

DIPLOMARBEIT

„Die Effekte von Hyaluronidase auf Synovia-Zell-Analysen“

eingereicht von

Horst Winter

Mat.Nr.: 0433556

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Innere Medizin (UKIM),
Klin. Abt. f. Rheumatologie und Immunologie**

unter der Anleitung von

Prof. Dr. Hans-Peter Brezinschek

Graz, am _____

Winter Horst

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Anmerkung: Aufgrund des Textverständnisses und der Einfachheit wurde auf geschlechterspezifische Formulierungen verzichtet.

Graz, am _____

Unterschrift: _____
Winter Horst

VORWORT

Bei meiner Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Brezinschek im immunologischen Labor der rheumatologischen Abteilung des Universitätskrankenhauses Graz wurde ich von diesem gefragt, ob ich Interesse hätte, mit einem Laser-Scanning-Cytometer zu arbeiten. Nicht abgeneigt von dieser Vorstellung und mit guten Aussichten auf ein Diplomarbeitsthema begann ich mit der Geräteeinschulung und den Vorversuchen, wobei ich von Frau Irene Holzer tatkräftig unterstützt wurde. Im Rahmen dieser Arbeiten stieß ich aber auf einige Hindernisse und Unklarheiten, die trotz genauer Literaturrecherche nicht beseitigt werden konnten. Eine grundlegende Frage, wie man die Viskosität der Gelenksflüssigkeit verringert, konnte geklärt werden, nämlich mit Hyaluronidase. Jedoch gab und gibt es, nach meinem Wissensstand, keine Informationen bezüglich der Auswirkung dieser Hyaluronidasebehandlung auf die Zellen der Gelenksflüssigkeit, insbesondere der Leukozyten.

Somit kam ich zu meinem Diplomarbeitsthema, „Die Effekte von Hyaluronidase auf Synovia-Zell-Analysen“.

DANKSAGUNGEN

Zu aller erst möchte ich mich bei meinem Mentor und Diplomarbeitsbetreuer, *Univ. Prof. Dr. Hans-Peter Brezinschek*, ganz herzlich bedanken. Er ist mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden und hat dafür gesorgt, dass unser Arbeitsverhältnis mehr ein kollegiales als hierarchisches war. Darüber hinaus hat er Sorge getragen, dass ich vollwertig in das Arbeitsteam des immunologischen Labors integriert wurde. Auch Weiterbildung auf dem Sektor Immunologie und Rheumatologie war ihm sehr wichtig und ich wurde so oft es ging ermutigt, Seminaren und Fortbildungen beizuwohnen, wofür ich ihm sehr dankbar bin.

Weiters möchte ich mich beim gesamten Arbeitsteam des immunologischen Labors bedanken, ganz besonders aber bei *BA. Karin Gründl* und *BA. Irene Holzer*, die mir die grundlegenden Laborfertigkeiten angelernt haben und mir ein reibungsloses Arbeiten, auch während der Standardarbeitszeiten, ermöglichten.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meiner Familie, besonders meinen Eltern **Peter** und **Ute Winter**, und meiner Freundin **Anna Sgouridis**, die mich in dieser finalen Phase meines Studiums mit all ihrer Kraft unterstützt haben und etwaige Spannungen abgepuffert haben, damit ich mein Ziel, so kurz vor dem Ende, nicht aus den Augen verliere.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Effekte von Hyaluronidase auf Synovia-Zell-Analysen

Hintergrund: Die Gelenksflüssigkeit(GF)-Analyse ist einer der wichtigsten Labortests um Gelenkserkrankungen zu differenzieren. Gesamtzellzahl (GZZ) und Differentialzellzählung (DZZ) werden verwendet um zwischen entzündlichem und nicht-entzündlichem Geschehen zu unterscheiden. Mit Hilfe eines Polarisationsmikroskops können Kristalle typisiert werden, wobei es sich im Wesentlichen um Urat- (Gicht) oder Kalziumpyrophosphatkristalle (Pseudogicht) handelt. Die Beimengung von Hyaluronidase (HY) setzt die Viskosität herab und vereinfacht dadurch die Handhabung.

Zielsetzung: Das Ziel der Arbeit war herauszufinden, auf welche Weise HY Auswirkungen auf Synovia-Zell-Analysen hat.

Methodik: Zehn GF-Proben wurden untersucht, wobei folgende Parameter gemessen worden sind: GZZ und DZZ wurden mit Hilfe eines automatischen Zellzählers bestimmt. Viabilität und Apoptose von GF-Lymphozyten sind nach einer FITC-Annexin-V und 7-AAD Färbung durch ein FACS Canto II Durchflusszytometer analysiert worden. Nach der Gelenkspunktion (GP) wurde die GF für weitere Analysen in 3 Fraktionen aufgeteilt. Ein Teil wurde unmittelbar nach der GP analysiert und fungierte als Kontrolle. Danach wurde HY des Typs I-S (Sigma-Aldrich. 439U/mg) in aliquoten Teilen (0,5mg/ml) beigemischt und für 15, 30 oder 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Der zweite Teil wurde in 2 mit EDTA beschichteten 5ml Röhren gefüllt und für 24h bei Raumtemperatur (RT) oder bei 4°C gelagert. Nach der Inkubation wurden diese Proben nach dem gleichen Schema wie der erste GF-Teil analysiert. Der dritte Teil wurde sofort mit HY vermengt, bei RT oder 4°C für 24h gelagert und danach analysiert.

Ergebnisse: Die Beigabe von HY zu GF bei einer Inkubationszeit (IZ) von 15 Minuten führt zu einem geringen Anstieg der GZZ ($104,59\% \pm 3,87$). Nach 60 Minuten aber ergibt sich eine Abnahme auf $90,28\% \pm 5,23$ im Vergleich zur Kontrolle. Die 24h Lagerung von GF ohne HY reduziert die GZZ um 24,43% bei RT und um 12,53% bei 4°C, wobei die Veränderungen statistisch nicht signifikant sind. Abweichungen in der Zahl der

Granulozyten und Monozyten folgen dem Muster der GZZ. Die Anzahl der Lymphozyten bleibt während der ganzen Inkubationsdauer über dem Ausgangsniveau. Die Viabilität der Lymphozyten wird weder durch die Behandlung mit HY, noch durch IZ bis zu 60 Minuten beeinflusst ($94,14\% \pm 1,34$ versus $93,69\% \pm 1,71$). Eine Lagerung über 24h führt jedoch zu einer signifikanten Abnahme ($p \leq 0.03$), die bei RT-Lagerung stärker ausfällt (RT bis $73,17\% \pm 7,01$; 4°C bis $79,43\% \pm 5,02$). Interessanterweise hat die Zugabe von HY keinen bedeutsamen Effekt auf dieses Phänomen.

Schlussfolgerung: Die Behandlung von GF mit HY führt zu keiner relevanten Verbesserung der Messparameter. Zwar steigt die GZZ an, jedoch zu gering um einen Vorteil zu erzeugen. Dagegen ist die Zubereitung von HY teuer und zeitintensiv, da sie immer frisch in Lösung gebracht werden muss (Lagerung bei -10°C als Pulver). Die effizienteste Form GF auszuforschen ist, wie allgemein bekannt, die sofortige Analyse nach der GP. Falls dies nicht möglich ist, sollte eine Lagerung in einem EDTA-beschichteten Röhrchen bei 4°C angestrebt werden.

Schlüsselwörter: Synovia-Zell-Analysen, Durchflusszytometer, Lagerung, HY, EDTA

ABSTRACT

The effects of hyaluronidase on synovial fluid cell analysis

Background: Synovial fluid analysis represents one of the most important laboratory tests for the evaluation of joint diseases. Total cell count (TCC) and differential cell count (DCC) are used to discriminate between non-inflammatory and inflammatory conditions. Crystal analysis under a polarizing-light microscope reveals the presence of monosodium urate crystals (gout) or calcium pyrophosphate dehydrate crystals (pseudogout). The addition of hyaluronidase (HY) can reduce viscosity and should simplify the handling.

Objectives: The aim of the study was to evaluate the effects of HY on the outcome of synovial fluid cell analysis.

Methods: Ten synovial fluid (SF) samples were evaluated and the following parameters were determined: TCC and DCC using an automatic cell counter. Viability and apoptosis of SF leucocytes were measured by FITC-Annexin-V and 7-AAD staining analyzed by flow cytometry on a FACS Canto II. After arthrocentesis SF was divided into 3 parts for further analyses. One part of the sample was measured immediately and served as control. HY Type I-S (Sigma-Aldrich, 439U/mg) was added to aliquots of this SF (0.5mg/ml) and incubated for 15, 30 and 60 minutes at 37°C. The second part of SF was transferred to 2 EDTA tubes and stored for 24h at room temperature (RT) or 4°C, respectively. After incubation the samples were treated with HY in the same way as indicated above. The third fraction of the SF was immediately mixed with HY, stored for 24h at RT or 4°C and measured thereafter.

Results: Addition of HY to the SF for 15 minutes leads to a minimal rise in the mean % \pm SE of TCC (104.59% \pm 3.87). After 60 minutes of incubation there is a decrease to 90.28% \pm 5.23 of the control value. Storage of SF without HY for 24h reduced the TCC by 24.43% at RT and by 12.53% at 4°C. The changes were not statistically significant. Alteration in the number of granulocytes and monocytes followed the TCC. The number of lymphocytes was elevated over the whole incubation period. The viability of SF lymphocytes was neither influenced by the treatment with HY nor the incubation time up to 60 minutes

(94.14 % \pm 1.34 versus 93.69% \pm 1.71, respectively). In contrast, storage for 24h was associated with a significant decrease ($p \leq 0.03$) in viable cells especially at RT (at RT 73.17% \pm 7.01 of control value; at 4°C to 79.43% \pm 5.02). Interestingly, addition of HY to these samples had no positive effect.

Conclusion: Treatment of SF with HY does not improve the outcome of the analysis. The raise of the TCC is minimal and therefore irrelevant. Furthermore, the preparation of HY is expansive and time consuming, because it has to be prepared fresh. As already known, the most efficient way to analyze SF is the measurement immediately after arthrocentesis. If this is not possible, samples should be stored in an EDTA tube at 4°C.

Keywords: synovial fluid cell analysis, flow cytometer, storage, hyaluronidase, EDTA

INHALTSVERZEICHNIS

VORWORT.....	II
DANKSAGUNGEN	III
ZUSAMMENFASSUNG	IV
ABSTRACT.....	VI
INHALTSVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGEN	XII
GLOSSAR.....	XV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XVII
TABELLENVERZEICHNIS	XVIII
EINLEITUNG.....	19
1. Arthrozentese	19
1.1. Allgemein.....	19
1.2. Indikationen	19
1.2.1. Diagnostische GP	19
1.2.2. Therapeutische GP	20
1.3. Kontraindikationen	20
1.3.1. Absolute Kontraindikationen	20
1.3.2. Relative Kontraindikationen	20
1.4. Vorbereitung	21
1.4.1. Patienteneinverständniserklärung	21
1.4.2. Räumliche Anforderungen	21
1.4.3. Personelle (ärztliche) Anforderungen	21
1.4.4. Patientenvorbereitung	22
1.4.5. Material	22
1.5. Durchführung am Beispiel der Kniepunktion	24
1.5.1. Material	24
1.5.2. Laterale suprapatellare Punktion	24
1.5.3. Laterale infrapatellare Punktion	26
2. Synovia	28
2.1. Allgemein.....	28
2.2. Zusammensetzung	29
2.2.1. Normalwerte der Synovia des Kniegelenks	30

2.3. Aufgaben.....	30
2.4. Beurteilung.....	31
2.4.1. Makroskopisch	31
1. Viskosität	31
2. Farbe und Klarheit	31
3. Volumen.....	32
2.4.2. Mikroskopisch	32
1. Zellzahl und Differenzialzellzählung	32
2. Kristalle.....	33
2.4.3. Bakteriologisch.....	35
2.4.4. Biochemisch	35
2.5. Durchführung	36
2.5.1. Viskosität.....	37
2.5.2. Farbe und Klarheit	37
2.5.3. Zellzahl.....	38
2.5.4. Differentialzellzahl	38
2.5.5. Kristalle	39
2.5.6. Bakteriologisch.....	39
2.5.7. Biochemisch	40
3. Hyaluronsäure	41
3.1. Allgemein.....	41
3.2. Biochemisch.....	41
3.3. Biosynthese	42
3.4. Vorkommen	42
3.5. Gewinnung	43
3.6. Anwendung	43
4. Hyaluronidase	44
4.1. Allgemein.....	44
4.2. Wirkung	44
4.3. Herstellung und Lagerung.....	45
4.4. Verwendung	45
4.5. Interaktionen	45
PATIENTEN	46
Probenkollektiv	46
METHODEN	47
1. Übersicht.....	47
1.1. GZZ und DZZ	47
1.2. Viabilität und Apoptose.....	47
1.3. Farbe, Klarheit und Viskosität	47
2. Probenbearbeitung.....	48
2.1. Vorbereitung	48
2.1.1. Hyaluronidase-Worksolution (HY-WS)	48
2.1.2. "Binding-Buffer"-Worksolution (BB-WS).....	48
2.2. Durchführung	49
2.2.1. Erste Fraktion	49
2.2.2. Zweite Fraktion	51
2.2.3. Dritte Fraktion	51
3. Färbemethoden.....	52

3.1. FITC-Annexin-V Färbung (38).....	52
3.1.1. Allgemein.....	52
3.1.2. Funktionsprinzip.....	52
3.1.3. Verwendung.....	54
3.1.4. Lagerung.....	54
3.1.5. Färbung.....	54
3.2. 7-AAD Färbung (39).....	54
3.2.1. Allgemein.....	54
3.2.2. Färbung.....	55
3.2.3. Zubereitung.....	55
3.2.4. Lagerung.....	55
3.2.5. Sicherheitshinweise.....	55
4. Messmethoden.....	56
4.1. Durchflusszytometer.....	56
4.1.1. Allgemein.....	56
4.1.2. Färbung (42).....	56
4.1.4. Auswahl eines Fluorochroms (42).....	57
4.1.3. Funktionsprinzip (42, 44).....	57
4.2. Automatischer Zellanalysator (45).....	59
4.2.1. Allgemein.....	59
4.2.2. Zellzähler („cell counter“).....	59

ERGEBNISSE 60

1. Gesamt-Leukozytenzahl.....	60
1.1. 0h - Lagerung.....	60
1.2. 24h - Lagerung bei RT.....	60
1.3. 24h - Lagerung bei 4°C.....	61
1.4. 24h - HY bei RT.....	61
1.5. 24h - HY bei 4°C.....	61
2. Granulozytenzahl.....	62
2.1. 0h - Lagerung.....	62
2.2. 24h - Lagerung bei RT.....	62
2.3. 24h - Lagerung bei 4°C.....	63
2.4. 24h - HY bei RT.....	63
2.5. 24h - HY bei 4°C.....	63
3. Monozytenzahl.....	64
3.1. 0h - Lagerung.....	64
3.2. 24h - Lagerung bei RT.....	64
3.3. 24h - Lagerung bei 4°C.....	65
3.4. 24h - HY bei RT.....	65
3.5. 24h - HY bei 4°C.....	65
4. Lymphozyten.....	66
4.1. Zellzahl.....	66
4.1.1. 0h - Lagerung.....	66
4.1.2. 24h - Lagerung bei RT.....	66
4.1.3. 24h - Lagerung bei 4°C.....	67
4.1.4. 24h - HY bei RT.....	67
4.1.5. 24h - HY bei 4°C.....	67
4.2. Viabilität.....	68
4.2.1. 0h - Lagerung.....	68

4.2.2. 24h - Lagerung bei RT	68
4.2.3. 24h - Lagerung bei 4°C	69
4.2.4. 24h - HY bei RT	69
4.2.5. 24h - HY bei 4°C	69
4.3. Apoptose	70
4.3.1. 0h - Lagerung	70
4.3.2. 24h - Lagerung bei RT	70
4.3.3. 24h - Lagerung bei 4°C	71
4.3.4. 24h - HY bei RT	71
4.3.5. 24h - HY bei 4°C	71
4.4. Nekrose	72
4.4.1. 0h - Lagerung	72
4.4.2. 24h - Lagerung bei RT	72
4.4.3. 24h - Lagerung bei 4°C	73
4.4.4. 24h - HY bei RT	73
4.4.5. 24h - HY bei 4°C	73
DISKUSSION	74
1. Allgemein	74
2. GZZ	75
3. Lymphozyten	76
4. DZZ	77
5. Conclusio	78
LITERATURVERZEICHNIS	79
ANHANG.....	82
Probenkennung	82
Probenbearbeitungsschritte.....	83
Zellzählungsauswertungsblatt.....	84
Durchflusszytometerauswertungsblatt	84
Durchflusszytometerauswertungsblatt	85
LEBENS LAUF	86

ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
0,25h	eine viertel Stunde; 15 Minuten
0,5h	eine halbe Stunde; 30 Minuten
1h	ein Stunde; 60 Minuten
2/7	zwei Siebtel
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
Abb.	Abbildung
Ak.	Antikörper
BB	binding buffer; <u>deutsch</u> : Bindungspuffer
Bsp.	Beispiel
ca.	circa; <u>deutsch</u> : ungefähr
CAVE	Wichtiger Hinweis; <u>latein</u> : hüte dich
CPPD	calcium pyrophosphate dehydrate crystal(s); <u>deutsch</u> : Kalziumpyrophosphatdihydratkristall(e)
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DCC (= DZZ)	differential cell count
DZZ (= DCC)	Differentialzellzählung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat; <u>deutsch</u> : Ethylendiamintetraessigsäure
etc.	et cetera; <u>deutsch</u> : und so weiter
FACS	fluorescence activated cell sorting; <u>deutsch</u> : fluoreszenzgesteuerte Zellsortierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
g	Gramm
G	Gauge
GE	Gelenkserguss
GF (= SF)	Gelenksflüssigkeit(en)
GP	Gelenkspunktion(en)
GZZ (= TCC)	Gesamtzellzahl
h	Stunde(n)
HA	Hyaluronsäure bzw. Hyaluronan

HY	Hyaluronidase bzw. hyaluronidase
HY-WS	Hyaluronidase Worksolution / Arbeitslösung
IZ	Inkubationszeit(en)
K	Kühlung = 4°C
k	Kilo; <u>griechisch</u> : χίλιοι (chílii), <u>deutsch</u> : tausend
KI	Kontraindikation(en)
LA	Lymphozyten-Apoptose
LF	Lagerform
LN	Lymphozyten-Nekrose
LT	Lagertemperatur
LV	Lymphozyten-Viabilität
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MPQ	Muzinpräzipitationsqualität
MPT	Muizinpräzipitationstest
MSU	monosodium urate crystal(s); <u>deutsch</u> : Mononatriumuratkristall(e)
NMH	niedermolekulares (fraktioniertes) Heparin
od.	oder
OSG	oberes Sprunggelenk
p	probability; <u>deutsch</u> : Wahrscheinlichkeit
PBS	phosphate buffered saline; <u>deutsch</u> : phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction; <u>deutsch</u> : Polymerasekettenreaktion
PI	propidium iodine; <u>deutsch</u> : Propidium-Jod
RA	rheumatoide Arthritis
rpm	rounds per minute; <u>deutsch</u> : Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SE	standard error; <u>deutsch</u> : Standardfehler
SF (= GF)	synovial fluid(s)
SLE	systemischer Lupus erythematoses
sog.	so genannt
SPA	Spondylarthritiden

SY-HY	Synovia-Hyaluronidase
SY-N	Synovia nativ (Synovia + PBS im Verhältnis 1:1)
SY-WS	Synovia Worksolution (Synovia + HY-WS im Verhältnis 1:1)
SY-WS ₁₅	SY-WS inkubiert für 15 Minuten bei 37°C
SY-WS _{24K}	SY-WS inkubiert für 24 Stunden bei 4°C
SY-WS _{24RT}	SY-WS inkubiert für 24 Stunden bei Raumtemperatur
SY-WS ₃₀	SY-WS inkubiert für 30 Minuten bei 37°C
SY-WS ₆₀	SY-WS inkubiert für 60 Minuten bei 37°C
SY _{24K}	SY-N gelagert für 24 Stunden bei 4°C in einem 3ml Vacuette® EDTA-Röhrchen
SY _{24K} -WS	SY _{24K} + HY-WS
SY _{24K} -WS ₁₅	SY _{24K} -WS inkubiert für 15 Minuten bei 37°C
SY _{24K} -WS ₃₀	SY _{24K} -WS inkubiert für 30 Minuten bei 37°C
SY _{24K} -WS ₆₀	SY _{24K} -WS inkubiert für 60 Minuten bei 37°C
SY _{24RT}	SY-N gelagert für 24 Stunden bei RT in einem 3ml Vacuette® EDTA-Röhrchen
SY _{24RT} -WS	SY _{24RT} + HY-WS
SY _{24RT} -WS ₁₅	SY _{24RT} -WS inkubiert für 15 Minuten bei 37°C
SY _{24RT} -WS ₃₀	SY _{24RT} -WS inkubiert für 30 Minuten bei 37°C
SY _{24RT} -WS ₆₀	SY _{24RT} -WS inkubiert für 60 Minuten bei 37°C
Tab.	Tabelle
TCC (= GZZ)	total cell count
Th.	Therapie
TNC	total nucleated cells; <u>deutsch</u> : gesamte kernhaltige Zellen
U	unit; <u>deutsch</u> : Einheit
u.a.	unter anderem
UFH	unfraktioniertes Heparin
usw.	und so weiter
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

GLOSSAR

- Coulter Prinzip** Ein optisches Partikelzählverfahren, das auf der Basis der Störung eines elektrischen Feldes arbeitet.
- Dalton (Da)** „Das Dalton ist ein Synonym für die atomare Masseneinheit (u) – festgelegt auf genau 1/12 der Masse des Kohlenstoff-Isotops ^{12}C und entspricht damit annähernd der Masse des Wasserstoff-Isotops ^1H (1,00794 u).“ (1)
- Debris** Fragmente toter (Körper)Zellen
- Gauge (G)** „Die Einheit G steht für den Außendurchmesser einer Kanüle. Je höher der Gauge-Wert ist, desto geringer ist der Außendurchmesser der Kanüle. Die Einheit ist dabei der amerikanischen Einheit für Drähte entlehnt, wo Gauge-Wertes der Anzahl der Arbeitsgänge entspricht, d. h. je häufiger ein Draht durch eine Drahtziehmaschine läuft. Dadurch wird er dünner, der Gauge-Wert aber größer.“ (2)
- Koagulopathien** Sind angeborene oder erworbene Störungen der (plasmatischen) Blutgerinnung oder der Fibrinolyse (3).
- Milwaukee-Schulter** Chronisch-rezidivierende Periarthritis des Schultergelenks, ausgehend von Hydroxylapatitkristallablagerungen; zählt zu den destruktiven Arthropathien.
- Neoplasie** Bezeichnet die Neubildung von Körpergeweben; damit kann sowohl die physiologische Regeneration eines Gewebes, als auch die autonome, pathologische Gewebeerneuerung eines Tumors gemeint sein (4).
- Rhagozyten** Neutrophile Granulozyten mit mikroskopisch nachweisbaren Zytoplasmaeinschlüssen; gehäuft bei SLE, RA, SPA, etc.

villonoduläre Synovitis	„Seltene Form einer Gelenksentzündung, bei der es zu ausgedehnten Wucherungen der Gelenksinnenhaut kommt.“ Therapie ist die Synovektomie (5).
viskoelastische Flüssigkeit	„Die Viskoelastizität ist durch ein teilweise elastisches, teilweise viskoses Verhalten geprägt. Die Flüssigkeit relaxiert nach Entfernen der externen Kraft nur unvollständig, die verbleibende Energie wird in Form von Fließvorgängen (Retardation) abgebaut.“ (6)
vortexen	Das Wort stammt aus dem lateinischen Wort für Strudel, Wirbel und bezeichnet das Vermischen von zwei Substanzen in einem Röhrchen mittels Vibration.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Equipment für eine Gelenkspunktion bzw. –injektion (12).....	23
Abb. 2: Laterale suprapatellare Kniepunktion (12)	24
Abb. 3: Laterale infrapatellare Gelenksinjektion (12)	26
Abb. 4: Die synoviale Membran an der Innenseite der Kniegelenkscapsel (13)	28
Abb. 5: Mononatriumuratkristalle (17)	33
Abb. 6: Kalziumpyrophosphatdihydratkristalle (17)	34
Abb. 7: MSU-Kristalle und ein Cholesterinkristall (Mitte des Bildes) (17)	34
Abb. 8: Synovia-Untersuchungsalgorithmus (15)	36
Abb. 9: Viskositätstestung mittels Fadentest (17)	37
Abb. 10: Klarheits- und Farbtstung nativer Synovia (17)	37
Abb. 11: Zählkammer der Firma Neubauer [®]	38
Abb. 12: Objektträger zur DZZ (Testsimplets [®]) der Firma Waldeck.....	38
Abb. 13: CPPD + Kalziumoxalatkristall (Mitte des Bildes) (17).....	39
Abb. 14: Kokkenartige Bakterien in einer Gramfärbung (17)	39
Abb. 15: Hyaluronsäure – Disaccharidbaustein (20).....	42
Abb. 16: Hyaluronidase des Schafs (24).....	44
Abb. 17: Hyaluronidase der Firma SIGMA ALDRICH (Typ I-S).....	45
Abb. 18: 5ml Falcon [®] Facs-Röhrchen, 3ml Vacuette [®] -Röhrchen,.....	47
Abb. 19: Filter-Spritzen-Kombination.....	48
Abb. 20: Coulter A ^C T 5diff AL [®] -Zellzählgerät.....	49
Abb. 21: Bild der BD FACS Canto II Einheit (40)	50
Abb. 22: Zellmembranveränderung als Annexin-V Bindungsstelle (41)	52
Abb. 23: FITC-Annexin-V	53
Abb. 24: Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers (42).....	58
Abb. 25: Veränderungen der Anzahl der Leukozyten	60
Abb. 26: Veränderungen der Anzahl der Granulozyten	62
Abb. 27: Veränderungen der Anzahl der Monozyten	64
Abb. 28: Veränderungen der Anzahl der Lymphozyten	66
Abb. 29: Veränderungen der Anzahl der viablen Lymphozyten.....	68
Abb. 30: Veränderungen der Anzahl der apoptotischen Lymphozyten.....	70
Abb. 31: Veränderungen der Anzahl der nicht-viablen Lymphozyten.....	72

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Gelenksergussätiologie.....	19
Tab. 2: Einteilung eines Gelenksergusses (15).....	31
Tab. 3: Hyaluronsäurekonzentrationen (22).....	42
Tab. 4: Allgemeine Probandaten	46
Tab. 5: Spezielle Probandaten	46
Tab. 6: Leukozyten - Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts.....	61
Tab. 7: Granulozyten - Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts.....	63
Tab. 8: Monozyten - Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts	65
Tab. 9: Lymphozyten - Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts	67
Tab. 10: Viabilität - Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts	69
Tab. 11: Apoptose - Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts	71
Tab. 12: Nicht-Viabel - Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts.....	73

EINLEITUNG

1. Arthrozentese

1.1. Allgemein

Eine Gelenkspunktion (GP) wird durchgeführt, um die Ursache einer akuten mit Gelenkserguss (GE) assoziierten Arthropathie festzustellen (7), sofern weniger invasive Verfahren keine eindeutige Diagnosestellung ermöglicht haben (8). Darüber hinaus dient sie der Schmerzlinderung und Druckentlastung.

