



Christian
Doppler
Laboratory

for
Cardiac and Thoracic
Diagnosis & Regeneration



MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

Therapeutische Applikation von PBMC-Sekretomen im Modell der Collagen induzierten Arthritis

Hendrik Jan Ankersmit, Lucian Beer
Oktober 2011

Übersicht

- Hintergrund
- Pathophysiologie
- Zielsetzung
- Versuchsaufbau

Hintergrund

- Rheumatoide Arthritis (RA) = chronisch entzündliche Systemerkrankung mit Synovialitis, Arthritis, Bursitis und Tendovaginitis und extraartikulären Organmanifestationen
- Prävalenz: 1 %
- Erkrankungsgipfel zw. 55.-75. Lebensjahr

Hintergrund

➤ ACR Kriterien

1. Morgensteifheit(mind. 1 h)
2. Schwellung oder Erguss in mind. 3 Gelenken
3. Arthritis der Gelenke der Hand: MCP, PIP
4. Symmetrische Schwellung derselben Gelenke auf beiden Seiten des Körpers
5. Rheumaknoten
6. positiver Rheumafaktor
7. radiologische Veränderungen

Hintergrund

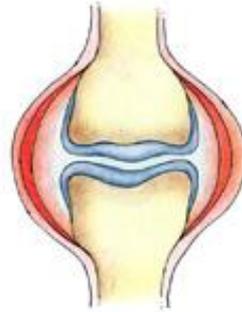
- Krankheitsverlauf schwer einschätzbar
- 50 % erleiden innerhalb der ersten 10 Jahre eine massive Funktionseinschränkung der betroffenen Gelenke
- bestimmte HLA-Antigen Typen mit erhöhtem Risiko für RA-Entwicklung

Sysmmons DP et al.; Best Pract Res Clin Rheumatol 2002,



Verlaufsform

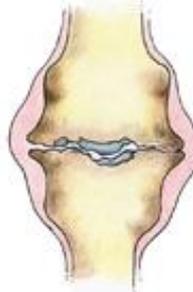
Die vier Stadien der rheumatoiden Arthritis



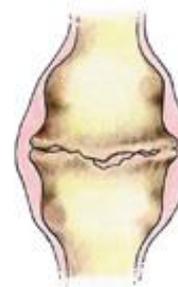
1. Gelenkentzündung
mit Flüssigkeitsansammlung
und Schwellung



