d.h. positiv), wird bei 21 Patienten und den elf Kontrollprobanden mit dem Power Doppler-sonographischen Nachweis von Blutfluss innerhalb der Gelenkkapsel („PD-Signal innen“) in Zusammenhang gebracht. Die Ultraschalluntersuchungen zeigten bei allen 21 Patienten eine deutliche Kapselabhebung, mit einer Ergussdicke von 1,5 mm bis 4,6 mm, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, bei der keine Kapselabhebung zu sehen war. Bei 17 der RA-Patienten ließ sich ein PD-Signal innerhalb der Kapsel nachweisen („PD-Signal innen“ = 1), während dies nur bei einem Probanden der Kontrollgruppe gelang. Daraus ergibt sich folgendes Ergebnis: Für die Gruppe ohne intrakapsulären Fluss („PD-Signal innen“ = 0; 14/32 Probanden) zeigen 28,6% (4/14) eine klinisch nachgewiesene Carpusarthritis (Merkmal „Schmerz/Schwellung“ = 1). Bei den Probanden mit intrakapsulärem Fluss („PDS innen“ = 1; 18/32 Probanden) zeigen 94,4% eine positive Merkmalsausprägung für „Schmerz/Schwellung“. Die Prozentzahlen können mathematisch als Korrelation angesehen werden. Der $\chi^2$-Test zeigt auf dem 99,99% Signifikanzniveau ein hoch signifikantes Ergebnis ($p < 0{,}0001$) für den Zusammenhang zwischen der mit der Power Doppler-Sonographie nachgewiesenen synovialen Vaskularisierung im Carpus und dem klinischen Befund der Carpusarthritis (siehe Tab. 4.1).

Bei jedem der Patienten mit PD-Signalen konnte mit Hilfe des Spektral-Dopplers in kleinen, intrakapsulär gelegenen Arterien eine typische arterielle Flusskurve nachgewiesen werden. Damit war die Differenzierung zwischen einem echten Gefäß und einem Artefakt möglich.

| | | | Kontrolle | RA-Patient | Gesamt |
|---|---|---|---|---|---|
| **a** | PD-Signal | nein | 10 | 4 | 14 |
| | innerhalb der Kapsel | ja | 1 | 17 | 18 |
| | Gesamt | | 11 | 21 | 32 |
| **b** | PD-Signal | nein | 71,4% | 28,6% | 100,0% |
| | innerhalb der Kapsel | ja | 5,6% | 94,4% | 100,0% |
| | Gesamt | | 34,4% | 65,6% | 100,0% |
| **c** | PD-Signal | nein | 90,9% | 19,0% | 43,8% |
| | innerhalb der Kapsel | ja | 9,1% | 81,0% | 56,3% |
| | Gesamt | | 100,0% | 100,0% | 100,0% |

*Tabelle 4.1:* Vierfeldertafeln: **a)** über die Anzahl der gesunden Probanden (Kontrolle) und der RA-Patienten, **b)** der relativen Anzahl der Probanden in Prozent bezogen auf das Merkmal Carpusarthritis, **c)** der relativen Anzahl der Probanden in Prozent hinsichtlich des Merkmals intrakapsulärer Fluss. Es ergibt sich ein deutlicher Zusammenhang (94,4 %) zwischen dem Merkmal der Carpusarthritis und dem intrakapsulären Fluss.

## 4.3 VEGF-Konzentrationen bei unbehandelten und behandelten Patienten sowie gesunden Probanden

Für den Zusammenhang zwischen der VEGF-Konzentration und der bisher erfolgten Therapie werden die Daten von allen 24 Patienten betrachtet. Die Serumspiegel des VEGF zeigten sich bei den RA-Patienten mit einem Median von 793,5 pg/ml im Vergleich zu den 11 gesunden Probanden mit einem Median von 566 pg/ml signifikant erhöht (Mann-Whitney U Test: $p = 0{,}027$). Allerdings streuen die einzelnen Werte in beiden Gruppen sehr stark: in der RA-Gruppe von 113 pg/ml bis 1974 pg/ml und von 70 pg/ml bis 971 pg/ml bei den gesunden Probanden.

Für die weitere Auswertung werden drei Gruppen betrachtet: Die Therapienaiven (Patienten mit Erstdiagnose RA), die bereits mit Prednisolon/DMARDs Behandelten und die gesunde Kontrollgruppe. Der Median der VEGF-Konzentration beträgt für die Gruppe der Therapienaiven 853 pg/ml, für die Gruppe der Behandelten 692 pg/ml und für die Kontrollgruppe 566

| | **ED** | **Behandelte** | **Kontrolle** |
|---|---|---|---|
| Anzahl | 11 | 13 | 11 |
| Median VEGF (pg/ml) | 853 | 692 | 566 |
| Minimum VEGF (pg/ml) | 211 | 113 | 70 |
| Maximum VEGF (pg/ml) | 1468 | 1974 | 971 |

*Tabelle 4.2:* Median, Minimum und Maximum der VEGF-Konzentration in pg/mlfür Therapienaive (ED), Behandelte und Kontrollprobanden

| | **RA vs. K** | **ED vs. B** | **B vs. K** | **ED vs. K** |
|---|---|---|---|---|
| **p** | 0,027 | 0,424 | 0,15 | 0,016 |

*Tabelle 4.3:* Angabe der Signifikanzen (p, Mann-Whitney U Test) für die Zusammenhänge des VEGF (Mediane) zwischen allen RA-Patienten und der Kontrollgruppe sowie zwischen den Gruppen der therapienaiven (ED), behandelten (B) und Kontroll-Probanden (K)

pg/ml. Es zeigen sich deutliche Unterschiede in der Höhe der Medianwerte für die VEGF-Konzentration (siehe Tab. 4.2). Statistisch hoch signifikant (Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U Test) ist jedoch nur der Unterschied zwischen den Medianwerten der Kontrollgruppe und den Therapienaiven ($p = 0{,}016$). Interessanterweise ist der Unterschied sowohl zwischen bereits Behandelten und Therapienaiven ($p = 0{,}424$) als auch zwischen den Behandelten und der Kontrollgruppe ($p = 0{,}15$) nicht statistisch signifikant (siehe auch Tab. 4.3).

## 4.4 Änderung der VEGF-Konzentration während einer Therapie mit Prednisolon bzw. Infliximab

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der acht Patienten mit Rheumatoider Arthritis vorgestellt (Gruppe B), bei denen der Verlauf der VEGF-Konzentration vor und nach 14-tägiger Therapie bestimmt wurde (siehe auch Tabelle 3.3, Kapitel 3). Wie bereits beschrieben (siehe Abschnitt 3.1), sind fünf der Patienten bei Beginn der Beobachtungen therapienaiv (Erstdiagnose

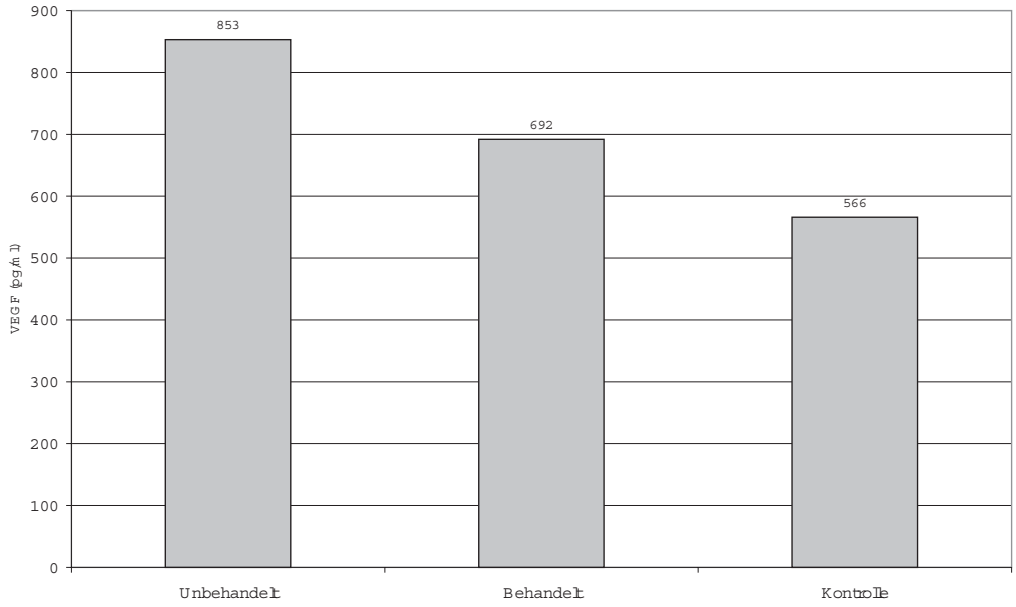



*Abbildung 4.2:* Darstellung der Medianwerte der VEGF-Konzentration (pg/ml) für die Gruppe der Therapienaiven, der bereits behandelten und der Kontrollen. Die gruppenspezifische Abnahme des Medians ist deutlich sichtbar.

= ED) und wurden bis zur Kontrolle der VEGF-Konzentration nach 10 bis 13 Tagen mit Prednisolon, beginnend mit 20 mg/Tag, behandelt. Die zweite Gruppe umfasst drei Patienten, die nach mehreren Basistherapien neu auf Infliximab eingestellt wurden. Auch bei ihnen erfolgte eine Kontrolle der VEGF-Konzentration nach 14 Tagen vor der zweiten Infusion.

Für beide Therapiegruppen ließ sich im Beobachtungzeitraum eine durch die Therapie bedingte statistisch signifikante Reduzierung der VEGF Ausgangskonzentration nachweisen ($p = 0{,}01$; Wilcoxon-Rang-Test). Für die fünf therapienaiven Patienten konnte sich nach 10 bis 13 Tagen mit Prednisolontherapie eine Reduktion der VEGF-Konzentration von durchschnittlich 45% im Vergleich zum Ausgangswert beobachtet werden. Bei den Patienten mit Infliximabtherapie fiel die Reduktion mit einer durchschnittlichen Verringerung um 42% des Ausgangswertes der VEGF-Konzentration nur geringfügig niedriger aus. Selbst bei nur geringen Ausgangswerten der VEGF-Konzentration (wie bei Patienten 13, 16 und 24) zeigte sich eine deutliche Reduktion nach 14-tägiger Therapiedauer (siehe Abb. 4.3 ).

Weiterhin fiel bei der statistischen Auswertung auf, dass die VEGF-Konzentration bei den therapienaiven Patienten sowohl vor als auch nach der Therapie im Median (Median = 1106 pg/ml) deutlich höher lag als in der Infliximab Gruppe (Median = 320 pg/ml), bei der die Patienten schon mehrfache DMARDs erhalten hatten. Unabhängig von der bisher erhaltenen Therapie zeigten sich bei Patienten mit kurzen Erkrankungsdauern (weniger als zwei Jahre) deutlich höhere Werte der VEGF-Konzentration (Median = 1106 pg/ml) als bei Patienten mit lang anhaltender, d.h. mehr als drei Jahre bestehender Erkrankung (Median = 315 pg/ml) (siehe dazu auch unten).