Da es sich um ein invasives Verfahren handelt, muss die Punktion unter streng aseptischen Kautelen erfolgen und es wird ein schriftliches Einverständnis des Patienten vorausgesetzt. Deshalb wurden Regeln und Leitlinien erarbeitet, die eine strenge Indikationsstellung erfordern und auch in der Rechtssprechung Eingang gefunden haben. Man kann auch Therapeutika in ein Gelenk applizieren, wobei man diesen Vorgang nicht als Punktion, sondern als intraartikuläre Injektion bezeichnet (9).

1.2. Indikationen

Gelenkspunktionen können in diagnostische und therapeutische aufgeteilt werden.

1.2.1. Diagnostische GP

Bei unklaren Gelenkspathologien versucht man mit Hilfe einer Gelenksflüssigkeitsanalyse die Ätiologie zu klären (siehe Tab. 1 bzw. Tab. 2). Eine Nicht-Gonokokkenarthritis ist eine Pflichtdiagnosestellung, da eine verspätete Feststellung oder Behandlung zu klinisch signifikanten Gelenksschäden und sogar zum Tod führen kann. Andere infektiöse Ursachen können Gonokokken-, Borrelien-, Tuberkulose- oder Pilzinfektionen sein. Kristallarthropathien (Gicht und Pseudogicht), rheumatoide Arthritis (RA), Arthrosen, Traumen und hämorrhagische Ergüsse können ebenfalls zu Gelenksirritationen führen (7).

Gelenkserguss					
<i>Entzündlich</i>				<i>nicht-entzündlich</i>	
rheumatisch	infektiös	degenerativ	kristallbedingt	serös	blutig
(Klasse 2)	(Klasse 3)	(Klasse 2)	(Klasse 2)	(Klasse 1)	(Klasse 4)

Tab. 1: Gelenksergussätiologie

1.2.2. Therapeutische GP

Bei bereits bekannter Ursache einer Gelenkserkrankung dient die Punktion:

- der Druckentlastung bei sehr großen Ergüssen, um eine Überdehnung der periartikulären Strukturen zu vermeiden (8),
- der Schmerzlinderung (9, 10),
- der Applikation von Medikamenten (z.B. Glukokortikoiden, Analgetika, Lokalanästhetika, Hyaluronsäure, etc.) (9, 10).

1.3. Kontraindikationen

1.3.1. Absolute Kontraindikationen

- Infektion der zum Gelenk gehörenden Extremität (z.B. Erysipel) (10)
- Hautveränderungen im Punktionsgebiet, von denen angenommen werden muss, dass sie keimbesiedelt sind, wie psoriatische Herde oder Ekzeme (11)
- Allgemeininfektion mit möglicher hämatologischer Streuung
- Zeitlich unmittelbar folgender operativer Eingriff am selben Gelenk (10)
- Koagulopathien und antikoagulative Therapien werden eigentlich als relative KI angesehen: Niedermolekulares Heparin (NMH) sollte auf jeden Fall 12h und unfraktioniertes Heparin (UFH) 2h vor der GP abgesetzt werden. Bei Aspirin und Clopidogrel fehlen diesbezüglich klinische Studien, weshalb man ein Absetzen nicht fordern kann (11). Da die Sicherheit von GP für Patienten mit Koagulopathien oder antikoagulativer Therapie nicht gewährleistet werden kann, sollte in diesen Fällen eine Intervention, wie das Absetzen der antikoagulativen Therapie oder das Verwenden von Thrombozytenkonzentraten, für jeden Patienten extra evaluiert werden (7).

CAVE: Bei Verdacht auf ein Gelenksempyem oder eine septische Arthritis muss in jedem Fall eine diagnostische GP durchgeführt werden (7, 9, 11)!

1.3.2. Relative Kontraindikationen

- Immunsuppression
- Antikoagulation
- Hautveränderungen in der Umgebung der Punktionsstelle
- Bestehender Gelenksersatz
- Spritzenphobie des Patienten

1.4. Vorbereitung

1.4.1. Patienteneinverständniserklärung

Eine GP ist mit wenigen Ausnahmen ein elektiver und damit planbarer Eingriff. Aus diesem Grund muss der zu behandelnde Patient im Vorfeld ausreichend über die anstehende Prozedur aufgeklärt werden und über Risiken, Nebenwirkungen, insbesondere die Gelenksinfektion, Komplikationen und alternative Therapiemethoden informiert werden. Es hat sich als hilfreich erwiesen, einem möglicherweise betroffenen Patienten frühzeitig GP-Indikationen zu erörtern und ihm einen Aufklärungsbogen auszuhändigen, damit er sich in Ruhe mit dem Thema auseinandersetzen und etwaige Fragen zur Sprache bringen kann (10). Jedoch sollte die übermittelte Information stets einfach, kurz und für den Patienten verständlich sein. Der Patient soll auch wissen, dass er bei Verschlimmerung oder Neuauftreten von Symptomen den betreffenden oder einen andern fachkompetenten Arzt aufsuchen soll (11).

1.4.2. Räumliche Anforderungen

Der Eingriffsraum bedarf einer regelmäßigen Reinigung und Desinfektion (9), die im Hygieneplan der Klinik oder Praxis eingetragen sein müssen. Insbesondere patientennahe Gegenstände bedürfen einer zusätzlichen Säuberung (10), wobei wasserundurchlässige Einmalunterlagen dies vereinfachen können (9).

Es dürfen sich auch keine (potentiell) infektiösen Personen, ohne dementsprechende Zwischenreinigung, vorgängig im Behandlungsraum aufgehalten haben (11).

1.4.3. Personelle (ärztliche) Anforderungen

- Die Zahl der sich im Eingriffsraum befindlichen Personen sollte auf ein Minimum reduziert und Gespräche auf das Notwendigste beschränkt werden (9-11).
- Von der Kleidung des Arztes, besonders von den Ärmeln, darf keine Infektionsgefahr ausgehen, weshalb es empfehlenswert ist, den Ärztekittel auszuziehen (9).
- Das Tragen einer Gesichtsmaske (Einmal-Mund-Nasen-Schutz aus mehrlagigem Material) wird bei Infekten des Respirationstraktes dem Betroffenen, egal ob Arzt oder Patient, empfohlen (10).
- Auch die Literatur bezüglich des Tragens von sterilen Handschuhen ergibt keine Evidenz, welche diese zur Voraussetzung für eine saubere Injektion / Punktion macht. In einer älteren Studie (*Anders G. Gelenkpunktionen und intraartikuläre*

Injektionen in ambulanten orthopädischen Einrichtungen. Beitr. Orthop. Traumatol. 1984;31:419-25.) waren die Infekte unter aseptischen Bedingungen sogar 11mal höher als bei 75000 Eingriffen im Sprechzimmer ohne Abdeckung oder sterile Handschuhe (11).

- Lediglich die hygienische Händedesinfektion wird als Voraussetzung angesehen, wobei von manchen Ärzten zusätzlich nichtsterile Handschuhe zum Selbstschutz getragen werden.

Ausnahmen bilden die Notwendigkeit des (mehrfachen) Dekonnektierens von Kanüle und Spritze, z.B. bei der Abpunktion von sehr voluminösen Ergüssen, oder bei immunsuppressiver Therapie des Patienten, wodurch das Verwenden steriler Handschuhe zwingend und das Tragen eines Mundschutzes empfohlen wird (8, 10).

1.4.4. Patientenvorbereitung

- Das zu punktierende Gelenk des Patienten muss soweit von Kleidungsstücken freigelegt werden, dass durch die Kleidung keine Kontamination mehr erfolgen kann (9).
- Gegebenenfalls starke Körperbehaarung im Punktionsgebiet mit einer Schere und nicht mit einem Rasierer, wegen der Hauttraumatisierungsgefahr, entfernen (8-11).
- Der Patient sollte gelenksspezifisch und trotzdem für ihn bequem gelagert werden (8).
- Die Punktionsstelle sollte vor der Desinfektion markiert werden, entweder mit einem Hautmarker oder einfach durch den Abdruck einer Kanülenhülle (8).
- Gründliche Desinfektion der Punktionsstelle.

1.4.5. Material

- Vor einer Punktion eines Gelenks sollten die erforderlichen Materialien bereitgelegt werden, insbesondere wenn der Eingriff ohne Helfer durchgeführt wird (siehe Abb. 1).
- Kanülendicke: Die Auswahl der geeigneten Dicke richtet sich nach der Indikation der Arthrozentese: Bei einer GP ist eine Einmalkanüle mit der Dicke von 18-20G empfehlenswert, wobei bei einer Injektion eines Medikaments eine dünnere Kanüle, 21-24G, ausreicht (10).

- Kanülenlänge: Die Wahl ist vom zu punktierenden Gelenk abhängig, da man bei einer Hüftgelenkspunktion eine längere Nadel, mind. 80mm, benötigt, als bei einer Punktion des Knies, mind. 40mm, oder des OSG, mind. 30mm (10).
- Spritzengröße: Die passende Größe wird von der zuvor abgeschätzten Ergussmenge bestimmt, wobei man bei größeren Gelenken, wie der Hüfte, der Schulter oder dem Knie, zwischen 5 und 60ml fassende Spritzen verwenden sollte. Eine gute Schätzung erspart einen, den Eingriff erschwerenden, Spritzenwechsel (12).
- Lokalanästhesie: In Abhängigkeit vom zu punktierenden Gelenk werden 1 bis 10ml 1%iges Lidocain in einer entsprechend großen Spritze mit einer dünnen Kanüle, 25G und einer Länge von 30mm bereitgelegt (12).
- Die Desinfektion sollte mit einem anerkannten, registrierten Desinfektionsmittel für die Haut durchgeführt werden, egal ob dies ein Wisch- oder Sprühpräparat ist. Wichtig ist nur die Einhaltung der jeweils vorgeschriebenen Einwirkdauer und der „no touch“-Technik, die ein erneutes Berühren der zuvor desinfizierten Hautstelle untersagt (11).
- Steriles Verbandsmaterial



Abb. 1: Equipment für eine Gelenkspunktion bzw. -injektion (12)

1.5. Durchführung am Beispiel der Kniepunktion

1.5.1. Material

- 5-10ml Spritze für Lokalanästhetikum
- 5-60ml Spritze für Punktion
- 25G, 30mm Kanüle für Lokalanästhetikum
- 18G, 40mm Kanüle für Punktion
- 5ml 1% Lidocain
- Hautmarker
- Hautdesinfektionsmittel
- Sterile Tupfer
- Sterile, elastische Bandage
- Nichtsterile Einmalhandschuhe (12)

1.5.2. Laterale suprapatellare Punktion

Sie wird als die einfachste, komplikationsärmste und vom Patienten meist tolerierte Punktionsart des Knies bezeichnet. Dies ist darauf zurückzuführen, dass keine großen Arterien, Venen oder Nerven im Einstichgebiet liegen. Punktiert wird die Bursa suprapatellaris, welche extraartikulär liegt, aber trotzdem gelenkkommunizierend ist, wodurch man iatrogene Knorpelschäden im Kniegelenk vorbeugt. Der Patient wird am Rücken liegend mit ausgestreckten Beinen gelagert, wobei das zu punktierende Bein etwas abgewinkelt ist, wodurch der Patient nicht in das Eingriffsgebiet einsehen kann und die Patientennervosität gesenkt wird.

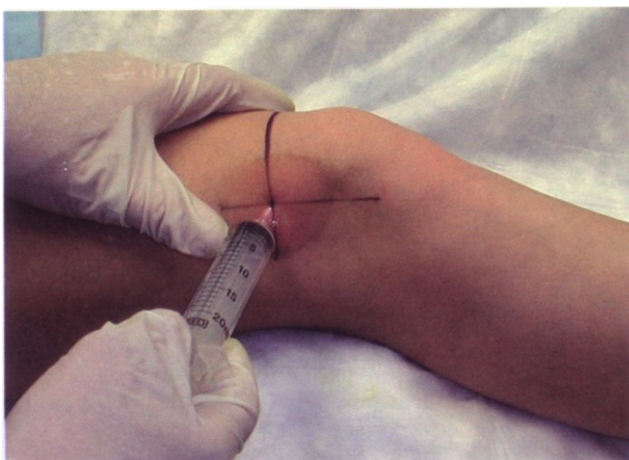


Abb. 2: Laterale suprapatellare Kniepunktion (12)

Technik:

1. Vorbereitung wie in Kapitel 1.4. beschrieben.
2. Markierung der Einstichstelle mit einem Hautmarker:
Als erstes palpiert man die Basis der Kniescheibe und zeichnet an diese eine horizontale Linie. Danach ertastet man die laterale Kante und zieht eine vertikale Linie an diese. Der Schnittpunkt der beiden Linien ist die Einstichsstelle.
3. Desinfektion des Eingriffsgebiets mit adäquater Wartezeit.
4. Setzen der Lokalanästhesie:
Einspritzen des Lokalanästhetikums unter Depotbildung in den verschiedenen Gewebeschichten. Einhalten einer adäquaten Einwirkzeit.
5. Einführen der Punktionskanüle im rechten Winkel zu den zuvor gezogenen Linien auf der Haut. Während des Vorschiebens stets den Spritzenstempel unter Zug halten, um eine intravasale Lage der Kanülenspitze zu bemerken.
Falls die Kanüle auf Knochen treffen sollte, bevor GF aspiriert werden kann, einfach entlang des Knochens nach distal gleiten, bis GF im Spritzenzylinder erscheint.
6. Sobald GF aspiriert wird, Kanüle in dieser Lage fixieren und so viel Flüssigkeit wie möglich abpunktieren, auch wenn dies einen Spritzenwechsel impliziert.
7. Nach der Abpunktion der gesamten GF, Spritze samt Kanüle entfernen.
8. Punktionsstelle mit sterilen Tupfern abdecken und mit einer elastischen Bandage unter moderatem Zug verbinden.

Die oben beschriebene Punktionsart kann auch medialseitig durchgeführt werden, wobei sich der Arzt dafür zwischen den Beinen des Patienten aufhalten muss, wodurch die Bewegungsfreiheit eingeschränkt ist, was weder für den Arzt noch für den Patienten von Vorteil ist. Außerdem kann dies ein unnötiger Einschnitt in die Privatsphäre des Patienten sein, besonders bei Frauen (12).

1.5.3. Laterale infrapatellare Punktion

Dieser Gelenkszugang ist schwieriger durchzuführen und hat mehr Komplikationen als der zuvor genannte. Das ist zum einen anatomisch bedingt, da man hierbei direkt ins Gelenk eindringt, womit die Gefahr besteht, dass man mit der Kanülenspitze den Knorpel des distalen Femurs verletzt. Darüber hinaus kann der Patient, falls der Vorgang im Sitzen durchgeführt wird, in das Eingriffsgebiet einsehen, wodurch sich Nervosität aufbauen könnte. Dies kann sogar soweit gehen, dass der Patient aufgrund einer vasovagalen Reaktion kollabiert und von der Untersuchungsliege fällt.

Auf der anderen Seite kann es ein Vorteil sein, weil man diesen Eingriff auch im Sitzen bei 90° gebeugtem Knie durchführen kann, z.B. wenn ein Patient nicht in eine liegende Position gebracht werden kann, oder im Rollstuhl sitzt.



Abb. 3: Laterale infrapatellare Gelenksinjektion (12)

Technik:

1. Vorbereitungen wie in Kapitel 1.4. beschrieben.
2. Markierung der Einstichstelle mit einem Hautmarker:
Als erstes ertastet man die Patellasehne, welche am distalen Ende der Patella, der Apex patellae, ihren Ursprung hat. An dieser Knochen-Sehnen-Grenze geht man mit den Fingern tastend ca. 1-2cm nach lateral, bis man eine Versenkung spürt. An diesem Punkt setzt man eine Markierung, um die Einstichstelle zu kennzeichnen.
3. Desinfektion des Eingriffsgebiets mit adäquater Wartezeit.
4. Setzen der Lokalanästhesie:
Einspritzen des Lokalanästhetikums unter Depotbildung in den verschiedenen Gewebeschichten, sowie Einhalten einer adäquaten Einwirkzeit.

5. Einstechen der Punktionskanüle in die zuvor markierte Stelle unter einem leicht medialen Winkel. Sorgsames und langsames Vorschieben unter ständiger Aspiration, um eine etwaige intravasale Lage der Kanülenspitze zu bemerken.
6. Sobald GF aspiriert wird, Kanüle in dieser Lage fixieren und so viel Flüssigkeit wie möglich abpunktieren, auch wenn dies einen Spritzenwechsel impliziert.
7. Nach der Abpunktion der gesamten GF, Spritze samt Kanüle entfernen.
8. Punktionsstelle mit sterilen Tupfern abdecken und mit einer elastischen Bandage unter moderatem Zug verbinden.

Die oben beschriebene Punktionsart kann auch mediallyseitig durchgeführt werden, wobei sich der Arzt zwischen den Beinen des Patienten aufhalten muss, wodurch die Bewegungsfreiheit eingeschränkt ist, das weder für den Arzt noch für den Patienten von Vorteil ist. Außerdem kann es ein unnötiger Eingriff in die Privatsphäre des Patienten sein, besonders bei Frauen (12).

2. Synovia

2.1. Allgemein

„In synovialen Gelenken befindet sich an der Innenseite der Gelenkscapsel die synoviale Membran (Synovialis oder Gelenksinnenhaut). Diese überzieht in Gelenken die in der Kapsel gelegenen Knochenteile und setzt sich über die intrinsischen Ligamente (z.B. die Kreuzbänder des Knies) und die intraartikulär verlaufenden Sehnen (z.B. Bizepssehne im Schultergelenk) fort. Die innerste Lage nennt man Intima. Diese ist aus ein bis vier Lagen synovialer Zellen aufgebaut“ (13), welche ungeordnet und mit großen Interzellularspalten (14) nebeneinander in einer amorphen Grundsubstanz eingebettet liegen (13). Da keine Basalmembran ausgebildet ist (14), befindet sich direkt unter diesen Zellen die Subintima, ein loses Bindegewebsnetzwerk, das gut mit Blutkapillaren und Lymphgefäßen versorgt ist und in direktem Kontakt mit der Gelenksflüssigkeit (Synovia oder Gelenksschmiere) steht.

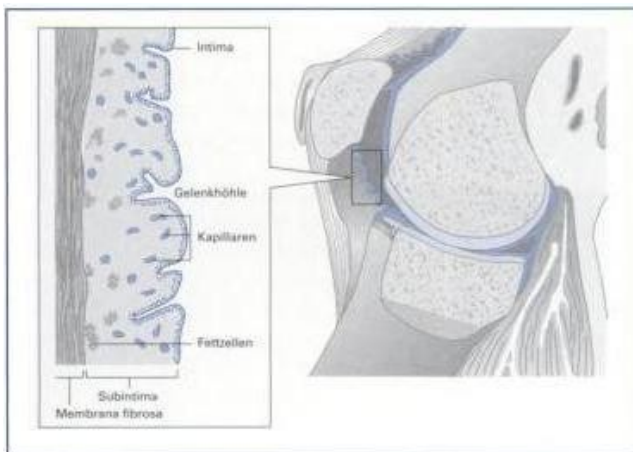


Abb. 4: Die synoviale Membran an der Innenseite der Kniegelenkscapsel (13)

„Histologisch werden zwei Typen synovialer Zellen unterschieden. Es werden auch intermediäre Formen gefunden, allerdings wird diskutiert, ob es sich dabei um funktionelle Formen ein und desselben Zelltyps handelt. Der eine Typ, die A-Zelle, hat eine Oberfläche mit vielen Ausstülpungen und im Zellplasma liegen neben einem gut entwickelten Golgi-Apparat viele Lysosomen. Funktionell übersetzt, beschäftigt sich diese Zelle mit der Herstellung von Hyaluronsäuremolekülen und mit der Entfernung von Stoffen aus der Gelenkhöhle. Wegen der Reinigungsfunktion werden diese Zellen mit Makrophagen verglichen und darum auch M-Zelle genannt. Der andere Zelltyp, die B-Zelle, hat ein gut entwickeltes, mit Ribosomen besetztes endoplasmatisches Retikulum, was auf die Produktion von Eiweißen hindeutet. Die B-Zelle heißt wegen ihrer Ähnlichkeit zu

Fibroblasten auch F-Zelle. Da angenommen wird, dass ein großer Teil der in der synovialen Flüssigkeit vorhandenen Eiweiße direkt aus den Blutkapillaren der Subintima stammt, ist die Rolle dieser Zellen nicht ganz geklärt.

