

**Diplomarbeit**

**Die Erprobung und Etablierung der ultraschallgezielten  
Synovialgewebsbiopsie an der Med. Universität Graz**

eingereicht von

**Philipp Julian Bosch**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Klin. Abteilung für Rheumatologie und Immunologie  
Universitätsklinik für Innere Medizin Graz**

unter der Anleitung von

**Assoz. Prof. Priv. Doz. Dr. med. univ. Christian Dejaco, Ph.D.,  
MBA**

Graz, am 09.05.2017

### *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.*

*Graz, am 09.05.2017*

*Philipp Bosch eh*

# Danksagungen

Ich möchte am Anfang dieser Arbeit meinen großen Dank an alle Personen ausdrücken, die mich während meines Studiums unterstützt, begleitet und inspiriert haben.

Als erstes will ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Assoz. Prof. Priv. Doz. Dr. med. univ. Christian Dejaco, Ph.D., MBA, bedanken, der mich an das Thema meiner Arbeit herangeführt und mit viel Engagement, Motivation und Geduld beim Erarbeiten und Schreiben unterstützt hat. Einen besonderen Dank will ich auch für die vielen Gespräche ausdrücken, welche in mir die Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten geweckt haben.

Bei Herrn Prof. Dr. med. univ. Dr. sc. nat. Johannes Haybäck AHCM, FASCP, MAANP will ich mich herzlich für die Unterstützung beim Auswerten der histologischen Ergebnisse bedanken, sowie für die Hilfe beim Schreiben der Diplomarbeit und für die motivierenden Gespräche.

Besonders danken will ich auch Herrn Dr. Rusmir Husic, für die wichtige Hilfe beim Erlernen der Synovialgewebsbiopsie und Herrn Dr.scient.med. Johannes Fessler, BSc. MSc. für die Hilfe bei der Auswertung der Labordaten.

Ein herzliches Dankeschön geht außerdem an die Teams der klinischen Abteilung für Rheumatologie und Immunologie sowie des Instituts für Pathologie der Medizinischen Universität Graz, für all die Unterstützung, die ich während dieses Arbeitsprozesses erhalten habe.

Ein spezieller Dank geht an meine langjährigen Freunde Brigitte und Wolfgang und an meine Freundin, die mich trotz weiter Entfernung gedanklich unterstützt hat und hinter mir gestanden ist.

Schlussendlich will ich meiner Mutter, meiner Großmutter und meinem Großvater danken, deren bedingungslose und herzliche Unterstützung mich mein Leben lang begleitet hat. Danke.

# Zusammenfassung

## **Einleitung:**

Die Synovialmembran spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler rheumatischer Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis. Auf der Suche nach neuen Biomarkern, um den Therapieerfolg von Medikamenten bei diesen Erkrankungen besser messen und voraussagen zu können, gilt die Synovialmembran als interessante, zukunftssträchtige Quelle. Die ultraschallgezielte Synovialgewebsbiopsie zeigte in Studien, dass sich Gewebe in guter Qualität und Quantität gewinnen lässt und die Technik sicher und gut tolerierbar ist. Das Ziel dieser Pilotstudie ist die Weiterentwicklung dieser Methode zur Erforschung von Biomarkern an der klinischen Abteilung für Rheumatologie und Immunologie der Medizinischen Universität Graz.

**Methoden:** An acht Patientinnen und Patienten mit rheumatischen Erkrankungen erfolgten ultraschallgezielte Synovialgewebsbiopsien der Knie-, Ellbogen-, Acromioclavicular- und Metacarpophalangealgelenke, sowie der Bursa subdeltoidea. Das gewonnene Gewebe wurde mit Hämatoxylin–Eosin gefärbt, immunhistochemisch aufgearbeitet, und es erfolgte erstmalig die Analyse der Lymphozyten-Subpopulationen anhand der Durchflusszytometrie (FACS). Die Daten und Krankengeschichten der Patientinnen und Patienten wurden retrospektiv ausgearbeitet und demographische Daten und Daten zur Krankheitsaktivität extrahiert. Des Weiteren erfolgte die ultraschallgezielte Synovialgewebsbiopsie an Knien von 15 Leichen des Instituts für Pathologie der Medizinischen Universität Graz ohne bekannte rheumatische Erkrankungen. Das gewonnene Gewebe wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und histologisch als Kontrollgruppe ausgewertet.

**Ergebnisse:** Unter den biopsierten Patientinnen und Patienten fanden sich vier Fälle von rheumatoider Arthritis und je ein Fall von Psoriasisarthritis, Arthritis urica, undifferenzierter Arthritis und Bursitis subdeltoidea.

Bei sechs der acht Biopsien konnte die Synovialmembran im histologischen Schnitt nachgewiesen werden. In allen Fällen lag eine Synovialitis vor. Bei vier der acht Biopsien wurden Lymphozytensubpopulationen mit Hilfe der FACS analysiert. Beim untersuchten Gewebe zeigte sich eine Prädominanz von CD4+ Zellen im Vergleich zu CD8+ Zellen. Bei

keiner der Biopsien kam es zu Komplikationen nach dem Eingriff. Bei den Leichen wurde bei 7 von 15 Biopsien Synovialmembran gewonnen.

**Konklusion:** Durch diese Pilotstudie konnte gezeigt werden, dass an ultraschallgezielten Synovialgewebsbiopsien Histologie und FACS Analysen durchführbar sind. Für die Aussagekraft des histologischen Bilds in Bezug auf klinische Präsentation und Krankheitsprognose, bedarf es jedoch noch größerer Studien. Die aus dieser Studie erzielten Erkenntnisse sollen als Grundlage für weitere Projekte an der klinischen Abteilung für Rheumatologie und Immunologie der Medizinischen Universität Graz dienen.

## **Abstract**

**Introduction:** The synovial membrane plays a crucial role in the pathogenesis of rheumatic joint diseases such as rheumatoid arthritis. Synovial tissue analysis seems to be a promising method for the research of novel biomarkers aiding treatment decisions and predicting the course of the disease. Ultrasound guided biopsy of the synovial membrane has been reported to be a safe and well-tolerated method for patients. Furthermore, tissue can be obtained in good quality and quantity for histological assessment. The objective of this pilot study was to test this method and establish it at the Division of Rheumatology and Immunology at the Medical University of Graz.

**Methods:** Biopsies were performed in eight patients, at knee, elbow, acromioclavicular- and metacarpophalangeal joints, and the subdeltoid bursa. The harvested tissue was stained with hematoxylin-eosin and used for immunohistochemistry. For the first time, tissue samples were examined using flow-cytometry (FACS) to analyse infiltrating lymphocyte-subpopulations. Patients' data and history were collected from charts and presented herein together with results of the synovial tissue analysis as a case-series. We also performed ultrasound guided synovial membrane biopsies in 15 cadavers. The tissues were stained with hematoxylin-eosin and evaluated microscopically.

**Results:** Four patients with rheumatoid arthritis, one patient with psoriatic arthritis, one with gouty arthritis, one with undifferentiated arthritis and one with subdeltoid bursitis were biopsied. Microscopically, a synovial membrane could be found in the harvested tissue in six out of eight biopsied patients. Every tissue showed signs of synovitis. FACS analysis was performed in four cases. There was a positive ratio of CD4+ to CD8+ cells in all obtained samples. None of the patients experienced complications. Additionally, synovial tissue was retrieved in 7 of the 15 dead subjects.

**Conclusion:** This pilot study shows that synovial tissue obtained by an ultrasound guided biopsy technique can be used for histological assessment and FACS analysis. In order to compare histology with clinical data and to identify prognostic markers, further research with larger patient populations is needed. The information and data obtained in this study can be used for further projects at the Division of Rheumatology and Immunology at the Medical University of Graz.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagungen</b> .....	<b>ii</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>vi</b>
<b>Glossar und Abkürzungen</b> .....	<b>viii</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>x</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Rheumatoide Arthritis .....	1
1.1.1 Definition und Einleitung .....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	1
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese .....	3
1.1.4 Klinische Symptome .....	4
1.1.5 Diagnose und Krankheitsaktivität .....	7
1.1.6 Therapie.....	11
1.2 Muskel- und Gelenksultraschall .....	13
1.2.1 Anatomie des Gelenks .....	13
1.2.2 Allgemeines zum Muskel- und Gelenksultraschall.....	14
1.2.3 Synovialgewebe im Ultraschall.....	15
1.2.4 Ultraschall bei der RA .....	16
1.3 Synovialgewebe.....	17
1.3.1 Methoden der Gewebsgewinnung .....	17
1.3.2 Möglichkeiten der Verarbeitung und Analyse der Synovialmembran .....	22
1.3.3 Das gesunde Synovialgewebe .....	23
1.3.4 Das Synovialgewebe bei Erkrankungen .....	26
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>35</b>
2.1 Studienpopulation.....	35
2.2 Ultraschallgezielte Gewebsgewinnung.....	36
2.2.1 Biopsie an Patientinnen und Patienten der rheumatologischen Abteilung....	36
2.2.2 Biopsie an kürzlich Verstorbenen .....	38
2.3 Verarbeitung des Gewebes .....	38
2.3.1 Gewebe der Patientinnen und Patienten der rheumatologischen Abteilung..	38

2.3.2	Gewebe der kürzlich Verstorbenen .....	39
2.4	Ausarbeitung der Daten von Patientinnen und Patienten .....	39
2.5	Statistik .....	40
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse – Resultate .....</b>	<b>40</b>
3.1	Studienpopulation der Patientinnen und Patienten der rheumatologischen Abteilung .....	40
3.1.1	Präsentation der Fallserie .....	45
3.2	Studienpopulation der kürzlich Verstorbenen .....	59
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>67</b>
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>70</b>