Auch für die Konzentration des CRP findet sich eine deutlich Reduktion 14 Tage nach Therapiebeginn. Für die Patienten mit Prednisolontherapie kam es zu einer durchschnittlichen Reduktion von 80% (der Wert von Patient Nr. 5 fehlt hier), in der Infliximab-Gruppe betrug die Reduktion durchschnittlich 79%. Somit sind die Laborwerte nach 14-tägiger Therapie im Normalbereich. Weiterhin fällt auf, dass es auch bei den geringen, fast normalen Ausgangswerten zu einer deutlichen Reduktion dieses Entzündungswertes kommt. Wie schon für die VEGF-Konzentration beschrieben, sind auch die

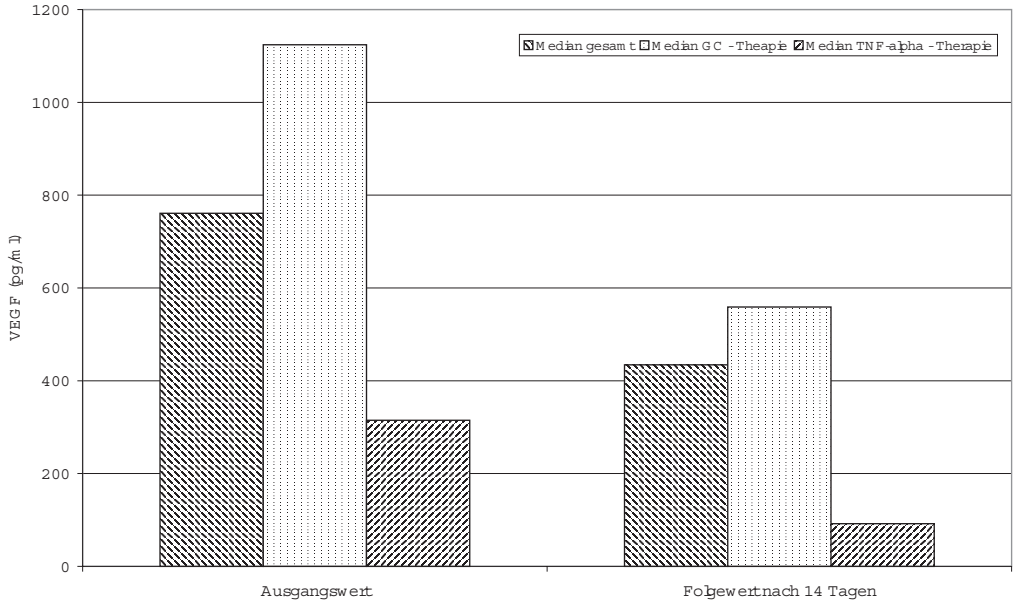



*Abbildung 4.3:* Reduktion der VEGF-Konzentration (Gruppe B): Dargestellt sind neben dem Median für den Ausgangs- und Folgewert der VEGF-Konzentration der gesamten Gruppe B auch die Mediane für die GC- und TNF-$\alpha$-Therapie-Untergruppen. Die Reduktion der VEGF-Konzentration ist nach 10-14-tägigen Behandlungsdauer deutlich erkennbar und statistisch hoch signifikant (p = 0,01; Wilcoxon-Rang-Test).

Ausgangswerte des CRP in der therapienaiven Gruppe deutlich höher (Median = 4,35 mg/dl) als in der bereits vorbehandelten Gruppe (Median = 1,4 mg/dl) (siehe auch Abb. 4.4).[2]

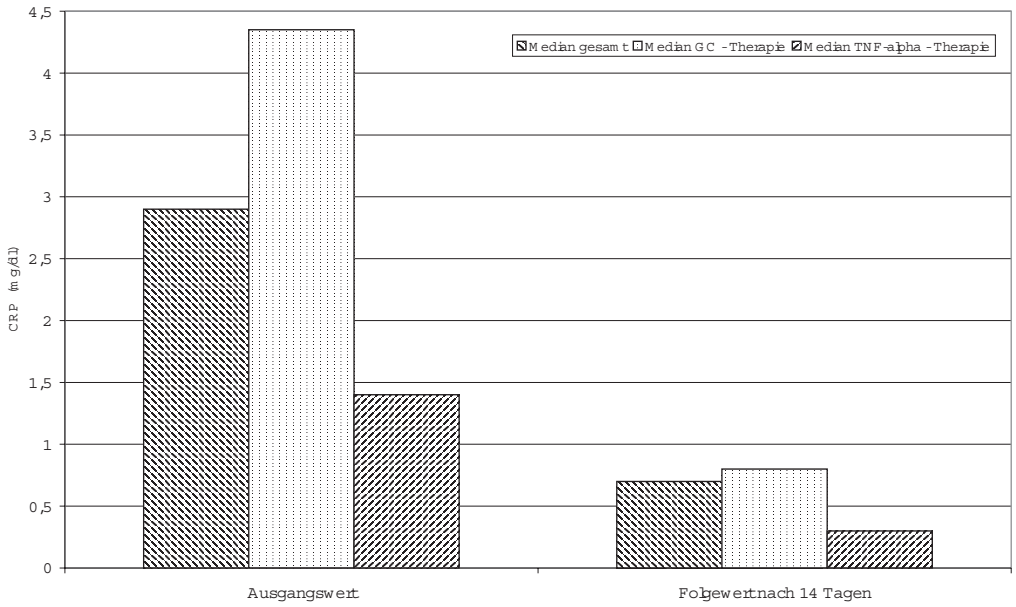



*Abbildung 4.4:* Reduktion des CRP (Gruppe B): Dargestellt sind die Mediane für den Ausgangs- und Folgewert des CRP der gesamten Gruppe B sowie die Mediane für die GC- und TNF-$\alpha$-Therapie-Untergruppen. Wie die VEGF-Konzentration zeigt auch das CRP eine deutliche Reduktion nach 10-14-tägigen Therapie.

## 4.5 Weitere Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden Zusammenhänge zwischen der Höhe der VEGF-Konzentration und der Erkrankungsdauer, dem Lebensalter und den Entzündungswerten vorgestellt.

[2] Aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs ist eine weitere statistsiche Analyse mathematisch nicht sinnvoll, die Darstellung der Ergebnisse erfolgte daher rein deskriptiv.

### Zusammenhang zwischen der VEGF-Konzentration und der Erkrankungsdauer

Die Erkrankungsdauer der Patienten überspannt einen großen Zeitraum zwischen 0,25 und 36 Jahren. Der Medianwert der Erkrankungsdauer liegt zum Zeitpunkt der Datenerhebung bei zwei Jahren (für Patient 8, 10, 20 fehlen die Angaben). Bei Betrachtung der Daten (siehe Abb. 4.5) fällt auf, dass mit zunehmender Erkrankungsdauer die Höhe der VEGF-Konzentration trotz klinisch aktiver Carpusarthritis geringer wird im Vergleich zum Beginn der Erkrankung. Die extrem hohen Werte der VEGF-Konzentration von über 1000 pg/ml lassen sich bis auf eine Ausnahme (Patient 11) bei Patienten mit einer Erkrankungsdauer von unter zwei Jahren finden. Statistisch lässt sich diese Beobachtung mit Hilfe des parameterfreien Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten bestätigen. Bei einem $p = 0{,}014$ und $r = -0{,}528$ kann von einem hoch signifikanten Zusammenhang mit einer mittelstarken Korrelation zwischen der Höhe der VEGF-Konzentration und der Erkrankungsdauer gesprochen werden.

### Höhe der VEGF-Konzentration in Abhängigkeit vom Lebensalter

Sowohl die Höhe der VEGF-Werte als auch deren Variabilität nimmt mit dem Lebensalter der Probanden zu. In der Kontrollgruppe ist dieses Verhalten nicht zu beobachten. Anders als für die Erkrankungsdauer lässt sich dieser Zusammenhang jedoch statistisch nicht sichern. Da die hier berechnete Signifikanz mit einem p von 0,097 jedoch nur knapp über dem 90% Signifikanzniveau liegt (bei schlechter Korrelation: $r = 0{,}346$, Spearman-Rangkorrelationskoeffizient), sollte dieser Zusammenhang an einer größeren Stichprobe erneut geprüft werden.

### Zusammenhang zwischen der VEGF-Konzentration und den Entzündungsparametern

Die Daten der VEGF-Konzentration wurden mit den drei Entzündungsparametern BSG, Leukozytenzahl und CRP verglichen. Bei der graphischen Betrachtung lassen sich nur „Punktwolken“ beobachten (siehe auch Abb. 4.5).

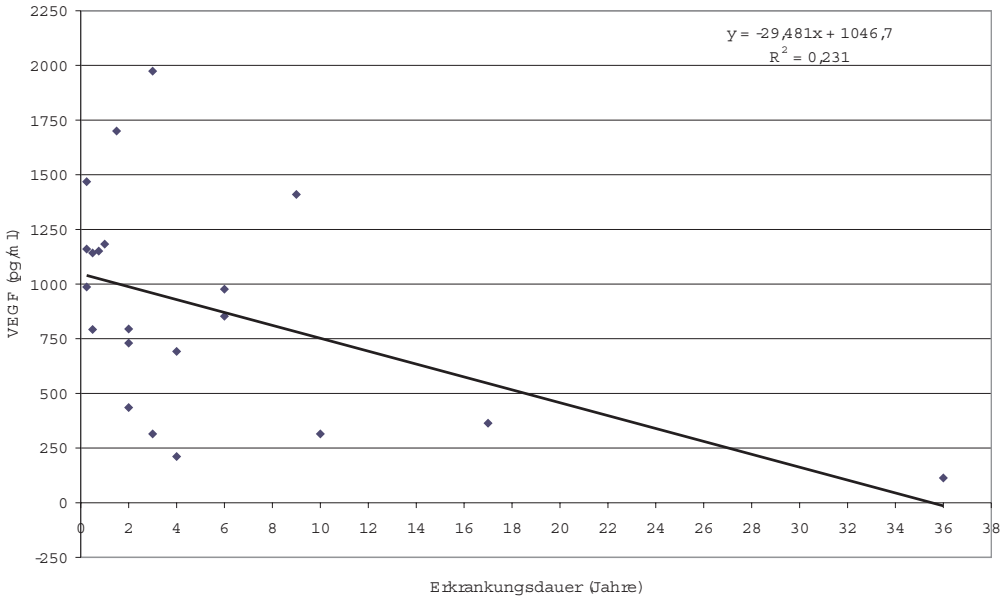



*Abbildung 4.5:* Darstellung der VEGF-Konzentration (pg/ml) in Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer (Jahre): Die Abnahme der VEGF-Konzentration mit zunehmender Erkrankungsdauer ist deutlich sichtbar.

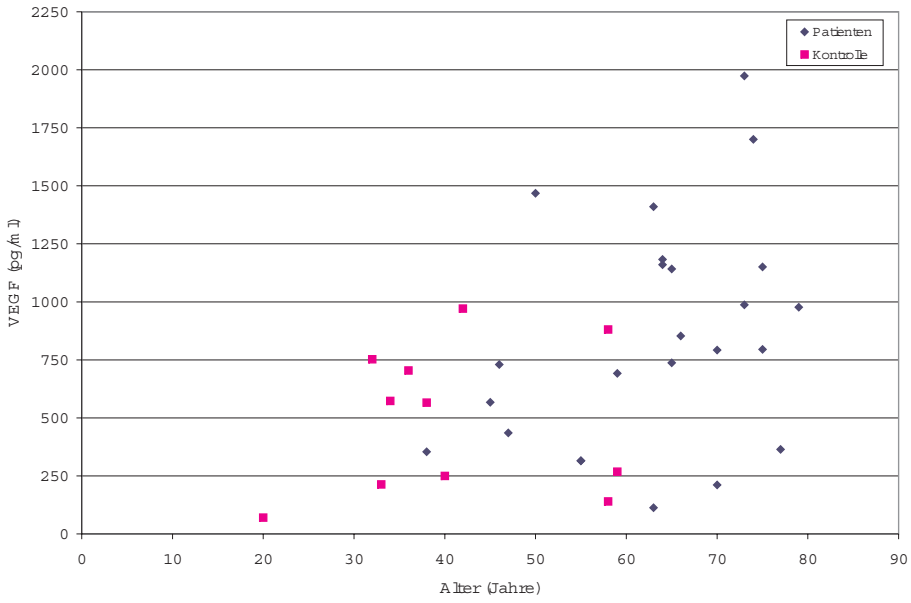



*Abbildung 4.6:* Abhängigkeit der VEGF-Konzentration vom Alter der Patienten

| | **BSG (mm/h)** | **Leukozyten ($10^3/\mu l$)** | **CRP (mg/dl)** |
|---|---|---|---|
| **r** | 0,36 | -0,097 | 0,189 |
| **p** | 0,092 | 0,652 | 0,397 |

*Tabelle 4.4:* Spearman-Rho-Korrelationskoeffizient (r) und Signifikanz (p) für die Korrelation von VEGF und BSG, Leukozyten und CRP

Auch statistisch kann für keinen der drei Entzündungswerte ein signifikanter Zusammenhang mit der VEGF-Konzentration beschrieben werden (siehe Tab. 4.4). Weitere Untersuchungen scheinen hier aber angebracht, da die Korrelation von BSG und VEGF-Konzentration mit einer Signifikanz von p = 0,092 (Spearman-Rangkorrelationskoeffizient) nur knapp unter dem Signifikanzniveau von 0,05 liegt und es in der Literatur Beschreibungen für einen solchen Zusammenhang gibt [*Ballara et al.*, 2001]; [*Lee et al.*, 2001]. Als wichtige Aussage für die hier vorliegenden Daten ergibt sich hieraus, mathematisch betrachtet, die lineare Unabhängigkeit der VEGF-Konzentration von den Entzündungsparametern CRP, Leukozyten und BSG. Praktisch bedeutet dies, dass keine Rückschlüsse von der Höhe der VEGF-Konzentration auf Entzündungsparameter gezogen werden können, sondern dass er als eigenständiger Wert bestimmt werden muss.