Darüber hinaus weist die synoviale Membran an der Innenseite Zotten und Falten auf, die villi und plicae synovialis, die sich in die Gelenkhöhle dort einstülpen, wo die Gelenksoberflächen während der Bewegung keinen Kontakt haben. Im Gewebe dieser Falten werden oft Anhäufungen von Fettzellen gefunden, die früher von Anatomen als Drüsen angesehen wurden, welche die synoviale Flüssigkeit produzieren. Heute weiß man, dass die gesamte synoviale Membran Gelenksflüssigkeit produziert. Die Membranfalten erhöhen einerseits, durch eine beträchtliche Oberflächenvergrößerung der Synovialis, die Produktion von Synovia und andererseits ermöglichen sie während der Bewegung das Gleiten der Synovia über die darunter befindlichen Gelenksoberflächen. Elastische und kollagene Fasern in der Subintima verhindern, dass die Synovialisfalten während der Bewegung zwischen den Gelenksoberflächen eingeklemmt werden.

Auf eine Beschädigung reagiert die synoviale Membran mit der Bildung von Granulationsgewebe, das stark in die Gelenkhöhle wuchern kann. Früher wurde bei rheumatoiden Erkrankungen die dicke, synoviale Lage operativ entfernt (Synovektomie), wobei sich nach einigen Wochen das Granulationsgewebe wieder regenerierte. Heute versucht man, die Entzündung frühzeitig medikamentös in den Griff zu bekommen.“ (13)

2.2. Zusammensetzung

Die Gelenksflüssigkeit ist eine klare, durchsichtige, hell- bis strohgelbe, zähe Flüssigkeit, die dem Hühnereiweiß ähnelt, weshalb sie von Paracelsus (1493-1541) mit dem Namen Synovia („eiweißähnend“) benannt wurde.

„Die Gelenksflüssigkeit ist ein hochvisköses Ultrafiltrat des Blutplasmas, das mit Syntheseprodukten aus synovialen Zellen vermischt ist. Plasmaproteine wie Prothrombin, Fibrinogen, Faktor V und VII, Antithrombin und Komplementfaktoren sind vermindert oder fehlen“ (15), „da sie die „Blut-Gelenk-Schranke“ nicht passieren können; Substanzen mit einem größeren Molekulargewicht als 150kDa werden nicht filtriert. Eiweißgehalt, Glukosekonzentration und Aktivität von Enzymen (z.B. alkalische Phosphatase) sind deutlich niedriger als im Blut.“ (14) „In einem nicht krankhaft veränderten Gelenk finden sich nur wenige Zellen ($\leq 200/\mu\text{l}$), wobei hauptsächlich Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten unter 25%) oder freie synoviale Zellen vorliegen und Erythrozyten gänzlich fehlen. Die von den Zellen produzierten Moleküle, wie die

Hyaluronsäure, das Proteoglycan 4 (früher Lubricin genannt) und andere Proteoglykane, sind hauptverantwortlich für die physikalischen Eigenschaften der Synovia. Die Hyaluronsäure hat ein Molekulargewicht von bis zu 1000kDa und bildet aufgrund seiner starken negativen Ladung einen enormen Wasserspeicher. Da aber die Wassermenge in einem Gelenk beschränkt ist, konkurrieren die einzelnen Hyaluronsäuremoleküle um diese und erzeugen dadurch die hohe Viskosität. Außerdem erzeugen sie eine Art Formverhalten, wodurch Synovia, zeitlich begrenzt, elastisch verformbar ist. Physikalisch wird Gelenksflüssigkeit deshalb als viskoelastische oder thixotrope Flüssigkeit bezeichnet.“ (13)

2.2.1. Normalwerte der Synovia des Kniegelenks

- Volumen 0,2 bis maximal 3,5ml
- Gesamtzellzahl bis 200/ μ l, überwiegend Lymphozyten und Monozyten, gering Granulozyten und Synovialzellen.
- Rhagozyten bis maximal 5%
- Konzentration des Gesamteiweiß liegt bei einem Drittel des Serumeiweißes (1,07 bis 3,0g/dl)
- Viskosität ist hoch (15)

2.3. Aufgaben

Das Aufgabenspektrum der Synovia lässt sich aufgrund ihrer Zusammensetzung in mehrere Teilgebiete aufteilen:

- Erstens hat sie nutritive Funktionen, da sie die oberen und mittleren Knorpelschichten des Gelenksknorpels, mit Ausnahme der radiären Zonen, welche vom Knochenmark her ernährt werden, mit Nährstoffen versorgt.
- Zweitens hat sie immunologische Aufgaben, da die Aktivierung der Abwehrleistungen bei Gelenksinfektionen über sie vermittelt wird.
- Und zu guter Letzt der mechanische Aufgabenbereich, der die Absorption und Dämpfung von Stößen, sowie die Gleitfähigkeit und Schmierung des Gelenks gewährleistet. Grundsätzlich wäre zu sagen, dass das Gelenk ein sich selbst regulierendes Gleitlager darstellt, das sich seinen Anforderungen, wie Druck und Scherbewegungen, durch Regulierung der Menge und Zusammensetzung der Synovia anpasst (14).

2.4. Beurteilung

Ein Gelenkserguss ist stets Ausdruck eines intraartikulären Leidens, das verschiedene Ursachen haben kann. Als Ergänzung zur Anamnese und zu Erhebung des klinischen Zustands ist die Untersuchung der Synovia eine wertvolle Hilfe bei der Diagnose von Gelenkserkrankungen (16).

Die Klassifizierung des Gelenkspunktats (siehe Tab. 2) erfolgt unter anderem:

1. Makroskopisch
2. Mikroskopisch
3. Bakteriologisch
4. Biochemisch

Klassifizierung	Normal	Klasse 1 (nicht-entzündlich)	Klasse 2 (entzündlich)	Klasse 3 (septisch)	Klasse 4 (blutig)
Farbe	Gelb	gelb	gelb bis milchig	purulent	rot
Klarheit	Klar	klar	klar bis trüb	rahmig	blutig
Viskosität	Hoch	hoch	variabel	gering	variabel
Leukozyten (/µl)	< 200	< 2.000	2.000 – 100.000	> 50.000	200 – 2000
Granulozyten	< 25%	< 25%	> 50%	> 95%	50 – 75%
Kultur	Negativ	negativ	negativ	oft positiv	variabel

Tab. 2: Einteilung eines Gelenksergusses (15)

2.4.1. Makroskopisch

1. Viskosität

„Normale Synovia ist fadenziehend, wobei ein Faden erst nach 2,5-5 cm abreißt. Dies kann entweder mit dem Fadentest oder mit einem Rotationsviskosimeter, welches aber mit großem Aufwand verbunden ist und in der Routinediagnostik fast keine Verwendung findet, detektiert werden.

Bei entzündlich veränderten Gelenken ist die Viskosität der Synovia meist herabgesetzt. Verursacht wird dies durch eine erniedrigte Synthese und verstärkten Abbau von Hyaluronsäure, sowie durch einen osmotisch bedingten Wassereinstrom. Des Weiteren kann die Synovia, aufgrund eines pathologischen Fibringehalts, gerinnen, denn bei Entzündungen ist die Permeabilität der Synovialis erhöht und somit die Blut-Gelenk-Schranke gestört.“ (14)

2. Farbe und Klarheit

Die Klarheit des Ergusses wird im Wesentlichen von der Zellzahl und dem im Punktat befindlichen Debris bestimmt. Je höher der Zell- und Partikelanteil ist, umso trüber

erscheint die Synovia. Bei sehr hoher Zellzahl (z.B. septische Arthritis) hat das Punktat ein rahmiges Aussehen. In seltenen Fällen kann dies auch bei einer Gicht oder Pseudogicht auftreten (15). Ungetrübte Synovia ist ein Hinweis für ein nicht-inflammatorisches Geschehen, jedoch kein Ausschluss einer Entzündung (17). Hämorrhagische Ergüsse können durch Traumen, Kristallopathien (z.B. Pseudogicht und Milwaukeeerschulter), villonodulärer Synovitis oder anderen Neoplasien, sowie bei Koagulopathien auftreten und führen zu einem roten oder blutigen Aspirat. Von diesen Farbveränderungen muss natürlich die artifizielle Blutbeimengung im Rahmen der Punktion abgegrenzt werden. Diese ist meist dadurch gekennzeichnet, dass das Blut nicht gleichmäßig im Aspirat verteilt ist, sondern in Form von Schlieren auffällt (15).

3. Volumen

Die genaue Synoviamenge lässt sich im gesunden Gelenk nur schwer ermitteln. Sie ist generell sehr gering, wobei sie von Mensch zu Mensch und zwischen den Gelenken erheblich schwankt (14), z.B. beim Kniegelenk beträgt das Volumen 0,2 bis maximal 3,5ml (15). Bei chronischen Gelenkserkrankungen ist das Volumen herabgesetzt („dry joints“ oder „dry taps“) (7).

2.4.2. Mikroskopisch

1. Zellzahl und Differenzialzellzählung

Bei Reizergüssen oder nicht-entzündlichen Arthropathien findet man nur wenige Zellen ($\leq 2000/\mu\text{l}$), während man bei nicht-infektiösen Arthritiden Werte unter $60.000/\mu\text{l}$ erwarten muss. Zellzahlen um die $100.000/\mu\text{l}$ sieht man besonders bei septischer Arthritis und eventuell bei Arthritis urica.

„In den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden bei Patienten mit rheumatoider Arthritis neutrophile Granulozyten mit dunklen, blass- bis olivgrünen Granula entdeckt und von Delbarre und Mitautoren als RA-Zelle, oder auch Rhagozyten bezeichnet. Die Granula sind Lysophagosome und enthalten Immunkomplexe, unter anderem auch Rheumafaktoren. Die ersten Untersuchungen ließen auf eine hohe Spezifität für RA schließen, doch in weitere Analysen konnte dies nicht bestätigt werden. Man findet diese Zellen vermehrt auch bei septischer Arthritis, Gicht und Pseudogicht. Nach Ausschluss einer Kristallarthropathie spricht ein sehr hoher Prozentsatz von Rhagozyten ($> 95\%$) für eine septische Arthritis, während bei der RA die Werte um 70% liegen“ (15).

2. Kristalle

Kristalle lassen sich mit Hilfe eines Polarisationsmikroskops vor allem nach ihrem Lichtablenkungsvermögen und ihrer Form identifizieren. Sie können intra- oder extrazellulär vorkommen und man unterscheidet hauptsächlich:

- Harnsäure- / Mononatriumuratkristalle (Gicht)
- Kalziumpyrophosphatdihydratkristalle (Chondrokalzinose = Pseudogicht)

Seltener vorkommend sind:

- Cholesterinkristalle
- Hydroxylapatitkristalle
- Kortikoidkristalle (16)

„**Mononatriumuratkristalle** (MSU) sind im Lichtmikroskop als lange dünne Nadeln zu erkennen, die Leukozyten durchbohren und deutlich negativ doppelbrechend sind. Sie leuchten gelb, wenn die Ausrichtung des Kristalls parallel zur Achse des Rotkompensators liegt. Die Diagnose einer Gicht kann auch in der beschwerdefreien Phase der Erkrankung erfolgen, da in den befallenen Gelenken unbehandelter und zumindest bei 70% der behandelten Patienten Uratkristalle nachgewiesen werden können“ (15).

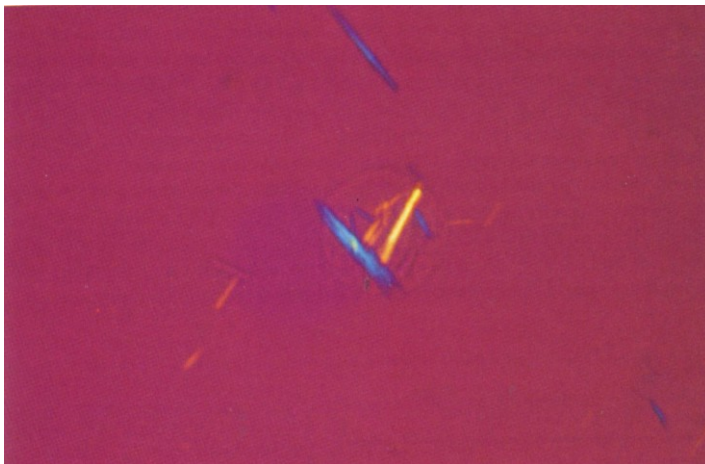


Abb. 5: Mononatriumuratkristalle (17)

„**Kalziumpyrophosphatdihydratkristalle** (CPPD) sind im Polarisationsmikroskop nicht oder schwach positiv doppelbrechend und haben meist eine gedrungene oder rhomboide Form (s. Abb. 6). Im Gegensatz zu MSU erscheinen CPPD blau, wenn sie parallel zur Kompensatorausrichtung liegen.“ (15)

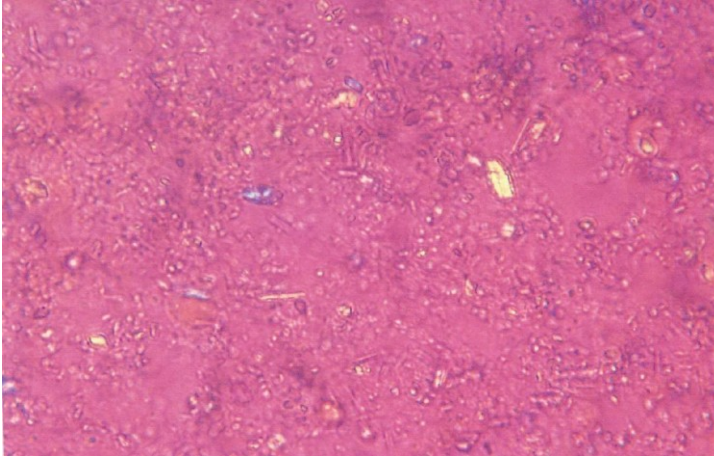


Abb. 6: Kalziumpyrophosphatdihydratkristalle (17)

„**Hydroxylapatitkristalle** finden sich bei verschiedenen Bindegewebsverkalkungen, sind im Gelenk aber nicht leicht detektierbar, da sie zu klein und im Polarisationsmikroskop nicht doppelbrechend sind. Sie stellen sich als amorphe, verklumpte und runde Masse dar und können mit 2%igem Alizarinrot gefärbt werden (orangeroter Niederschlag). Große Ansammlungen von Hydroxylapatit finden sich bei der „Milwaukee-Schulter“.“ (15)

Cholesterinkristalle liegen nie intrazellulär und haben ein plattenförmiges Aussehen (15).

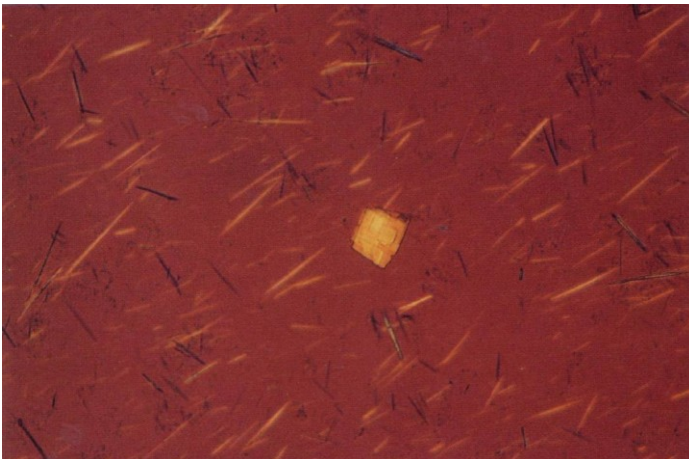


Abb. 7: MSU-Kristalle und ein Cholesterinkristall (Mitte des Bildes) (17)

Kortikoidkristalle sind doppelbrechend und nur nach einer intraartikulärer Injektion anzutreffen, wobei sie Entzündungsschübe auslösen können (16) und bis zu 10 Wochen im Gelenk verweilen.

Das Auffinden eines bestimmten Kristalls schließt das Vorhandensein eines weiteren nicht aus, das heißt, es können in einem Punkt sowohl MSU- als auch CPPD-Kristalle nachweisbar sein und eventuell noch andere Pathologien (15).

2.4.3. Bakteriologisch

„Bei Verdacht einer bakteriellen Arthritis sollte eine Gramfärbung durchgeführt werden, wobei die Sensitivität dieser Methode bei Nicht-Gonokokken rund 50-70% beträgt und eine Spezifität von 100% aufweist. Bei einer Gonokokkenarthritis, der häufigsten Ursache einer infektiösen Gelenkentzündung im Erwachsenenalter, liegt die Empfindlichkeit nur bei 10-25%. Auch die tuberkulöse Arthritis ist durch eine geringe Sensitivität der Gramfärbung charakterisiert (20%).

Das Anlegen einer Kultur erhöht die Sensitivität bei Nicht-Gonokokkenarthritis auf 75-95% und bei Gonokokkenarthritis auf 10-50%. Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) können auch nicht kultivierbare Mikroben wie z.B. *Borrelia burgdorferi* nachgewiesen werden.“ (15)

2.4.4. Biochemisch

Gesamteiweiß und LDH verlaufen parallel zur Entzündungsaktivität (15).

„Die Glukosewerte sind in entzündeten Gelenken aufgrund des erhöhten Verbrauchs und des gestörten Transportes aus dem Blut erniedrigt. Hingegen erhöht sich die Laktatkonzentration bei bakteriellen Arthritiden und bei der chronischen Polyarthritis.

Lysosomale Enzyme, Sauerstoffradikale und Prostaglandine, die eine Depolymerisation der Hyaluronsäure bewirken, steigen bei einer Entzündung ebenfalls an.

Der Polymerisationsgrad der Hyaluronsäure kann mit dem Muzinpräzipitationstest (MPT) leicht festgestellt werden: Die normale Synovia zeigt im sauren Milieu eine kompakte klumpenförmige Ausfällung der Hyaluronsäure bei klarer Restsynovia = Stufe 1 der Muzinpräzipitationsqualität (MPQ). Besonders bei infektiösen Arthritiden erhöht sich die MPQ auf Stufe 3 bis 4, wobei hierbei das Präzipitat bröcklig bis flockig ist und die Restsynovia trübe, gelb bis dunkel braun aussieht.“ (14)

„Nur bei Kristallarthropathien oder septischen Arthritiden liegen Veränderungen in der Gelenksflüssigkeit vor, die eine spezifische Diagnosestellung erlauben. Bei allen anderen Arthropathie kann man mit Hilfe dieser Klassifizierung lediglich die Differentialdiagnosen eingrenzen.“ (15)

2.5. Durchführung

Die Abbildung 8 gibt einen Überblick des Routine-Untersuchungsablaufs von Gelenksflüssigkeit wieder. Nach der Punktion sollte man einen Teil der Synovia mit einigen Tropfen Heparin versetzen oder in ein mit Heparin beschichtetes Röhrchen transferieren. Zur Antikoagulation sollte nur Natrium-Heparin oder EDTA verwendet werden, da Lithium-Heparin und Calciumoxalat doppelbrechend sind und eine Kristallanalyse erschweren. Weiters kann das Punktat durch Schwenken in einem mit Glasperlen beschickten Erlenmeyer-Kölbchen defibriert werden. Bei hoher Viskosität empfiehlt sich der Zusatz von Hyaluronidase (15).

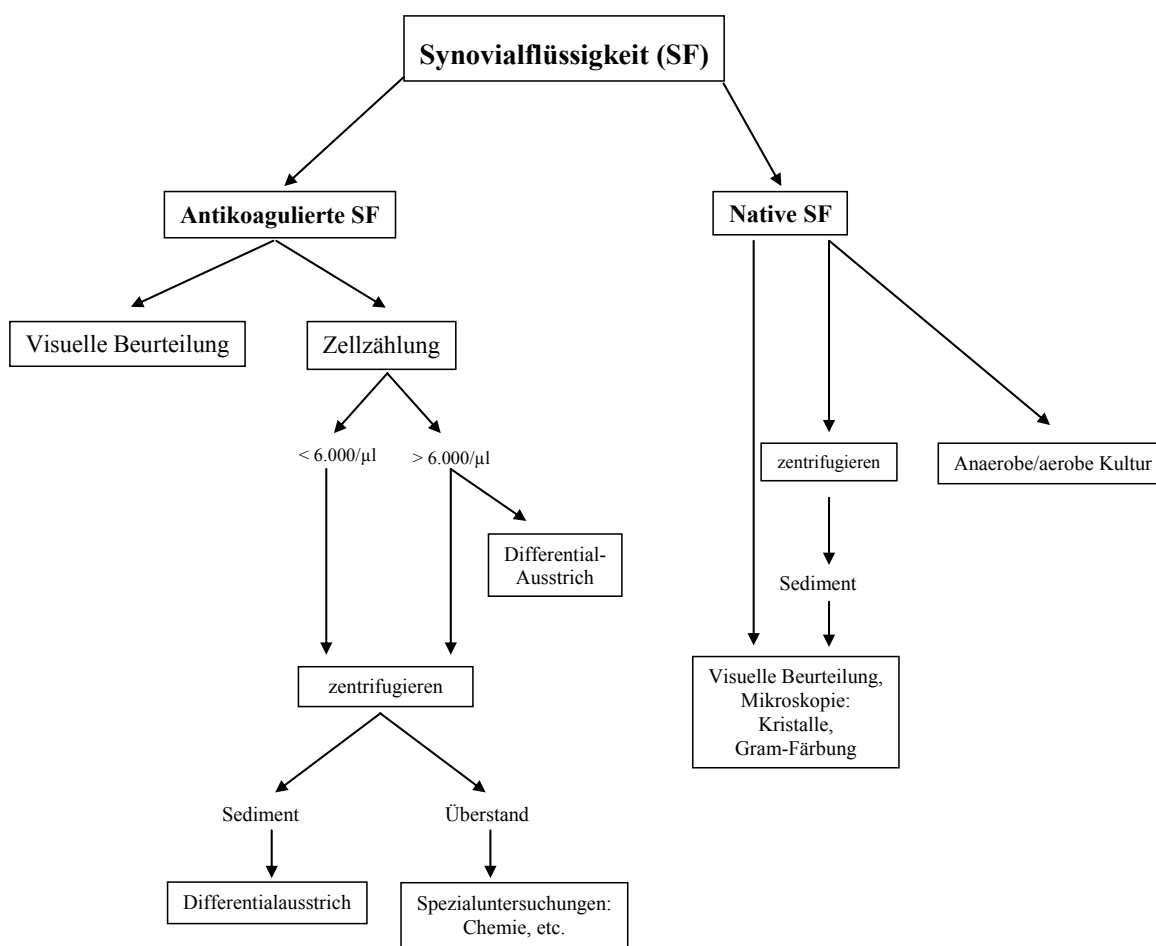


Abb. 8: Synovia-Untersuchungsalgorithmus (15)

2.5.1. Viskosität

Beim einfachen Fadentest wird die Zähheit eines nativen Synoviatropfens mit einer Spritze, einer Pipette oder einfach zwischen dem Daumen und dem Zeigefinger geprüft. Dabei wird gemessen, bei welcher Länge der Tropfen abreißt (15).

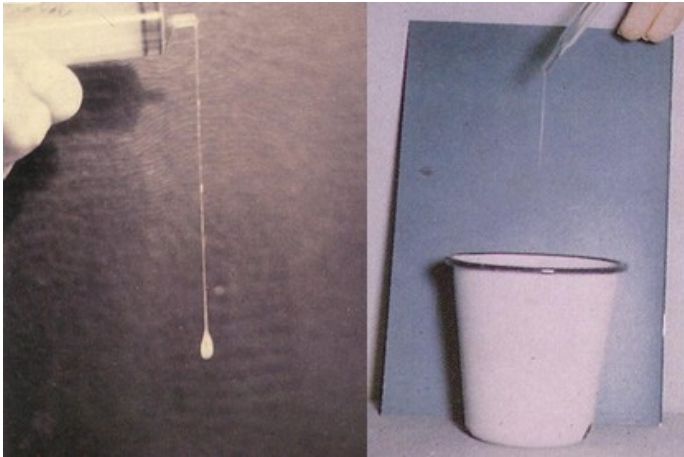


Abb. 9: Viskositätstestung mittels Fadentest (17)

2.5.2. Farbe und Klarheit

Um die Klarheit zu testen, hält man die Punktionspritze oder das mit Synovia befüllte Röhrchen vor ein weißes, bedrucktes Blatt Papier und beurteilt wie gut die Schrift durch die GF zu lesen ist. Darüber hinaus kann man gleichzeitig den Farbton der GF bestimmen (15).