## Glossar und Abkürzungen

<b>AC-Gelenk</b>	Acromioclavikular-Gelenk	<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle's medium
<b>ACPA</b>	Anti citrullinated peptide antibodies	<b>DN</b>	Doppelt-negativ
<b>ACR</b>	American College of Rheumatology	<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>AS</b>	Ankylosierende Spondylitis	<b>EULAR</b>	European League Against Rheumatism
<b>BSG</b>	Blutsenkungs-geschwindigkeit	<b>FACS</b>	Fluorescence activated sorting/scanning
<b>B-mode</b>	Brightness mode	<b>Fc</b>	Fragment crystallisable
<b>c-ANCA</b>	C-Anti-neutrophiler cytoplasmatischer Antikörper	<b>FLS</b>	Fibroblast-like-synoviocyte
<b>CD</b>	Cluster of differentiation	<b>GLOESS</b>	Global OMERACT-EULAR Synovitis score
<b>CDAI</b>	Clinical disease activity index	<b>HA</b>	Hydroxylapatit
<b>cDNA</b>	complementary DNA	<b>HAQ</b>	Health assessment questionnaire
<b>CPPD</b>	Calziumpyrophosphat-dihydrat	<b>HFE – Gen</b>	High iron Fe – Gen
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein	<b>HLA</b>	Human leukocyte antigen
<b>CT</b>	Computertomographie	<b>HLA DRB1</b>	Human leukocyte antigen – antigen D related B1
<b>DAPSA</b>	Disease activity in psoriatic arthritis	<b>AM-1</b>	Intracellular adhesion molecule 1
<b>DAS</b>	Disease activity score	<b>Ig</b>	Immunoglobulin
<b>DAS28</b>	Disease activity score 28	<b>IL</b>	Interleukin
<b>DIP</b>	Distales Interphalangeal-gelenk	<b>JAK</b>	Janus Kinase
<b>DKK-1</b>	Dickkopf-1	<b>LDH</b>	Laktatdehydrogenase
<b>DMARD</b>	Disease-modifying-anti-rheumatic-drug	<b>MCP</b>	Metacarpophalangeal-gelenk
		<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex

<b>MLS</b>	Macrophage-like-synoviocyte	<b>SpA</b>	Seronegative Spondyloarthropathie
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie	<b>T-regs</b>	T-regulatorische Zellen
<b>MTP</b>	Metatarsophalangealgelenk	<b>Th</b>	T-Helferzellen
<b>MTX</b>	Methotrexat	<b>TJC</b>	Tender joint count
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells	<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>NSAR</b>	Nichtsteroidales Antirheumatikum	<b>UDP</b>	Uridindiphosphat
<b>n.a.</b>	Not available	<b>UDPGDH</b>	UDP-Glukose-6-Dehydrogenase
<b>OMERACT</b>	Outcome measures in Rheumatology	<b>VCAM-1</b>	Vascular cell adhesion molecule 1
<b>PhGA</b>	Physician global activity		
<b>PtGA</b>	Patient global activity		
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion		
<b>PIP</b>	Proximales Interphalangealgelenk		
<b>PsA</b>	Psoriasisarthritis		
<b>RA</b>	Rheumatoide Arthritis		
<b>RADAI</b>	Rheumatoid Arthritis disease activity index		
<b>RANKL</b>	Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand		
<b>RF</b>	Rheumafaktor		
<b>s.c.</b>	Subkutan		
<b>SDAI</b>	Simplified disease activity index		
<b>SJC</b>	Swollen joint count		
<b>SLE</b>	Systemischer Lupus erythematosus		

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prävalenz von rheumatoide Arthritis ausgewählter Kontinente/Regionen.....	2
Abb. 2: Synoviale Hypertrophie .....	16
Abb. 3: Methoden der Synovialgewebsbiopsie.....	21
Abb. 4: Vorrichtungen und Instrumente zur ultraschallgezielten Synovialgewebsbiopsie ...	37
Abb. 5: Pat 1 Hämatoxylin-Eosin Färbung. A, 10fache- B, 20fache- C, 40fache Vergrößerung .....	46
Abb. 6: Pat 2 Hämatoxylin-Eosin Färbung. A, 10fache- B, 20fache- C, 40fache Vergrößerung .....	48
Abb. 7: Pat 3 Hämatoxylin-Eosin Färbung. A, 10fache- B, 20fache- C, 40fache Vergrößerung .....	50
Abb. 8: Pat 4 10fache Vergrößerung folgender Färbungen: A, Hämatoxylin-Eosin. B, CD68 pos. C, CD3 pos. D, CD8 pos. E, CD4 pos., F, CD20 pos. G, IgG4 pos. ....	53
Abb. 9: Pat 5 Hämatoxylin-Eosin Färbung. A, 10fache- B, 20fache- C, 40fache Vergrößerung .....	54
Abb. 10: Leiche 1 median Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x.....	61
Abb. 11: Leiche 1 lateral Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x.....	61
Abb. 12: Leiche 3 medial Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x.....	62
Abb. 13: Leiche 3 median Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x.....	62
Abb. 14: Leiche 5 medial Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x.....	63
Abb. 15: Leiche 5 lateral Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x.....	63
Abb. 16: Leiche 6 medial Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x.....	64
Abb. 17: Leiche 6 median Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x.....	64
Abb. 18: Leiche 11 median Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x.....	65
Abb. 19: Leiche 12 median Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x.....	65
Abb. 20: Leiche 12 lateral Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x.....	66
Abb. 21: Leiche 14 medial Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x.....	66

# Tabellenverzeichnis

Tab. 1: ACR Kriterien für rheumatoide Arthritis.....	8
Tab. 2: Disease activity scores.....	10
Tab. 3: Schema zur histologischen Beurteilung der 3 Kompartimente der chronischen Synovialitis.....	33
Tab. 4: Die Synovialflüssigkeit bei ausgewählten Erkrankungen.....	34
Tab. 5: Ausschlusskriterien bei Patientinnen und Patienten der rheumatologischen Abteilung.....	36
Tab. 6: Patientenübersicht.....	42
Tab. 7: FACS Analyse der Synovialmembran, der Synovialflüssigkeit und des Blutes.....	44
Tab. 8: Verhältnis der CD8+ : CD4+ Zellen der FACS.....	44
Tab. 9: Patientin 1 Synovialbefund.....	46
Tab. 10: Patientin 2 Synovialbefund.....	48
Tab. 11: Patient 3 Synovialbefund.....	50
Tab. 12: Patient 4 Synovialbefund.....	52
Tab. 13: Patientin 5 Synovialbefund.....	54
Tab. 14: Patientin 6 Synovialbefund.....	56
Tab. 15: Patientin 7 Synovialbefund.....	57
Tab. 16: Patient 8 Synovialbefund.....	59
Tab. 17: Allgemeine Daten zu den kürzlich Verstorbenen.....	60
Tab. 18: Leiche 1 median.....	61
Tab. 19: Leiche 1 lateral.....	61
Tab. 20: Leiche 3 medial.....	62
Tab. 21: Leiche 3 median.....	62
Tab. 22: Leiche 5 medial.....	63
Tab. 23: Leiche 5 lateral.....	63
Tab. 24: Leiche 6 medial.....	64
Tab. 25: Leiche 6 median.....	64
Tab. 26: Leiche 11 median.....	65
Tab. 27: Leiche 12 median.....	65
Tab. 28: Leiche 12 lateral.....	66
Tab. 29: Leiche 14 medial.....	66

# 1. Einleitung

## 1.1 Rheumatoide Arthritis

### 1.1.1 Definition und Einleitung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine Autoimmunkrankheit, die eine chronisch systemische Entzündung bewirkt. In erster Linie sind die Gelenke bzw. vor allem die innere Gelenkshaut (Synovialmembran) von der Entzündung betroffen, aber es kommt auch zur Beteiligung innerer Organe wie dem Herz-Kreislaufsystem und seltener der Lungen, Leber, Nieren und Augen. Dieser systemische Krankheitsbefall und die erhöhte Anfälligkeit für Infektionen, vermindern die Lebenserwartung von Betroffenen, in schweren Fällen um bis zu zehn Jahre.(1, 2)

Besondere genetische, molekulare und zelluläre Eigenschaften sind bei der RA bekannt, wobei sie sich trotz alledem als heterogene Krankheit darstellt, deren Verläufe oft variabel und nur schwer einschätzbar sind.

Ein wichtiges Ziel der Forschung ist daher das Ergründen dieser Heterogenität, um eine Einteilung in Subtypen zu ermöglichen, und um dadurch eine bestmögliche, individuelle Therapie für Patientinnen und Patienten bereitstellen zu können.(2)

### 1.1.2 Epidemiologie

Die Prävalenz von RA lag nach der „Global Burden of Disease 2010 study“ weltweit bei 0,35% bei Frauen und bei 0,13% bei Männern.(3) Das Verhältnis zwischen Frauen und Männern lag dementsprechend bei ungefähr 3:1.

Die Prävalenzen bezogen auf Kontinente und Regionen zeigten relativ große Unterschiede. (vgl. Abb. 1). Die höchsten Prävalenzen fanden sich in Nordamerika, Westeuropa und Australasien, während in Regionen wie Ostasien, Nordafrika-mittlerer Osten und Ozeanien die Prävalenzen am niedrigsten waren. Die geschätzte Inzidenz betrug global (von 5 – 100 Jahren Alter) 20/100.000 bei Frauen und 6,7/100.000 bei Männern, mit einem Erkrankungsgipfel bei 80 Jahren.