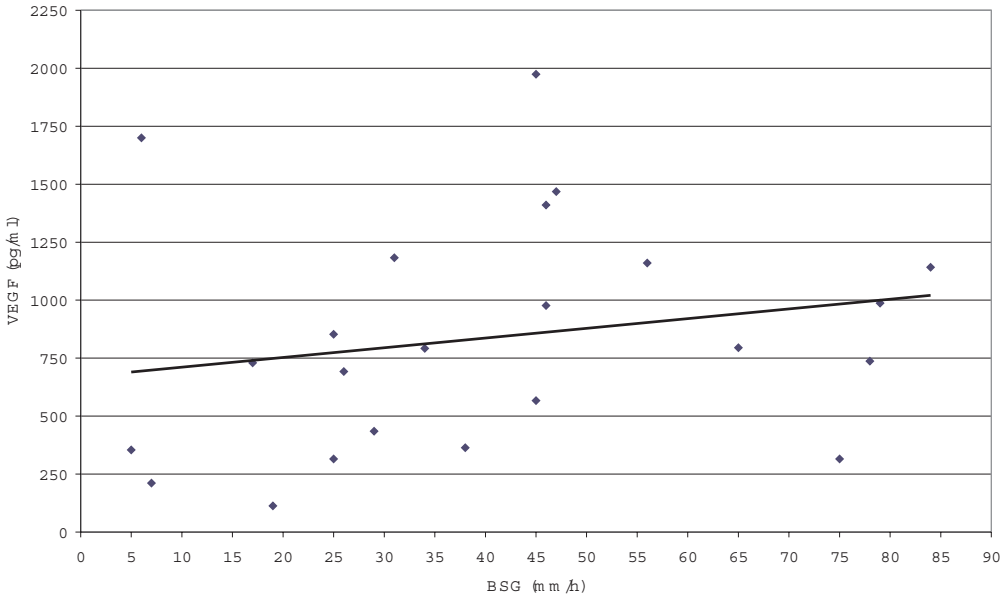



*Abbildung 4.7:* Darstellung des Zusammenhangs zwischen der VEGF-Konzentration und der BSG: diese Darstellung zeigt am Beispiel des Streudiagramms von VEGF und BSG die höchste Korrelation von Entzündungswerten und der VEGF-Konzentration auf (r = 0,36 und p = 0,092, Spearman-Rho Rangkorrelationskoeffizient). Sie dient exemplarisch dafür, dass es keine Korrelation zwischen der VEGF-Konzentration und den Entzündungswerten Leukozytenzahl, CRP und BSG für diesen Datensatz gibt. Es ist zusätzlich die Trendlinie eingefügt, die einen leicht steigenden Verlauf hat.

# Kapitel 5

# Diskussion

### VEGF-Konzentration und Power Doppler-Sonographie

Wie schon in Kapitel 2 näher erläutert, ist das Kennzeichen der RA die synovitische Hyperplasie mit Pannusbildung und Entzündung, die durch frühe Neubildung von zum Teil in den Knorpel eindringenden Gefäßen gekennzeichnet ist. In der Folge der Entzündung kommt es zu Destruktion und Ankylosen der betroffenen Gelenke. Die Initiation der Entzündung ist charakterisiert durch periartikuläre Vasodilatation gefolgt von synovialer, intraartikulärer, durch Angiogenese gekennzeichneter Proliferation (siehe Kapitel 2.1.3). Damit nimmt die synoviale Angiogenese eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der RA ein [*Paleolog*, 1996]; [*Koch*, 1998]. Sie wird sowohl durch die im Gelenk entstehende Hypoxie induziert [*Distler et al.*, 2004] als auch durch verschiedenste Zytokine, z.B. Il-1, TNF-$\alpha$ oder den endothelspezifischen Faktor VEGF [*Koch et al.*, 1994]. Der VEGF, ursprünglich als Permeabilitätsfaktor in Tumoren entdeckt, wird heute immer wieder als Mediator und eines der zentralen Zytokine in der Angiogenese der RA beschrieben [*Koch et al.*, 1994]; [*Paleolog*, 1996].

Um die frühen entzündlichen Veränderungen der aktiven Arthritis zu erkennen, sind dringend sensitive und spezifische diagnostische Methoden, die zudem einfach zu handhaben sein sollten, erforderlich. Erst die Entwicklung von hochauflösenden Ultraschallgeräten und die Einführung der PD-Sonographie durch *Rubin & Adler* [1993] Anfang der 1990er Jahre machen im Gegensatz zur Grau-Skalen-Sonographie eine Diskrimination zwischen rei-

nem Gelenkerguss und einer aktiven Entzündung durch die Darstellung der intraartikulären Hyperämie möglich [*Newman et al.*, 1994], [*Newman et al.*, 1996]. *Strunk et al.* [2001] heben hervor, dass sich die PD-Sonographie zudem zur Diskrimination von kleinsten peri- und intraartikulär gelegenen Blutgefäßen eignet. Die mit der Entzündung einhergehenden Veränderungen, wie Pannusbildung und ossäre Destruktionen, lassen sich in Kombination mit der Grau-Skalen-Sonographie oft schon lange vor einem radiologischen Nachweis erkennen [*Newman et al.*, 1996]. (Weitere Ausführungen dazu sind im Kapitel 2.2.2 zu finden.)

Das hier entwickelte Modell verbindet die systemische Messung des proangiogenetischen VEGF mit der unmittelbaren Visualisierung des lokalen Ergebnisses der Angiogenese im entzündlichen Prozess, die verstärkte Hyperämie. *Terslev et al.* [2003] konnten in einer ähnlich angelegten Studie nur eine schwache Korrelation zwischen der intraartikulären Entzündungsaktivität, mit MRT und Sonographie dargestellt, und den systemisch messbaren Entzündungsparametern CRP und BSG finden.

Für die hier vorliegende klinische Arbeit ließ sich kein statistischer Zusammenhang zwischen der Intensität der PD-Signale (qualitative Bestimmung) und der Höhe der systemischen VEGF-Konzentration beschreiben. Die VEGF-Konzentration sinkt mit zunehmender Intensität der PD-Signale im Median ab. Jedoch finden sich die höchsten VEGF-Konzentrationen in den PD-Grading-Gruppen 1 und 3 (siehe Abbildung auf S. 38). Die Divergenz zwischen der lokalen sonographisch nachgewiesenen Hyperämie und der systemischen, mit der VEGF-Konzentration beschriebenen Krankheitsaktivität und angiogenetischen Aktivität wird besonders bei den bereits im Ergebnisteil erwähnten zwei Beispielen deutlich:

**(a)** Es lässt sich bei zwei Patienten (Patient 3 und 12) trotz extrem hoher VEGF-Konzentrationen kein intraartikulärer Blutfluss mit dem PD nachweisen (PD-Intensitätsskala 1).

**(b)** Im Gegensatz zum ersten Fall zeigen drei Patienten (Patient 13, 16 und 20) mit intensiven PD-Signalen (PD-Intensitätsskala 3) nur sehr niedrige VEGF-Konzentrationen.

Als mögliche Erklärung dient folgende Überlegung geben: Im ersten Fall könnte sich bei bereits klinisch aktiver Carpusarthritis die Angiogenese, bedingt durch die hohen VEGF-Konzentrationen, in der Initialisierungsphase befinden. Die Angiogenese ist als Folge der VEGF-Ausschüttung anzusehen. Ein sonographischer Nachweis ist daher noch nicht möglich. Im zweiten Fall ist der intensive Blutfluss Zeichen der aktiven Entzündung, Vasodilatation und Angiogenese. Ein möglicher negativer Feedback-Mechanismus hat die VEGF-Konzentration aber bereits wieder abgesenkt. Ein solcher Feedback-Mechanismus könnte auch als Erklärung für die abnehmende VEGF-Konzentration bei steigender sichtbarer Vaskularisierung dienen: Die hohe VEGF-Konzentration in der Grading-Gruppe 1 (Patienten mit wenig PD-Signalen) steht für die Initialisierung der sonographisch noch nicht nachweisbaren Angiogenese. Die leicht gesunkenen VEGF-Konzentrationen in der zweiten Grading-Gruppe könnten einen Hinweis auf einen (beginnenden) Feedback-Mechanismus geben, der in der Grading-Gruppe 3 (intensive PD-Signale) erst vollständig ausgereift ist. Eine andere Überlegung für die in der dritte Grading-Gruppe auch vorkommenden hohen VEGF-Konzentrationen, geht von einer Verselbständigung des Systems aus, die zu einer voranschreitenden Wachstumsstimulation führt und die zum Teil sehr hohen VEGF-Konzentrationen erklären könnte. *Pinheiro et al.* [2001] vermuten, dass der VEGF im Serum bei Patienten mit lang bestehender RA ein unabhängiger Marker ist. Darüber hinaus beschreibt er, dass Schmerzen bei lang bestehender RA eher durch Destruktionen als durch ein entzündliches Geschehen hervorgerufen werden. Dem entgegen steht die bei fast allen Patienten dieser Studie mit der PD-Sonographie eindeutig nachgewiesene Hyperämie in den betroffenen Gelenken, als Zeichen der aktiven Entzündung.

Letztendlich kann die Frage nach der Abhängigkeit der lokalen, angiogenetischen Veränderungen im Gelenk von den systemisch messbaren Veränderungen der VEGF-Konzentration an dieser Stelle nicht endgültig beantwortet werden. Die Studie zeigt jedoch das Potential des beschriebenen Models für weitere Forschungen mit größeren Patientengruppen, die mit den neuen Techniken der dreidimensionalen Doppler-Sonographie und dem kontrastmittelverstärkten MRT bereits durchgeführt werden.

### Power Doppler-Sonographie und die klinisch nachweisbare Carpusarthritis

Die aktuellen Leitlinien für das Management der RA fordern eine frühe und aggressive Therapie mit dem Ziel, Gelenkdestruktion, Schmerzen, Funktionsverlust und den damit einhergehenden Verlust der Lebensqualität zu verhindern. Die Sonographie und im Besonderen die PD-Sonographie ermöglichen eine frühzeitige Diagnostik. Sie erleichtern die Entscheidung zu einer die Progredienz verlangsamenden Therapie [*Weidekamm et al.*, 2003].

In den schmerzhaften und geschwollenen Carpi der 21 sonographisch untersuchten RA-Patienten konnte, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, eine echoarme Zone von 1,5 bis 4,6 mm dargestellt werden. Aber erst der Nachweis der intrakapsulären Hyperämie mit Hilfe der PD-Sonographie bei 17 von 21 untersuchten Patienten (das entspricht 80%) ermöglichte die sichere Unterscheidung zwischen reinem Gelenkerguss und Synovitis mit Gelenkerguss und somit auch zwischen periartikulärer Vasodilatation und synovialer Hyperämie und Angiogenese. Die PD-Sonographie reagiert sehr empfindlich auf kleinste Bewegungen, wie z.B. Sprechen des Patienten. Die so auftretenden Artefakte können wie echte Gefäße imponieren. Der Beweis „echten“ arteriellen intrakapsulären Blutflusses konnte bei diesen 17 Patienten mit Hilfe der Spektral-Fluss-Kurve geführt werden. Bei den vier Patienten ohne intrakapsulären Blutfluss (Patienten 3, 4, 8 und 12) bleibt die Ungewissheit, ob es sich bei der beobachteten Kapselabhebung trotz deutlicher klinischer Zeichen einer Arthritis nicht doch nur um einen Gelenkerguss ohne Synovitis gehandelt hat. Alternativ käme, wie oben bereits diskutiert, ein initiales Stadium der Entzündung mit bereits erhöhten VEGF-Konzentrationen in Frage, zumal bei drei dieser Patienten die Diagnose der RA zum ersten Mal gestellt wurde. Trotz dieser vier Patienten ohne intraartikulären Blutfluss zeigt sich der Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen klinische Carpusarthritis und intraartikulärer Blutfluss mit einem $p < 0{,}0001$ ($\chi^2$-Test) statistisch hoch signifikant.