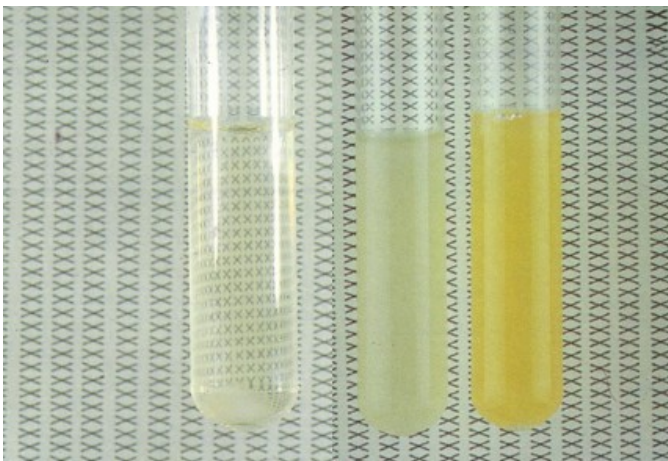


Abb. 10: Klarheits- und Farbtstung nativer Synovia (17)

2.5.3. Zellzahl

Die native Gelenksflüssigkeit sollte mit Heparin vermischt und in einer Zählkammer ausgezählt werden. Eventuell ist eine Verdünnung mit 0,9%iger Kochsalzlösung oder bei einem hämorrhagischen Erguss mit 0,3%iger Kochsalzlösung (führt zur Hämolyse), notwendig (15). Der Einsatz eines automatischen Zellzählers kann die Bestimmung der Zellzahl erleichtern (Zitat).



Abb. 11: Zählkammer der Firma Neubauer®

2.5.4. Differentialzellzählung

Die einfachste Färbemethode ist der Schnelltest mittels farbbeschichtetem Objektträger (z.B. Testsimplets® der Firma Waldeck).

„Es wird ein Tropfen heparinisierte Synovia aufgebracht und die Differenzierung im Lichtmikroskop durchgeführt. Ist die Zellzahl zu gering ($< 6.000/\mu\text{l}$), sollte die Synovia vor der Analyse zentrifugiert werden.“ (15)



Abb. 12: Objektträger zur DZZ (Testsimplets®) der Firma Waldeck

2.5.5. Kristalle

„Einen Teil der Nativ-Synovia zentrifugieren, den Überstand verwerfen und das Sediment resuspendieren. Jeweils einen Tropfen des Nativmaterials und des Sediments auf einen Objektträger bringen und mit einem Deckglas versehen. Wenn die Analyse nicht unmittelbar erfolgen kann, sollte das Präparat mittels Nagellack abgedichtet werden. Das Auffinden der Kristalle und die Differenzierung erfolgt am besten im Polarisationsmikroskop“ (15).

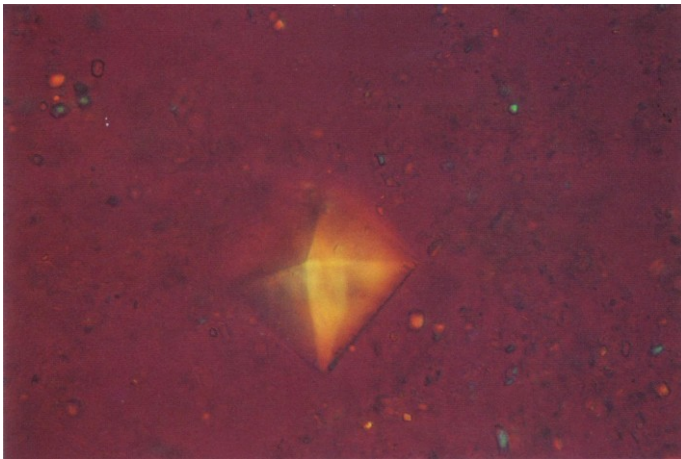


Abb. 13: CPPD + Kalziumoxalatkristall (Mitte des Bildes) (17)

2.5.6. Bakteriologisch

„Eine Gramfärbung kann am nativen Präparat durchgeführt werden, wobei auch hier durch die Verwendung des Sediments ein besseres Ergebnis zu erwarten ist. Die Anlage einer aeroben und anaeroben Kultur ist empfehlenswert. Eine PCR zum Keimnachweis kann bei Verdacht auf eine Arthritis durch Tuberkelbazillen oder Borrelien veranlasst werden, da hier der direkte Erregernachweis oft negativ ist.“ (15)

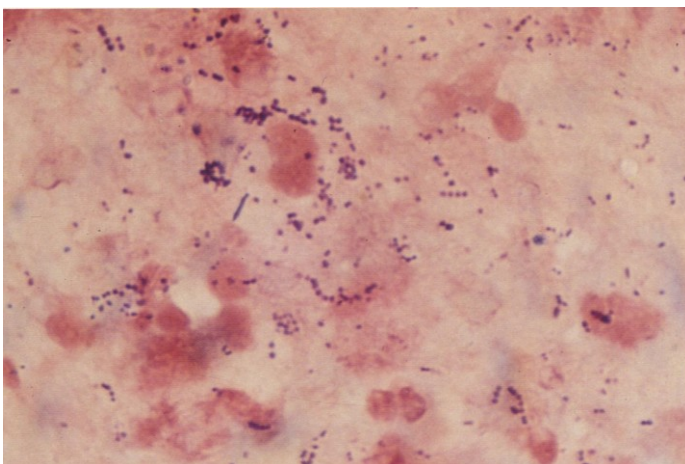


Abb. 14: Kokkenartige Bakterien in einer Gramfärbung (17)

2.5.7. Biochemisch

Die Bestimmung des absoluten Glukosewertes in der heparinisierten Synovialflüssigkeit ist von geringer Aussagekraft, besser ist die Bestimmung des Quotienten GF-Glukose zu Serum-Glukose.

Spezielle Untersuchungen wie die Elektrophorese am nicht heparinisierten, jedoch defibrinierten Erguss nach Hyaluronidasezusatz, die Bestimmung von Autoantikörper, Enzymkonzentrationen oder Zytokinen haben für die Routinediagnostik keine Bedeutung (15).

3. Hyaluronsäure

3.1. Allgemein

Der Name Hyaluronsäure (HA), oder Hyaluronat, leitet sich vom griechischen Wort „hyalos“ ab, das Glas bedeutet. Darüber hinaus ist sie glasartig durchscheinend und der Hauptbestandteil des Glaskörpers des Wirbeltierauges, aus welchem sie zum ersten Mal isoliert wurde. HA gehört zu den Glukosaminoglykanen, einer Untergruppe der Heteropolysaccharide, die sich durch wiederkehrende Disaccharideinheiten, welche lange lineare Polymere bilden, kennzeichnen. Diese Polysaccharide kommen nur bei Tieren und manchen Bakterien vor, z.B. Streptokokken, nicht jedoch bei Pflanzen (18).

Die vier Hauptvertreter dieser Gruppe sind:

- Hyaluronsäure
- Chondroitinsulfat
- Keratansulfat
- Heperansulfat (19)

3.2. Biochemisch

Eines der beiden Monosaccharide eines Glukosaminoglykans ist immer ein Aminozucker, entweder N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin und das andere in den meisten Fällen eine Uronsäure, gewöhnlich D-Glucuronsäure oder L-Iduronsäure. Aufgrund der hohen Dichte negativer Ladungen nehmen diese Moleküle in Lösung lang gestreckte Konformationen ein, z.B. eine stabförmige Helix, um die Abstoßungskräfte zwischen den benachbarten negativ geladenen Gruppen, Sulfat- oder Carboxylatgruppen, zu minimieren (18).

Im Falle der HA besteht eine Disaccharideinheit aus N-Acetylglucosamin und D-Glucuronsäure (s. Abb. 15). Jedoch unterscheidet sie sich in drei Punkten grundlegend von den anderen Gruppenvertretern:

- Erstens enthält HA keine Sulfatgruppe, wie aus dem Namen hervorgeht.
- Zweitens bindet sie nicht an ein Kernprotein, wodurch sie einfach als Glykan bezeichnet wird. Die anderen Glukosaminoglykane binden aber an einen Proteinkern und werden zusammen mit diesem auch als Proteoglykane benannt (19).
- Drittens bildet HA Ketten bis zu einer Länge von 50.000 Disaccharidbausteinen aus, wodurch sie ein Molekulargewicht von über 1 Million Da erreichen kann (18).

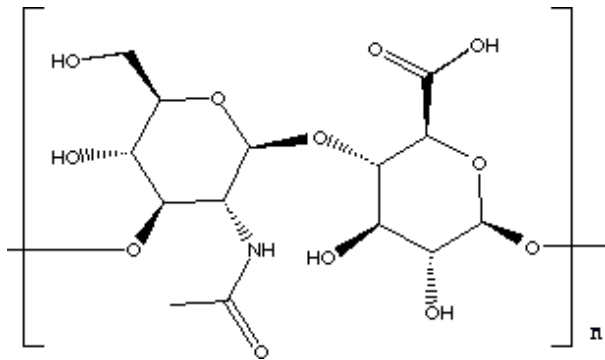


Abb. 15: Hyaluronsäure – Disaccharidbaustein (20)

3.3. Biosynthese

„Da HA kein Protein enthält, unterscheidet sich ihre Synthese grundsätzlich von der, der Proteoglykane. Die repetitiven Disaccharideinheiten werden Schritt für Schritt in Form ihrer Nucleosiddiphosphat-aktivierten-Monosaccharide an die wachsende Zuckerkette angeheftet. Die hierfür verantwortliche Hyaluronat-Synthase verfügt über zwei Bindungsstellen für die beiden Uridindiphosphat(UDP)-Monosaccharide. Beim Menschen kommen drei unterschiedliche Synthasen vor, die sich aber sehr ähneln.“ (21)

3.4. Vorkommen

HA kommt in tierischen Geweben ubiquitär vor und wird in den Fibroblasten fast aller Vertebraten und in manchen Bakterien, als Baustein ihrer Zellwand, gebildet. Sie ist neben den Chondroitinsulfaten eine Hauptkomponente der Extrazellulärmatrix und kommt darüber hinaus in den meisten Geweben vor: Grundstoff des Knorpels, der Gelenksflüssigkeit, der Sehnen, des Glaskörpers, der Haut, der Bandscheiben, etc. (siehe Tab. 3) (21, 22).

Organ od. Flüssigkeit	Konzentration ($\mu\text{g/g}$)
Nabelschnur	~ 4100
Synovia	1400-3600
Dermis	~ 200
Glaskörper	140-340
Gehirn	35-115

Tab. 3: Hyaluronsäurekonzentrationen menschlicher Organe od. Flüssigkeiten (22)

3.5. Gewinnung

„Für kommerzielle Zwecke wird HA heutzutage hauptsächlich aus Hahnenkämmen isoliert, jedoch gewinnt die biotechnische Herstellungsförm, durch bakterielle Fermentation, immer mehr an Stellenwert. Dies ist vor allem auf die Forderung der EMEA (European Medicines Evaluation Agency) zurückzuführen, auf tierische Produkte nach Möglichkeit zu verzichten.“ (22)

3.6. Anwendung

HA wird aufgrund ihrer guten Biokompatibilität in Medizin, Pharmazie und Kosmetik häufig verwendet:

- Bei Arthropathien wird HA in die betroffenen Gelenke injiziert.
- Bei Augenoperationen wird HA als chirurgische Hilfsmittel verwendet.
- Bei Wundheilungsstörungen wird HA auf die Wundflächen aufgetragen.
- In der Kosmetik hat HA große Bedeutung als „moisturing factor“.
- In der Pharmazie werden neue „drug delivery“-Systeme entwickelt, die HA als Trägersubstanz nutzen (22)

4. Hyaluronidase

4.1. Allgemein

Hyaluronidase (HY) ist ein Glykoprotein mit enzymatischer Wirkung. Es ist ein Tetramer, das heißt es ist aus 4 gleichen Untereinheiten aufgebaut, und enthält 5% Mannose und 2,2% Glucosamine. Jede dieser Untereinheiten hat ein Molekulargewicht von 14kDa, wodurch das gesamte Enzym auf ein Gewicht von ca. 55kDa kommt (23).

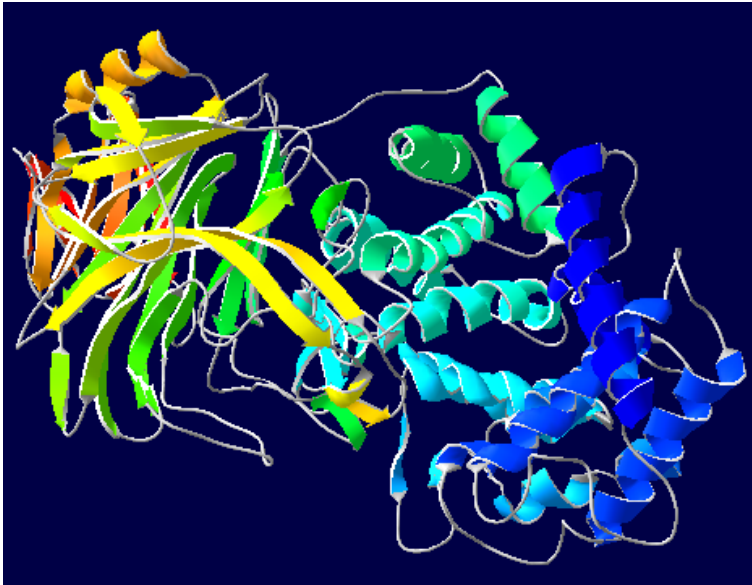


Abb. 16: Hyaluronidase des Schafs (24)

4.2. Wirkung

Das Enzym hydrolysiert 1,4-Bindungen zwischen N-Acetyl- β -D-Glucosaminen und β -D-Glucuronaten, beides Bestandteile des Hyaluronats, wobei dies keinem Muster folgt. Der pH-Wert, bei dem HY optimal reagiert, liegt zwischen 4,5 und 6,0. Darüber hinaus hydrolysiert es auch 1,4-E-D-glycosidische-Bindungen zwischen N-Acetyl-Galactosaminen, N-Acetyl-Galactosamin-Sulfaten oder Glucuronsäuren aus Chondroitin, Chondroitin-4/6-Sulfaten oder Dermatan (23).

Auch bei der Befruchtung von Eizellen durch Spermien wird HY für die Penetration eingesetzt. Dem entsprechend sind hohe Konzentrationen im Hodengewebe und im Sperma von Tieren und Menschen zu finden.

Weiters nutzen einige Tiere die Wirkung von HY, um z.B. die Toxizität ihres Giftes zu verstärken (Bienen, Schlangen), oder sich leichter Zugang zu ihrer Nahrung zu verschaffen (Stechmücke, Bluteigel).

Diese Phänomene waren Vorbilder für den sog. „spreading factor“, eine pharmazeutische Einschleusetaktik von Arzneistoffen in Gewebe.

4.3. Herstellung und Lagerung

Man gewinnt HY entweder aus Hodengewebe des Rinds, des Schafs oder biotechnisch aus dem hyphenbildenden Bakterium *Streptomyces hyalurolyticus*.

Bei der Firma SIGMA-ALDRICH gibt es z.B. verschiedene Subtypen, welche mit den Bezeichnungen I-S, II, II-S, IV-S, V, VI-S, VIII benannt sind. Sie unterscheiden sich anhand des Ursprungsgewebes, sowie der Zahl der units/mg Festmasse. Zum Beispiel kennzeichnet sich der Subtyp I-S dadurch, dass er aus Rinderhoden gewonnen wird und eine Konzentration von 400-1000units/mg lyophilisiertem Pulver, welches bei -20°C gelagert werden muss, hat (23).



Abb. 17: Hyaluronidase der Firma SIGMA ALDRICH (Typ I-S).

4.4. Verwendung

Häufig wird HY in Kombination mit Kollagenase verwendet, um Extrazellulärmatrix zu verdauen, wodurch man viable Zellen für Gewebezellkulturen gewinnt. Außerdem kann HY verwendet werden, um GF zu verflüssigen und dadurch einer Zellzählung zugänglich zu machen (23).

4.5. Interaktionen

Die enzymatische Wirkung von HY wird von den folgenden Substanzen inhibierend beeinträchtigt:

Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Heparin, Aurintricarboxylsäuren, -sulfaten, -nitrat, acetylierter Hyaluronsäure, sulfathaltigen Zelluloseestern, sulfathaltigen Chitinstern, sulfathaltiger Carboxylzellulose, sulfathaltigem Xylan, Gallesalzen, sulfathaltigen Steroiden, Hexylresorcinol, o- und p-Quinone und sulfathaltige alipatische Alkohole (23).

PROBEN

Probenkollektiv

Die Auswahl der Proben unterlag keinerlei Ausschlusskriterien oder Regelungen. .

Es wurden aufeinanderfolgend Gelenksflüssigkeitsproben aus dem immunologischen Labor der Klinischen Abteilungen für Rheumatologie und Immunologie, Universitätsklinik für Innere Medizin verwendet, die zur Abklärung eines Gelenksergusses zugesandt worden sind.

Die folgende Tabelle gibt allgemeine Probendaten wieder.

Geschlecht	Zahl (N)	%N	Alter (a)	Mittelwert	Median
Männer (m)	9	90	34-84	55	51
Frauen (f)	1	10	78	78	78

Tab. 4: Allgemeine Probendaten

Die folgende Tabelle gibt spezielle Probendaten wieder

Probe	GZZ	Diagnoseklasse	Kristallnachweis
1	25.600	2	0
2	2.150	1	0
3	5.950	2	0
4	70.600	2	0
5	1.000	1	MSU-Kristalle
6	8.900	2	MSU-Kristalle
7	13.300	2	0
8	15.600	2	0
9	12.300	2	0
10	1.000	1	MSU-Kristalle

Tab. 5: Spezielle Probendaten

Aufgrund der hohen Streubreite der absoluten Zellzahlen wurden die prozentuellen Zellzahlveränderungen – bezogen auf die Ausgangswerte der einzelnen Proben – zur statistischen und graphischen Auswertung herangezogen.

METHODEN

1. Übersicht

Zehn Gelenkspunktate wurden untersucht und folgende Parameter gemessen:

1.1. GZZ und DZZ

Gesamtzellzahl und Differentialzellzahl wurden mit Hilfe eines automatischen Zellzählers (25-35) (A^C T 5diff AL) der Firma Beckman Coulter[®] detektiert (s. Abb. 20).

Aufgrund der besseren Darstellbarkeit wurde eine logarithmische Graphikskalierung gewählt. Dadurch entspricht der 0,01-Wert auf der x-Achse der sofortigen Analyse ohne Hyaluronidase. In den Tabellen wurde die korrekte IZ angegeben.

1.2. Viabilität und Apoptose

Viabilität und Apoptose von Lymphozyten wurden nach einer FITC-Annexin-V und 7-AAD Färbung durch ein FACS Canto II Durchflusszytometer der Marke BD Biosciences[®] gemessen (s. Abb. 21).

1.3. Farbe, Klarheit und Viskosität

Diese Parameter wurden dem Routinemessblatt entnommen.



Abb. 18: 5ml Falcon[®] Facs-Röhrchen, 3ml Vacuette[®]-Röhrchen, 0,45µm MILLEX[®] HA Filter Unit (von links nach rechts)

2. Probenbearbeitung

2.1. Vorbereitung

2.1.1. Hyaluronidase-Worksolution (HY-WS)

Da nur die Lagerung als lyophilisiertes Pulver bei -20°C die einwandfreie Funktion des HY-Enzyms gewährleistet (23), ist ein frisches Ansetzen der Arbeitslösung vor jeder Probenanalyse voranzusetzen.

Die HY-WS wird als 0,05% Lösung in Phosphatpuffer angesetzt (23, 34), was bedeutet, dass 1mg HY-Trockenpulver in 2ml PBS gelöst ist.

Vor dem Gebrauch der Enzymlösung wird diese noch durch einen Filter, MILLEX[®] HA, mit der Porengröße $0,45\mu\text{m}$ (36) der Firma MILLIPORE (s. Abb. 18, 19) steril gefiltert, um etwaige Enzymkonglomerate zu entfernen.



Abb. 19: Filter-Spritzen-Kombination zur Filterung der HY-WS

2.1.2. “Binding-Buffer”-Worksolution (BB-WS)

Hierfür wird ein Annexin-V-Binding-Buffer-Konzentrat verwendet, dass im Verhältnis 1:10 mit Aqua destillata (Aqua dest.) verdünnt werden muss; dabei wird ein Teil Annexin-V-Binding-Buffer-Konzentrat mit neun Teilen Aqua dest. Vermengt (37).

2.2. Durchführung

Nach den Routineuntersuchungen, Farb-, Klarheits- und Viskositätsbestimmung, mikroskopische GZZ und DZZ, sowie dem Kristallnachweis, wurde die restliche Synovia nach folgendem Schema bearbeitet und analysiert:

Die native Gelenksflüssigkeit wird in drei Fraktionen aufgeteilt, wobei die erste 2/7, die zweite 4/7 und die dritte 1/7 des Probenvolumens umfasst.

2.2.1. Erste Fraktion

Die erste Fraktion wird noch am Punctionstag (Tag_0) analysiert und dient als Kontrollprobe. Sie wird wiederum in vier gleiche Teile geteilt, wobei jeder in ein 5ml Falcon[®] Facs Röhren (s. Abb. 18) pipettiert wird.

Daraufhin wird einem der vier Teile (SY-N) eine aliquote Menge PBS beigemischt und den anderen drei dieselbe Menge HY-WS.

Diese drei Röhren werden, nach passender Beschriftung (SY-WS_{15/30/60}), bei 37°C für 15, 30 oder 60 Minuten inkubiert.

Die SY-N wird währenddessen gewaschen, indem sie mit 3ml kalter PBS vermengt und für 5min bei 20°C und mit 1500rpm zentrifugiert wird. Nach Abschütten des Überstandes wird der Vorgang einmal wiederholt.

Nach erneutem Abschütten des Überstandes, wird das Zellkonglomerat mit 150µl PBS wieder in Lösung gebracht („gewaschene SY-N“) und gut gevortext, bis eine homogene, leicht milchig weiße Lösung vorliegt, die Farbe ist von der Zellzahl abhängig. Dann werden von dieser 30µl in ein weiteres 5ml Falcon[®] Facs Röhren pipettiert und mit 270µl PBS verdünnt („verdünnte SY-N“), um sie, nach kurzem Vortexen, in einem automatischen Zellzählgerät (siehe Abb. 20) auszuwerten.



Abb. 20: Coulter A^CT 5diff AL[®]-Zellzählgerät der Firma Beckman Coulter

Ergibt die gemessene Gesamtzellzahl der Leukozyten nicht mehr als 5×10^6 Zellen/ml ($= 5 \times 10^3/\mu\text{l}$), ist eine folgende Auswertung der „verdünnte SY-N“ bezüglich Apoptose und Viabilität ohne weitere Verdünnung möglich. Falls der gemessene Wert zu hoch ist, muss die „verdünnte SY-N“ mit PBS unter den zuvor genannten Grenzwert verdünnt werden. Aus dieser Messung gehen außerdem die Daten bezüglich der Differentialzellzahl hervor, wobei man die Werte der Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten aufzeichnet (s. ANHANG - Zellzählungsauswertungsblatt).

Sobald die „verdünnte SY-N“ eine passende Leukozytenzahl aufweist, werden $100\mu\text{l}$ in ein neues 5ml Falcon® FACS Röhrchen pipettiert, mit $5\mu\text{l}$ FITC-Annexin-V (38) und mit $5\mu\text{l}$ 7-AAD (39) vermischt („gefärbte SY-N“), leicht gevortext und für 15min bei Dunkelheit und RT inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit (IZ) werden $400\mu\text{l}$ BB-WS hinzugegeben (38), wiederum gevortext und für weitere 5min inkubiert. In diesem Zustand kann die Lösung für maximal 1h bei Dunkelheit und RT gelagert werden, bevor sich Messveränderungen manifestieren können (38). Deshalb sollte die „gefärbte SY-N“ innerhalb dieser Zeitspanne an einem Durchflusszytometer ausgewertet werden.

Für die maschinelle Auswertung wird ein BD FACS Canto II Durchflusszytometer verwendet und die Aufbereitung der gemessenen Daten wird mittels einer BD FACSDiva Software Version 6.1.3. durchgeführt.