Die „Global burden of disease 2010 study“ erstellte auch ein Ranking bei welchem 291 Krankheiten nach ihrer Belastung („burden“) für die Patientinnen und Patienten gereiht wurden. Berechnet wurde diese Belastung anhand der Anzahl der Jahre seit Krankheitsbeginn + der Anzahl der Jahre, die man aufgrund der Krankheit durch frühzeitiges Ableben verliert. Bei diesem Ranking erzielte die RA den 74. Platz. Angeführt wurde dieses Ranking durch Krankheiten wie koronare Herzkrankheit, Infektionen der unteren Atemwege und zerebrovaskuläre Erkrankungen. (3, 4)

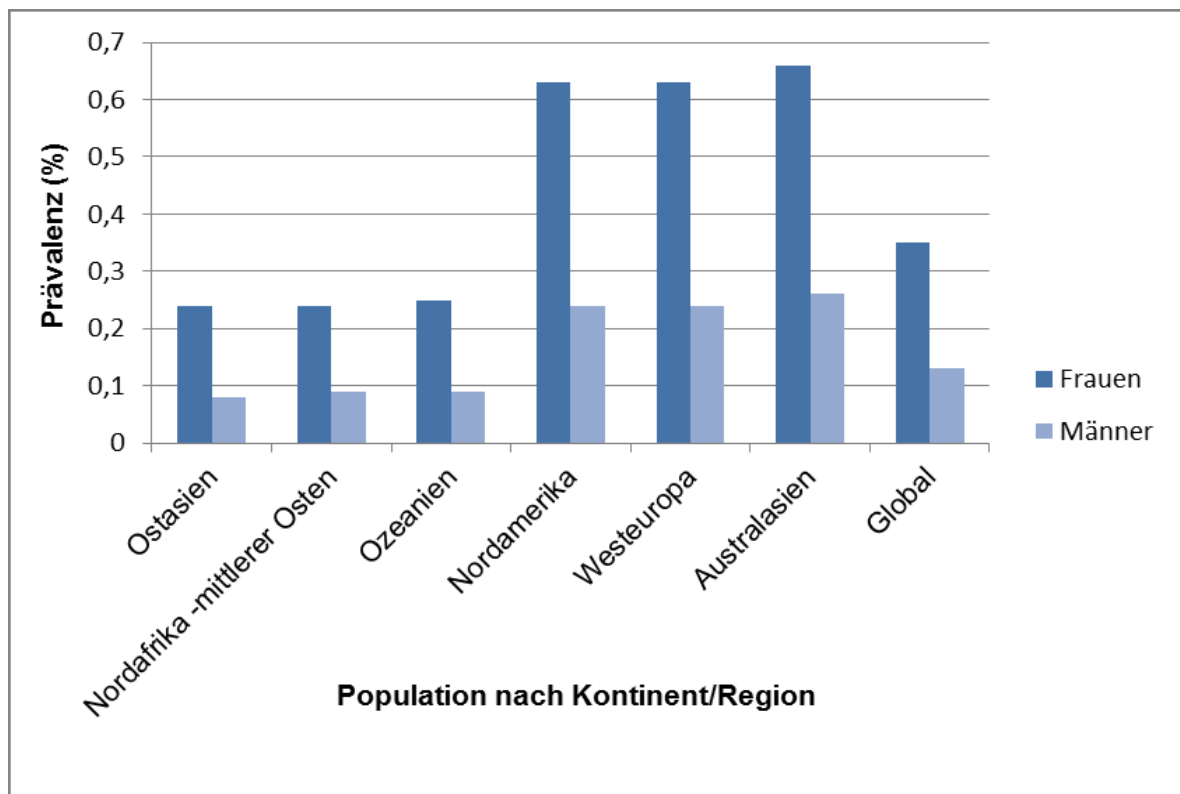


Abb. 1: Prävalenz von rheumatoide Arthritis ausgewählter Kontinente/Regionen.

Abb. abgeändert aus/modified from: (3)

### **1.1.3 Ätiologie und Pathogenese**

Während die Ursache für die Entstehung der RA noch unklar ist, gibt es mehrere Faktoren, die mit ihr in Zusammenhang gebracht werden:

#### **1.1.3.1 Genetische Faktoren**

Der „Major histocompatibility complex (MHC)“ ist ein Komplex aus Genen, welcher eine Reihe von zellulären Oberflächenmolekülen bildet, die in der Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Eine Familie dieser MHC Gene heißen beim Menschen „Human leucocyte antigen (HLA)“ Gene. Die hiervon codierten Oberflächenmoleküle lassen sich in zwei Klassen einteilen: MHC I und MHC II. Diese binden mit Rezeptoren der Zellen des erworbenen Immunsystems im Rahmen der Antigenpräsentation.(2, 5)

„HLA – antigen D related (HLA DR)“ B1 Allele sind als Risikofaktor für die RA bereits seit 25 Jahren bekannt. Diese Region kodiert das „shared epitope“, welches vermehrt unpolare Aminosäuren wie Citrullin bindet. Citrullin-hältigen Antigene werden dann per MHC II dem T Zellrezeptor präsentiert, was im Falle der RA zu einer Autoimmunantwort führt. Durch diese Autoimmunantwort kommt es schließlich zur Bildung von Antikörpern gegen citrullinierte Peptide (ACPA).(2, 6)

Besonders gefährdet an RA zu erkranken sind Patientinnen und Patienten die ein HLA DRB1\*0404 Allel besitzen.(7)

Nicht nur Gene, die die Antigenpräsentation beeinflussen sind mit Antikörpern gegen citrullinierte Peptide assoziiert, sondern auch Gene die Proteine zur T-Zell Aktivierung (z.B.: PAD 14 Gen), Differenzierung (z.B.: PTPN22 Gen) und Effektor Funktion (z.B.: STAT4 Gen) kodieren.(2, 8)

#### **1.1.3.2 Nicht genetische Faktoren**

Eine Reihe an nicht genetischen Faktoren wird mit der RA assoziiert:

Während Schwangerschaften generell einen protektiven Effekt auf die Entstehung der RA haben, steigt die Inzidenz der RA in den ersten zwölf Monaten postpartum deutlich an. Dies trifft vor allem für die Zeit nach der ersten Schwangerschaft zu.(9) Es wird angenommen, dass dies mit den hohen Prolaktinwerten in der Stillzeit in Zusammenhang stehen könnte.(10)

Autoimmunerkrankungen wie Diabetes Typ 1 und Autoimmunthyroiditis sind zwar keine Risikofaktoren für die RA, kommen aber bei Personen mit RA vermehrt vor, was den Schluss eines gemeinsamen, molekularen Pathomechanismus nahelegt.(11, 12)

Die Einnahme von oralen Kontrazeptiva scheint einen protektiven Einfluss auf die Entstehung von RA zu haben, wobei hierzu aber auch widersprüchliche Studien existieren.(13)

Das Rauchen von Zigaretten gilt hingegen als klarer Risikofaktor.(14)

Ein weiterer Zusammenhang findet sich zwischen RA und dem eigenen oralen und intestinalen Mikrobiom. Orale und intestinale Bakterien scheinen dabei einen Einfluss auf die Entstehung von ACPA beziehungsweise auf die Aktivierung von T-Helferzellen-17 zu haben, welche eine bedeutende Rolle bei der RA spielen.(15)

Eine genaue Darstellung der pathogenetisch, molekularen Veränderungen bei der RA findet sich im Kapitel „Die Synovialmembran bei RA“.

#### **1.1.4 Klinische Symptome**

Da die RA eine systemische Autoimmunerkrankung ist, finden sich bei ihr sowohl artikuläre und periartikuläre, als auch systemische, nicht artikuläre Symptome.

##### **1.1.4.1 Artikuläre- und Periartikuläre Symptome**

Die artikulären und periartikulären Manifestationen der RA werden durch Entzündungen des Gelenks und der umgebenden Strukturen verursacht, welche die Bildung von Gelenkergüssen und die Verdickung der Synovialmembran (Pannus), die Destruktion von Knorpel und Knochen, Subluxationen, Dislokationen und Verknöcherungen von Gelenken und die damit einhergehenden Schmerzen zur Folge haben.

Bei der RA finden sich Entzündungen der Synovialmembran (Synovialitis), der Sehnen und Sehnenscheiden (Tendinitis und Tenosynovitis), der Schleimbeutel (Bursitis) und bestimmter Sehnenansätze (beispielsweise die Epicondylitis).

Die RA befällt sowohl kleine, mittlere, große, als auch axiale Gelenke. (16)

#### ***1.1.4.1.1 Kleine Gelenke bei RA***

Bei den kleinen Gelenken sind vor allem die Metacarpophalangealgelenke (MCP), die proximalen Interphalangealgelenke (PIP), die Gelenke des Handgelenks und die Metatarsophalangealgelenke (MTP) involviert. Die distalen Interphalangealgelenke (DIP) sind im Normalfall ausgespart. Die RA ist meist eine Polyarthritis mit einem, im Normalfall, symmetrischen Befall der MCP und PIP.(16)

Bei langandauernder und unbehandelter Krankheit können Deformitäten wie die Schwanenhalsdeformität, die Boutonnière-Deformität und Krallenzehen entstehen. Es kann außerdem zur Radialdeviation des Handgelenks und Ulnardeviation der MCP Gelenke kommen.(16, 17)

Tenosynovitiden im Bereich des Handgelenks können des Weiteren ein Karpaltunnelsyndrom verursachen.(18)

#### ***1.1.4.1.2 Mittlere und große Gelenke bei RA***

Bei mittleren und großen Gelenken sind am häufigsten die Ellbogen-, Schulter-, Knie und Sprunggelenke betroffen.

Die wichtigsten Komplikationen beim Ellbogengelenk sind neben der Synovialitis, Gelenksergüsse und Entzündungen der Bursa olecrani.