Die hier vorliegenden Daten zeigen, dass sich, wie bereits von *Newman et al.* [1994] beschrieben, die PD-Sonographie zur Unterscheidung zwischen

reinem Gelenkerguss und aktiver Entzündung durch die Darstellung der intraartikulären Hyperämie eignet. Es kann sogar noch ein Schritt weiter gegangen werden. Die aktuelle Entzündungsaktivität innerhalb eines Gelenkes kann durch die qualitative Bestimmung des intrakapsulären mikrovaskulären Flusses mit Hilfe eines Gradings erfasst werden, wie es in dieser Arbeit vorgestellt wird (siehe Seite 30). Sie bietet die Möglichkeit, dass Verständnis über die entzündlichen Prozesse im RA-Gelenk durch die Visualisierung der frühesten pathologischen Veränderungen der RA zu erweitern. Sie stellt eine echte Innovation für die Diagnostik, insbesondere in den frühen Krankheitsstadien, der RA dar. Da sie, im Gegensatz zur MRT, weit verbreitet, einfach zu handhaben, über die wesentlich bessere Auflösung verfügt, kostengünstig ist und zudem keine Risiken für den Patienten birgt [*Schmidt*, 2001], ist sie zur Untersuchung der Krankheitsaktivität der RA, die dem MRT vorzuziehende Methode.

### VEGF-Konzentration bei behandelten und unbehandelten Patienten

In Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Studien [*Harada et al.*, 1998; *Ballara et al.*, 2001] konnte auch hier ein hoch signifikanter statistischer Unterschied zwischen den VEGF-Konzentrationen von RA-Patienten und gesunden Probanden gefunden werden ($p = 0{,}027$; Mann-Whitney U Test). Unterteilt man jedoch die Gruppe der RA-Patienten in therapienaive und bereits behandelte Patienten und betrachtet die VEGF-Konzentrationen beider Unterguppen zueinander sowie jeweils zur Gruppe der Gesunden, so lässt sich nur zwischen den Therapienaiven und den Gesunden ein statistischer Zusammenhang erkennen ($p = 0{,}016$; Mann-Whitney U Test). Auffallend ist zudem die große Streubreite der VEGF-Konzentrationen im Serum sowohl bei den RA-Patienten (113 - 1974 pg/ml) als auch bei den gesunden Probanden (70 - 971 pg/ml). Diese Ergebnisse überraschen etwas und lassen weitere Einflüsse auf die Höhe der VEGF-Konzentration vermuten. Dazu könnte auch eine genetisch bedingte individuelle Variabilität zählen, wie sie z.B. auch über das Vorhandensein des Rheumafaktors oder des HLA-B 27 entscheidet. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Faktoren wie Geschlecht, Lebensal-

ter, Erkrankungsdauer, Anzahl der betroffenen Gelenke sowie die aktuelle Therapie eines jeden Patienten zu dieser Variabilität beitragen (siehe dazu weiter unten im Text).

Vielfach ist die lokale Expression von VEGF durch synoviale Makrophagen und Fibroblasten, durch subsynovialen Makrophagen und durch die perivaskulären glatten Muskelzellen im synovitischen Gelenk untersucht und beschrieben worden [*Koch et al.*, 1994; *Nagashima et al.*, 1995]. Dahingegen ist die Quelle für den VEGF im Serum bis heute nicht eindeutig geklärt. *Mohle et al.* [1997] konnten den VEGF in Thrombozyten nachweisen. So könnte das vor dem Einfrieren erfolgte Zentrifugieren der Blutproben durch teilweise Zerstörung der Thrombozyten zur Steigerung der später bestimmten VEGF-Konzentration beigetragen haben. *Nagashima et al.* [1995] postulieren, dass der VEGF aus den Gelenken stammt. Damit wäre die VEGF-Konzentration abhängig von der Aktivität der RA und der Anzahl der entzündeten Gelenke [*Nagashima et al.*, 1995; *Harada et al.*, 1998]. Letztendlich ist noch nicht geklärt, ob die synoviale Angiogenese der RA lokal oder systemisch gesteuert wird und welche Rolle Faktoren wie der VEGF systemisch spielen. Sicher ist hingegen, dass sich durch den lokalen Entzündungsprozess zahlreiche Parameter systemisch messbar verändern (Entzündungsfaktoren, VEGF, TNF-$\alpha$).

### VEGF-Konzentration während der Therapie mit Prednisolon und Infliximab

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die klinisch effektive Prednisolon- bzw. Infliximab-Therapie mit einer deutlichen Reduktion der VEGF-Konzentrationen von 45% resp. 42% (trotz sehr unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen) bei RA-Patienten nach nur zweiwöchiger Therapie verbunden ist (siehe auch S. 27). Diese Beobachtungen belegen ein Ansprechen des VEGF auf die Therapie.

Andere Studien, die ebenfalls eine Reduktion der VEGF-Konzentration demonstrieren konnten, bestätigen dies. *Nagashima et al.* [2000] konnten eine Reduktion der VEGF-Konzentration sowohl in vitro als auch in vivo im Median von 57% (von 411,3 pg/ml auf 178,4 pg/ml) während einer Thera-

pie mit Dexamethason und im Median von 55% (auf 184,9 pg/ml) während einer Bucillamin-Therapie nachweisen (Zeitangaben über die Behandlungsdauer fehlen). Auch *Harada et al.* [1998] zeigten nach Therapie mit DMARDs und Prednisolon bei Patienten in klinischer Remission eine Reduktion der VEGF-Konzentration (genaue Zahlenangaben über die Reduktion fehlen). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die sehr guten Ansprechraten auf Prednisolon und Infliximab innerhalb der ersten zwei Wochen nach Therapiebeginn eher auf eine allgemeine anti-entzündliche als auf eine spezielle Medikamentenwirkung zurück zuführen sind. Eine von *Gerlag et al.* [2004] durchgeführte Studie, lässt ähnliches vermuten: In arthroskopisch gewonnenem synovialem Gewebe werden nach 14-tägiger oraler Gabe von Prednisolon die synovialen und subsynovialen Makrophagen deutlich gehemmt. Darüber hinaus konnte die Studie zeigen, dass mit der Makrophagenhemmung die Sekretion wichtiger Zytokine wie TNF-$\alpha$, Il-1 und VEGF deutlich vermindert wird sowie der Trend zu einem verringertem Gefäßwachstum geht. Damit scheinen die Glukokortikoide, neben ihren vielfältigen Angriffspunkten auf die Entzündung, auch die Angiogenese als solche indirekt zu hemmen.

Auch die Hemmung der VEGF-Sekretion durch den anti-TNF-$\alpha$ Antagonisten Infliximab konnte in in vitro und in vivo Studien nachgewiesen werden [*Paleolog et al.*, 1998; *Nakahara et al.*, 2003]. Jedoch hat keine der in vivo Studien die VEGF-Konzentration im Serum nach 14 Tagen Therapie, d.h. vor der zweiten Infusion, bestimmt.

Der inhibitorische Effekt von Infliximab auf die VEGF-Ausschüttung der synovialen Zellen in vitro wird als sehr schwach beschrieben [*Paleolog et al.*, 1998; *Nakahara et al.*, 2003]. Andererseits zeigen *Paleolog et al.* [1998] auch, dass sich die VEGF-Konzentration in Abhängigkeit der Dosierung von anti-TNF-$\alpha$ reduzieren lässt. Aufgrund dieser Beobachtungen stellt sich auch hier die Frage, inwiefern es sich um medikamentenspezifische oder aber um allgemeine anti-entzündliche Wirkungen handelt. Es sind zwei wichtige Wirkungsmechanismen der Infliximab-Therapie bekannt: Zum einen die Deaktivierung der pro-inflammatorischen Zytokinkaskade durch Neutralisierung der TNF-$\alpha$-Bioaktivität, indem es sich an sezernierte TNF-alpha Moleküle bindet und mit ihnen stabile Komplexe bildet. Und zum anderen die verminderte Rekru-

tierung von Entzündungszellen aus dem Blut in das entzündete Gelenk durch Hemmung von Adhäsion und Chemotaxis [*Taylor et al.*, 2000; *Maini & Feldman*, 2004]. Insbesondere bei dem zweiten aufgeführten Mechanismus handelt es sich um eine wichtige, aber allgemeine anti-entzündliche Wirkung, die wesentlicher Bestandteil der schnellen klinischen Wirkung durch Unterbrechung des „Entzündungskreises " ist. Sowohl die Unterbrechung der Zytokinkaskade als auch die Hemmung von Adhäsion und Chemotaxis führen, wenn auch indirekt zur Hemmung der VEGF-Produktion und Expression und bieten somit eine Erklärung der schnellen Minderung der VEGF-Konzentration.

Unabhängig der gezeigten Hemmung der VEGF-Sekretion mehren sich die Hinweise auf eine Medikamenten bedingte Krankheitsmodifikation. Schon allein die Therapie mit Prednisolon schützt vor erosiven Veränderungen am Gelenk [*Kirwan & Group*, 1995]. *Taylor et al.* [2004] stellten für eine Therapie von Infliximab plus Methotrexat eine deutlich geringere Progression der Gelenkdestruktion innerhalb eines Jahres fest. Aufgrund dieser Tatsachen ist die Entscheidung zu einer frühen Therapie anzuraten.

### VEGF-Konzentration und Erkrankungsdauer

Wie schon in anderen Studien [*Ballara et al.*, 2001; *Pinheiro et al.*, 2001] zeigte sich auch in dieser Arbeit ein signifikanter Unterschied für die Höhe der VEGF-Konzentration in Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer ($p = 0{,}014$, $r = -0{,}528$; Spearman-Rho-Rangkorrelation): Bei Patienten mit kurzer Krankheitsdauer ($< 2$ Jahre) waren die VEGF-Konzentrationen um einen Faktor zwei höher (Median = 1124 pg/ml) als bei Patienten mit langer Krankheitsdauer ($> 2$ Jahre, Median = 528 pg/ml). Ein Einfluss des Lebensalters auf die Höhe der VEGF-Konzentration kann ausgeschlossen werden, denn das durchschnittliche Lebensalter von den zwei Gruppen der Patienten (kurzer bzw. langer Erkrankungsdauer) ist mit 65 Jahren bzw. 64,5 Jahren nicht voneinander zu unterscheiden. Bei den Patienten 13, 17 und 24 lag die VEGF-Konzentration trotz eines akuten Schubs der RA deutlich unterhalb des Medians der VEGF-Konzentration aller Patienten. Da die Höhe der VEGF-Konzentration auf den destruktiven Verlauf der Erkrankung einen Einfluss zu haben scheint [*Ballara et al.*, 2001], sollte es über eine langfristi-

ge Therapie möglich sein, das Grundlevel der VEGF-Konzentration deutlich abzusenken und somit die Progredienz der Erkrankung zu verlangsamen.

Die Erkrankungsdauer als solche könnte einen möglichen Einfluss auf die VEGF-Konzentration haben, wie sich am Beispiel von Patient 16 zeigen lässt: Obwohl er seit zehn Jahren an regelmäßigen Schüben der RA leidet, ohne bisherige Diagnosestellung ist und daher therapienaiv und zum Zeitpunkt der Datenerhebung eine klinisch hochaktive Carpusarthritis mit ausgeprägter Morgensteifigkeit präsentiert, weist er eine niedrige VEGF-Konzentration von 325 pg/ml auf. *Strunk et al.* [2006] stellen hierzu die These auf, dass Erkrankungsdauer und Therapie mit DMARDs und GC zwei verschiedene, unabhängige, die VEGF-Konzentration beeinflussende Faktoren sind. Gegenstand zukünftiger Forschungen wird sein, diese These zu überprüfen und herauszufinden, wodurch individuelle (langsame) Verläufe und niedrige VEGF-Konzentrationen bedingt werden. Zur Zeit steht die frühe Diagnostik im Mittelpunkt der Forschung, um Patienten mit einem rasch progredienten Verlauf zu erkennen und ihnen eine frühestmögliche Therapie zukommen zu lassen.