(s. ANHANG - Durchflusszytometerauswertungsblatt)



Abb. 21: Bild der BD FACS Canto II Einheit (40)

2.2.2. Zweite Fraktion

Die zweite Fraktion, die den Großteil der Probe (4/7) umfasst, wird halbiert und je ein Teil (2/7) wird in ein violettes 3ml Vacuette[®]-Röhrchen (s. Abb. 18) abgefüllt und gevortext, damit sich das an der Röhrchenwand haftende EDTA mit der Probe vermischen kann.

Eines der beiden wird bei RT (SY_{24RT}) und das andere bei 4°C (SY_{24K}) für 24h gelagert.

Am nächsten Tag (Tag_1) werden beide nach dem Schema der ersten Fraktion analysiert.

2.2.3. Dritte Fraktion

Die dritte und letzte Fraktion umfasst 1/7 der Probenmenge und wird ebenfalls halbiert und je in ein 5ml Falcon[®] Facs Röhrchen pipettiert. Jedem dieser Röhrchen wird eine aliquote Menge an HY-WS beigefügt. Eines wird bei RT (SY-WS_{24RT}) und das andere bei 4°C (SY-WS_{24K}) für 24h gelagert.

Am darauf folgenden Tag (Tag_1) werden beide Proben bearbeitet: GZZ, DZZ, Viabilität und Apoptose werden nach den oben beschriebenen Verfahren (s. Methoden 2.2.1.) ausgewertet.

3. Färbemethoden

3.1. FITC-Annexin-V Färbung (38)

3.1.1. Allgemein

Apoptose ist ein physiologischer Vorgang, der sowohl während der Embryonalentwicklung als auch in gesunden Geweben vorkommt. Der Ablauf der Apoptose ist durch spezielle Charakteristika gekennzeichnet, wie den Verlust der Zellmembranunregelmäßigkeit, den Verlust von Zellmembrananhängsel, Kondensation von Kern und Zytoplasma oder DNS-Brüchen.

3.1.2. Funktionsprinzip

Der Verlust der Zellmembranunregelmäßigkeit ist eines der ersten Anzeichen apoptotischer Zellen. Bei diesen Zellen ist das Zellmembran-Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite transloziert, wodurch PS der Zellumgebung zugänglich wird (s. Abb. 22). Diesen Effekt nutzt Annexin-V aus, da es ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes, 35-36kDa schweres Protein ist, das eine hohe Affinität zu PS aufweist und dadurch an apoptotische Zellen bindet. Annexin-V kann mit Fluorochromen, z.B. FITC kombiniert werden, um (früh)apoptotische Zellen durchflusszytometrisch zu erkennen.

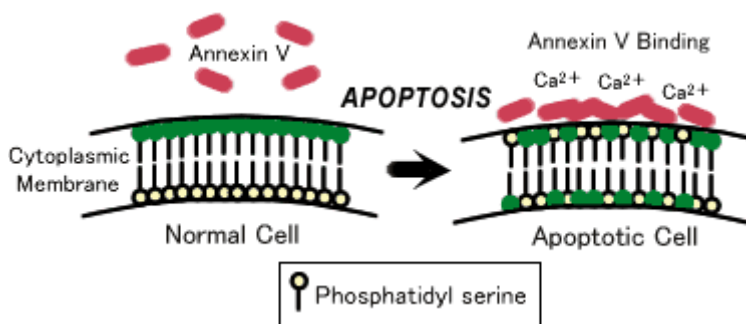


Abb. 22: Zellmembranveränderung als Annexin-V Bindungsstelle (41)

Dies ist der Vorteil gegenüber anderen Färbemethoden, die Zellkern- oder DNS-Veränderungen detektieren, welche erst in späteren Phasen der Apoptose auftreten. FITC-Annexin-V bindet bereits an Zellen bevor die Plasmamembranintegrität verloren geht, das letzte Stadium des Zelltods darstellt, egal ob durch Apoptose oder Nekrose verursacht. Deshalb wird die FITC-Annexin-V Färbemethode normalerweise mit einer Vitalfärbung wie Propidium-Jod (PI) oder 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) kombiniert, um

frühapoptotische Zellen von späteren Stadien der Apoptose abzugrenzen. Zum Beispiel sind gesunde Zellen sowohl FITC-Annexin-V als auch PI oder 7-AAD negativ, während frühapoptotische Zellen FITC-Annexin-V positiv und PI oder 7-AAD negativ sind und spätapoptotische Zellen sowohl FITC-Annexin-V als auch PI oder 7-AAD positiv sind. Diese Färbetechnik kann nicht unterscheiden, ob die Zellen einen apoptotischen oder nekrotischen Zelluntergang durchgemacht haben, da sich in beiden Fällen tote Zellen mit beiden Farbstoffen färben. Wenn man Apoptose in Abhängigkeit von der Zeit misst, kann man jedoch beobachten, dass Zellen von FITC-Annexin-V und PI oder 7-AAD negativ (viable Zelle, oder kein Nachweis von Apoptose messbar) zu FITC-Annexin-V positiv und PI oder 7-AAD negativ (frühapoptotisches Zellstadium; intakte Membranintegrität) und schlussendlich zu FITC-Annexin-V und PI oder 7-AAD positiv wechseln (endapoptotische oder tote Zelle) (s. Abb. 23). Das Durchschreiten dieser drei Stadien impliziert den Zelltod durch Apoptose. Im Gegensatz dazu kann eine einzelne Beobachtung nicht sagen, welchen Untergangsweg eine FITC-Annexin-V und PI oder 7-AAD positive Zelle durchgemacht hat.

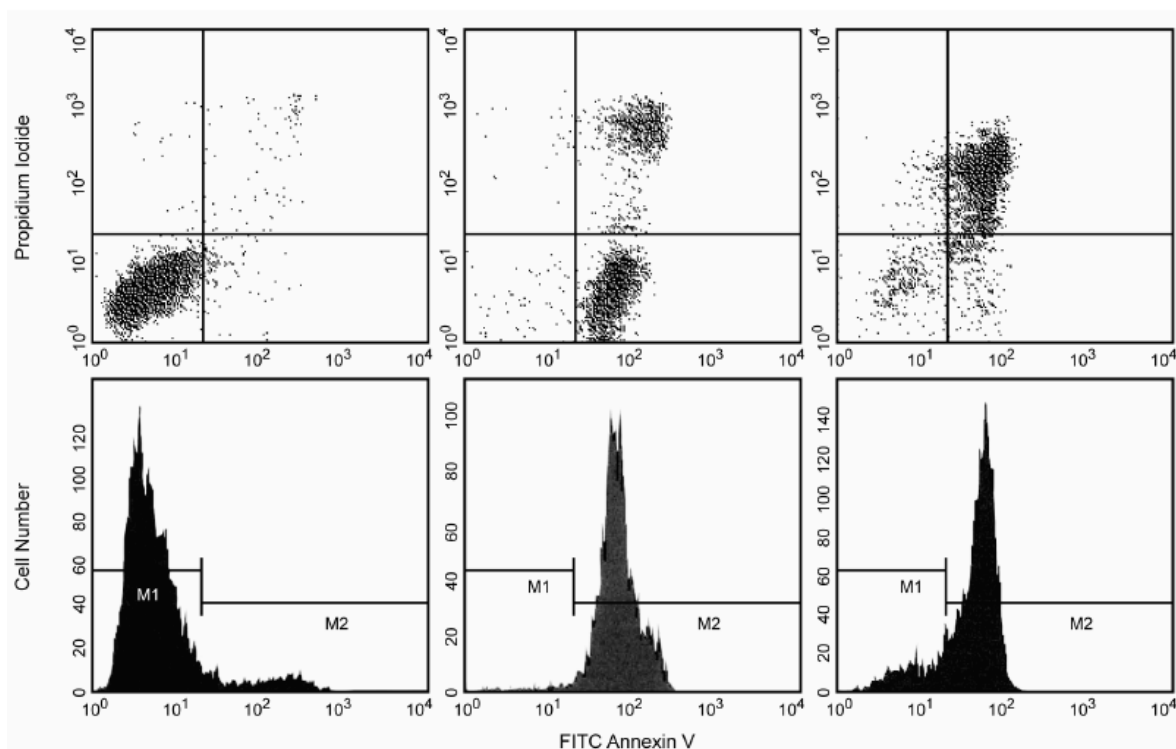


Abb. 23: FITC-Annexin-V, ein Werkzeug um apoptotische Zellen nachzuweisen

Linker unterer Quadrant: PI und FITC-Annexin-V negativ; viable Zellen.

Linker oberer Quadrant: PI positiv und FITC-Annexin-V negativ.

Rechter unterer Quadrant: PI negativ und FITC-Annexin-V positiv; frühapoptotische Zellen.

Rechter oberer Quadrant: PI und FITC-Annexin-V positiv; tote Zellen.

3.1.3. Verwendung

FITC-Annexin-V wird verwendet, um quantitativ den Prozentsatz von Zellen in einer Population zu bestimmen, der aktiv im Prozess der Apoptose steht. Als hilfreich wird die zusätzliche Verwendung eines standard durchflusszytometrischen Viabilitäts-Markers (PI oder 7-AAD) angesehen, um zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden.

3.1.4. Lagerung

FITC-Annexin-V wird bei 4°C gelagert, darf jedoch nicht gefrieren und eine längere Lichtexposition sollte vermieden werden.

3.1.5. Färbung

1. Probe zweimal mit kaltem PBS waschen und danach mit Binding-Buffer auf eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml auftitrieren.
2. 100µl dieser Zelllösung in ein 5ml Kultur-Röhrchen abfüllen
3. 5µl FITC-Annexin-V hinzufügen
4. 5µl 7-AAD oder 10µl PI hinzufügen
5. leicht vortexen und für 15 Minuten bei 25°C und Dunkelheit inkubieren.
6. Danach 400µl Binding-Buffer ergänzen und innerhalb 1 Stunde mit einem Durchflusszytometer analysieren.

3.2. 7-AAD Färbung (39)

3.2.1. Allgemein

7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD) ist eine praktische, direkt verwendbare Nukleinsäure-Färbemethode, die Anstelle von Propidium Jod (PI) verwendet werden kann, um nicht-viable bzw. tote Zellen bei durchflusszytometrischen Messungen nachzuweisen. Der Vorteil von 7-AAD gegenüber PI ist, dass man es in Kombination mit Phycoerythrin (PE) oder Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markierten monoklonalen Antikörpern verwenden kann. Hierbei entsteht nur eine minimale spektrale Überlappung zwischen der fluoreszierenden Emission von 7-AAD, PE, und FITC. Die Ausstrahlung von 7-AAD wird im Rotanteil des Farbspektrums bei 650nm mit einem „long-pass“ Filter gemessen.

3.2.2. Färbung

1. Probe zweimal mit kaltem PBS waschen und danach mit Binding-Buffer auf eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml auftitrieren.
2. 100µl dieser Lösung in ein 5ml Kultur-Röhrchen abfüllen
3. 5µl 7-AAD hinzufügen
4. Leicht vortexen und für 10 Minuten bei 25°C und Dunkelheit inkubieren.
5. Danach 400µl Binding-Buffer ergänzen und innerhalb 1 Stunde mit einem Durchflusszytometer analysieren.

3.2.3. Zubereitung

Das Reagenz wird in anwendungsfertiger Form geliefert und benötigt keine weitere Aufbereitung. Es wurde für folgendes Anwendungsverfahren geeicht:

5µl 7-AAD werden mit 100µl Probe gemischt und vor der Analyse für 10 Minuten inkubiert. Die Probe sollte eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml aufweisen.

3.2.4. Lagerung

7-AAD wird bei 4°C gelagert, darf jedoch nicht gefrieren und eine längere Lichtexposition sollte vermieden werden.

3.2.5. Sicherheitshinweise

7-AAD ist eine potentiell kanzerogene Substanz, weshalb passende Schutzkleidung, wie z.B. Schutzbrille oder Handschuhe, erforderlich ist und der Kontakt mit bloßer Haut oder Schleimhaut zu vermeiden ist.

4. Messmethoden

4.1. Durchflusszytometer

4.1.1. Allgemein

Die Durchflusszytometrie ist heutzutage eine häufig genutzte Methode, um Zelloberflächenstrukturen und intrazelluläre Moleküle zu detektieren oder unterschiedliche Zelltypen und Zellpopulationen zu charakterisieren. Hauptsächlich wird diese Technik aber zur Fluoreszenz-Intensitätsmessung genutzt, wobei Fluoreszenz-markierte Antikörper, Proteine oder Liganden, auch Fluorochrome genannt, verwendet werden, die an spezifische Zell-assoziierte Moleküle binden, wie z.B. Propidium Jod (PI), das an DNS bindet (42). Die wichtigste Funktion ist aber, dass eine sehr große Anzahl von Zellen, 100.000 und mehr, pro Minute (in Echtzeit) analysiert werden können. Hierbei werden pro Zelle über die Streulicht- und Fluoreszenzsignale bis zu 16 zellspezifische Parameter gemessen (16 optische Parameter plus 65 gerechnete Parameter inkl. Zeit). Das Detektionslimit beträgt etwas weniger als 100 fluoreszierende Moleküle pro Zelle (43, 44).

4.1.2. Färbung (42)

Für das Färbeverfahren wird eine Zellsuspension angesetzt, der man unmarkierte oder fluoreszenz-markierte Antikörper oder andere Fluorochrome beimengt. Nach einer Inkubationsphase wird noch vor der Messung ein Puffer hinzugefügt, um ein optimales Messergebnis zu erzielen.

- Direkte Färbung:

Bei der direkten Immunofluoreszenzfärbung werden Zellen mit einem Antikörper inkubiert, der direkt mit einem Fluorochrom verbunden ist (z.B. FITC). Das hat den Vorteil, dass nur ein Inkubationsschritt notwendig ist und, dass die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Bindung eines sekundären Antikörpers ausgeschlossen ist. Das ist vor allem bei intrazellulären Färbemethoden nützlich, da große Antikörper-Fluorochrom-Komplexe mit mehreren Antikörpern leichter unspezifische Bindungen eingehen, oder sogar unfähig sind in die Zelle einzudringen und somit der Messung entgehen.

- Indirekte Färbung:

Bei dieser Färbung ist der primäre Antikörper nicht an ein Fluorochrom gebunden, aber er wird durch einen sekundären, Fluorochrom-gekoppelten Antikörper detektiert. Durch diese Methode und der heutzutage großen Auswahl an

konjugierten sekundären Antikörpern öffnet sich dem Untersucher eine Fülle an untersuchbaren Proteinen. Alternativ kann man das Avidin-Biotin-Verfahren nutzen, bei dem ein Antikörper mit Biotin verknüpft wird. Dieser Antikörper-Biotin-Komplex wird durch ein Fluorochrom-markiertes Avidin aufgespürt.

- Intrazelluläre Färbung:

Diese Markierungsart beruht auf verschiedenen Fixations- und Permeabilisationsarten, womit intrazelluläre Strukturen detektierbar gemacht werden.

4.1.4. Auswahl eines Fluorochroms (42)

Der Erfolg einer Messung ist auch von der Wahl eines geeigneten Fluorochroms abhängig. Folgend eine allgemeine Auflistung von Fluorochromen nach ihrer relativen Intensität, vom hellsten Fluorochrom absteigend:

PE , PE-Cy7 , PE-Cy5 , APC > APC-Cy7 , Alexa Fluor 47 , Alexa Fluor 700 > FITC , Pacific Blue , Alexa fluor 488 , etc.

Ein hochexprimiertes Antigen kann mit den meisten Fluorochromen messbar gemacht werden, aber ein sehr gering exprimiertes Antigen braucht eine hohe Signalstärke, welche durch ein „helleres“ Fluorochrom gewährleistet ist, um die gefärbten Zellen von den ungefärbten zu unterscheiden.

Darüber hinaus wird die relative Intensität eines Fluorochroms auch vom verwendeten Durchflusszytometer beeinflusst, da Unterschiede in den Laser-Filter-Kombinationen bei verschiedenen Geräten bestehen.

4.1.3. Funktionsprinzip (42, 44)

Während der Analyse im Durchflusszytometer wird die Probe hydrodynamisch, mittels einer „sheath“-Flüssigkeit, durch eine sehr kleine Öffnung („nozzle“) gelenkt. Dadurch entsteht ein sehr feiner Flüssigkeitsstrahl, der jede Zelle einzeln einen Laserstrahl passieren lässt. Die einzelnen Zellen streuen den Lichtstrahl unterschiedlich, abhängig von ihrem Phänotyp. Weiters gibt es einige Detektoren, die das durch die Zellen gestreute Licht des Laserstrahls auffangen. Einer ist direkt vor dem Laserstrahl („forward scatter“ oder FSC) und mehrere sind zu dessen Seiten („side scatter“ oder SSC) angebracht (s. Abb. 24).

Der FSC korreliert mit der Größe der gemessenen Zelle und die SSC mit deren Dichte, z.B. der Anzahl von Granula. Bereits durch diese Analyse können viele Zellpopulationen von einander unterschieden werden.

Fluorochrome, die zur Färbung von Zellsuspensionen verwendet werden, emittieren Licht, sobald sie von einem Laserstrahl passender Wellenlänge bestrahlt werden. Zur Messung dieses emittierten Lichts gibt es spezielle Fluoreszenz-Detektoren, die eine unabhängige Zell-Analyse zulassen. Bei der Auswertung werden die Messdaten aller Detektoren kombiniert, um eine genaue Zellanalyse zu erhalten.

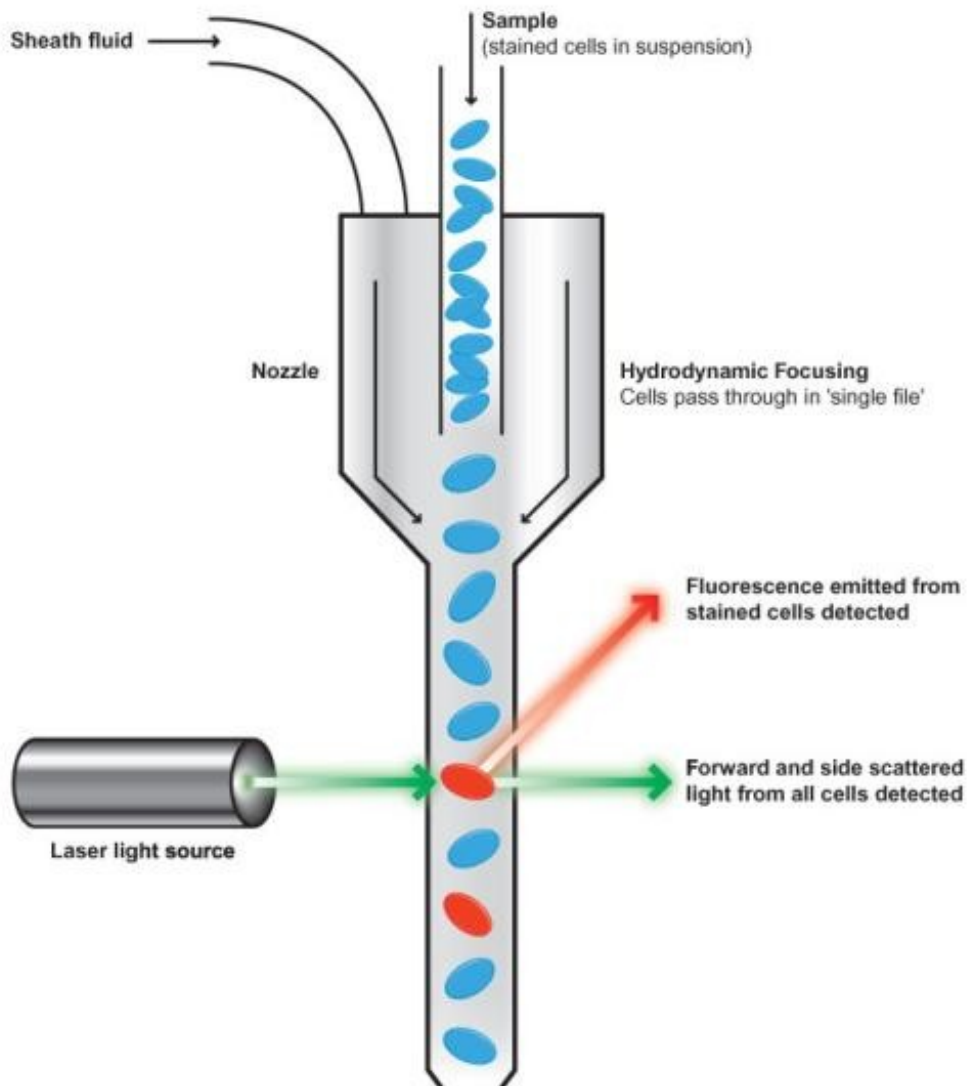


Abb. 24: Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers (42)

4.2. Automatischer Zellanalysator (45)

4.2.1. Allgemein

Ein automatischer Zellanalysator ist ein Laborgerät, das eine große Menge an Proben schnell und mit minimaler menschlicher Unterstützung analysiert.

Verschiedene Methoden der Zuführung von Proben wurden entwickelt, aber normalerweise wird ein mit Probenröhrchen bestücktes Karussell verwendet, das durch Rotation einen Probenwechsel vollzieht. Um die Gesundheit des Laborpersonals zu schützen und deren Sicherheit zu verbessern, gibt es auch Systeme, die mit geschlossenen Probenröhrchen arbeiten.

4.2.2. Zellzähler („cell counter“)

Zellzählgeräte nutzen optische und elektrische Techniken, um die verschiedenen Zellpopulationen aus dem Blut zu analysieren:

- Für die elektrische Analyse benötigt man eine verdünnte Lösung des Blutes. Diese wird durch eine Apparatur, die unter elektrischer Spannung steht, gepumpt. Die Bewegung von Zellen durch dieses elektrische Feld verändert die Impedanz zwischen den Detektoren (= „Coulter-Prinzip“). Um eine Differenzierung zwischen Leukozyten (weiße Blutkörperchen oder WBC) und Erythrozyten (rote Blutkörperchen oder RBC) zu erhalten, wird eine lytische Substanz der Blutlösung beigelegt, um selektiv nur die Erythrozyten zu zerstören. Dadurch verbleiben allein die Leukozyten und die Thrombozyten. Diese werden wiederum durch ein elektrisches Feld gelenkt, wobei man die Thrombozyten, aufgrund ihres geringeren Volumens, anhand der kleineren Impedanzausschläge („impedance spikes“) von den Leukozyten unterscheiden kann.
- Die optische Messung dient der Differenzierung der Populationen der Leukozyten. Eine verdünnte Zelllösung wird durch eine schmale Röhre gepumpt, sodass die Zellen einzeln einen Laserstrahl passieren. Die Reflexion, Transmission und Streuung des Laserlichts wird aufgefangen und analysiert, wodurch die Zellen den verschiedenen Populationen der Leukozyten zugeordnet werden können. Eine geeignete Software verarbeitet die gesammelten Daten und gibt repräsentative Absolutzahlen wieder.

Retikulozytenzählungen können auch durchgeführt werden, jedoch überwiegen die manuellen, mikroskopischen Auszählungen durch das Laborpersonal.