Bei dem Schultergelenk kommt es anfangs meist zu einer Tenosynovitis der Bizepssehne, wobei es im weiteren Verlauf auch zu Rupturen von Sehnen der Rotatorenmanschette und zu Destruktionen des Glenohumeralgelenks kommen kann.

Im Bereich des Kniegelenks findet sich oft eine Synovialitis mit Gelenkserguss in der Bursa suprapatellaris, sowie eine Bursitis poplitealis mit Gelenkserguss (Baker Zyste).

Durch die Involvierung des oberen und unteren Sprunggelenks, kann es zu Plattfüßen und dadurch zu Valgusstellungen der Beine kommen.(16)

Eine retrospektive Studie aus dem Jahr 1997 zeigte, dass über einen Zeitraum von 22 Jahren 25% der Patientinnen und Patienten mit RA eine Totalendoprothese implantiert bekamen. Der Großteil dieser Prothesen entfiel auf Knie- und Hüftgelenke.(19) Eine Studie aus dem Jahr 2010 konnte jedoch zeigen, dass die Anzahl an Totalendoprothesen - Implantationen, im Zeitraum von 2003-2007 deutlich gesunken war. Im Vergleich zu den Jahren 1983-1987 sank die Anzahl an Eingriffen bei Knie-Totalendoprothesen um 19% bei Hüft-Totalendoprothesen um 40%. Es wird angenommen, dass dieser Rückgang mit

der früher beginnenden medikamentösen Behandlung, sowie mit dem besseren Ansprechen von modernen Medikamenten gegen RA im Zusammenhang steht.(20)

#### ***1.1.4.1.3 Axiale Gelenke bei RA***

Besonders gefährlich sind die Beteiligung und mögliche entzündliche Destruktion der atlantoaxialen Gelenke (C1-C2). Es kann zu Dislokationen und nach Erosionen, zu Frakturen des Dens axis kommen, welche zu Kompressionen des Rückenmarks und dadurch zu Paraplegien und im schlimmsten Fall zu Störungen des Atemzentrums führen können. (16, 21)

#### **1.1.4.2 Extraartikuläre Symptome und Komorbiditäten**

In Abhängigkeit der Krankheitsaktivität sind unspezifische Symptome wie Müdigkeit, Gewichtsverlust, Fieber, Gelenksteifigkeit am Morgen und generelles Unwohlsein mit der RA assoziiert.

Rheumaknoten sind subkutane, bindegewebige Knoten welche sich in erster Linie an den Muskel-Extensoren Seiten der oberen und unteren Extremität finden. Sie können aber auch auf inneren Organen, wie dem Lungenparenchym oder im Myocardium auftreten.(16) Sie sind die häufigste extraartikuläre Manifestation der RA.(22)

An den Augen kann sich die RA auf verschiedene Weisen manifestieren: In 1% der Fälle kann es zu einer Episkleritis kommen, welche abgesehen von einer Rötung des Auges, meist milde Symptome verursacht. Die Skleritis hingegen, äußert sich als schmerzhaftes Augenrötung mit Photophobie und möglicher Sehstörungen.(23) Eine weitere Möglichkeit ist die Entwicklung eines sekundären Sjögren Syndroms, welches sich an den Augen als Keratokonjunctivitis sicca äußert. (16, 22)

Hämatologische Veränderungen bei RA sind unter anderem: Eine Anämie aufgrund der chronischen Entzündung, eine Thrombozytose und Leukozytose wegen entzündlicher Vorgänge im Blut, eine Erhöhung bestimmter akut-Phase Proteine wie dem C-reaktiven Protein (CRP) sowie eine Verlängerung der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG). Benigne Lymphadenopathien können vorkommen, müssen aber von einem möglichen non-Hodgkin Lymphom (meistens B –Zelllymphom) abgegrenzt werden, für welche das Risiko bei der RA als Folge der chronischen Entzündung deutlich erhöht ist.

Durch die chronische Entzündung kann es bei der RA selten zu einer sekundären Amyloidose kommen, wobei die Ablagerung von Amyloid A zu terminalem Nierenversagen führen kann.

Es besteht die Möglichkeit einer sekundären Vaskulitis, welche vor allem kleine und mittelgroße Hautgefäße betrifft. Dies kann zu Ulzerationen und Nekrosen, aber auch zu peripheren Neuropathien führen. Diese äußern sich oft als distale Gefühlsstörungen im Bereich der Hände und Füße, aber auch als Mononeuritis multiplex, bei der zwei oder mehrere periphere Nerven in verschiedenen Körperbereichen betroffen sind.(16)

In der Lunge kann es zu Pleuritiden und zu interstitiellen Lungenfibrosen kommen. Neben der Krankheitsaktivität gilt bei RA Patientinnen und Patienten auch Rauchen als ein Risikofaktor für die Entstehung einer Lungenfibrose. (24)

Perikarditis und Perikarderguss sind mögliche extraartikuläre Manifestationen der RA. Des Weiteren ist das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen bei RA deutlich erhöht und vergleichbar mit dem von Patientinnen und Patienten mit Diabetes mellitus.(25)

Die RA wird außerdem mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen assoziiert, wobei auch die immunsuppressive Therapie darauf einen Einfluss hat. (26)

Schließlich ist auch das Risiko an Osteoporose zu erkranken doppelt so hoch wie bei gesunden Menschen.(16)

### **1.1.5 Diagnose und Krankheitsaktivität**

Die RA ist eine klinische Diagnose, die anhand der Anamnese, der körperlichen Untersuchung, Laborwerten und bildgebender Verfahren gestellt werden kann.(16)

Die frühe Diagnose mit anschließender Therapie führt bei RA Patientinnen und Patienten zu einer Verbesserung von Lebensqualität und Beweglichkeit sowie zu geringeren Gelenkszerstörungen.(27)

Diagnostische Kriterien existieren nicht, wohingegen klinische Kriterien, welche darauf abzielen, homogene Gruppen für klinische und epidemiologische Studien zu definieren, vorhanden sind. Im Unterschied zu diesen „Klassifikationskriterien“ hat eine klinische Diagnose zum Ziel, Patientinnen und Patienten individuell zu kategorisieren und Falschdiagnosen zu minimieren.(28)

Die 2010 veröffentlichten klinischen Kriterien für RA des „American College of Rheumatology (ACR)“ und der „European League Against Rheumatism (EULAR)“ beziehen sich auf Patientinnen und Patienten, welche zumindest ein Gelenk mit klinisch

diagnostizierter Synovialitis vorweisen können und diese nicht besser durch eine andere Erkrankung als die RA erklärt werden kann.(29) Bei den ACR Kriterien für RA werden Punkte für die Anzahl der betroffenen Gelenke (große und kleine Gelenke separat), für einen positiven Rheumafaktor (RF) oder positive ACPA, für positive Entzündungsparameter und für eine Dauer der Symptome von über sechs Wochen vergeben. Bei einem Punktwert von  $\geq 6$  kann die klinische Diagnose einer RA gestellt werden. (vgl. Tab. 1)

Kriterien	Punkte
<b>Gelenksbefall</b>	
1 großes Gelenk	0
2-10 große Gelenke	1
1-3 kleine Gelenke (mit oder ohne Befall von großen Gelenken)	2
4-10 kleine Gelenke (mit oder ohne Befall von großen Gelenken)	3
>10 Gelenke (zumindest 1 kleines Gelenk)	5
<b>Serologie (zumindest ein Test Ergebnis wird für die Klassifikation benötigt)</b>	
Negativer RF UND negative ACPA	0
Niedrig positiver RF ODER niedrig positive ACPA	2
Hoch positiver RF ODER hoch positive ACPA	3
<b>Akut-Phase-Reaktant (zumindest ein Test Ergebnis wird für die Klassifikation benötigt)</b>	
Normales CRP UND normale BSG	0
Abnormale CRP ODER abnormale BSG	1
<b>Dauer der Symptome</b>	
<6 Wochen	0
$\geq 6$ Wochen	1
<b>Ergebnis: <math>\geq 6</math> Punkte benötigt zur Klassifizierung der RA</b>	

**Tab. 1: ACR Kriterien für rheumatoide Arthritis. Tab. abgeändert aus/modified from: (29) Rheumafaktor (RF); Antikörpern gegen citrullinierte Peptide (ACPA); C-reaktives Protein (CRP); Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG).**

### **1.1.5.1 Serologie**

Die Klassifikationskriterien 2010 involvieren zwei Antikörper: den RF und die ACPA.