**VEGF-Konzentration und Entzündungsfaktoren**

Für die hier vorliegenden Daten konnte kein statistischer Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration des VEGF und den Entzündungsparametern CRP und der Leukozytenzahl im Blut gefunden werden (siehe S. 46). Lediglich für die BSG lässt sich auf dem 90% Signifikanzniveau ($p = 0{,}092$; $r = 0{,}36$ Spearman Rho Rangkorrelation) eine schwache signifikante Korrelation feststellen. Mehrfach wurde in anderen Studien auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der VEGF-Konzentration und den Entzündungswerten untersucht, mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Während *Harada et al.* [1998] einen Zusammenhang zwischen den VEGF- und CRP-Serumkonzentrationen fanden, stellten *Pinheiro et al.* [2001], wie auch diese Arbeit, keinen Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern fest. In wieder anderen Studien konnte zusätzlich auch ein Zusammenhang zur BSG nachgewiesen werden [*Nagashima et al.*, 2000; *Lee et al.*, 2001], nicht aber für die synoviale VEGF-Konzentration und die BSG bzw. das CRP [*Lee et al.*, 2001]. Ebenso wenig konnten *Lee et al.* [2001] einen Zusammenhang zwischen den im Serum und

der in der Synovialflüssigkeit bestimmten VEGF-Konzentrationen finden.

Die VEGF-Konzentration zeigt sich bei den RA-Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden signifikant erhöht. Keiner der gesunden Kontrollprobanden hatte erhöhte Entzündungswerte. Das gute Ansprechen der CRP- und VEGF-Konzentrationen auf eine Therapie mit Prednisolon bzw. mit Infliximab bei gleichzeitiger Besserung der klinischen Befunde deuten auf eine Abhängigkeit beider Parameter von der klinischen Aktivität hin, wie es u.a. bei *Nagashima et al.* [1995] und *Harada et al.* [1998] postuliert wird. Um so überraschender ist der für die hier vorliegenden Daten fehlende statistische Zusammenhang zwischen der VEGF-Konzentration und den oben genannten Laborparametern. *Kirwan* [1997] stellt die These auf, dass die persistierende Synovitis in Fingergelenken einen nur geringen Anteil an systemischen Entzündungsparametern wie dem CRP hat. Diese Überlegungen führen erneut zu den bisher unbeantworteten Fragen nach der systemischen Bedeutung des VEGF und der Quelle des VEGF im Serum.

**Fazit**

Ein wichtiger Bestandteil dieser Querschnittsstudie ist die Klärung der klinischen Bedeutung des VEGF als Aktivitäts-, Verlaufs- und Entzündungsparameter und Angiogenesefaktor im Vergleich zu im Gelenk sonographisch darstellbarer Hyperämie. Eine wichtige Aussage dieser Arbeit ist, dass der VEGF anhand der hier erhobenen Daten nicht als Entzündungsparameter betrachtet werden kann. Hingegen eignet er sich als Verlaufsparameter während einer Therapie. Spannend bleibt die noch zu klärende Frage, wie sich die VEGF-Konzentration, aber auch die im Gelenk bestehende Hyperämie innerhalb der ersten zwei Wochen nach Therapiebeginn mit GC oder BT verhält. Das hier vorgestellte Modell dient als Grundlage für weitere Studien, die sich dieser Frage widmen.

In der Literatur herrscht inzwischen Einigkeit, dass der VEGF als synovitischer Aktivitätsparameter zu werten ist [*Nagashima et al.*, 1995; *Harada et al.*, 1998; *Lee et al.*, 2001; *Taylor & Sivakumar*, 2005]. Der signifikante Unterschied in der Höhe der VEGF-Konzentration von Gesunden und RA-Patienten und die deutliche Reduktion der VEGF-Ausgangskonzentration bei

gleichzeitiger Besserung der klinischen Befunde während einer Therapie mit Prednisolon, bzw. Infliximab unterstützen diese Auffassung. Ein deutlicher Gegensatz dazu lässt sich in der fehlenden Korrelation zwischen den Entzündungsparametern und der VEGF-Konzentration und in der beschriebenen Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer finden. Sie lassen auf einen individuellen Verlauf der VEGF-Konzentration schließen. Gleichzeitig wird die Frage aufgeworfen, ob die Höhe der VEGF-Konzentration und die sonographisch darstellbare individuelle Angiogenese zu Beginn der Erkrankung eine prognostische Aussage über ihren weiteren Verlauf zu lässt, wie es Studien von *Ballara et al.* [2001] und *Taylor et al.* [2004] vermuten lassen. Künftige Forschungen werden sich mit dieser These weiter auseinander setzen müssen.

Für weitere Studien, die den Zusammenhang zwischen lokalen und systemischen entzündlich bedingten Veränderungen darstellen, stehen inzwischen, im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verwendeten Sonographiegerät, neue hochauflösendere und zur dreidimensionalen Bildwiedergabe fähige Geräte sowie das kontrastmittelverstärkte MRT als Erfolg versprechendere, nicht invasive Methoden zur Verfügung [*Strunk et al.*, 2004; *Terslev et al.*, 2003]. Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit festgestellt werden, dass die Kombination der lokalen Visualisierung entzündlicher Prozesse und systemischen Bestimmung von Angiogenesestimulatoren neue Informationen über die synoviale Angiogenese und den VEGF sowie ihre Interaktionen mit dem Entzündungsprozess, ihr Verhalten unter einer Therapie und Wertigkeit als Prognoseparameter gewonnen werden können.

# Kapitel 6

# Zusammenfassung

Die frühe Erkennung des destruktiven Potenzials der Rheumatoiden Arthritis (RA) ist entscheidend für den Therapiebeginn und damit für die Prognose der Erkrankung. Die Angiogenese nimmt eine zentrale Rolle im Entzündungs- und Zerstörungsprozess der RA ein. Sie wird von verschiedensten Faktoren gesteuert, von denen der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) zu den am besten untersuchten gehört. Das Ergebnis der Entzündung und der Angiogenese, der vermehrte synoviale Blutfluss, kann mit Hilfe der Power Doppler-Sonographie visualisiert werden. Das hier entwickelte Modell zur Untersuchung der Angiogenese der RA verbindet die systemische Messung des pro-angiogenetischen VEGF mit der unmittelbaren Visualisierung des lokalen Ergebnisses der Angiogenese im entzündlichen Prozess, die verstärkte Hyperämie. Es ließ sich jedoch kein statistischer Zusammenhang zwischen der qualitativ bestimmten Intensität der PD-Signale (auf einer dreistufige Skala) und der Höhe der VEGF-Konzentration feststellen. Weitere Studien, die der Frage nach der Abhängigkeit der systemisch messbaren Veränderungen der VEGF-Konzentration und anderer Angiogenesefaktoren von den lokalen angiogenetischen Veränderungen im Gelenk nachgehen, werden mit der neuen, Erfolg versprechenderen Technik der dreidimensionalen Doppler-Sonographie bereits durchgeführt.

Für die PD-Sonographie konnte gezeigt werden, dass sie sich zur Darstellung und Objektivierung der aktuellen Entzündungsaktivität, auch in den frühesten Stadien der RA, innerhalb eines Gelenkes durch die qualitative Be-

stimmung des intrakapsulären mikrovaskulären Flusses eignet. Es konnte ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen der synovialen Hyperämie und der klinisch nachweisbaren Synovitis bei RA-Patienten nachgewiesen werden.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der Höhe der Serumkonzentration des VEGF aller RA-Patienten und aller gesunden Probanden sowie der therapienaiven RA-Patienten und der gesunden Probanden nachgewiesen. Der Unterschied zwischen den vorbehandelten Patienten und den Gesunden sowie zwischen den beiden Gruppen der RA-Patienten ist jedoch nicht signifikant. Eine endgültige Erklärung für diese Ergebnisse konnte noch nicht gefunden werden. Wahrscheinlich spielt jedoch die bisher unbekannte Quelle des VEGF im Serum eine Rolle.

Neben der Entwicklung des neuen Angiogenesemodells wurde die VEGF-Konzentration als Verlaufsparameter während einer Therapie mit Prednisolon bzw. Infliximab charakterisiert. So zeigte sich einhergehend mit einer klinischen Besserung der Carpusarthritis eine deutliche Reduktion der Ausgangskonzentrationen des VEGF um 45% nach vierzehntägiger Therapie mit Prednisolon, bzw. 42% nach vierzehntägiger Therapie mit Infliximab.

Die Beobachtung, dass die VEGF-Konzentration mit der Dauer der Erkrankung abnimmt, lässt auf weitere Einflussfaktoren schließen, die für den Grundspiegel der VEGF-Konzentration verantwortlich sind. In Frage kommen bisherige Therapien, die Erkrankungsdauer selber, aber auch individuelle Unterschiede, die genetisch bedingt sein können, ähnlich dem Vorhandensein des Rheumafaktors oder des HLA-B 27.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit ein neues Gesamtbild der synovialen Angiogenese gewonnen werden. Die Ergebnisse zeigen Informationen über den VEGF als wichtigen Interaktionspartner im Entzündungsprozess und stellen ihn als Aktivitäts- und Verlaufsparameter dar. Ferner wird festgestellt, dass sich die PD-Sonographie als eine zur Objektivierung der klinischen Befunde geeignete Methode eignet. Die Arbeit ist Ausgangspunkt für weitere Forschungen, bei denen zur Zeit der Zusammenhang zwischen lokalen und systemischen Veränderungen der RA mittels Messung molekularer Marker (wie z. B. des VEGF) und Einsatz fortschrittlicher sonographischer und Doppler-sonographischer Techniken untersucht wird.

# Kapitel 7

# Summary

The early detection of rheumatoid arthritis (RA) is crucial for the initiation of therapy and clinical prognosis. Angiogenesis plays a central role in the inflammation and damage of rheumatoid arthritis and is driven by several factors. Vascular Endothelial Growth factor (VEGF) is one of the best characterized of these.

Power Doppler (PD-) sonography can image the increased synovial blood flow in a certain joint caused by the inflammation and angiogenesis. Within this thesis a new model to investigate angiogenesis associated with local and systemic changes in RA was developed. No statistic relationship between the qualitative determined intensity of the PD-signals (on a three-step scale) and the serum VEGF concentration was found. Other studies, using newer, more promising techniques like three-dimensional-Doppler-sonography, are currently searching for the relationship between angiogenic factors, including VEGF and the local angiogenic changes in a joint.

This study showed that PD-sonography is a useful method to visualize and objectify the actual inflammatory activity in a certain joint, even in the earliest stages of inflammation, through the qualitative determination of the intra-articular microvascular blood flow. A highly significant relationship exists between synovial hyperemia and clinical synovitis.

Within this study it was found that the difference between VEGF serum concentrations of non-treated RA patients and healthy controls is significant. No significance in VEGF levels existed between treated patients and healthy

controls or between the two treatment arms. After a 14 day treatment course the prednisolone treated patients had a 45% reduction in VEGF concentration and the infliximab group had a 42% reduction. Both groups had clinical improvement of their carpus arthritis.

While it was observed that VEGF concentration also decreases with the disease duration, the definitive explanation for this difference in VEGF concentrations is unknown. Many factors such as an as yet undiscovered source of the serum VEGF, treatment therapies or medications, or individual genetic differences, like the presence of rheumatoid factor or HLA-B 27, could play an important role.

In summary, this work gives a new picture of the synovial angiogenesis of RA. The results show that PD-sonography is a useful method to objectify clinical findings and that VEGF is important as a factor in the inflammatory process and as an activity and development parameter. Further research using the concentration of molecular factors like VEGF in combination with advanced sonographic and Doppler sonographic technics to examine the relationship between local and systemic changes in RA is recommended.