2. Der Gelenkknorpel
beginnt sich aufzu-
lösen.

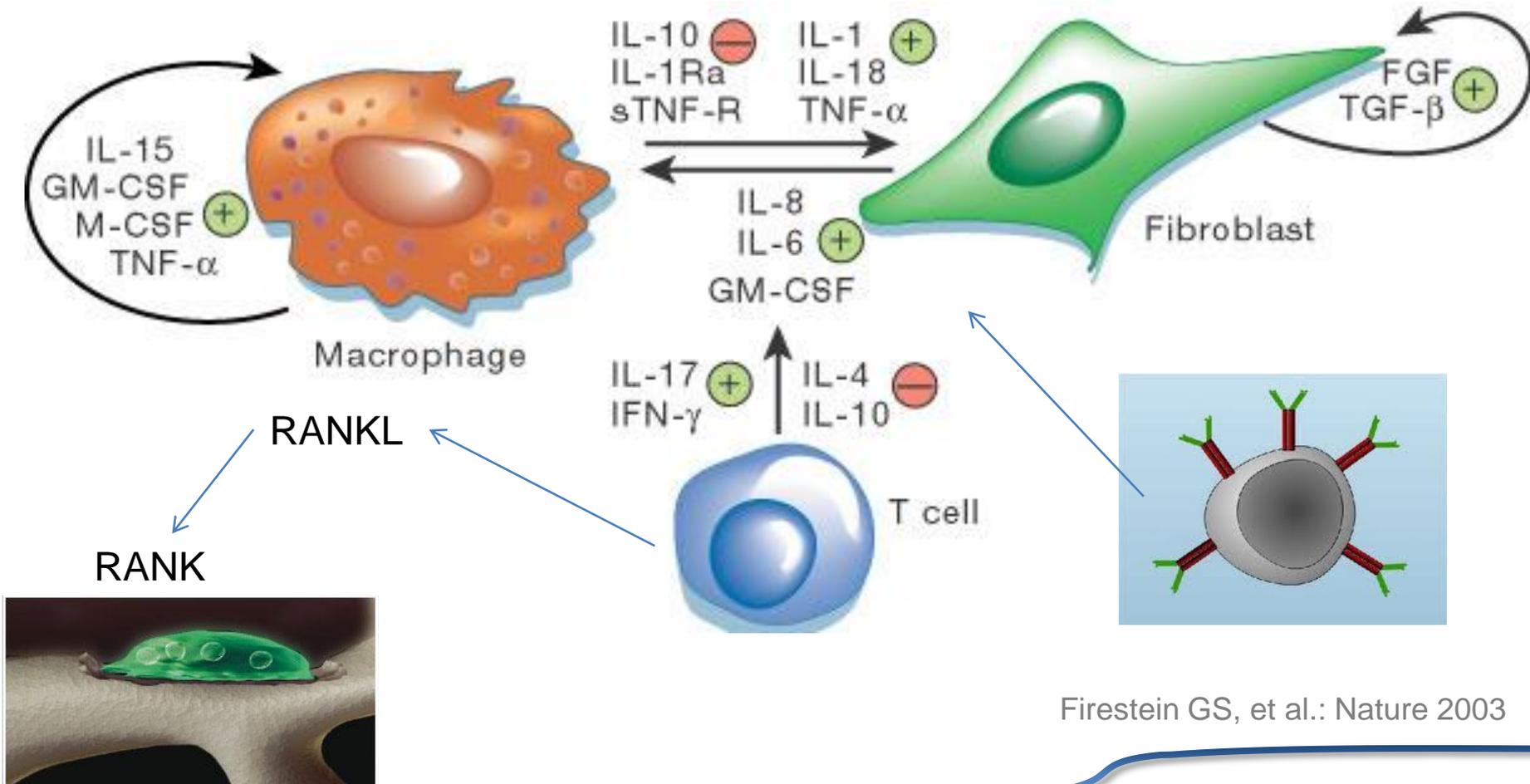


3. Weitgehend zerstörter
Gelenkknorpel und
beginnender Knochen-
umbau. Das Gelenk
wird instabil.



4. Fortgeschrittene
Gelenkszerstörung
und Versteifung
des Gelenks.

Pathophysiologie



Firestein GS, et al.: Nature 2003

Zielsetzung

- Verhinderung der Entwicklung / Progression der Collagen induzierten Arthritis im Mausmodell durch die Verabreichung des Sekretoms von apoptotischen weißen Blutkörperchen

Methode

- Collagen induzierte Arthritis (CIA)
- etabliertes Modell seit 1980
- gängigstes Arthritismodell
- Autoimmunarthritis durch Injektion von Typ-II- Collagen + Freund'schen Adjuvans
- 3-4 Wochen post Immunisierung sichtbar
- histopathomorphologisch ähnlich der humanen RA

Courtenay JS, Nature 1980

RA-Modelle

- Collagen-Ak-induzierte Arthritis
- Zymosan-induzierte Arthritis
- Antigen-induzierte Arthritis
- spontan Arthritiden in transgenen Mäusen
 - K/BxN Mäuse
 - TNF-alpha Überexprimierung
 - ...

Courtenay JS, Nature 1980

Methode



➤ CIA in DBA Mäuse

- sowohl T-Zell als auch B-Zell basierend
- robustes Modell
- preventive treatment
- semi-therapeutic treatment
- therapeutic treatment
- Verlauf je nach Literaturangabe zw. 40-70 Tage

Courtenay JS, Nature 1980

CIA

- Th1-Zell vermittelte Interferon- γ Produktion
- B-Zell vermittelte IgG2a
Antikörperproduktion
- Monozyten/Makrophagen und Granulozyten
- Timeline:
 - Tag 1: Immunisierung
 - Tag 21: Booster-Immunisierung

Boisser MC., Eur J Immunol 1995

Similarities and Differences between RA and CIA in DBA/1

- Polyarticular
- Joint pathology
- Hyperplasia of synovial membrane
- Synovial immune infiltration (Neutrophils)
- Pannus formation
- Bone destruction by osteoclasts
- Serological markers
- Anti-CII antibodies
- Anticyclic citrullinates peptide antibodies