Der RF ist ein Antikörper der gegen die „Fragment crystallisable (Fc)“ Region des Immunglobulin (Ig) G gerichtet ist und bei RA, aber auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, chronischen Infektionen und bei gesunden, älteren Personen gehäuft vorkommt.(30, 31)

Die Sensitivität des RF bei RA (sowohl von IgM als auch IgA) liegt bei 69% und die Spezifität bei 85%.(32)

Die Sensitivität der ACPA ist der des RF ähnlich und beträgt 67%, während die Spezifität mit 95% deutlich höher ist als die des RF.(32) Des Weiteren scheint das Vorhandensein der ACPA im Blut von Gesunden ein Risikofaktor für die zukünftige Erkrankung einer RA zu sein. (33)

Positive Ergebnisse bei RF und bei ACPA sind unabhängige Prädiktoren für die radiologische Krankheitsprogression bei neu diagnostizierter RA.(34) Hohe Antikörpertiter sind außerdem ein Zeichen für verstärkte, systemische Krankheitsaktivität.(16)

### **1.1.5.2 Messung der Krankheitsaktivität**

Die Messung der Krankheitsaktivität bei der RA erfolgt mit Hilfe von sogenannten „composite scores“ oder „disease activity scores (DAS)“. Diese setzen sich aus verschiedenen Daten von Patientinnen und Patienten zusammen, wie beispielsweise der Anzahl der geschwollenen (engl.: swollen joint count (SJC)) oder schmerzhaften (engl.: tender joint count (TJC)) Gelenke.(35)

Der „Disease activity score 28 (DAS28)“ wurde 1995 entwickelt und kombiniert Gelenksschwellung und Gelenksschmerz mit der BSG und der subjektiven Bewertung der Krankheitsaktivität durch Patientinnen und Patienten.(36)

Weitere Scores, wie der „Simplified disease activity index (SDAI)“(37) und der „Clinical disease activity index (CDAI)“(38) wurden entworfen, um die Berechnung der Krankheitsaktivität zu erleichtern und eine subjektive Bewertung der Ärztinnen und Ärzte hinzuzufügen. Im Falle des CDAI wurde außerdem auf Laborwerte verzichtet, um die Berechnung in der Praxis noch weiter zu erleichtern.(35) (vgl. Tab. 2)

Score	Score - Bestandteile	Cut off für Remission
<b>DAS 28 (BSG)</b>	$(0,56 \cdot \text{TJC} \cdot 1/2) + (0,28 \cdot \text{SJC} \cdot 1/2) + (0,7 \cdot \ln[\text{BSG}]) + (0,014 \cdot \text{PtGA})$	< 2,6
<b>CDAI</b>	SJC + TJC + PhGA + PtGA	≤ 2,8
<b>SDAI</b>	SJC + TJC + PhGA + PtGA + CRP (mg/dl)	≤ 3,3

**Tab. 2: Disease activity scores. Tab. abgeändert aus/modified from: (16)**

**Disease activity score 28 (DAS28); Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG); clinical disease activity index (CDAI); simplified disease activity index (SDAI); tender joint count (TJC); swollen joint count (SJC); patient global activity (PtGA); physician global activity (PhGA); C-reaktives Protein (CRP).**

Eine weitere Möglichkeit, die Krankheitsaktivität zu messen ist der Einsatz von Fragebögen, für Patientinnen und Patienten, wie der „Rheumatoid Arthritis disease activity index (RADAI)“. Mit diesem wird in erster Linie die subjektive Einschätzung der Krankheitsaktivität in der Vergangenheit bewertet.(39)

Eine modifizierte Version des RADAI ist der RADAI-5, welcher zur Vereinfachung des Fragebogens, eine Frage bezüglich schmerzhafter Gelenke weglässt.(40) Es konnte gezeigt werden, dass der RADAI-5 bei RA gut mit Scores wie dem DAS28-BSG und dem CDAI korreliert.(41)

### **1.1.5.3 Bildgebung bei RA**

Das konventionelle Röntgen dient in der klinischen Routine zur Darstellung von Erosionen, Gelenkraumverschmälerungen, Knochenzysten, Osteoporose, Subluxationen, und Verknöcherungen von betroffenen Gelenken. (42)

Durch die Magnetresonanztomographie (MRT) lassen sich sämtliche Strukturen des Gelenks darstellen. Dazu zählen unter anderem die Synovialmembran, Knochen, Knorpel, Bänder, Sehnen und Sehnencheiden.(43) Das MRT hat eine höhere Sensitivität als das Röntgen Erosionen darzustellen.(44)

Eine genaue Beschreibung der Rolle des Ultraschalls bei der RA, findet sich im Kapitel „Ultraschall bei der RA“.

### **1.1.6 Therapie**

Das Ansprechen der RA auf eine medikamentöse Behandlung ist umso besser, je früher die Diagnose gestellt und mit der Therapie begonnen wird.(45) Es konnte gezeigt werden, dass die frühe Therapieeinleitung eines „Disease-modifying-anti-rheumatic-drug (DMARD)“ für die Prävention von radiologischen Veränderungen vorteilhaft ist. Patientinnen und Patienten die früh behandelt wurden, zeigten über einen Zeitraum von fünf Jahren deutlich weniger radiologische Veränderungen, als jene, die erst neun Monate nach Einsetzen der ersten Symptome behandelt wurden.(46)

Die moderne Behandlung der RA erfolgt nach dem sogenannten „treat-to-target“ Prinzip. Dieses Prinzip beruht auf der Definition von Therapiezielen und regelmäßigen Kontrollen, die Patientinnen und Patienten mit Ärztinnen und Ärzten ausmachen, sowie auf der Änderung der Therapie bei Ausbleiben der besprochenen Therapieziele.(47) Hierbei wird in erster Linie die Remission oder die „low disease activity“ der Krankheit als Ziel festgesetzt.(48) Remission kann anhand von klinischen Symptomen oder „Cut-off-Werten“ der DAS bestimmt werden. Das ACR und die EULAR empfehlen die Definition von Remission unter anderem ab einem SDAI Wert von  $\leq 3,3$ .(49)

#### **1.1.6.1 Methotrexat und synthetische DMARDs**

DMARDs werden als die erste Therapie bei neu aufgetretener RA empfohlen.(48) Eine besondere Rolle nimmt Methotrexat (MTX) ein, dessen Langzeiteffekt auf den Körper gut erforscht ist, billiger als die anderen DMARDs ist, aber in seiner Effektivität der der anderen DMARDs gleicht(50, 51).

Die Frage, ob MTX als Monotherapie oder in Kombination mit einem anderen DMARD verwendet werden sollte, wird kontrovers diskutiert. Eine Meta-Analyse der vorhandenen Daten zeigte eine höhere Wirksamkeit bei ebenfalls höherer Toxizität bei der Kombination mehrerer DMARDs.(52)

#### **1.1.6.2 Glukokortikoide**

Glukokortikoide kommen bei der RA in der Initialbehandlung sowie im Verlauf bei einem Schub der Erkrankung zum Einsatz. Glukokortikoide können dabei sowohl oral, intramuskulär als auch direkt in das Gelenk verabreicht werden.(51) Orale Glukokortikoide haben neben ihrer anti-inflammatorischen, auch eine „disease modifying“ Komponente

und führen zur Verzögerung von radiologisch, destruktiven Veränderungen im Gelenk.(53)  
Die langfristige Verwendung von Glukokortikoiden führt allerdings zu systemischen Nebenwirkungen, weshalb sie nur für kurze Zeit angewendet werden sollten.(48, 54)

### **1.1.6.3 Biologica (biologische DMARDs)**

Biologica sind Medikamente, die vor allem bei therapierefraktärer RA eingesetzt werden.(51) Die Entwicklung dieser Medikamente beruht auf bekannten pathogenetischen Konzepten der RA, wodurch sie gegen bestimmte Moleküle wie „tumor necrosis factor (TNF)“ $\alpha$ , Interleukin (IL) 1 und IL 6, sowie B- und T-Lymphozyten gerichtet sind.(55)  
Nachteile der Biologica sind ihr hoher Preis, die parenterale Gabe als einzige Applikationsform und das erhöhte Risiko von Infektionskrankheiten.(51, 56)

TNF $\alpha$  Inhibitoren bergen zusätzlich das Risiko einer Reaktivierung einer latenten Tuberkulose(57) und Rituximab scheint mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer multifokalen Leukenzephalopathie einherzugehen.(58)

### **1.1.6.4 Janus Kinasen Inhibitoren**

Janus Kinasen Inhibitoren sind relativ neue Medikamente zur Behandlung von rheumatoider Arthritis. Sie inhibieren die verschiedenen Janus Kinasen JAK1, JAK2, JAK3 und Tyrosin Kinase 2 und interagieren so mit dem Signalweg mehrerer Zytokine.(59)

Der erste in den USA zugelassene Wirkstoff Tofacitinib wurde sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit MTX gegen eine MTX Monotherapie bei RA Patientinnen und Patienten getestet. Sowohl die Tofacitinib Monotherapie, als auch die Kombination mit MTX zeigten im MRT ein geringeres Ausmaß an Synovitis nach 3 Monaten Therapie, sowie weniger Erosionen und geringere Mengen an Knochenmarksödemen nach 6 Monaten, im Vergleich zur MTX Monotherapie.(60)

Eine weitere Studie verglich das Erreichen der „ACR 20 response“ Kriterien nach sechs Monaten zwischen einer Gruppe mit Tofacitinib Therapie und einer Gruppe mit Adalimumab Therapie. Hierbei zeigte sich in beiden Gruppen ein Erreichen der ACR 20 response Kriterien in ungefähr 50% der Fälle.(61)

Ein klarer Vorteil von Janus Kinasen Inhibitoren gegenüber den biologischen DMARD ist die orale Applikation. Beobachtete Nebenwirkungen von Tofacitinib sind Nasopharyngitis,

Hypercholesterinämie, Neutropenie, Anämie, sowie das erhöhte Risiko von Infektionskrankheiten.(59)

## **1.2 Muskel- und Gelenksultraschall**

### **1.2.1 Anatomie des Gelenks**

Jedes Gelenk (Diarthrose) besteht aus einer Gelenkhöhle (Cavitas articularis), die von artikulierenden Gelenksflächen (Facies articulares) sowie einer Gelenkkapsel (Capsula articularis) umgeben ist. Zwischenscheiben (Disci, Menisci), Bänder (Ligamenta), Schleimbeutel und Sehnenscheiden (Bursae et Vaginae synoviales) sind zusätzliche Einrichtungen, die sich im oder um das Gelenk herum befinden. Die Gelenkhöhle wird von Synovialflüssigkeit ausgespült.

Die Gelenksflächen bestehen, außer beim Schlüsselbein- und Kiefergelenk, aus hyalinem Knorpel. Dieser ermöglicht das Gleiten der Gelenkskörper und wirkt schockabsorbierend. Da der Knorpel weder Nerven- noch Blutgefäße aufweist, ernährt er sich zu einem Drittel aus subchondralem Knochengewebe und zu zwei Drittel aus der Synovialflüssigkeit. Unter Druck gibt der Knorpel Synovialflüssigkeit ab und saugt diese bei erneuter Entlastung wieder auf.