# Abbildungsverzeichnis

2.1 Circulus vitiosus der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis: Die synoviale Hyperplasie und Proliferation führt zum gesteigerten metabolischen und Sauerstoffbedarf bei gleichzeitiger Entfernungszunahme der Zellen von den Blutgefäßen. Die dadurch bedingte Hypoxie stellt einen entscheidenden Stimulus für die Angiogenese dar. Die Zunahme der Gefäße erleichtert die Infiltration von Zytokinen, Wachstumsfaktoren (GF = Growth Factor) und Entzündungszellen und sorgt somit für die Aufrechterhaltung der synovialen Hyperplasie. . . . . 7

2.2 Therapieschema zur Behandlung der Rheumatoiden Arthritis nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie . . . . . 15

3.1 Gruppeneinteilung und Versuchsablauf . . . . . 29

3.2 Dorsaler Longitudinalschnitt des Handgelenks: Der echoarme Raum zwischen den beiden Kreuzen repräsentiert den Gelenkerguss. Dieser Befund entspricht dem Grading 1. . . . . 31

3.3 Visualisierung des intraartikulären Blutflusses mit Hilfe der Power Doppler-Sonographie. . . . . 32

3.4 Doppler-Fluss durch eine kleine intraartikuläre Arterie. . . . . 33

4.1 Verteilung der VEGF-Werte in Abhängigkeit der dreistufigen modifizierten Intensitätsskala (21 Patienten der Gruppe A): Es zeigt sich die große Streuung der einzelnen VEGF-Werte innerhalb der Grading - Gruppen. Die grau unterlegten Bereiche dienen nur der Verdeutlichung der Variabilität. . . . . 38

4.2 Darstellung der Medianwerte der VEGF-Konzentration (pg/ml) für die Gruppe der Therapienaiven, der bereits behandelten und der Kontrollen. Die gruppenspezifische Abnahme des Medians ist deutlich sichtbar. . . . . 42

4.3 Reduktion der VEGF-Konzentration (Gruppe B): Dargestellt sind neben dem Median für den Ausgangs- und Folgewert der VEGF-Konzentration der gesamten Gruppe B auch die Mediane für die GC- und TNF-$\alpha$-Therapie-Untergruppen. Die Reduktion der VEGF-Konzentration ist nach 10-14-tägigen Behandlungsdauer deutlich erkennbar und statistisch hoch signifikant (p = 0,01; Wilcoxon-Rang-Test). . . . . 44

4.4 Reduktion des CRP (Gruppe B): Dargestellt sind die Mediane für den Ausgangs- und Folgewert des CRP der gesamten Gruppe B sowie die Mediane für die GC- und TNF-$\alpha$-Therapie-Untergruppen. Wie die VEGF-Konzentration zeigt auch das CRP eine deutliche Reduktion nach 10-14-tägigen Therapie. . 45

4.5 Darstellung der VEGF-Konzentration (pg/ml) in Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer (Jahre): Die Abnahme der VEGF-Konzentration mit zunehmender Erkrankungsdauer ist deutlich sichtbar. . . . . 47

4.6 Abhängigkeit der VEGF-Konzentration vom Alter der Patienten 47

4.7 Darstellung des Zusammenhangs zwischen der VEGF-Konzentration und der BSG: diese Darstellung zeigt am Beispiel des Streudiagramms von VEGF und BSG die höchste Korrelation von Entzündungswerten und der VEGF-Konzentration auf (r = 0,36 und p = 0,092, Spearman-Rho Rangkorrelationskoeffizient). Sie dient exemplarisch dafür, dass es keine Korrelation zwischen der VEGF-Konzentration und den Entzündungswerten Leukozytenzahl, CRP und BSG für diesen Datensatz gibt. Es ist zusätzlich die Trendlinie eingefügt, die einen leicht steigenden Verlauf hat. . . . . 49

# Tabellenverzeichnis


2.1 ACR - Kriterien . . . . . 4

2.2 Übersicht über stimulierende Faktoren der Angiogenese . . . . 8

2.3 Übersicht über inhibierende Faktoren der Angiogenese . . . . . 9

3.1 Ein- und Ausschlusskriterien . . . . . 24

3.2 Übersicht der Ergebnisse der Patienten der Gruppe A . . . . . 25

3.3 Übersicht der Ergebnisse der Gruppe B . . . . . 27

3.4 Übersicht der Ergebnisse der Kontrollgruppe . . . . . 28

4.1 Vierfeldertafeln: **a)** über die Anzahl der gesunden Probanden (Kontrolle) und der RA-Patienten, **b)** der relativen Anzahl der Probanden in Prozent bezogen auf das Merkmal Carpusarthritis, **c)** der relativen Anzahl der Probanden in Prozent hinsichtlich des Merkmals intrakapsulärer Fluss. Es ergibt sich ein deutlicher Zusammenhang (94,4 %) zwischen dem Merkmal der Carpusarthritis und dem intrakapsulären Fluss. . . . . 40

4.2 Median, Minimum und Maximum der VEGF-Konzentration in pg/mlfür Therapienaive (ED), Behandelte und Kontrollprobanden . . . . . 41

4.3 Angabe der Signifikanzen (p, Mann-Whitney U Test) für die Zusammenhänge des VEGF (Mediane) zwischen allen RA-Patienten und der Kontrollgruppe sowie zwischen den Gruppen der therapienaiven (ED), behandelten (B) und Kontroll-Probanden (K) . . . . . 41

4.4 Spearman-Rho-Korrelationskoeffizient (r) und Signifikanz (p) für die Korrelation von VEGF und BSG, Leukozyten und CRP 48

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| ACR | American College of Rheumatism |
| BM | Basalmembran |
| BSG | Blutsenkungsgeschwindigkeit |
| BT | Basistherapeutikum |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CD | Color-Doppler |
| CD4-T-Zellen | T-Helferzellen |
| CD8-T-Zellen | T-Killerzellen |
| CRP | C-reaktives Protein |
| DGRh | Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie |
| DMARDs | Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs |
| ECM | Extra Cellular Matrix |
| ED | Erstdiagnose |
| ELISA | Enzyme linked immuno sorbent assay |
| FGF | Fibroblast Growth Factor |
| GC | Glukokortikoide |
| GF | Wachstumsfaktor (growth factor) |
| HIF | Hypoxia inducible factor |
| i.S. | im Serum |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobluin |
| Il | Interleukin |
| MMP | Matrix Metall Proteinase |
| mRNA | mitochondriale Ribonukleinsäure |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MTX | Methotrexat |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| PD | Power Doppler |
| PDGF | Platelet Derived Growth Factor |
| PDS | Power Doppler-Sonographie |

| | |
|---|---|
| PRF | Puls Repetition Frequenz |
| PW | Pulsed waved |
| RA | Rheumatoide Arthritis |
| RF | Rheumafaktor |
| TGF-$\beta$ | Transforming Growth Factor-$\beta$ |
| TNF-$\alpha$ | Tumor necrosis factor-$\alpha$ |
| US | Ultraschall |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| VERA | very early rheumatoid arthritis |

# Literaturverzeichnis


Afuwape, A. O., S. Kiriakidis & E. M. Paleolog. The role of the angiogenic molecule VEGF in the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Histol Histolpathol*, *17*, 961–972, 2002. Review.

Arnett, F. C., S. M. Edworthy, D. A. Bloch, D. J. McShane, J. F. Fries, N. S. Cooper, L. A. Healey, S. R. Kaplan, M. H. Liang, H. S. Luthra, T. A. Medsger Jr., D. M. Mitchell, D. H. Neustadt, R. S. Pinals, J. G. Schaller, J. T. Sharp, R. L. Wilder & G. G. Hunder. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, *31*, 315–324, 1988.

Backhaus, M., G. R. Burmester, T. Gerber, W. Grassi, K. P. Machold, W. A. Swen, R. J. Wakefield & B. Manger. Guidelines for musculoskeletal ultrasound in rheumatolgy. *Ann Rheum Dis*, *60*, 641–649, 2001. Review.

Ballara, S., P. C. Taylor, P. Reusch, D. Marmé, M. Feldmann, R. N. Maini & E. M. Paleolog. Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*, *44*, 2055–2064, 2001.

Berse, B., J. A. Hunt & R. J. Diegel. Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and Il-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol*, *115*, 176–182, 1999.

Bottomley, M. J., N. J. Webb & C. J. Watson. Peripheral blood mononuclear cells from patients with Rheumatoid Arthritis spontaneously secrete vascular endothelial growth factor (VEGF): specific up-regulation by tumour

necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in synovial fluid. *Cin Exp Immunol*, *117*, 1999.

Burmester, G. R. *Taschenatlas der Immunolgie: Grundlagen, Labor, Klinik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1998.

Distler, J. H. W., R. H. Wenger, M. Gassmann, M. Kurowska, A. Hirth, S. Gay & O. Distler. Physiologic responses to hypoxia and implications for hypoxia-inducible factors in the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, *50*, 10–23, 2004.

Fava, R. A., N. J. Olsen & G. Spencer-Green. Vascular permeability factor/endothelial growth factor VPF/VEGF: accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med*, *180*, 341–346, 1994.

Firestein, G. S. Rheumatoid synovitis and pannus. In *eds. Rheumatology*, herausgegeben von H. J. Klippel & P. A. Dieppe, Bd. 1. Mosby International; London, England, zweite Aufl., 1998.

Gerlag, D. M., J. J. Haringham, T. J. M. Smeets, A. H. Zwinderman, M. C. Kraan, P. J. Laud, S. Morgan, A. F. P. Nash & P. Tak. Effect of oral prednisolone on biomarkers in synovial tissue and clinical improvement in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, *50*, 3783–3791, 2004.

Harada, M., K. Mitsuyama, H. Yoshida, S. Sakisaka, E. Taniguchi, T. Kawaguchi, M. Ariyoshi, T. Saiki, M. Sakamoto, K. Nagata, M. Sata, K. Matsuo & K. Tanikawa. Vascular endothelial growth factor in patients with Rheumatoid Arthritis. *Scand J Rheumatol*, *27*, 377–380, 1998.

Kasama, T., F. Shiozawa, K. Kobayashi, N. Yajima, M. Hanyuda, H. T. Takeuchi, Y. Mori, M. Negishi, H. Ide & M. Adachi. Vascular endothelial growth factor expression by activated synovial leukocytes in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, *44*, 2515–2524, 2001.

Kirwan, J. R. The relationship between synovitis and erosions in Rheumatoid Arthritis. *Br J Rheumatol*, *36*, 225–228, 1997.

Kirwan, J. R. & t. A. L. D. G. S. Group. The effect of glucocorticoids on joint destruction in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*, *333*, 142–146, 1995.

Koch, A. E. Angiogenesis - Implication for Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, *41*, 951–962, 1998. Review.

Koch, A. E., L. A. Harlow, G. K. Haines, E. P. Amento, E. N. Unemori, W. L. Wong, R. M. Pope & N. Ferrara. Vascular Endothelial Growth Factor – A cytokine modulating endothelial function in Rheumatoid Arthritis. *J Immunol*, *152*, 4149–56, 1994.

Lee, S. S., Y. S. Joo, W. U. Kim, D. J. Min, J. K. Min, S. H. Park, C. S. Cho & H. Y. Kim. Vascular endothelial growth factor in levels in the serum and synovial fluid of patients with Rheumtaoid Arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, *19*, 321–324, 2001.

Maini, R. N. & M. Feldman. Infliximab therapy. In *TNF-$\alpha$-Inhibition in the treatment of Rheumatoid Arthritis*, herausgegeben von L. Moreland & P. Emery, S. 23–45. Martin Dunitz, London, 2004.

Martinoli, C., L. E. Derchi, G. Rizzatto & L. Solbiati. Power Doppler Sonography: General principles, clinical applications, and future prospects. *Eur Radiol*, *8*, 1224–1235, 1998.

Mau, W., W. Bräuer & S. Merkesdal. Long-term prognosis of work disability in early Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, *44(suppl)*, S152, 2001. Abstract.

Miossec, P. Are T cells in rheumatoid synovium aggressors or bystanders? *Curr Opin Rheumatol*, *12*, 181–185, 2000.

Müller-Ladner, U., R. E. Gay & S. Gay. Activation of synoviocytes. *Curr Opin Rheumatol*, *12*, 186–194, 2000.

Mohle, R., D. Green, M. A. Moore, R. L. Nachman & S. Rafii. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth

factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci USA*, *94*, 663–668, 1997.

Mohr, W. Pathogenese der Gelenkzerstörung bei der chronischen Polyarthritis. *Radiologe*, *36*, 593–599, 1996.

Nagashima, M., W. K, D. Hirano, S. Ishigami, H. Aono, M. Takai, M. Sasano & S. Yoshino. Effects of combination of anti-rheumatic drugs on the production of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in cultured synoviocytes and patients with Rheumatoid Arthritis. *Br J Rheumatol*, *39*, 1255–1262, 2000.