ERGEBNISSE

1. Gesamt-Leukozytenzahl

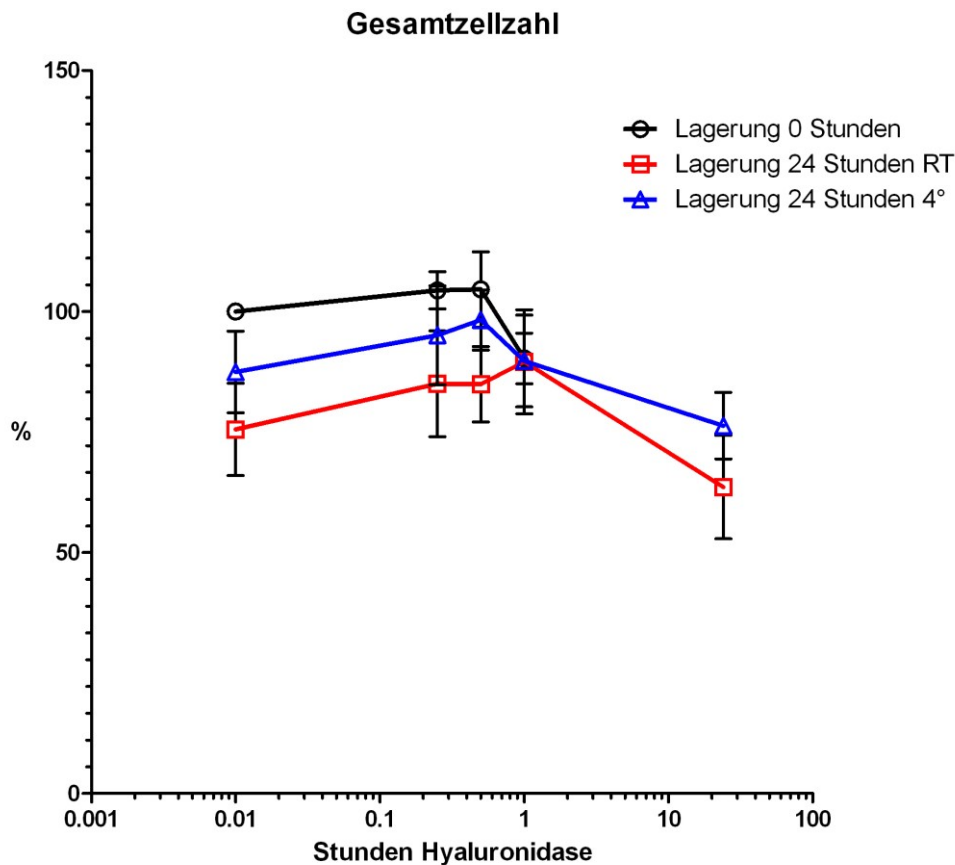


Abb. 25: Veränderungen der Anzahl der Leukozyten (%; bezogen auf die Kontrollprobe) im Verlauf der Probenbehandlung

1.1. 0h - Lagerung

Die Probenanteile, die am Tag_0, dem Punktionstag, analysiert wurden, zeigen bei den IZ 0,25h [SY-WS₁₅] bzw. 0,5h [SY-WS₃₀] eine minimale Gesamtleukozytenzahlvermehrung und zwar auf 104,41% ($\pm 3,87$) bzw. 104,59% ($\pm 7,83$) bezogen auf die Ausgangsprobe (SY-N; 100%). Bei längerer Inkubation, 1h, sinkt die Gesamtzellzahl aber wieder auf 90,28% ($\pm 5,23$) [SY-WS₆₀].

1.2. 24h - Lagerung bei RT

Die Lagerung über 24h in einem EDTA-beschichteten Röhrchen bei RT wirkt sich negativ auf die Gesamtleukozytenzahl aus. Ohne Inkubation und Zugabe von HY zeigen diese

Proben [SY_{24RT}] eine Zellzahlreduktion auf 75,57% ($\pm 9,57$). Diese Verminderung verbessert sich durch HY und die Prozentwerte steigen mit der Dauer der Inkubation (0,25h: 85,02% $\pm 10,98$ [SY_{24RT-WS15}]; 0,5h: 84,93% $\pm 7,83$ [SY_{24RT-WS30}]).

Zum Unterschied zu den anderen Lagerungsformen, die ab einer Inkubation von 1h einen erneuten Zellzahlverlust verzeichnen, wird hier bei einstündiger Inkubation[SY_{24RT-WS60}] sogar ein Zellzahloptimum von 89,58% ($\pm 10,79$) erreicht.

1.3. 24h - Lagerung bei 4°C

Die Lagerung über 24h in einem EDTA-beschichteten Röhrchen bei 4°C [SY_{24K}] verursacht ebenfalls einen Gesamtzellzahlverlust (87,47%; $\pm 8,45$), folgt aber bei der weiteren Behandlung dem Verlauf der Ausgangsprobe: Bei den ersten beiden IZ, 0,25h [SY_{24K-WS15}] und 0,5h [SY_{24K-WS30}], kann ein leichter Zellzuwachs gemessen werden, 95,08% ($\pm 10,29$) und 98,28% ($\pm 6,25$), wobei dieser ab 1h Inkubation wieder sinkt 89,74% ($\pm 9,52$) [SY_{24K-WS60}].

1.4. 24h - HY bei RT

Die Einlagerung eines Synovia-Hyaluronidase(SY-HY)-Gemisches für 24h bei RT [SY-WS_{24RT}] hat einen 37%igen Gesamtzellzahlverlust (63,59% $\pm 10,73$) zur Folge.

1.5. 24h - HY bei 4°C

Die Einlagerung eines SY-HY-Gemisches für 24h bei 4°C [SY-WS_{24K}] hat nur einen Gesamtzellzahlverlust rund 24% (76,31% $\pm 6,90$) zur Folge.

Tabellarische Darstellung der Abbildung 25.:

h HY	Gesamtleukozytenzahl								
	Lagerung 0h			Lagerung 24h RT			Lagerung 24h 4C°		
	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N
0	100,00	0,00	10	75,57	9,57	10	87,47	8,45	10
0,25	104,41	3,87	10	85,02	10,98	10	95,08	10,29	10
0,5	104,59	7,83	10	84,93	7,83	10	98,28	6,25	10
1	90,28	5,23	10	89,58	10,79	10	89,74	9,52	10
24				63,59	10,73	8	76,31	6,90	10

Tab. 6: Leukozyten - Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts und Anzahl der gemessenen Daten sortiert nach spezifischer Lagerung und Inkubation

2. Granulozytenzahl

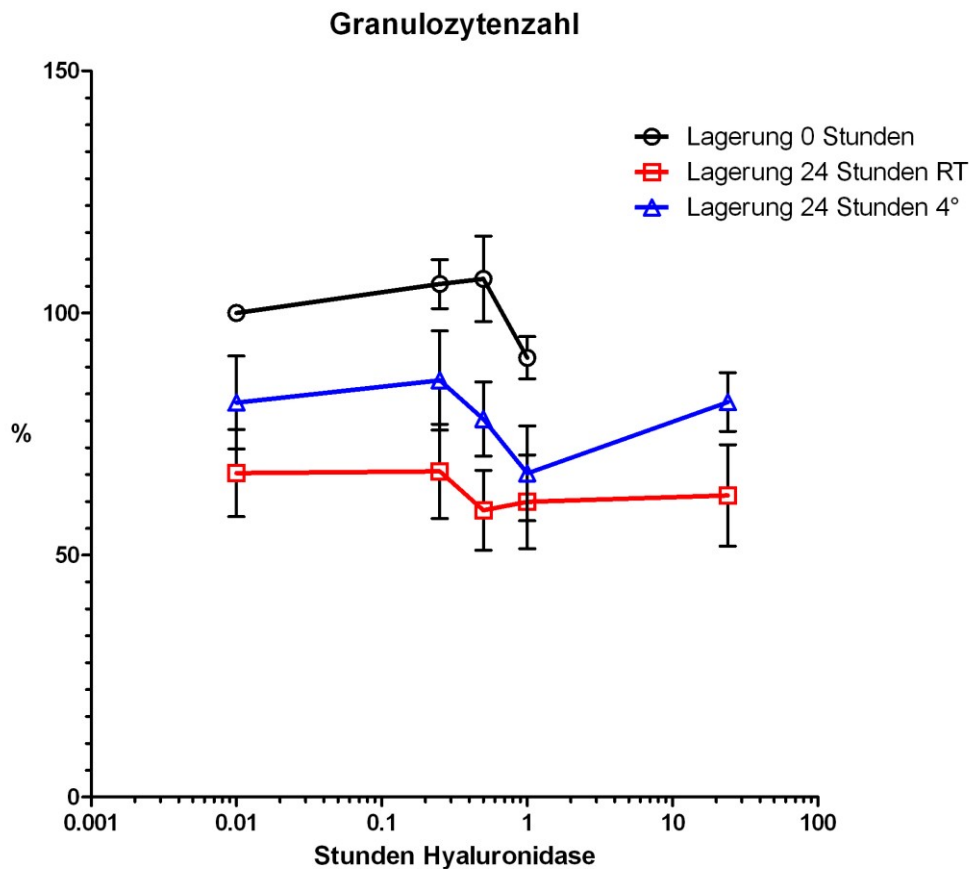


Abb. 26: Veränderungen der Anzahl der Granulozyten (%; bezogen auf die Kontrollprobe) im Verlauf der Probenbehandlung

2.1. 0h - Lagerung

Der Verlauf der Granulozytenzahl am Tag₀ der Analyse verhält sich synchron zu dem der Gesamtzellzahl. Es ist nämlich bei den ersten beiden IZ, 0,25h bzw. 0,5h, ein minimaler Zellzuwachs zu verzeichnen, 105,97% ($\pm 5,05$) bzw. 107,06% ($\pm 8,84$), der aber nach 1h Inkubation in eine Zellzahlverminderung (90,77% $\pm 4,35$) umschlägt.

2.2. 24h - Lagerung bei RT

Eine Aufbewahrung über 24h in einem EDTA-beschichteten Röhrchen bei RT hat zunächst eine Granulozytenzellabnahme von mehr als 30% zur Folge (66,94% $\pm 8,99$). Nach Zugabe von HY und 0,25h Inkubation bei 37°C kann ein unbedeutender Zellzuwachs

(67,29% ± 9,73) detektiert werden, der nach weiterer Inkubation, 0,5h bzw. 1h, in einen deutlichen Zellverlust, 59,26% (± 8,26) bzw. 60,98% (± 9,69), umschlägt.

2.3. 24h - Lagerung bei 4°C

Eine Aufbewahrung über 24h in einem EDTA-beschichteten Röhrchen bei 4°C führt zu einer Abnahme der Granulozytenzahl auf 81,5% (± 9,62) im Vergleich zur sofortigen Analyse. Im Laufe der weiteren Behandlung der Proben zeigt sich zunächst nach 0,25h Inkubation eine kleine Zellzahlvermehrung (86,07% ± 10,24), die jedoch bei den anderen zwei Messzeitpunkten, 0,5h bzw. 1h, nicht mehr nachgewiesen werden kann und sich sogar in eine Zellzahlverminderung von bis zu 22% umwandelt (78,10% ± 7,65 bzw. 66,88% ± 9,80).

2.4. 24h - HY bei RT

Die Einlagerung eines SY-HY-Gemisches für 24h bei RT hat einen Granulozytenzellzahlverlust von über 35% (62,31% ± 10,49) zur Folge.

2.5. 24h - HY bei 4°C

Die Einlagerung eines SY-HY-Gemisches für 24h bei 4°C hat einen fast 20%igen Granulozytenzellzahlverlust (81,61% ± 6,06) zur Folge.

Tabellarische Darstellung der Abbildung 26.

Granulozytenzahl									
h HY	Lagerung 0h			Lagerung 24h RT			Lagerung 24h 4°C		
	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N
0	100,00	0,00	10	66,94	8,99	8	81,50	9,62	9
0,25	105,97	5,05	9	67,29	9,73	9	86,07	10,24	10
0,5	107,06	8,84	9	59,26	8,26	10	78,10	7,65	9
1	90,77	4,35	9	60,98	9,69	9	66,88	9,80	9
24				62,31	10,49	7	81,61	6,06	9

Tab. 7: Granulozyten - Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts und Anzahl der gemessenen Daten sortiert nach spezifischer Lagerung und Inkubation

3. Monozytenzahl

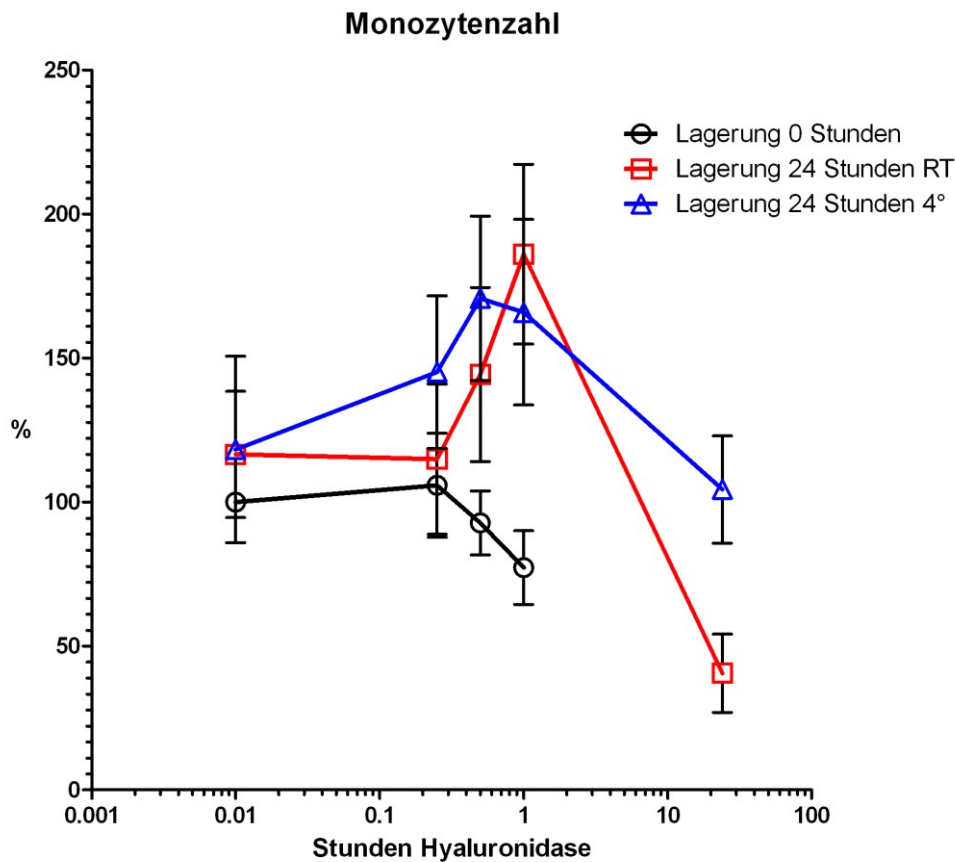


Abb. 27: Veränderungen der Anzahl der Monozyten (%; bezogen auf die Kontrollprobe) im Verlauf der Probenbehandlung

3.1. 0h - Lagerung

Die Veränderung der Monozytenzahl verhält sich am Tag_0 ähnlich der Veränderung der Granulozyten- oder Gesamtzellzahl. Nach anfänglicher Vermehrung (0,25h: 105% ± 18,08) pendelt sich ein konsequenter Abwärtstrend ein, der mit der Dauer der Inkubation zusammenhängt (0,5h: 92,78% ± 11,14; 1h: 77,25% ± 12,78).

3.2. 24h - Lagerung bei RT

Alleine die Lagerung einer Probe über 24h in einem EDTA-beschichteten Röhrchen bei RT führt zu einer fast 17%igen Erhöhung der Monozytenzahl (116,54% ± 21,91). Durch die Zugabe von HY kann, nach anfänglicher Stagnation (0,25h: 114,90% ± 16,15), die Zellzahl fast auf das Doppelte des Ausgangswerts (1h: 186,10% ± 31,20) erhöht werden.

3.3. 24h - Lagerung bei 4°C

Auch die Lagerung über 24h in einem EDTA-beschichteten Röhrchen bei 4°C führt zu einem ähnlichen Effekt, wie bei RT, nämlich einer 18%igen Steigerung der Ursprungszellzahl ($118\% \pm 32,35$). Die weitere Zellzahlerhöhung durch Hyaluronidasezugabe ist bereits nach 0,25h Inkubation messbar ($145,15\% \pm 26,43$), jedoch steigt sie nicht in solche Höhen (0,5h: $170,74\% \pm 28,55$) und fällt nach 1h wieder etwas ab ($165,95\% \pm 32,25$).

3.4. 24h - HY bei RT

Die Einlagerung eines SY-HY-Gemisches für 24h bei RT hat einen Monozytenverlust von über 59% ($40,51\% \pm 13,59$) zur Folge.

3.5. 24h - HY bei 4°C

Die Einlagerung eines SY-HY-Gemisches für 24h bei 4°C führt zu einer Monozytenzahlvermehrung von 4% ($104,37\% \pm 18,66$).

Tabellarische Darstellung der Abbildung 27.

Monozyten									
h HY	Lagerung 0h			Lagerung 24h RT			Lagerung 24h 4°C		
	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N
0	100,00	0,00	10	116,54	21,91	8	118,27	32,35	10
0,25	105,84	18,08	10	114,90	26,15	9	145,15	26,43	10
0,5	92,78	11,14	10	144,28	30,25	10	170,74	28,55	10
1	77,25	12,78	10	186,10	31,20	9	165,92	32,25	10
24				40,51	13,59	7	104,37	18,66	10

Tab. 8: Monozyten - Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts und Anzahl der gemessenen Daten sortiert nach spezifischer Lagerung und Inkubation

4. Lymphozyten

4.1. Zellzahl

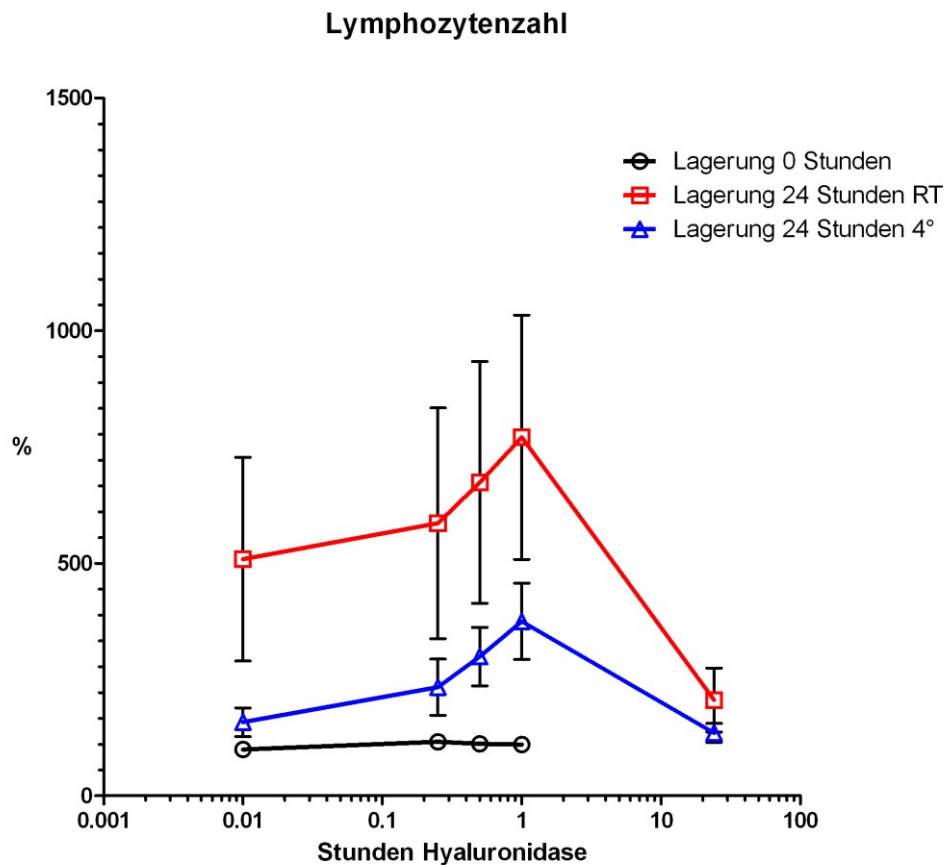


Abb. 28: Veränderungen der Anzahl der Lymphozyten (%; bezogen auf die Kontrollprobe) im Verlauf der Probenbehandlung

4.1.1. 0h - Lagerung

Die Zugabe von HY zu nativer Synovia erhöht die messbare Lymphozytenzahl um mindestens 10%. Die Dauer der Inkubation bestimmt dabei die Höhe der Veränderung. Nach 0,25h ist der Benefiz am Höchsten ($116,18\% \pm 11,72$), jedoch fällt er bei 0,5h auf $111,75\% (\pm 6,65)$, um nach 1h weiter abzufallen ($110,54\% \pm 8,43$).

4.1.2. 24h - Lagerung bei RT

Die Aufbewahrung einer Probe über 24h in einem EDTA-beschichteten Röhrchen bei RT erhöht die Lymphozytenzahl um das Fünffache ($508,71\% \pm 219,10$). Durch die Zugabe von HY steigen die Werte weiter an (0,25h: $585,98\% \pm 247,96$; 0,5h: $673,63\% \pm 260,10$),

bis zu einem Maximum – nach 1h Inkubation – das fast das Achtfache des Ausgangswertes erreicht ($770,99\% \pm 262,44$).

4.1.3. 24h - Lagerung bei 4°C

Die Aufbewahrung über 24h in einem EDTA-beschichteten Röhrchen bei 4°C ergibt ein simultanes Muster wie bei RT, jedoch sind diese Messwerte um ca. 50% niedriger und ihre Spannbreite ebenfalls geringer ist. Die alleinige Lagerung führt zu einer ca. 60%igen Zellzahlerhöhung ($158,28\% \pm 31,13$), die nach Hyaluronidasezugabe und während der Inkubation stetig ansteigt (0,25h: $233,50\% \pm 60,33$; 0,5h: $299,35\% \pm 62,83$).

Das Zellzahlmaximum ($375,20\% \pm 81,95$) tritt genau wie bei RT-Lagerung nach 1h IZ auf.

4.1.4. 24h - HY bei RT

Die Einlagerung eines SY-HY-Gemisches für 24h bei RT führt zu einer Verdopplung der Lymphozytenzahl ($205,93\% \pm 68,57$).

4.1.5. 24h - HY bei 4°C

Die Einlagerung eines SY-HY-Gemisches für 24h bei 4°C lässt eine 35%ige Lymphozytenzahlerhöhung ($135,31\% \pm 20,44$) verzeichnen.

Tabellarische Darstellung der Abbildung 28.

Zellzahl									
h HY	Lagerung 0h			Lagerung 24h RT			Lagerung 24h 4°C		
	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N
0	100,00	0,00	10	508,71	219,10	8	158,28	31,13	10
0,25	116,18	11,72	10	585,98	247,96	9	233,50	60,33	10
0,5	111,75	6,65	10	673,63	260,10	10	299,35	62,83	10
1	110,54	8,43	10	770,99	262,44	9	375,20	81,95	10
24				205,93	68,57	7	135,31	20,44	10

Tab. 9: Lymphozyten - Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts und Anzahl der gemessenen Daten sortiert nach spezifischer Lagerung und Inkubation

4.2. Viabilität

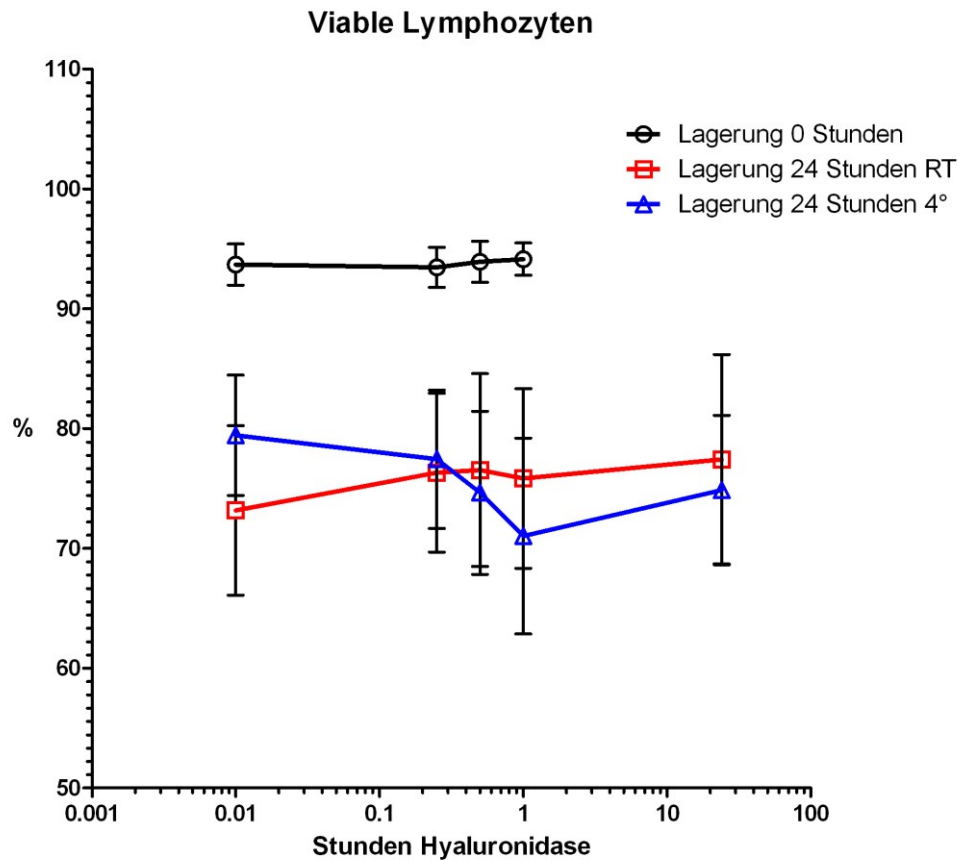


Abb. 29: Veränderungen der Anzahl der viablen Lymphozyten (%) im Verlauf der Probenbehandlung

4.2.1. 0h - Lagerung

Die Viabilität von Synoviallymphozyten (SY-LY) ändert sich am Tag_0 kaum. Sie wird weder durch die Zugabe von HY, noch von der Dauer der Inkubation beeinflusst.