Die Gelenkkapsel ist an der Knochen-Knorpel-Grenze der Gelenkskörper befestigt und erstreckt sich auch in Strukturen, die mit dem Gelenksraum verbunden sind (z.B: Bursa suprapatellaris). Sie besteht aus zwei Schichten. Die äußere Schicht (Membrana fibrosa) besteht aus kollagenen und elastischen Fasern und geht in das Periost des Knochens über. Sie wird von eigenen Bändern (Ligamenta articularia) verstärkt und es finden sich zahlreiche Gefäße, Nerven und Rezeptoren in dieser Schicht.

Die innere Schicht (Membrana synovialis) besteht erneut aus zwei Schichten: Der inneren synovialen Deckschicht (synoviale Intima, intimal layer, lining cells) und einer subintimalen (subsynovialen) Schicht. Die innere synoviale Deckschicht bildet die Synovialflüssigkeit. Die subintimale Schicht enthält zahlreiche Mechano- und Nozirezeptoren und ist hauptverantwortlich für das Verspüren von Gelenksschmerzen bei Entzündungen und Ergüssen.

Die Synovialmembran kann gefäßreiche Zotten (Villi synoviales) (vgl. Abb. 2) und gefäßreiche Falten (Plicae synoviales) bilden. Die Falten dienen als Reserve bei Bewegung

und vergrößern die Oberfläche. Die Synovialmembran ist gut durchblutet und hat eine hohe Permeabilität.

Die Synovialflüssigkeit ist eine klare, gelbliche, fadenziehende Flüssigkeit mit Schmierfunktion. In größeren Gelenken finden sich physiologisch bis zu 35ml Synovialflüssigkeit. Sie ist reich an Hyaluronsäure und Plasmaproteinen. Ihre Viskosität lässt bei niedrigen Temperaturen nach, wodurch die vermehrte Gelenksteifigkeit bei Kälte zu erklären ist.(62)

### **1.2.2 Allgemeines zum Muskel- und Gelenksultraschall**

Der Ultraschall ist ein Schnittbildverfahren, das auf der Ausbreitung einer Ultraschallwelle (Echo) in einem Gewebe beruht. Beim Durchtritt durch Gewebe werden Schallwellen auf unterschiedliche Weisen geschwächt und abgelenkt:

Das Phänomen der Absorption beschreibt die Umwandlung der kinetischen Energie der Schallwelle in Wärme. Die Amplitude der Schallwelle nimmt dabei ab. Diese Schwächung der Schallwelle ist umso größer, je dichter das passierte Gewebe ist und je schlechter sich dieses komprimieren lässt. Des Weiteren werden Schallwellen einer höheren Frequenz mehr geschwächt als jene einer niedrigeren.

Brechung und Reflexion treten an Grenzflächen auf und sind abhängig von der Differenz der Impedanzen der aufeinanderliegenden Gewebearten. Bei großen Differenzen (z.B. Luft und Knochen) werden bis zu 100% der Schallwelle reflektiert. Die dorsal an diesem Gewebe stattfindende Schallauslöschung wird dorsaler Schallschatten genannt.

Bei der Streuung werden Schallwellen, wenn sie auf kleinere Strukturen als ihre Wellenlänge treffen, in alle Richtungen abgelenkt. Dadurch sinken der Kontrast und die Detailerkennung.

Schallwellen laufen mit wachsender Entfernung auseinander. Dieses Prinzip nennt sich Divergenz und ist ebenfalls von der Form des Schallkopfs abhängig.

Die zurückgeworfenen Schallwellen werden schließlich anhand ihrer Amplituden und ihrem zeitlichen Eintreffen ausgewertet und als Bild dargestellt.(63)

Im Muskel- und Gelenksultraschall sind vor allem der B-Mode und der Colour/Power Doppler bei der Bildgebung von Bedeutung. Bei dem B-mode wird die Amplitude des zurückgeworfenen Echos als Grauwert dargestellt (gray-scale). Bei dem Colour/Power Doppler hingegen wird der Blutfluss und somit die Perfusion des Gewebes dargestellt.(64)

Als Schallköpfe werden Linearschallköpfe mit Frequenzen von >12 MHz bei kleineren, oberflächlich gelegenen Gelenken verwendet, während bei größeren und tiefer gelegenen Gelenken Schallköpfe mit Frequenzen von 4-13MHz zur Anwendung kommen.(65, 66)

Hochfrequenz-Schallköpfe haben den Vorteil der besseren örtlichen Auflösung, wobei die Eindringtiefe gering bleibt. Deswegen eignen sie sich gut für oberflächlich gelegene Gelenke. Tieffrequenz-Schallköpfe weisen eine größere Eindringtiefe bei einer geringeren Auflösung auf. Diese eignen sich daher bei tiefer gelegenen Gelenken, wie beispielsweise dem Hüftgelenk.(64)

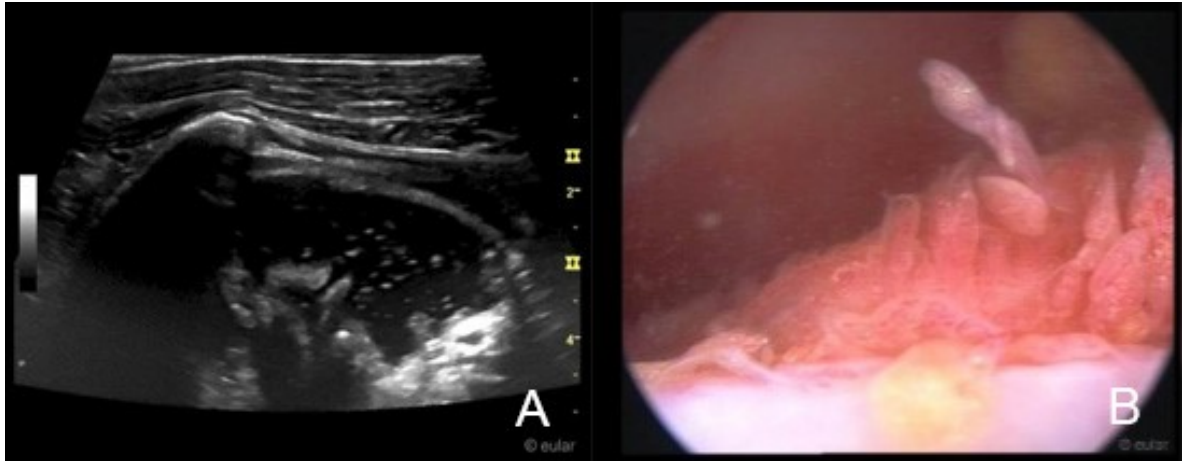
### **1.2.3 Synovialgewebe im Ultraschall**

Die Darstellung und klare Abgrenzung einer gesunden Synovialmembran zum umliegenden Gewebe im Gelenksultraschall ist oft schlecht möglich. Dies lässt dadurch erklären, dass die gesunde Synovialmembran lediglich einige µm dick ist und sich dadurch kaum von den umgebenden Gelenksstrukturen unterscheiden lässt.(67) Eine Synovitis im Ultraschall lässt sich hingegen diagnostizieren, wenn ein Gelenkserguss vorhanden ist oder wenn es zur Hypertrophie der Synovialmembran gekommen ist (vgl. Abb. 2). (68)

Synoviale Hypertrophie zeigt sich im B-mode als abnormal hypoechogenes intraartikuläres Gewebe, welches nicht verschiebbar oder komprimierbar ist und meist im Doppler eine vermehrte Perfusion aufweist. Die Hypoechogenität ist relativ zum subdermalen Fettgewebe und zum umgebenden Bindegewebe zu betrachten. Unter Umständen kann die Synovialmembran im Gesamtbild auch iso- oder hyperechogen erscheinen.

Die Synovialflüssigkeit hingegen zeigt sich im B-Mode hypo- oder anechogen, lässt sich verschieben, komprimieren und weist kein Doppler Signal auf. (69)

Zur ultraschallgezielten Gewinnung der Synovialmembran eignet sich vor allem hypertrophiertes Gewebe.(70, 71)



**Abb. 2: Synoviale Hypertrophie**

**A, B-mode eines Gelenksergusses und synovialer Hypertrophie im Glenohumeralgelenk.**

**B, Arthroskopisches Bild von Villi synoviales in der Bursa suprapatellaris.**

**Abb. mit freundlicher Genehmigung aus/with kind permission from: (72, 73)**

#### **1.2.4 Ultraschall bei der RA**

Mit Hilfe des Ultraschalls ist es möglich, sowohl destruktive als auch entzündliche Veränderungen bei der RA darzustellen.(43)

Mittels B-mode lässt sich die Verdickung der Synovialmembran bestimmen (69), während mit dem Power Doppler der vermehrte Blutfluss durch das Gewebe, wie er bei Entzündungen vorkommt, festgestellt werden kann.(74)

Zur Standardisierung der Bewertung des Ultraschallbildes bei RA hat die „Outcome Measures in Rheumatology (OMERACT) synovitis working group“ einen Score entwickelt, der die Hypertrophie der Synovialmembran des B-modes mit dem vermehrten Blutfluss des Power Doppler Verfahrens vereint.(75)

Der „Global OMERACT-EULAR Synovitis Score (GLOESS)“ wurde in einer prospektiven Studie an Patientinnen und Patienten, welche eine Therapie mit Abatacept erhielten validiert. Demnach fand sich bereits eine Woche nach Therapiebeginn eine Verbesserung des Scores. Zwar reagierten sowohl GLOESS als auch DAS28 auf die neu eingeleitete Therapie, aber eine Korrelation der zwei Scores konnte zu keinem Zeitpunkt dargestellt werden.(76, 77)

Erosionen sind im Ultraschall als intraartikuläre Diskontinuitäten der Knochenoberfläche zu erkennen.(69) Der Ultraschall hat dabei eine höhere Sensitivität bei der Erkennung von Erosionen als das Röntgen. (78, 79)

Weitere mögliche Veränderungen des Bewegungsapparats bei RA finden sich an den Sehnen und Sehnenscheiden:

Eine Tenosynovitis zeigt sich als hypo-, oder anechogenes, verbreitetes Gewebe mit oder ohne Flüssigkeit in den Sehnenscheiden.