Nagashima, M., S. Yoshino, T. Ishiwata & G. Asano. Role of Vascular Endothelial Growth Factor in angiogenesis of Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*, *22*, 1624–30, 1995.

Nakahara, H., J. Song, M. Sugimoto, K. Hagihara, T. Kishimoto, K. Yoshizaki & N. Nishimoto. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, *48(6)*, 1521–1529, 2003.

Newman, J. S., R. S. Adler, R. O. Bude & J. M. Rubin. Detection of soft-tissue hyperemia: Value of power Doppler sonography. *AJR*, *163*, 385–389, 1994.

Newman, J. S., T. J. Laing, C. J. McCarthy & R. S. Adler. Power Doppler Sonography of synovitis assessment of therapeutic response - preliminary observations. *Radiology*, *198*, 582–4, 1996.

Paleolog, E. M. Angiogenesis: A critical process in the pathogenesis of RA – A role for VEGF? *Br J Rheumatol*, *35*, 917–920, 1996. Editorials.

Paleolog, E. M. Angiogenesis in Rheumatoid Arthitis. *Arthritis Res*, *4(suppl3)*, S81–90, 2002. Supplement Review.

Paleolog, E. M., S. Young, A. C. Stark, R. V. McCloskey, M. Feldmann & R. Maini. Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by

tumor necrosis factor $\alpha$ and interleukin-1 in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, *41*, 1258–1265, 1998.

Paus, H. J., Dr. *Physik in Experimenten und Fallbeispielen.* Carl Hanser Verlag, München - Wien, 1995.

Pinheiro, G. R. C., C. A. F. Andrade, C. R. Gayer, M. S. Coelho, S. M. Freire & M. A. Scheinberg. Serum vascular endothelial growth factor in late Rheumatoid Arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, *19*, 721–723, 2001.

Quinn, M. A., P. G. Conaghan, P. J. O'Connor, Z. Karim, A. Greenstein, A. Brown, C. Brown, A. Fraser, S. Jarret & P. Emery. Very early treatment with Infliximab in addition to Methotrexate in early, poor-prognosis Rheumtoid Arthritis reduces magnetic resonance imaging evidence of synovitis and damage, with sustained benefit after Infliximab withdrawal: Results from a twelve-month randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*, *52*, 27–35, 2005.

Renz, H. *Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin; Pathophysiologie, Pathobiochemie, Hämatologie.* Walter de Gruyter, Berlin, New York, 2003.

Rubin, J. M. & R. S. Adler. Power Doppler expands standard color capability. *Diagn. Imaging (San Fran)*, *15*, 66–69, 1993.

Rubin, J. M., R. S. Adler, J. B. Fowlkes, S. Spratt, J. E. Pallister & J. F. Chen. Fractional moving blood volume: estimation with Power Doppler US. *Radiology*, *197*, 183–90, 1995.

Rubin, J. M., R. O. Bude, P. L. Carson, R. L. Bree & R. S. Adler. Power Doppler US: A potentially useful alternative to mean frequency-based Color Doppler US. *Radiology*, *190*, 853–856, 1994.

Ruland, W. O. *Dopplersonographische Diagnostik.* Dt Ärzte Verlag, 2000.

Schmidt, G. H. *Checkliste Sonographie.* Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1997.

Schmidt, K. L. *Checkliste Rheumatologie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 2nd Aufl., 2000.

Schmidt, W. A. Value of sonography in diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *The Lancet*, *357*, 1056–57, 2001. Commmentary.

Schrieber, L. & C. J. Jackson. Angiogenesis in RA. In *eds. Rheumatology*, herausgegeben von H. J. Klippel & P. A. Dieppe, Bd. 1. Mosby International; London, England, zweite Aufl., 1998.

Seemayer, C. A., O. Distler, S. Kuchen, U. Müller-Ladner, B. A. Michel, M. Neidhart, R. E. Gay & S. Gay. Die Rheumatoide Arthritis: Neuentwicklung in der Pathogenese unter besonderer Berücksichtigung der synovialen Fibroblasten. *Z Rheumatol*, *60*, 309–318, 2001.

Strunk, J., E. Bundke, K. L. Schmidt & U. Lange. Anti-TNF-$\alpha$-antibody Infliximab and glucocorticoids reduce serum Vascular Endothelial Growth Factor levels in patiens with Rheumatoid Arthritis - a pilot study. *Rheumatol Int*, *26*, 252–256, 2006.

Strunk, J., E. Heinemann, G. Neeck, K. L. Schmidt & U. Lange. A new approach to studying angiogenesis in Rheumatoid Arthritis by means of power Doppler ultrasonography and measurement of serum vascular endothelial growth factor. *Rheumatol*, *43*, 1480–1483, 2004.

Strunk, J., U. Lange & U. Müller-Ladner. Diagnostik und Therapie der Rheumatoiden Arthritis. *DMW*, S. 1761–1768, 2005.

Strunk, J., U. Lange, K. L. Schmidt & G. Neeck. Sonomorphologische Aspekte entzündlich rheumatischer Erkrankungen unter Einbeziehung der Power Doppler-Sonographie. *Ultraschall Med*, S. P104, 2001.

Sule, S. & J. M. Bathon. Etanercept. In *TNF-$\alpha$-Inhibition in the treatment of Rheumatoid Arthritis*, herausgegeben von L. Moreland & P. Emery, S. 47–69. Martin Dunitz, London, 2004.

Szkudlarek, M., M. Court-Payen, S. Jacobsen, M. Klarlund, H. S. Thomsen & M. Ostergaard. Interobserver agreement in ultrasonography of the finger and toe joints in Rheumatoid Arthritis. *ar*, *48*, 955–962, 2003.

Tak, P. P., P. C. Taylor, F. C. Breedveld & et al. Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor $\alpha$ monoclonal antibody treatment in patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, *39*, 1077–1081, 1996.

Taylor, P. C. Serum vascular markers and vascular imaging in assessment of Rheumatoid Arthritis disease activity and response to therapy. *Rheumatology*, *44*, 721–728, 2005.

Taylor, P. C., A. M. Peters, E. M. Paleolog, P. T. Chapman, M. J. Elliott, E. R. McCloskey, M. Feldman & R. N. Maini. Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by Tumor Necrosis Factor $\alpha$ blockade in patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, *43*, 38–47, 2000.

Taylor, P. C. & B. Sivakumar. Hypoxia and angiogenesis in Rheumatoid Arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, *17*, 293–298, 2005. Review.

Taylor, P. C., A. Steuer, J. Gruber, D. O. Cosgrove, M. J. K. Blomley, P. A. Marster, C. L. Wagner, C. McClinton & R. N. Maini. Comparison of ultrasonographic assessment of synovitis and joint vascularity with radiographic evaluation in a randomized, placebo-controlled study of Infliximab therapy in early Rheumtoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, *50*, 107–1116, 2004. Research article.

Terslev, L., S. Torp-Pedersen, A. Savnik, P. von der Recke, E. Quistgaard, B. Danneskiold-Samsoe & H. Bliddal. Doppler ultrasound and magnetic resonance imaging of synovial inflammation of the hand in Rheumatoid Arthritis: a comparative study. *Arthritis Rheum*, *48(9)*, 243–241, 2003.

Walsh, D. A. Angiogenesis and arthritis. *Rheumatology*, *38*, 103–112, 1999. Review.

Weidekamm, C., M. Köller, M. Weber & F. Kainberger. Diagnostic value of high-resolution B-mode and Doppler sonography for imaging of hand and finger joints in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, *48*, 325–333, 2003.

# Abstracts

## Veröffentlichungen

### A new approach to studying angiogenesis in rheumatoid arthritis by means of power Doppler sonography and measurement of serum vascular endothelial growth factor

J. Strunk, E.Heinemann, G. Neeck, K.L. Schmidt, U. Lange. Rheumatology 2004; 43: 1480-1483

*Objective:* To evaluate angiogenesis as an essential component of pannus formation and cartilage destruction in rheumatoid arthritis (RA) using power Doppler ultrasound (PDUS) and serum vascular endothelial growth factor (VEGF) measurement. *Methods:* Twenty-one RA patients with a painful and swollen wrist and 12 healthy controls were examined with ultrasound. By means of standard scans, vascularity near and inside the joint capsule was visualized with PDUS. Two trained investigators performed sonography. Representative video clips were stored and read by two independent investigators, under blindes conditions, with regard to the microvascular Doppler flow being either inside or outside the joint capsule and with respect to a qualitative estimate of the intensity of blood flow, according to a grading from 1 to 3. Serum levels of VEGF were measured with a standard quantitative sandwich ELISA. *Results:* The power Doppler mode identified increased synovial microvascular blood flow inside the joint capsule in 17 of 21 RA patients (81%) vs one of the healthy controls. We found large variation in serum VEGF levels in RA patients an in the healthy controls. The degree of synovial vascularity determined by PDUS showed no correlation with the immediate serum VEGF level in the same patient. *Conclusion:* The high correlation between

intra-articular microvascular power Doppler flow and clinical synovitis in RA patients (P<0,0001) indicates that PDUS may be a helpful in studying the role of synovial blood vessels in rheumatoid arthritis.

**Anti-TNF- antibody Infliximab and glucocorticoids reduce serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with rheumatoid arthritis: a pilot study**

J. Strunk, E. Bundke, U. Lange. Rheumatology Int 2006; 26: 252 - 256

*Objective:* To compare the effect of oral glucocorticoid therapy with the effect of intravenous anti-TNF- therapy on serum VEGF levels of patients with rheumatoid arthritis. *Methods:* Five RA patients (5/8) who had no prior treatment with DMARDs or glucocorticoids (GC) were administered 20 mg prednisolone daily. Three patients who failed more than one DMARD therapy received infusion with Infliximab (200mg). VEGF-serum levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay before treatment and at day 10 or 13 during prednisolone therapy or 14 days after the first Infliximab infusion. *Results:* Serum VEGF levels in therapy naive RA patients (GC group) were higher than those in pretreated patients who received Infliximab (median serum VEGF level: 1106 pg/ml versus 320 pg/ml; p=0.1). Treatment with Infliximab as well as glucocorticoids decreased serum VEGF levels after 10 to 14 days in RA patients significantly (median serum VEGF level after treatment: GC group: 559 pg/ml, Infliximab group: 92 pg/ml; p=0.01 versus without treatment or preinfusion). *Conclusions:* Anti-TNF-antibody Infliximab as well as GC are able to decrease serum VEGF levels in patients with active RA. Whether therapeutic reduction of serum VEGF levels is associated with inhibition of angiogenesis, should be evaluated in future by imaging of synovial vasculature.

# Kongresse

## EULAR 2003

### Raised serum Vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with Rheumatoid Arthritis are associated with microvascular power Doppler flow in the synovial tissue

J. Strunk 1, E. Heinemann 1, K.L. Schmidt 1, U. Lange. Annals of the Rheumatic Disease 2003, 60 Suppl 1:516

*Background:* Angiogenesis is a feature of proliferative and destructive synovitis, which is thought to be driven by a combination of up-regulation of endothelial growth factors (f.e. VEGF) and down-regulation of inhibitors. Power Doppler sonography (PDS) is a useful method in the detection of low-velocity blood flow at the microvascular level. *Objectives:* To evaluate whether raised serum VEGF levels in patients with Rheumatoid Arthritis (RA) are associated with microvascular Power Doppler flow in the synovial tissue of a swollen and painful wrist. *Methods:* Concentrations of VEGF were measured by enzyme-linked immunosorbent assay in serum samples from 14 patients with Rheumatoid Arthritis who suffer from active arthritis of the wrist. In addition measurements were made in samples from 14 healthy controls. Ultrasound examination of the wrist was performed in both groups using a 7,5 MHz transducer (HP Image Point). Blood flow in the synovial tissue was visualized by Power Doppler mode and quantified by PW-Doppler in single microvessels. Moreover the doppler signals were graded on a scale of 1-4 as described by Newman. *Results:* Serum VEGF levels at presentation were elevated in patients with RA (mean $\pm SDlevel = 997 \pm 547 pg/ml$) in comparison with healthy controls (mean $\pm SD = 686 \pm 492 pg/ml$). In all of the RA patients power doppler signals in the synovial tissue of the wrist were detected and in non of the healthy controls. However we could not find a correlation between VEGF level and doppler sonographic grading. *Conclusion:* Power Doppler sonography is a useful method for the visualization of new blood vessel formation (angiogenesis) in patients with Rheumatoid Arthritis, which is confirmed in the present study by raised mean serum levels of the proangiogenic cytokine VEGF.