Der durchschnittliche Ausgangswert ($93,69\% \pm 1,71$), das heißt, die Viabilität nativer, lediglich eingefärbter SY-LY, wird nur unbedeutend, im Promillebereich, während der Probenbehandlung verändert (s. Tab. 10).

4.2.2. 24h - Lagerung bei RT

Die Lagerung über 24h in einem EDTA-beschichteten Röhrchen bei RT hat dagegen eindeutig negative Auswirkungen auf die Viabilität, da diese durch die reine Aufbewahrung auf $73,17\% (\pm 7,07)$ reduziert wird, ein Defizit von fast 22%. Durch die Zugabe von HY kann eine dezente Verbesserung erzielt werden (0,25h: $76,33\% \pm 6,63$), die sich bei IZ bis 1h ($75,84\% \pm 7,50$) aufrechterhält.

4.2.3. 24h - Lagerung bei 4°C

Wegen der Lagerung über 24h in einem EDTA-beschichteten Röhrchen bei 4°C sinkt die Lymphozytenviabilität auf 79,43% ($\pm 5,02$). Durch die Behandlung mit HY wird dieser Viabilitätsverlust noch verstärkt (0,25h: 77,44% $\pm 5,77$), wobei mit der Dauer der Inkubation die Verlustrate weiter steigt (1h: 74,65% $\pm 6,81$).

4.2.4. 24h - HY bei RT

Die Einlagerung eines SY-HY-Gemisches über 24h bei RT führt zu einer 17%igen Viabilitätsreduktion der SY-LY (77,44% $\pm 8,74$).

4.2.5. 24h - HY bei 4°C

Die Einlagerung eines SY-HY-Gemisches über 24h bei 4°C führt zu einer 20%igen Viabilitätsreduktion der SY-LY (74,87% $\pm 6,23$).

Tabellarische Darstellung der Abbildung 29.

Viabilität									
h HY	Lagerung 0h			Lagerung 24h RT			Lagerung 24h 4°C		
	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N
0	93,69	1,71	10	73,17	7,07	10	79,43	5,02	10
0,25	93,45	1,68	10	76,33	6,63	10	77,44	5,77	10
0,5	93,92	1,72	10	76,54	8,05	10	74,65	6,81	10
1	94,14	1,34	10	75,84	7,50	10	71,03	8,17	10
24				77,44	8,74	8	74,87	6,23	10

Tab. 10: Viabilität - Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts und Anzahl der gemessenen Daten sortiert nach spezifischer Lagerung und Inkubation

4.3. Apoptose

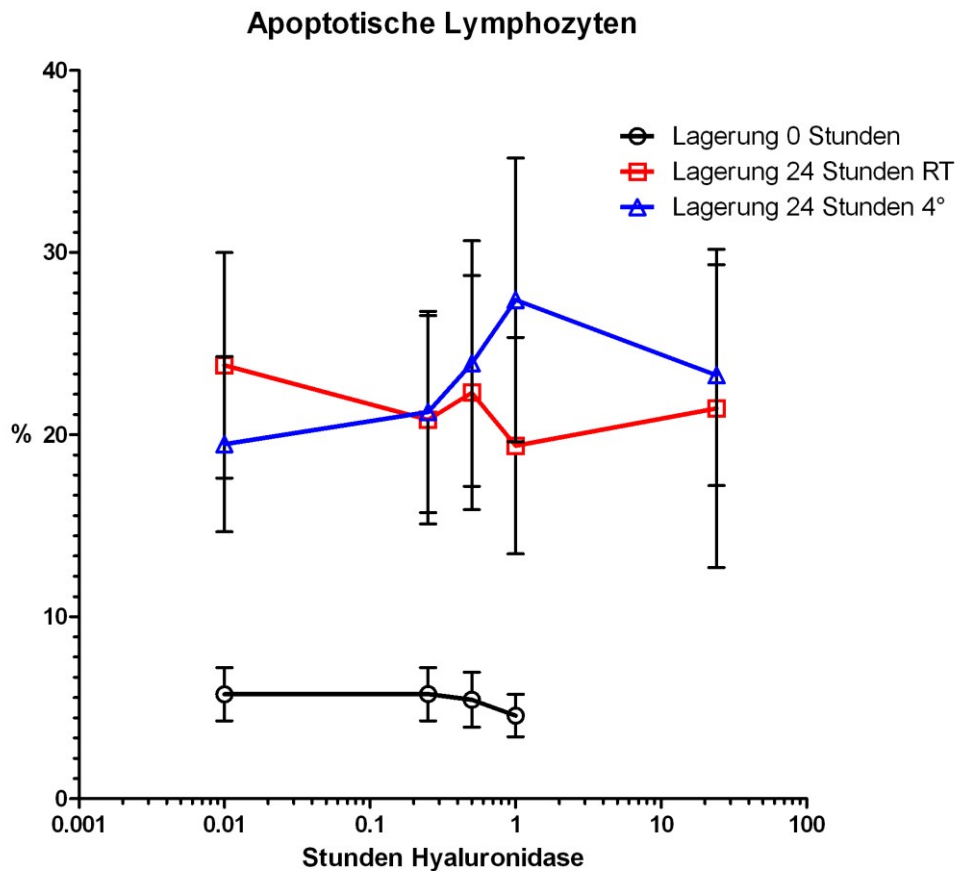


Abb. 30: Veränderungen der Anzahl der apoptotischen Lymphozyten (%) im Verlauf der Probenbehandlung

4.3.1. 0h - Lagerung

Die Lymphozytenapoptoserate bei frisch punktierter, lediglich eingefärbter Synovia beträgt 5,74% ($\pm 1,46$). Dieser Anteil verändert sich nur minimal während der weiteren Probenbehandlung, wobei man einen leichten Abwärtstrend der Apoptosequote feststellen kann, der mit der Länge der Inkubation zusammenhängt (s. Abb. 30 bzw. Tab. 11)

4.3.2. 24h - Lagerung bei RT

Die Aufbewahrung von GF über 24h in einem EDTA-beschichteten Röhrchen bei RT hat einen Anstieg der Apoptosequote von über 300%, auf 23,80% ($\pm 6,19$), zur Folge. Durch HY kann der apoptotische Lymphozytenanteil reduziert werden (0,25h: 20,81% $\pm 5,72$). Darüber hinaus führt eine Inkubation von 1h zur besten Reduktion (19,39% $\pm 5,94$).

4.3.3. 24h - Lagerung bei 4°C

Die Aufbewahrung von GF über 24h in einem EDTA-beschichteten Röhrchen bei 4°C verursacht annähernd eine Vervierfachung ($19,47\% \pm 4,81$) der Ausgangsapoptoserate ($5,74\% \pm 1,46$). In diesem Fall führt HY zu einem stetigen Anstieg der apoptotischen LY, abhängig von der Dauer der Inkubation (s. Abbildung 30 bzw. Tabelle 11).

4.3.4. 24h - HY bei RT

Die Einlagerung eines SY-HY-Gemisches über 24h bei RT führt zu einem $21,44\%$ ($\pm 8,74$) hohem Anteil apoptotischer LY.

4.3.5. 24h - HY bei 4°C

Die Einlagerung eines SY-HY-Gemisches über 24h bei 4°C führt zu einem $23,26\%$ ($\pm 6,07$) hohem Anteil apoptotischer LY.

Tabellarische Darstellung der Abbildung 30.

Apoptose									
h HY	Lagerung 0h			Lagerung 24h RT			Lagerung 24h 4°C		
	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N
0	5,74	1,46	10	23,80	6,19	10	19,47	4,81	10
0,25	5,75	1,46	10	20,81	5,72	10	21,24	5,53	10
0,5	5,44	1,51	10	22,30	6,43	10	23,90	6,74	10
1	4,57	1,16	10	19,39	5,94	10	27,39	7,80	10
24				21,44	8,74	8	23,26	6,07	10

Tab. 11: Apoptose - Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts und Anzahl der gemessenen Daten sortiert nach spezifischer Lagerung und Inkubation

4.4. Nekrose

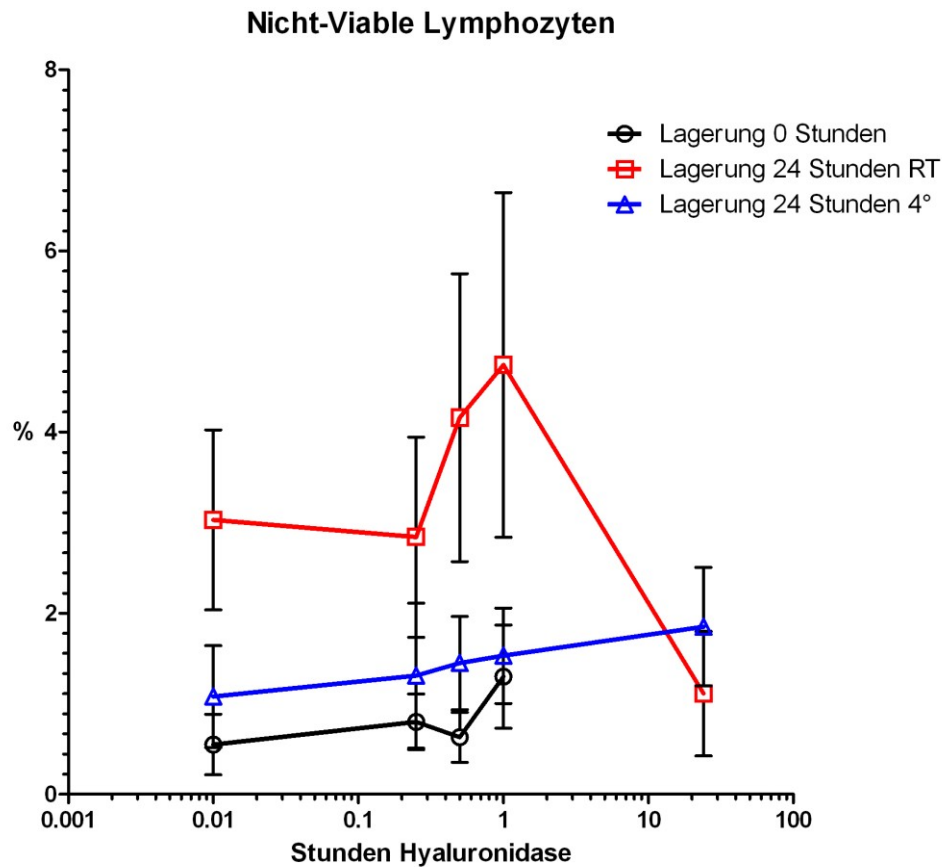


Abb. 31: Veränderungen der Anzahl der nicht-viablen Lymphozyten (%) im Verlauf der Probenbehandlung

4.4.1. 0h - Lagerung

Die Höhe des Anteils an toten Zellen einer nativen GF-Probe beträgt im Durchschnitt 0,55% ($\pm 0,33$). Durch die Behandlung mit HY steigt dieser Zahlenwert in Zusammenhang mit der Länge der Inkubation an. Eine Ausnahme stellt der 0,5h-Wert (0,63% $\pm 0,28$), da dieser ein niedrigeres Resultat aufweist als der 0,25h-Wert (0,80% $\pm 0,31$). Der 1h-Wert hingegen folgt dem Schema und erreicht fast die 1,5%-Marke (1,30% $\pm 0,57$).

4.4.2. 24h - Lagerung bei RT

Durch die Lagerung über 24h in einem EDTA-beschichteten Röhrchen bei RT wird die Rate der nicht-viablen GF-LY auf 3,03% ($\pm 0,99$) angehoben. Durch HY kann, bei 0,25h Inkubation, zunächst eine Reduktion auf 2,84% ($\pm 1,11$) bewirkt werden, jedoch schlägt dieser Trend nach 0,5h schlagartig und steil um und landet nach 1h auf 4,74% ($\pm 1,90$).

4.4.3. 24h - Lagerung bei 4°C

Die Lagerung über 24h in einem EDTA-beschichteten Röhrchen bei 4°C zeigt eine Quotensteigerung der nicht-viablen GF-LY auf 1,08% ($\pm 0,56$), annähernd eine Verdoppelung des Ursprungswertes. Durch die weitere Behandlung kann eine beinahe lineare Steigung des Zelluntergangs beobachtet werden (s. Abb. 31 bzw. Tab. 12).

4.4.4. 24h - HY bei RT

Die Einlagerung eines SY-HY-Gemisches für 24h bei RT führt zu einer Steigerung der nicht-viablen GF-LY auf 1,11% ($\pm 0,69$), das einer Verdoppelung entspricht.

4.4.5. 24h - HY bei 4°C

Die Einlagerung eines SY-HY-Gemisches für 24h bei 4°C führt zu einer Steigerung der nicht-viablen GF-LY auf 1,85% ($\pm 0,66$), was mehr als einer Verdoppelung entspricht.

Tabellarische Darstellung der Abbildung 31.

Nicht-Viabel									
h HY	Lagerung 0h			Lagerung 24h RT			Lagerung 24h 4°C		
	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N
0	0,55	0,33	10	3,03	0,99	10	1,08	0,56	10
0,25	0,80	0,31	10	2,84	1,11	10	1,31	0,80	10
0,5	0,63	0,28	10	4,16	1,59	10	1,45	0,51	10
1	1,30	0,57	10	4,74	1,90	10	1,53	0,53	10
24				1,11	0,69	8	1,85	0,66	10

Tab. 12: Nicht-Viabel - Mittelwert, Standardfehler des Mittelwerts und Anzahl der gemessenen Daten sortiert nach spezifischer Lagerung und Inkubation

DISKUSSION

1. Allgemein

Der Anlass dieser Studie war, herauszufinden, wie man Synovia für moderne Zellanalyseverfahren, z.B. der Durchflusszytometrie oder der Laser-Scanning-Cytometrie, zugänglich machen kann. Darüber hinaus sollte getestet werden, ob eine Lagerung der GF über 24h Auswirkungen auf die Messparameter (GZZ, LV, LA, LN; DZZ wurde zusätzlich erhoben) hat.

Nach sorgfältiger Literaturrecherche wurde die GZZ mit einem automatischen Zellzählgerät(25-35) gemessen, da es eine schnellere Probenaufarbeitung erlaubte. Zusätzlich konnte als positiver Nebeneffekt, die DZZ mitbestimmt werden, ohne die zeitintensivere manuelle Auszählung durchführen zu müssen.

Die erste Fragestellung, die vor einer Synovia-Zell-Analyse steht, ist die Viskositätsverringerung. Dies sollte nach der gängigen Lehrmeinung mit dem Zusatz von HY(17, 25, 26, 34) bewerkstelligt werden können. Es gibt zwar keine Einigkeit bezüglich der HY-Dosis oder der Inkubationszeit bzw. -temperatur, jedoch wird immer ein Verdünnungseffekt beschrieben und sogar von einer geringen GZZ-Zunahme wird gesprochen(17). Aufgrund dieser Uneinigkeit wurden verschiedene IZ (15, 30, 60 min), alle bei 37°C, untereinander und mit der nativen Probe verglichen.

Die zweite Frage, die sich auf Grund der Ersten stellt, ist, ob die Zugabe von HY Auswirkungen auf die Viabilität von GF-Leukozyten, insbesondere von GF-LY, hat. Da diesbezüglich, nach dem Wissen des Autors, keine Daten vorhanden sind, wurde auf diesen Punkt das Hauptaugenmerk gerichtet.

2. GZZ

Die Auswirkungen von HY bei IZ von 15, 30, und 60min bei 37°C auf die GZZ am Tag_0 zeigten sich als unbedeutend, wobei der in der Literatur beschriebene geringe Zellanzahlanstieg (17, 46, 47) nach 15 und 30min IZ nachweisbar war. Ab einer IZ von 60min verschwand dieser aber wieder und es stellte sich eine leichte Zellzahlverringering – bezogen auf den Ausgangswert – ein. Daraus resultiert, dass keine Notwendigkeit besteht, frisch punktierte, native SY mit HY zu versetzen, wenn man diese einer Zellwaschung, wie sie bei dieser Versuchsreihe angewandt wurde, unterzieht (s. METHODEN). Im Rahmen dieser Studie wurde nicht untersucht, ob eine Zellwaschung per se Auswirkungen auf die GZZ hat, da man bei der automatischen Analyse unbehandelter, nativer SY Gefahr laufen kann, die feinen Ansaugröhrchen des Zählgerätes durch Zell-Konglomerate zu verstopfen und oder Fehlmessungen zu erhalten (26, 48).

Falls eine längere Lagerung (24h) eines Präparates unerlässlich ist, wird die Aufbewahrung in einem mit EDTA-beschichteten Röhrchen bei 4°C in der Literatur (31) empfohlen und es hat sich auch im Laufe dieser Versuchsreihe gezeigt, dass diese Lagerform (LF) zu bevorzugen ist. Aber, im Gegensatz zu bereits bekannten Fachberichten (31), führte die 24h-Lagerung, abhängig von der Lagertemperatur (LT), zu messbaren GZZ-Rückgängen: Bei 4°C blieben die Zellverluste im Mittel unter 15%, bei RT hingegen wurde ein mittlerer Verlust von fast 25% detektiert. Es kann jedoch mit der Zugabe von HY und einer 15 bis 30 minütigen Inkubation bei 37°C, vor der Analyse, der oben beschriebene Zellzahl-Erhöhungseffekt genutzt werden, um das Messergebnis zu verbessern.

Die Aufbewahrung eines bereits angesetzten SY-HY-Gemisches führte zu sehr hohen GZZ-Verringerungen, unabhängig von der LT, wodurch diese LF als unbrauchbar deklariert werden muss. Es gibt auch diesbezüglich keine Daten in der Literatur.

3. Lymphozyten

Die Auswirkungen von HY auf die Lymphozytenzahl am Tag_0 sind dieselben, wie auf die GZZ. Es wird ein dezenter Anstieg vermessen, der aber bereits nach 0,25h sein Maximum (16% Steigerung) erreicht und, abhängig von der IZ, langsam abflacht. Dies könnte eine mögliche Ursache für den GZZ-Anstieg sein.

Die Erhöhung der Lymphozytenzahl nach einer Lagerung über 24h lässt sich durch den Abfall der Granulozytenzahl, welche den Hauptteil der GZZ stellt, erklären (s. DISKUSSION - 4. DZZ).

Die Effekte auf die *Lymphozytenviabilität* sind am Tag_0 unbedeutend und bewegen sich in einem Rahmen von einem halben Prozentpunkt. Daraus resultiert, dass die Behandlung einer GF-Probe mit HY, plus Inkubation, am Puktionstag keinen Einfluss auf die Viabilität von GF-LY hat. Es wird zwar eine Abnahme bei den in Apoptose stehenden LY vermerkt, die aber durch den Anstieg der nicht-viablen LY erklärt werden kann. Dieses Phänomen ist von der IZ abhängig, da der Zelluntergang wahrscheinlich durch die hohe Temperatur im Brutschrank beschleunigt wird.

Die Lagerung von GF-Proben über 24h hat, unabhängig von der LF, einen Viabilitätsverlust, von mindestens 15%, zur Folge. Dies spiegelt sich in den apoptotischen und nicht-viablen Zellen wider, die einen Anstieg nach 24h Lagerung verzeichnen. Die Hinzugabe von HY verändert diesen Effekt nicht, aber durch die Inkubation wird der Zelluntergang verstärkt und mit der Inkubationsdauer steigt auch der Anteil der apoptotischen und nicht-viablen Zellen an. Hier zeigt sich ein Unterschied zwischen den Lagerungsformen, wobei man bei der 24h-Lagerung bei 4°C einen gleichmäßigeren Verlauf sieht als bei RT: Der Prozentsatz der apoptotischen sowie nicht-viablen Zellen steigt konstant an, abhängig von der Inkubationsdauer, wobei der Viabilitätsanteil dementsprechend fällt. Bei RT-Lagerung ist ein weniger regelmäßiger Verlauf zu beobachten. Es scheint sogar, dass eine kurzzeitige (0,25h) Behandlung mit HY einen Viabilitätsanstieg (~ 3%) und einen Apoptose- (~ 2,5%) sowie Zelltodrückgang (0,2%) bewirkt, jedoch kann keine Signifikanz festgestellt werden. Bei längerer IZ (0,5h bzw. 1h) schreitet nur mehr der Zelluntergang der bereits in Apoptose stehenden Zellen voran, bei gleich bleibenden Viabilitätszahlen.

Durch die Einlagerung von SY-HY-Gemischen über 24h bei RT oder 4°C erzielt man geringere Lymphozytenzahlerhöhungen als bei der bloßen Einlagerung von GF in EDTA bei 4°C über 24h. Darüber hinaus wirkt sich diese LF negativer als die anderen LF auf die gemessenen Zellparameter (Viabilität, Apoptose, Zelltod) aus. Falls die Lagerung solch einer Mischung unabdingbar ist, werden bei RT bessere Ergebnisse erzielt als bei 4°C.

4. DZZ

Die *Granulozytenzahl* verhält sich sehr ähnlich der GZZ, was darauf zurückzuführen ist, dass sie deren größte Zellfraktion stellt und dadurch maßgeblich für das Verhalten der GZZ verantwortlich ist. Nach anfänglicher Zellzahlerhöhung stellt sich nach 1h IZ ein deutlicher Zellzahlverlust ein.

Eine 24h-Lagerung bewirkt einen starken Zellzahlrückgang (20-30%), der bei 4°C-Lagerung im Laufe der Probenuntersuchung dem Schema der Tag_0 Population folgt. Bei RT-Lagerung ist der Verlust höher und der Verlauf nicht so regelmäßig, wobei auch hier ein inkubationsabhängiger Zellzahlverlust deutlich wird.

Die Einlagerung eines SY-HY-Gemisches über 24h hat auf die Granulozytenzahl im Vergleich zu den anderen Zellpopulationen eine nicht so dramatische Wirkung.

Die Messwerte erreichen beinahe dieselben Ergebnisse wie bei der Lagerung über 24h in EDTA, abhängig von der LT.

Die *Monozytenzahl* verhält sich am Tag_0 ähnlich der GZZ, nach anfänglicher Zellzahlzunahme pendelt sich ein stetiger Rückgang nach 0,25h Inkubation ein.

Bei der Lagerung über 24h wird ein Zellzahlzuwachs vermerkt, der durch die Dauer der Inkubation weiter steigt, unabhängig von der LT. Auch dieser Effekt könnte durch den Granulozytenuntergang erklärt werden.

Die Einlagerung eines SY-HY-Gemisches wirkt sich eindeutig negativ auf die Monozytenzahl aus, wobei die RT-Lagerung auf jeden Fall vermieden werden sollte, da hier Zellzahlreduktionen von über 60% möglich sind.

5. Konklusion

Zusammenfassend ist zu sagen, dass zur Viskositätsminderung frisch punktierter GF die Vermengung mit flüssigem EDTA, z.B. in einem violetten 3ml Vacuette[®]-Röhrchen, ausreicht. Falls diese Behandlung nicht den gewünschten Effekt zeigt, kann man das Präparat mit kalter PBS waschen (s. METHODEN), wodurch das Viskositätsproblem auf jeden Fall beseitigt wird. Als positiven Nebeneffekt der Probenwaschung erhält man die Möglichkeit, das Präparat einfach auf eine spezielle Zellzahl zu bringen. Dies ist bei FACS-Analysen sehr hilfreich, da die Gerätehersteller bestimmte Zellzahlenhöhen als Voraussetzung für korrekte Analysen fordern.