Enthesiopathien sind Veränderungen von Sehnen oder Bänder am Knochenansatz. Sonographisch kann die Entese in diesen Fällen verdickt und/oder hypoechogen verändert sein sowie ein Doppler Signal, Enthesiophyten oder Erosionen aufweisen.(69)

## **1.3 Synovialgewebe**

### **1.3.1 Methoden der Gewebsgewinnung**

Die Gewinnung von Synovialmembran bei Personen mit rheumatologischen Erkrankungen erfolgte im Laufe der Jahre über verschiedene Verfahren. Durch chirurgische Eingriffe am Gelenk kann Synovia entnommen werden, wobei dafür meist ein größerer Eingriff nötig ist.(80)

#### **1.3.1.1 Punchbiopsie nach „Polley-Bickel“**

Das erste Verfahren zur Gewinnung von Synovialmembran ist die „Punchbiopsie nach Polley-Bickel“, bei der nach einem kleinen Hautschnitt eine 5mm im Durchmesser breite Hohlzylinder in den Gelenkraum vorgeschoben wird. Durch das Einführen einer Biopsiestanze erfolgt anschließend die Gewinnung von Synovialmembran. (vgl. Abb. 3) Bei der Präsentation der Methode im Jahr 1951 wurde berichtet, dass in 86,2% der Fälle die Biopsien ausreichend Material zur weiteren histologischen Färbung lieferten. (81)

Die Nachteile dieser Methode sind die Invasivität, gegeben durch einen benötigten Hautschnitt, sowie die Verwendung der Methode bei hauptsächlich großen Gelenken.(81, 82)

### **1.3.1.2 „Blind needle“ Verfahren**

Um einen weniger invasiven Zugang zu schaffen, wurde die „Parker – Pearson Nadel“ entworfen, die mit 2 Zoll (5,8cm) und 14 Gauge (2,1mm) einen deutlich dünneren Durchmesser aufweist und keinen Hautschnitt zum Einführen benötigt. Die Biopsie erfolgt nach einer Lokalanästhesie durch das Einführen einer 4 Zoll (10,16cm) langen 15 Gauge Nadel, die am vorderen Ende stumpf ist und einen Schlitz zum Aufsammeln der Synovialmembran aufweist. (vgl. Abb. 3) Durch einen erzeugten Sog (z.B. durch eine leere Luer-Lock Spritze) wird das Gewebe in den Schlitz gesaugt und durch einen geschliffenen Haken beim Zurückziehen der inneren Nadel geschnitten und daraufhin entnommen.(82, 83)

Komplikationen, wie Hämarthrose oder Infektion traten in Kollektiven von 800 Patientinnen und Patienten nicht auf und Synovialmembran konnte in ausreichenden Mengen zur weiteren Verarbeitung in 85% der Fälle gewonnen werden.(84)

Diese Methode wird hauptsächlich zur Punktion der Bursa suprapatellaris verwendet, wobei auch andere Gelenke wie Schulter-, Ellbogen-, Hand- und Sprunggelenke sowie kleinere Fingergelenke mit einer modifizierten Nadel punktiert werden können.(84, 85)

Mikroskopisch ist das gewonnene Gewebe bei Patientinnen und Patienten mit RA, bezogen auf synoviale Entzündungszeichen, dem durch Arthroskopie gewonnenen Gewebe ähnlich. Ein Unterschied zeigte sich lediglich bei der Menge der „Cluster of differentiation (CD)“68 positiven Zellen in der „sublining“ Schicht nahe des Knorpel-Pannus Übergangs. Die Anzahl der CD68 positiven Zellen, gewonnen durch das „Blind needle“ Verfahren, war dabei deutlich geringer im Vergleich zur Arthroskopie.(86)

Nachteile dieser Methode sind außerdem der blinde Stichgang (daher auch Blind needle Verfahren), die übliche Beschränkung auf größere Gelenke und die Gefahr, bei nicht geschwollenen Gelenken, unzureichende Mengen an Gewebe zu erhalten. (83)

### **1.3.1.3 Arthroskopisches Verfahren**

Um eine Arthroskopie an einem Gelenk durchzuführen, benötigt man stets zwei separate Zugänge: einen für das Arthroskop und einen für den Greifarm. Es können prinzipiell größere Gelenke wie das Kniegelenk, aber auch kleinere Gelenke wie das Hand- und MCP Gelenk biopsiert werden. Bei größeren Gelenken wird ein 2,7mm-, und bei kleinen Gelenken ein 1,9mm Arthroskop verwendet.(84, 87)

Die Sicherheit dieser Methode wurde bei einer Befragung von mehreren rheumatologischen Zentren im Jahre 2002, bei der 15.682 Arthroskopien ausgewertet wurden, überprüft. Kleine Komplikationen, wie vasovagale Reaktionen und temporäres Anschwellen der Gelenke, wurden in 5-10% der Fälle beschrieben. Schwere Komplikationen waren sehr selten, die Häufigkeit von Wundinfektionen lag bei 0,1%, die eines Hämarthros bei 0,9% und die von tiefen Beinvenenthrombosen bei 0,3%.(88)

Des Weiteren wird die Methode von Patientinnen und Patienten in der Regel gut toleriert. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass bei 150 Patientinnen und Patienten, an denen eine Knie Arthroskopie vorgenommen wurde, 35-36% über minimale Schmerzen beziehungsweise Unannehmlichkeiten klagten. Stärkere Schmerzen wurden nicht verspürt. Weitere Vorteile dieser Methode sind die Möglichkeit der ständigen Spülung sowie der Biopsie unter Sicht.(89)

Die Biopsie unter Sicht bietet den Vorteil zielgenau Gewebe entnehmen zu können. (vgl. Abb. 3) Dies führt zu einer ausreichenden Ausbeute von Synovialmembran, sogar in nicht geschwollenen Gelenken.(87)

Ein Zusammenhang zwischen dem makroskopischen Bild des Gewebes in der Arthroskopie und dessen mikroskopisch/immunhistochemischen Bilds wurde in zwei Studien unterschiedlich bewertet, sodass ein klarer Zusammenhang nicht angenommen werden kann.(90, 91)

Die Nachteile der Arthroskopie im Vergleich zum „Blind needle“ Verfahren sind die höheren Kosten für die Ausrüstung und Räumlichkeiten sowie die Komplexität des Eingriffs.(88)

Aufgrund der Sicherheit, der guten Toleranz und der ausreichenden Ausbeute an Synovialmembran gilt die Arthroskopie, trotz erwähnter Nachteile, als der momentane Goldstandard zur Gewinnung von Synovialmembran.(87, 92)

#### **1.3.1.4 Ultraschallgezielte Gewebsgewinnung**

Das Interesse an ultraschallgezielten Synovialgewebsbiopsien kommt daher, dass die Methode sowohl bei kleinen als auch bei großen Gelenken eingesetzt werden kann und im Vergleich zur Arthroskopie minimal invasiv, günstiger und technisch weniger aufwendig ist. (92)

Die ultraschallgezielte Gewinnung von Synovialmembran ist ein verhältnismäßig neues Verfahren. Die erste Beschreibung von durchgeführten Synovialgewebsbiopsien mit Hilfe

des Ultraschalls stammt aus dem Jahr 1997. In dieser Studie wurde mit Hilfe einer 18 Gauge „Tru cut“ Biopsienadel Gewebe im Handgelenk zweier Patienten ultraschallgezielt entnommen.(93)

„Tru cut“ Biopsienadeln funktionieren nach einem ähnlichen Prinzip wie jene Biopsienadeln, die zur Gewebentnahme von extraartikulärem Tumorgewebe verwendet werden.(94) Ein Beispiel für diese Biopsienadeln sind Quick Core Nadeln wie sie von Kelly et al (70) verwendet wurden. (vgl. Abb. 3)