## EULAR 2004

### Evaluation of synovial angiogenesis by power Doppler sonography and serum Vascular Endothelial Growth Factor level measurement in Rheumatoid Arthritis

J. Strunk, E. Heinemann, K.L. Schmidt, U. Lange. Annals of the Rheumatic Disease 2004; 63(Suppl 1):465

*Background:* Joint destruction in Rheumatoid Arthritis is caused by hypervascularized pannus which invades cartilage and bone. Angiogenesis is recognized as a key event in the formation and maintenance of the pannus, which is regulated by a delicate balance of angiogenesis inducers, including vascular endothelial growth factor (VEGF), and different angiostatic agents. Technological improvements such as high resolution ultrasound and power Doppler mode make the discrimination between peri- and intra-articular blood flow along with the demonstration of synovial proliferation possible. *Objective:* We used power Doppler sonography to visualize intra-articular new blood vessel formation as a result of angiogenesis to evaluate a possible correlation with serum VEGF levels. *Methods:* 23 RA patients with a painful and swollen wrist and 10 healthy controls were examined by ultrasound. Using standard scans, vascularity near and inside the joint capsule was visualized by power Doppler sonography (PDS). Two trained investigators performed the sonography and found agreement with regard to the microvascular doppler flow as being either inside or outside the joint capsule and to a qualitative estimation of the intensity of the blood flow according a grading from 1 to 4. Serum levels of VEGF were measured using a standard quantitative sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Results:* Power Doppler mode identified increased synovial microvascular blood flow inside the joint capsule in 20 RA patients (87%), in comparison to in none of the healthy controls, - demonstrating a statistically significant correlation between intra-articular power Doppler flow and the diagnosis rheumatoid arthritis ($p<0{,}0001$). Qualitative Doppler sonographic estimation of the intensity of intra-articular synovial blood flow did not correlate with the actual serum VEGF level of the same patient. *Conclusion:* Power Doppler sonography is

a sensitive (87 % and specific (100 %) imaging modality to detect increased synovial microvascular blood flow in rheumatoid arthritis, which is a result of vasodilatation and new blood vessel formation (angiogenesis). Serum VEGF levels do not seem to reflect actual angiogenic activity in wrist arthritis of patients with rheumatoid arthritis.

**Anti-TNF-alpha antibody infliximab and glucocorticoid educe serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with rheumatoid arthritis**

J. Strunk, E. Heinemann, K.L. Schmidt, U. Lange. Annals of the Rheumatic Disease 2004; 63(Suppl 1):249

*Background:* Pannus growth in Rheumatoid Arthritis (RA) is critically dependent upon an accompanying neovascularisation. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent angiogenic promoter which stimulates migration and proliferation of endothelial cells and is thought to play a crucial role in synovial angiogenesis in rheumatoid arthritis (RA). Serum VEGF levels are elevated in RA patients, and therapy with the anti-TNF-alpha monoclonal antibody Infliximab reduce serum VEGF levels in these patients. *Objectives:* To compare the early effect of oral glucocorticoids (GC) with anti-TNF-alpha-therapy (Infliximab) on serum VEGF levels in patients with RA. *Methods:* Five RA patients (5/8) who had no prior treatment with DMARDs or glucocorticoids (GC) were administered 20 mg prednisolone daily. Three patients who failed more than one DMARD therapy received infusion with Infliximab (200 mg). VEGF-serum levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay before treatment and at day 10 or 13 during prednisolone therapy or 14 days after the first Infliximab infusion respectively. *Results:* Serum VEGF levels in therapy naive RA patients (GC group) were higher than those in pretreated patients who received Infliximab (median serum VEGF level: 1106 pg/ml versus 320 pg/ml; p = 0,09). Treatment with Infliximab as well as glucocorticoids significantly decreased serum VEGF levels after 10 to 14 days in RA patients (median serum VEGF level after treatment: GC group: 559 pg/ml, Infliximab group: 92 pg/ml; p = 0,01 versus without treatment or preinfusion). *Conclusion:* Treatment with oral

glucocorticoids leads to an early and drastic reduction of serum VEGF levels in therapy naive RA patients. TNF-alpha inhibition by Infliximab could reduce low serum VEGF levels in pretreated RA patients independent of the initial serum VEGF concentration. This is the first report comparing the effect of both therapies on serum VEGF levels, indicating a possible therapeutic inhibition of synovial angiogenesis in RA.

## 24. European Workshop for Rheumatology Research 2004, Berlin

### A new approach to studying angiogenesis in rheumatoid arthritis by means of power Doppler sonography and measurement of serum vascular endothelial growth factor

J.Strunk, E. Heinemann, U. Lange. Arthritis Research & Therapy 2004; 6(Suppl 1): 34 (103)

*Background:* Joint destruction in Rheumatoid Arthritis is caused by hypervascularized pannus which invades cartilage and bone. Angiogenesis is recognized as a key event in the formation and maintenance of the pannus, which is regulated by a delicate balance of angiogenesis inducers, including vascular endothelial growth factor (VEGF), and different angiostatic agents. Technological improvements such as high resolution ultrasound and power Doppler mode make the discrimination between peri- and intra-articular blood flow along with the demonstration of synovial proliferation possible. *Objective:* We used power Doppler sonography to visualize intra-articular new blood vessel formation as a result of angiogenesis to evaluate a possible correlation with serum VEGF levels. *Methods:* Vascularity near and inside the wrist of 23 RA patients and 12 healthy controls was visualized by power Doppler sonography. Microvascular Doppler flow was localized to either inside or outside the joint capsule, and estimated according to a grading from 1 to 4. Serum levels of VEGF were measured using a standard quantitative sandwich ELISA. *Results:* Power Doppler mode identified increased synovial microvascular blood flow inside the joint capsule in 20 RA patients (87%), in comparison to in none of the healthy controls ($p < 0{,}0001$). Although the median serum VEGF level in RA patients (653 pg/ml) was higher than

in healthy controls (638 pg/ml), qualitative Doppler sonographic estimation of the intensity of intra-articular synovial blood flow did not correlate with the actual serum VEGF level of the same patient. *Conclusion:*Power Doppler sonography is reliable imaging modality to detect increased intra-articular synovial microvascular blood flow as a result of vasodilatation and new blood vessel formation (angiogenesis) in acute arthritis of RA patients. A correlation with elevated serum VEGF levels indicates this method as a helpful tool to study the role of blood vessels n the rheumatoid inflammatory process.

**Anti-TNF-alpha antibody Infliximab and glucocorticoids reduce serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with rheumatoid arthritis - a pilot study**

J. Strunk, E. Bundke, U. Lange. Arthritis Research & Therapy 2004, 6 (Suppl 1): 94

*Background:* Pannus growth in Rheumatoid Arthritis (RA) is critically dependent upon an accompanying neovascularisation. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent angiogenic promoter which stimulates migration and proliferation of endothelial cells and is thought to play a crucial role in synovial angiogenesis in rheumatoid arthritis (RA). Serum VEGF levels are elevated in RA patients, and therapy with the anti-TNF-alpha monoclonal antibody Infliximab reduce serum VEGF levels in these patients. *Objective:* To compare the early effect of oral glucocorticoids (GC) with anti-TNF-alpha-therapy (Infliximab) on serum VEGF levels in patients with RA. *Methods:* Five RA patients (5/8) who had no prior treatment with DMARDs or glucocorticoids (GC) were administered 20 mg prednisolone daily. Three patients who failed more than one DMARD therapy received infusion with Infliximab (200 mg). VEGF-serum levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay before treatment and at day 10 or 13 during prednisolone therapy or 14 days after the first Infliximab infusion respectively. *Results:* Serum VEGF levels in therapy naive RA patients (GC group) were higher than those in pretreated patients who received Infliximab (median serum VEGF level: 1106 pg/ml versus 320 pg/ml; p = 0,09). Treatment with Infliximab as well as glucocorticoids significantly decreased serum VEGF levels

after 10 to 14 days in RA patients (median serum VEGF level after treatment: GC group: 559 pg/ml, Infliximab group: 92 pg/ml; p = 0,01 versus without treatment or preinfusion). *Conclusions:*Treatment with oral glucocorticoids leads to an early and drastic reduction of serum VEGF levels in therapy naive RA patients. TNF-alpha inhibition by Infliximab could reduce low serum VEGF levels in pretreated RA patients independent of the initial serum VEGF concentration. This is the first report comparing the effect of both therapies on serum VEGF levels, indicating a possible inhibition of synovial angiogenesis in RA.

# Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

# Danksagung

Mein erster Dank gilt an dieser Stelle meinen Eltern und meinem Mann. Ohne die Unterstützung meiner Eltern hätte ich nicht Medizin studiert und somit auch niemals diese Arbeit schreiben können. Mein Mann ist als Naturwissenschaftler zwar fachfremd, er war mir aber gerade deshalb ein guter Berater und Diskussionspartner während der gesamten Zeit, die ich mit dem Erstellen dieser Arbeit verbracht habe. Er war unermüdlich beim Beheben von Computerproblemen und Lesen der Arbeit. Dieser Dank gilt auch meiner Mutter, die von den ersten Zeilen an, die Arbeit mit germanistischem Scharfblick und Freude an der deutschen Sprache begleitet hat.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Johannes Strunk, der mir das Thema angeboten hat, mich in die Geheimnisse der Gelenksonographie eingeweiht und immer eine offene Tür und ein offenes Ohr für Gespräche hatte. Der Dank geht ebenso an meinen Dokotorvater, Herrn PD Dr. med. Uwe Lange, ohne den die Promotion nicht zustande gekommen wäre und der mich regelmäßig in meiner Arbeit anspornte.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Frau Christine Kendall, die für mich wesentlich bei Laborarbeiten zur Auswertung des VEGF unterstützte. Nicht weniger Dank geht an Frau Dipl. Math. Antje Brandstädt vom Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation des Klinikums der FSU Jena, die mich bei der Auswertung meiner Daten beraten und einen großen Anteil der statististischen Auswertung in ihrer Freizeit für mich erstellt hat. Statistische Hilfe habe ich zudem von Herrn Dr. W. Pabst der Arbeitsgruppe Statistik des Klinikums der JLU Gießen erhalten, dem ich an dieser Stelle ebenfalls dafür danken möchte.

Major Robert B. Wenzel, MC, Butzbach Health Clinic, thank you very

much for your advise and proofread of my summery.

Meine Familie und Freunde standen mir in der gesamten Zeit immer hilfreich und moralisch zur Seite. Eine solche Unterstützung tut sehr gut und ist nicht zu unterschätzen!

# Lebenslauf

| | |
|---|---|
| Name | Elisabeth Bundke, geb. Heinemann |
| Geburtsdatum | 05.03.1978 |
| Geburtsort | Jena |
| Familienstand | verheiratet |
| 1994–1995 | **Horton High School, Horton, KS, USA** High School Diploma |
| Juni 1997 | **Adolf–Reichwein–Gymnasium Jena** Abitur |
| September –Dezember 1997 | Rettungssanitäterausbildung, DRK Jena |
| 1998–2004 | **Justus Liebig Universität Gießen** Studium der Humanmedizin |
| März 2000 | Ärztliche Vorprüfung (Physikum) |
| März 2001 | Erstes Staatsexamen |
| September 2001–Februar 2002 | Auslandssemester an der **Rijksuniversiteit Groningen, NL** |
| August 2002– | **Kerckhoff–Klinik Bad Nauheim Abt. Rheumatologie Dissertation:** *Doppler-sonographische Darstellung synovialer Vaskularisierung bei gleichzeitiger Bestimmung des angiogenetischen Faktors VEGF - ein neues Modell zur Untersuchung der Angiogenese bei Rheumatoider Arthritis* |
| September 2003 | Zweites Staatsexamen |
| November 2004 | Drittes Staatsexamen |
| November 2005– | Assistenzärztin, Hochwaldkrankenhaus, Bad Nauheim |