Die Verwendung von HY zur Verflüssigung von nativer SY führt zu keiner Verbesserung der Messparameter gegenüber dem oben beschriebenen Verfahren. Hingegen ist die Zubereitung einer HY-Arbeitslösung kosten- sowie zeitintensiver als die Verwendung von EDTA-beschichteten Röhrchen oder eine Probenwaschung.

Bei einer Lagerung von SY über 24h muss mit einer Umverteilung der Leukozytenzellfraktionen gerechnet werden. Dies ist dadurch bedingt, dass Granulozyten die Lagerung schlechter verkraften als andere Leukozyten (Monozyten, Lymphozyten), aber sie den größten Anteil an der GZZ stellen. Dadurch wird eine Vermehrung der anderen Zelltypen vorgetäuscht, wobei nur verhältnismäßig ihr prozentueller Anteil an der GZZ steigt, da ca. 20% der Granulozyten zu Grunde gehen.

Um diesen Scheinvermehrungseffekt möglichst gering zu halten, sollte die GF-Probe in einem EDTA-beschichteten Röhrchen bei 4°C gelagert werden.

Interessanterweise führt die Zugabe von HY bei 24h-gelagerter SY zu einer Verstärkung des oben beschriebenen Effekts sowie einer Erhöhung des Zelluntergangs

Die Lagerung eines SY-HY-Gemisches, egal bei welcher LT, sollte auf jeden Fall vermieden werden, da bei dieser LF ein allgemein höherer Zellverlust sowie ein sehr hoher Scheinvermehrungseffekt auftreten.

Abschließend ist zu sagen, dass der Einsatz von HY bei modernen Zellanalyseverfahren keine Notwendigkeit hat und sich bei gelagerter SY sogar negativ auf die Messergebnisse auswirkt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Dalton [database on the Internet]. Wikipedia. 2010 [cited 01.07.2010]. Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Dalton>.
2. Kanüle [database on the Internet]. Wikipedia. 2010 [cited 01.07.2010]. Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Kanüle>.
3. GMBH DMS. Koagulopathie. 2010 [01.07.2010]; Available from: <http://flexikon.doccheck.com/Koagulopathie?q=koagulopathie>.
4. GMBH DMS. Neoplasie. 2010 [01.07.2010]; Available from: <http://flexikon.doccheck.com/Neoplasie>.
5. rheuma-online. Villonoduläre Synovitis. 2010 [01.07.2010]; Available from: <http://www.rheuma-online.de/a-z/v/villonodulaere-synovitis.html>.
6. Ptbotgourou. Viskoelastizität. 2010 [01.07.2010]; Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Viskoelastizität>.
7. Thomsen TW. Arthrocentesis of the Knee. The New England Journal of Medicine. 2006;354:e19(19).
8. Zeidler H, Zacher J, Hiepe F. Interdisziplinäre klinische Rheumatologie: [Innere Medizin - Orthopädie - Immunologie]; mit ... 252 Tabellen. 2., vollst. überarb. und erg. Aufl. ed. Heidelberg: Springer; 2008.
9. Jauch K-W, Mutschler W, Wichmann MW, editors. Chirurgie Basisweiterbildung: In 99 Schritten durch den Common Trunk: Springer Berlin; 2007.
10. Steinhaus M. Schmerztherapeutische Injektionen an Wirbelsäule und Gelenken. Köln: Dt. Ärzte-Verl.; 2009.
11. Rehabilitation SGfRsfPMu. Empfehlungen für die Durchführung von Injektionen durch Fachärztinnen und Fachärzte am Bewegungsapparat. 2004.
12. McNabb JW. A practical guide to joint & soft tissue injection & aspiration. Philadelphia ; London: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
13. Morree JJd, Sanning A. Dynamik des menschlichen Bindegewebes: Funktion, Schädigung und Wiederherstellung. 1. Aufl. ed. München: Urban & Fischer; 2001.
14. Dietz O, Huskamp B. Handbuch Pferdepraxis. 3., völlig neu bearb. Aufl. ed. Stuttgart: Enke; 2006.
15. Brezinschek H-P. Synovialflüssigkeitsanalyse.
16. Bayard J. Synovia im Labor. CADUCEUS EXPRESS. 2006;8(7).
17. Schumacher HR, Reginato AJ. Atlas of synovial fluid analysis and crystal identification. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991.
18. Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. Lehninger Biochemie. 4., vollst. überarb. u. erw. Aufl. ed. Berlin: Springer; 2009.
19. Horn F. Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium. 4., aktualis. u. erw. Aufl. ed. Stuttgart , New York NY: Thieme; 2009.
20. Harrison K. Molecule of the Month for August 2001 - Hyaluronidase. 2001 [11.02.2010]; Available from: <http://www.chem.ox.ac.uk/mom/hyaluronidase/hyaluronidase.html>; <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2003/stoneley/hyaluronidase.gif>.
21. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. Biochemie und Pathobiochemie. 8., völlig neu bearbeitete Auflage ed. Berlin Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2007.

22. Hänsel R. Pharmakognosie Phytopharmazie. 9., überarbeitete und aktualisierte Auflage ed. Sticher O, editor. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010.
23. SIGMA-ALDRICH®. Hyaluronidase Product Information. 2008 [11.02.2010]; Available from: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/h3506pis.Par.0001.File.tmp/h3506pis.pdf.
24. Hyaluronidase-1OJN.png [database on the Internet]. Wikipedia. 2005 [cited 01.05.2010]. Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hyaluronidase-1OJN.png>.
25. Aulesa C, Mainar I, Prieto M, Cobos N, Galimany R. Use of the Advia 120 hematology analyzer in the differential cytologic analysis of biological fluids (cerebrospinal, peritoneal, pleural, pericardial, synovial, and others). *Lab Hematol.* 2003;9(4):214-24.
26. Sugiuchi H, Ando Y, Manabe M, Nakamura E, Mizuta H, Nagata S, et al. Measurement of total and differential white blood cell counts in synovial fluid by means of an automated hematology analyzer. *J Lab Clin Med.* 2005 Jul;146(1):36-42.
27. Haskard DO, Revell PA. Methods of assessing the synovial fluid cell count. *Clin Rheumatol.* 1984 Sep;3(3):319-22.
28. Barnes PW, Eby CS, Shimer G. An evaluation of the utility of performing body fluid counts on the coulter LH 750. *Lab Hematol.* 2004;10(3):127-31.
29. Kresie L, Benavides D, Bollinger P, Walters J, Pierson D, Richmond T, et al. Performance evaluation of the application of body fluids on the Sysmex XE-2100 series automated hematology analyzer. *Lab Hematol.* 2005;11(1):24-30.
30. Brown W, Keeney M, Chin-Yee I, Johnson K, Lantis K, Finn W, et al. Validation of body fluid analysis on the Coulter LH 750. *Lab Hematol.* 2003;9(3):155-9.
31. Salinas M, Rosas J, Iborra J, Manero H, Pascual E. Comparison of manual and automated cell counts in EDTA preserved synovial fluids. Storage has little influence on the results. *Ann Rheum Dis.* 1997 Oct;56(10):622-6.
32. Dieppe P, Swan A. Automated counting of white blood cells in synovial fluid. *Rheumatology (Oxford).* 2004 Sep;43(9):1201; author reply -2.
33. de Jonge R, Brouwer R, Smit M, de Frankrijker-Merkestijn M, Dolhain RJ, Hazes JM, et al. Automated counting of white blood cells in synovial fluid. *Rheumatology (Oxford).* 2004 Feb;43(2):170-3.
34. Ekmann A, Rigdal ML, Grondahl G. Automated counting of nucleated cells in equine synovial fluid without and with hyaluronidase pretreatment. *Vet Clin Pathol.* 2010 Mar;39(1):83-9.
35. Atilola MA, Lumsden JH, Rooke F. A comparison of manual and electronic counting for total nucleated cell counts on synovial fluid from canine stifle joints. *Can J Vet Res.* 1986 Apr;50(2):282-4.
36. Balsler-Kutt A. Isolierung, Kultivierung, Charakterisierung proximaler und distaler Tubuluszellen der menschlichen Niere [Elektronische Ressource]. [S.l.] : [s.n.]; 2005.
37. BD-Biosciences®. Annexin V Binding Buffer Product Information. [Technical Data Sheet] 2006 [23.03.2010]; Available from: http://www.bdbeurope.com/cgi-bin/bd/bdweb/eservices/context/show.bd?oid=330669&type=0&BV_UseBV_Cookie=yes&BD_SID=UWtSQzpNQT09Ojo%3D.

38. BD-Biosciences®. Annexin-V-FITC Staining Solution Product Information. [Technical Data Sheet] 2008 [25.03.2010]; Available from: http://www.bdbeurope.com/cgi-bin/bd/bdweb/eservices/context/show.bd?oid=330665&type=0&BV_UseBV_Cookie=yes&BD_SID=UWtSQzpNQT09Ojo%3D.
39. BD-Biosciences®. 7-AAD Staining Solution Product Information. [Technical Data Sheet] 2006 [25.03.2010]; Available from: http://www.bdbeurope.com/cgi-bin/bd/bdweb/eservices/context/show.bd?oid=330671&type=0&BV_UseBV_Cookie=yes&BD_SID=UWtSQzpNQT09Ojo%3D.
40. Gradwohl G. Hochsensitive Facs-Analyse der B-Zell-Subpopulationen bei gesunden Probanden. [Diplomarbeit]. In press 2010.
41. BioCat. Apoptosis Detection. [30.03.2010]; Available from: [http://www.biocat.com/cgi-bin/page/sub2.pl?sub1=apoptosis&sub2=apoptosis_detection_\(phosphatidylserin/annexin_based\)&main_group=cell_biology](http://www.biocat.com/cgi-bin/page/sub2.pl?sub1=apoptosis&sub2=apoptosis_detection_(phosphatidylserin/annexin_based)&main_group=cell_biology).
42. abcam®. Introduction to flow cytometry. [29.03.2010]; Available from: <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11446>.
43. partec-GmbH. Was ist Durchflußzytometrie? 2005 [30.03.2010]; Available from: <http://213.155.70.239/de/partec/flowcytometry.html>.
44. Sack U, editor. Zelluläre Diagnostik : Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie ; 163 Tabellen. Basel ; Freiburg im Breisgau [u.a.]: Karger; 2007.
45. GMI-Inc. Cell-Analyser Definitions. 2008 [29.03.2010]; Available from: <http://www.gmi-inc.com/Categories/analyserdefinitions.htm>.
46. Palmer DG. Total leukocyte enumeration in pathologic synovial fluids. Am J Clin Pathol. 1968 Jun;49(6):812-4.
47. Moreno MJ, Clayburne G, Schumacher HR, Jr. Processing of noninflammatory synovial fluids with hyaluronidase for cytopspin preparations improves the accuracy of differential counts. Diagn Cytopathol. 2000 Apr;22(4):256-8.
48. Hasselbacher P. Variation in synovial fluid analysis by hospital laboratories. Arthritis Rheum. 1987 Jun;30(6):637-42.

ANHANG

Probenkennung

PROBE

Tag 0

Tag 1

Patientennummer:

Synovia:

.....

.....

Krankheitsdiagnose:

.....

.....

Punktionsstelle:

Punktionsindikation:

Probenbearbeitungsschritte

ARBEITSSCHRITTE

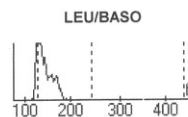
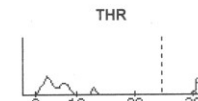
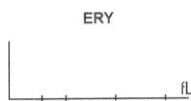
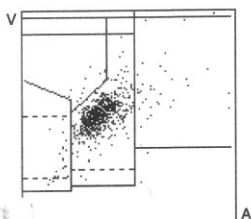
1. HYALURONIDASE WORKSOLUTION [HY-WS]
 - 1mg Hyaluronidase + 2ml PBS (vortexen)
 - Filtern (Spritze, Nadel, Filter)
2. BINDING-BUFFER WORKSOLUTION [BB-WS]
 - 100ml Binding-Buffer + 900ml Aqua dest. (vortexen)
3. SYNOVIA WORKSOLUTION [SY-WS]
 - x µl Synovia + x µl HY-WS (vortexen)
 - Ausnahme:** SY-N => x µl Synovia + x µl PBS!
4. INKUBATION BEI 37°C
 - SY-N => 0 Minuten
 - SY-WS₁₅ => 15 Minuten
 - SY-WS₃₀ => 30 Minuten
 - SY-WS₆₀ => 60 Minuten
5. ZELLWASCHUNG
 - Inkubierte SY-WS / SY-N + 3ml kaltem PBS
 - 5 Minuten bei 20°C und mit 1500 r/m zentrifugieren.
 - Überstand abgießen
 - Vorgang 1 mal wiederholen
 - Mit 150µl PBS auffüllen + gut vortexen [=„gewaschene SY“]
 - [Auffüllung hängt von der Gesamtzellzahl ab. Vielfache von 30:270]
6. ZELLZAHLMESSUNG
 - 30µl „gewaschene SY“ + 270 µl PBS (vortexen) [=„verdünnte SY“]
 - „Verdünnte SY“ => Messung mit Zellszählgerät
 - Bis 5x10⁶ Zellen/ml verwendbar, sonst mit PBS weiter verdünnen
7. ANNEXIN-V und 7-AAD – FÄRBUNG
 - 100µl „verdünnte SY“
 - + 5µl Annexin
 - + 5µl 7-AAD (leicht vortexen) [=„gefärbte SY“]
 - 15 Minuten bei Raumtemperatur [RT] im Dunkeln inkubieren
 - + 400µl BB-WS (leicht vortexen)
 - 5 – 10 Minuten bei RT im Dunkeln inkubieren
 - Maximal 1 Stunde bei RT lagerbar!!!!

Zellzählungsauswertungsblatt

Proben-ID	N-SY	Datum/Zeit	29/06/2009 16:49:06	Abnahmedatum/-zeit	
Kass.	Pos.	Warnhinw.	Standard-Bereich	Profil	KBB/DIFF Wdh. Nein
Station		Arzt		Bediener	Supervisor
Proben-Kommentar					
Patienten-ID					
Familienname		Geb.-Datum		Alter	Geschlecht Unbekannt
Vorname					
Patientenvermerk					

		Bereich		Bereich	Warnhinweise/Meldungen	
LEU	1.0LL	10 ³ /μL	4.0 / 11.0		DiffPlot- und Histogramm-Warnhinweise *LEU Interpretations-Meldungen Leukopenie Lymphopenie Neutropenie Interpretation ERY unmöglich Thrombozytopenie THR-Aggregate	
ERY	0.00VLL	10 ⁹ /μL	4.00 / 6.20	NE		90.4HH % 50.0 / 80.0
HGB	0.0*LL	g/dL	11.0 / 18.8	LY		2.7LL % 25.0 / 50.0
HKT	0.0*LL	%	35.0 / 55.0	MO		0.9LL % 2.0 / 10.0
MCV	fL	80 / 100	EO		4.8 % 0.0 / 5.0
MCH	pg	26.0 / 34.0	BA		1.2 % 0.0 / 2.0
MCHC	g/dL	31.0 / 35.0			
PLV	%	10.0 / 20.0	NE#		0.94LL 10 ³ /μL 2.00 / 8.00
THR	0*LL	10 ³ /μL	150 / 400	LY#		0.03LL 10 ³ /μL 1.00 / 5.00
MTV	fL	6.0 / 10.0	MO#		0.01L 10 ³ /μL 0.10 / 1.00
				EO#	0.05 10 ³ /μL 0.00 / 0.40	
				BA#	0.01 10 ³ /μL 0.00 / 0.20	

Ergebniskommentar



Rohdaten		LEU1		LEU2		LY#		SL		FNL		LEU	
ERY1	44	ERY2	41	MO#	7	ATL	0	FMN	2	RA#	805	DIFF#	795
HKT1	5894	HKT2	6188	NE#	728	UM	0	FNE	5	CO%	99.1		
THR1	43	THR2	34	EO#	38	LN	3	UN	0				
HGBB	3424	HGBM	3423	DB	2	C127	1	IMM	1				

Grenzwert übersch. **XX.X** Pat.-Gr. übersch. **XXX**

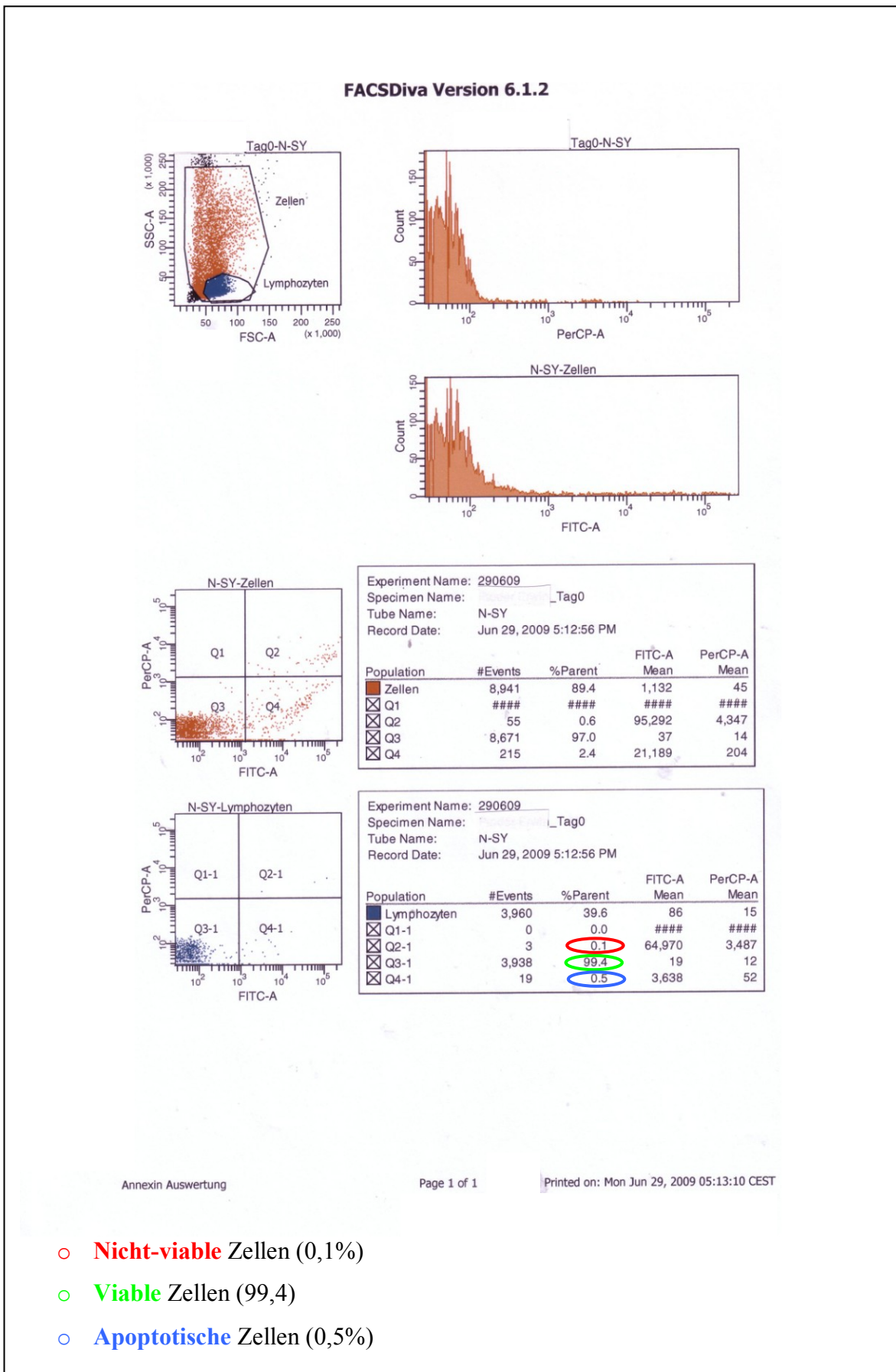
ROHDATENBERICHT NUR ZU FORSCHUNGSZWECKEN

Druck: 29/06/2009 16:49:09

Seite 1

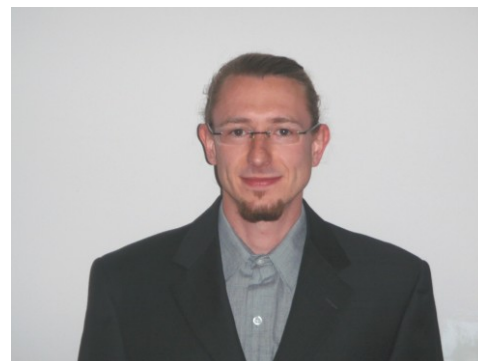
GZZ	1,0 x 10 ³ /ml		
DZZ	Granulozyten	Lymphozyten	Monozyten
	0,94 x 10 ³ /ml	0,03 x 10 ³ /ml	0,01 x 10 ³ /ml

Durchflusszytometerauswertungsblatt



LEBENS LAUF

Name **Winter Horst**
 e-mail winter.horst@gmail.com
 Adresse Rudersdorfer - Au Strasse 1,
 8055 Graz, Österreich
 Mobil 0043/699 19851961
 Fax 0043/316 293982



Persönliches:

Geburtsdatum 17.12.1985
 Geburtsort Graz, Steiermark, Österreich
 Beziehungsstatus Liiert
 Staatsbürgerschaft Austria

Ausbildung

1992-1996 Volksschule: VS Feldkirchen
 1996-2004 Gymnasium: BG/BRG Pestalozzi
 Seit 10/2004 Medizinischen Universität Graz: Humanmedizin O202
 04/2010 Winterlehrgang für Alpinmedizin zum „Diploma in Mountain Medicine“

Arbeitserfahrung

07/2002 4 Wochen Sattler AG
 07/2005 4 Wochen Estacion Tropical (Regenwald der Österreicher)

Medizinische Arbeitserfahrung

Seit 01/2005 Teilzeitangestellt in einer allgemeinmedizinischen Praxis
 2 Wo (02/2006) LKH Weiz: Innere Medizin
 2 Wo (09/2007) Universitätsklinikum Graz: Kinderinfektiologie
 2 Wo (09/2007) Universitätsklinikum Graz: Gefäßchirurgie
 2 Wo (02/2008) LKH Weiz: Allgemeinchirurgie
 2 Wo (03/2008) Universitätsklinikum Graz: Radiologie
 2 Wo (07/2008) Kathmandu Model Hospital: Innere Medizin (Nepal)
 3 Wo (07-08/2008) Kathmandu Model Hospital: Allgemeinchirurgie (Nepal)

2 Wo (04/2009) LKH Weiz: Innere Medizin

2 Wo (07/2009) Cho Ray Hospital: Tropenmedizin (Vietnam)

Mitarbeit an einer Studie über Therapie von Rheumatoider Arthritis (RA) bei Univ. Prof.
Dr. Hans-Peter Brezinschek

Spezielle Studienmodule (SSM)

SSM01 klinisch-topografische Anatomie der Eingeweide

SSM02 klinisch-topografische Anatomie der Extremitäten

SSM05 Modernste Methoden zur Messungen der Body Composition

SSM15 Medizinische Parasitologie

SSM29 Spezielle Notfallmedizin - eine interdisziplinäre Herausforderung

SSM47 Case-based Learning in Klinik und Praxis

Prüfungen

Alle vorklinischen Prüfungen

Alle klinischen Prüfungen

Erster Teil des praktischen Jahres (6.tes Jahr); Allgemein-Chirurgie im LKH Weiz

Zweiter Teil des praktischen Jahres (6.tes Jahr); Innere Medizin im LKH Weiz

Dritter Teil des praktischen Jahres (6.tes Jahr); Allgemeinmedizin-Famulatur (Pirka)

Vierter Teil des praktischen Jahres (6.tes Jahr); HNO im KH der Elisabethinen Graz

Fähigkeiten

Führerschein (A+ B)

Sprachen:

Englisch (8 Jahre in der Schule)

Italienisch (Grundkurs 1.1)

Spanisch (Grundkurs 1.1)

Griechisch (Grundkurs 1.1 + 1.2)

Hobbies: Wandern, Klettern, Skiwandern, Krafttraining, Tauchen, Reisen, etc.