- Symmetric joint involvement vs. nonsymmetric joint involvement
- chronisch vs. transient
- systemic vs. non systemic manifestations



Courtenay JS, Nature 1980

CIA

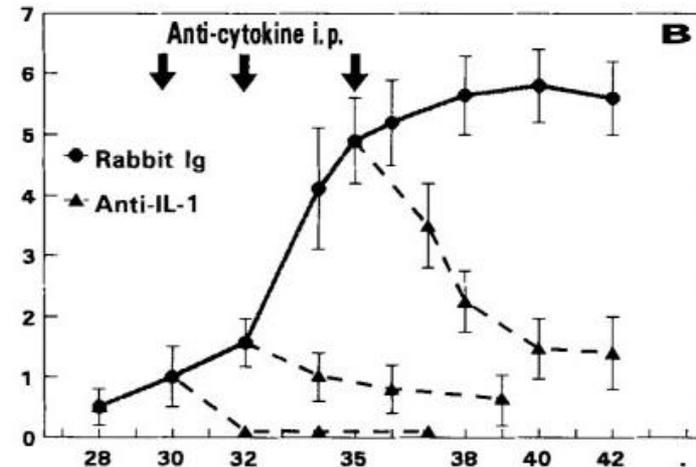
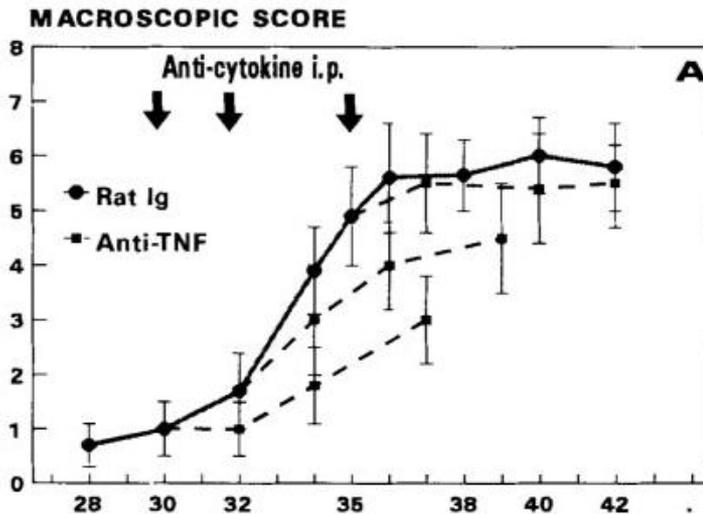
Subkutane Injektion

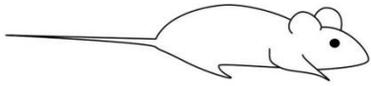


http://hookelabs.com/protocols/ciaInductionDBA1/ciaInduction_DBA1.html

Therapiezeitpunkte

- Joosten et al. zeigte 2008, dass eine „single Dose“ Therapie von Anti-TNF-alpha oder Anti-IL-1 oder IL-1Ra eine deutliche Symptomverbesserung hervorruft





Tag 1,3..11

Tag-1-7



Tag 25-30



Tag 35-41



Euthanisation

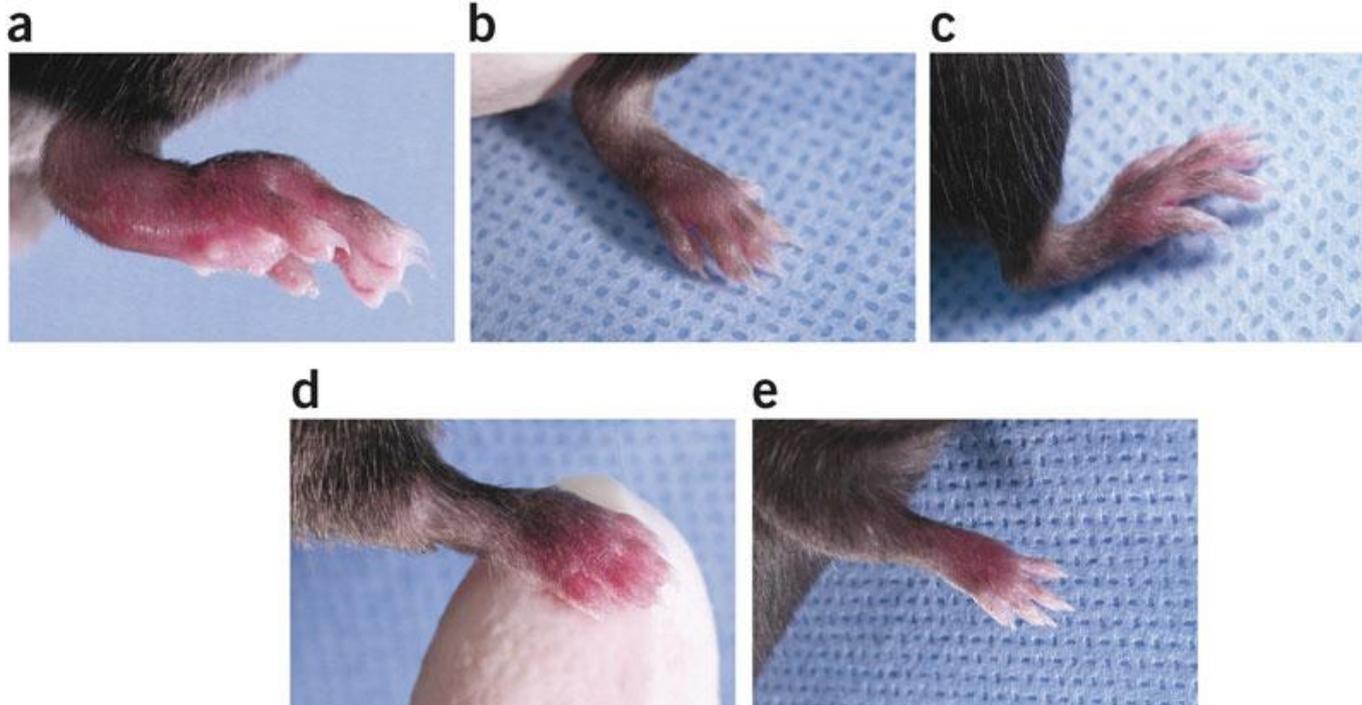


Timeline mit jeweiligen Therapiebeginn

Therapiebeginn mit Ausbruch der Krankheit als single dose

Auswertung

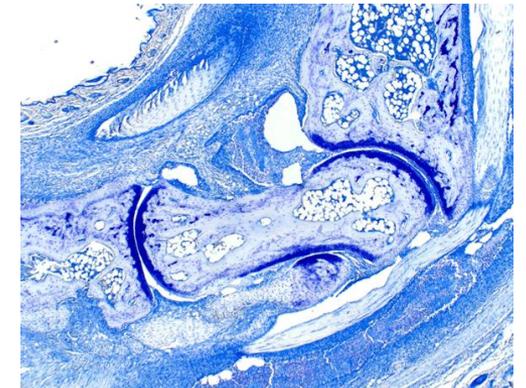
Arthritis Score



Dauids DB, et al. Nature Protocols 2007

Auswertung

- Histologie
 - H&E Färbung
 - TRAP-Färbung (Osteoklasten)
 - Toluidinblau-Färbung (Knorpel – Knochendestruktion)



Auswertung

➤ FACS:

- anti-CD3
- anti-CD4
- anti-CD8
- anti-CD11b (Makrophagen)
- anti-CD11c (Dendriten)
- anti CD44 (Memory T-cells)

Auswertung

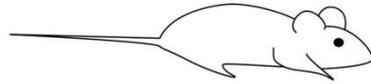
➤ Zellkultur:

- Stimulation mit anti-CD3 für 48 h
- oder Typ II Collagen für 72 h
- Thymidin-Einbau

Carrageenan induziertes „Pfotenödem“

- subkutane Injektion von 1% Carrageenan-Lösung die Hinterpfote
- akute Schwellung der Pfote
- Messung der Volumenzunahme (ml)
- Änderung der Volumenzunahme (Δ ml)





1h vor Immunisierung



1 h

2 h

3 h

4 h

5 h

6 h

24 h

Carrageenan induziertes Pfotenödem und die jeweiligen
Messzeitpunkte
Therapie: 1h vor Ödem-Induktion

*Vielen Dank für Ihre
Aufmerksamkeit!*