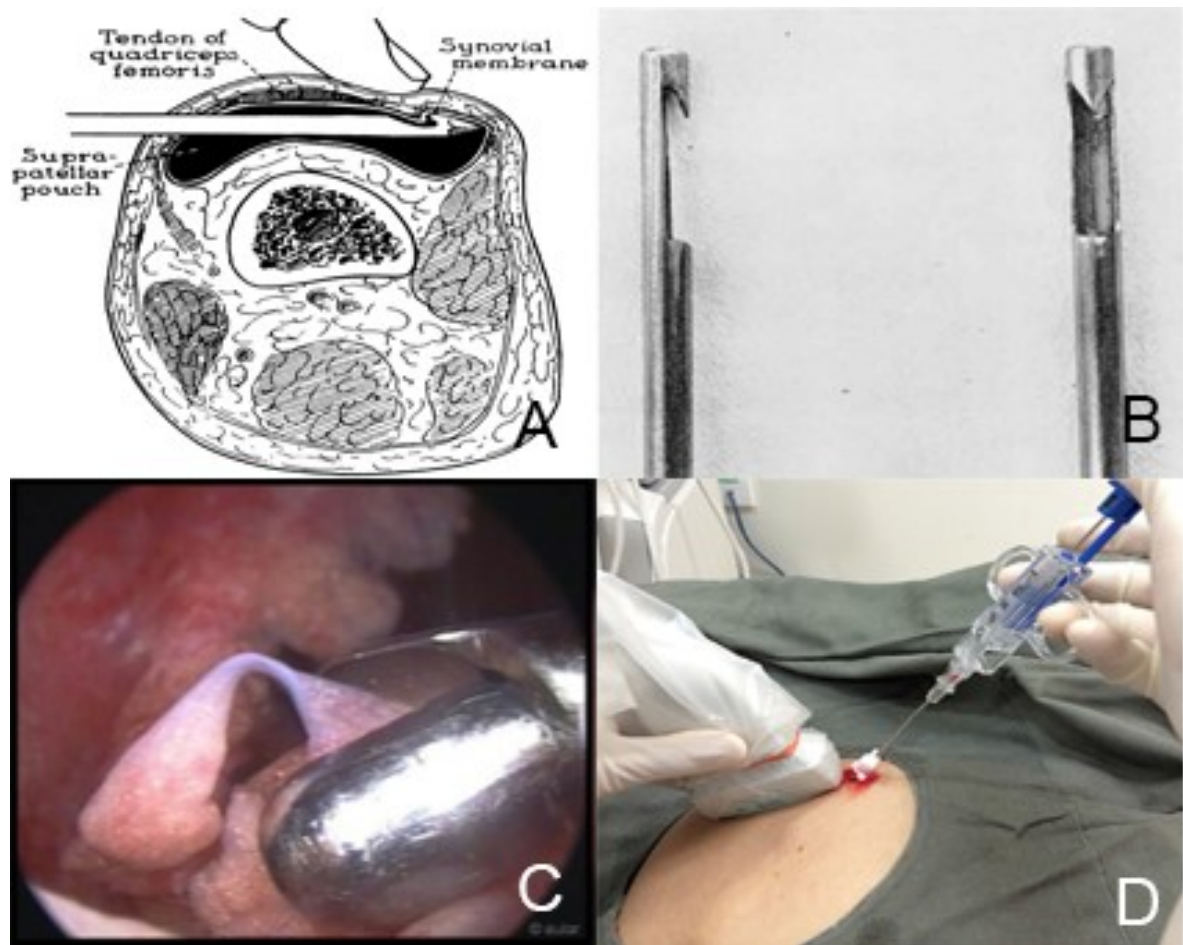
2004 erfolgte, ebenfalls ultraschallgezielt, die Entnahme von Synovialmembran an großen sowie kleinen Gelenken bei insgesamt 37 Patientinnen und Patienten mit Hilfe einer Biopsiezange („Portal and forceps“ Methode). Bei diesem Verfahren wurde, nach Durchführung einer Lokalanästhesie, ein 4 mm langer Hautschnitt durchgeführt, durch welchen ein Führungsdraht und mehrere Dilatatoren den Weg in das Gelenk eröffneten. Durch eine bewegliche, beziehungsweise starre Biopsiezange, erfolgte so die Entnahme von Synovialmembran.(95)

Im Jahr 2007 konnte gezeigt werden, dass das durch die „Portal and forceps“ Methode gewonnene Synovialmembran histopathologisch genauso verwertbar ist wie die durch Arthroskopie gewonnene Synovialmembran.(96)

Im Jahr 2015 wurde eine Kohorte von 57 Patientinnen und Patienten zwei Mal mittels „Tru cut“ Technik biopsiert, wobei 16 Gauge Nadeln für kleine und 14 Gauge Nadeln für große Gelenke verwendet wurden. Bei großen Gelenken wurde zusätzlich ein Trochar verwendet, um mehrere Biopsien an einem Gelenk vornehmen zu können. Insgesamt wurden 93 ultraschallgezielte Biopsien durchgeführt. Bei der Studie wurde ein Fragebogen zur Toleranz des Eingriffs ausgeteilt, wobei 77,7% der Patientinnen und Patienten keine Schmerzen, 15,1% geringe Unannehmlichkeiten, 6,5% stärkere Unannehmlichkeiten und 1,1% geringe Schmerzen angaben. Des Weiteren waren die einzigen Komplikationen, die während der 93 Eingriffe vorkamen, vasovagale Reaktionen in 3 Fällen. In 92,5% der Fälle erbrachte die Biopsie ausreichend Synovialmembran zur weiteren histopathologischen Verarbeitung sowie eine gute Ausbeute an extrahierbarer RNA.(70)

In all den erwähnten Studien rangierte die Anzahl der gewonnenen Proben bei der Punktion eines Gelenks zwischen 3-12.(70, 95-97) Die OMERACT veröffentlichte 2016 einen Review zur ultraschallgezielten Synovialgewebsbiopsie. Darin wird vorgeschlagen, künftige Studien zur ultraschallgezielten Synovialgewebsbiopsie mit dem arthroskopischen Verfahren zu vergleichen. Schwerpunkt soll dabei auf folgendes gelegt werden: die

Qualität des Gewebes, die Toleranz der Methode für Patientinnen und Patienten und die Suche nach Biomarkern anhand welcher Therapieerfolge gemessen werden können.(92)



**Abb. 3: Methoden der Synovialgewebsbiopsie**

**A, Schema der Synovialgewebsbiopsie nach „Polley Bickel“. B, Innerer Anteil der „Parker Pearson“ Nadel mit geschliffenem Haken. C, Arthroskopische Biopsie der Villi synoviales in der Bursa suprapatellaris. D, Ultraschallgezielte Biopsie mit Trochar.**

**Abb. mit freundlicher Genehmigung aus/with kind permission from: (65, 73, 81, 82)**

## **1.3.2 Möglichkeiten der Verarbeitung und Analyse der Synovialmembran**

### **1.3.2.1 Histologische Färbungen**

Als Routinefärbung wird die Hämatoxylin – Eosin – Färbung verwendet. Hierbei wird das Gewebe zuerst 24 Stunden in Formalin eingelegt, woraufhin es in Paraffin eingebettet und schließlich mit Hämatoxylin – Eosin gefärbt wird.(87)

Die immunhistochemische Färbung dient der Darstellung von Oberflächenantigenen, wie beispielsweise CD4 bei T-Helferzellen, oder CD8 bei T-Killerzellen, im histologischen Schnitt. Entsprechende Antikörper binden dabei das gewünschte Antigen und lassen sich durch Kopplung eines Nachweissystems im histologischen Schnitt darstellen. (87, 98)

### **1.3.2.2 Zell und Gewebekulturen**

Die Zellkultur ermöglicht es, Zelllinien der Zellen der Synovialmembran zu erstellen, welche für weitere Untersuchungen herangezogen werden können. „Whole tissue synovial explant ex vivo cultures“ sind Kulturen bei denen, im Gegensatz zu einfachen Zellkulturen, die Gewebsarchitektur sowie die Zellverbindungen intakt bleiben.(99) Da diese Kulturen proinflammatorische Zytokine produzieren, werden sie in proof-of-concept-Studien verwendet, um Angriffspunkte für mögliche Therapien bei entzündlichen Arthritiden zu finden. Das Gewebe kann im Anschluss auch für histologische Zwecke oder zur Isolation von RNA verwendet werden.(87)

### **1.3.2.3 Extraktion von RNA und Generierung von cDNA-Microarrays**

Die aus der Synovialmembran extrahierte RNA gilt als Ausgangsmaterial für die Genanalyse mittels „complementary DNA (cDNA)“-Microarray Technik. Anhand von Genanalysen können beispielsweise die heterogenen Eigenschaften des Gewebes von Patientinnen und Patienten mit RA gezeigt und genetische Signaturen identifiziert werden.(100, 101)

Zur Genanalyse wird die RNA amplifiziert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Anschließend wird sie in eine zuvor präparierte cDNA-Microarray Platte pipettiert. Es erfolgt die Hybridisierung, bei der es zur Bindung von komplementären Basen kommt. Die

nun verbundenen Nukleinsäuren emittieren ein Licht, anhand dessen ein Scanner ermittelt, ob und in welchem Ausmaß Gene in der Ausgangsprobe exprimiert werden.(101, 102)

#### **1.3.2.4 ELISA und Protein-Microarrays**

Durch den „Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)“ erfolgen der Nachweis und die Quantifizierung von Proteinen in der Synovialmembran. Durch die Protein-Microarray Technik wird die Funktion und Interaktionen der Proteine erforscht. Beide Methoden bedienen sich dem Prinzip der Antikörper-Antigen Bindung.

In einer Studie aus dem Jahr 2005 konnte gezeigt werden, dass die Reaktivität von Autoantikörpern (Proteinen) mit bestimmten Epitopen, bei RA, mit dem diagnostischen Krankheitsverlauf korrelierte.(103, 104)

#### **1.3.2.5 Durchflusszytometrie und FACS**

Bei der Durchflusszytometrie erfolgt die Messung von Zellen in einem Gemisch anhand ihrer Oberflächenantigene. So werden beispielsweise CD4<sup>+</sup> von CD8<sup>+</sup> Zellen unterschieden. Die Zellen müssen zuerst aus dem Gewebe herausgelöst werden und liegen dann lose vor.

Die gesuchten Oberflächenantigene werden mit dem entsprechenden Antikörper gekoppelt, welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist. Dieser Farbstoff wird durch einen Laserstrahl angeregt, wodurch ein Fluoreszenzlicht emittiert wird. Schließlich erfolgt die grafische Darstellung der individuellen Zellen im Zellgemisch durch einen Rechner.

Das „fluorescence activated cell sorting/scanning (FACS)“ funktioniert nach dem gleichen Prinzip, wobei die einzelnen Zellen an Hand ihrer Fluoreszenz getrennt und in separate Sammelgefäße aufgefangen werden.(98)

### **1.3.3 Das gesunde Synovialgewebe**

Die Synovialmembran besteht aus der inneren synovialen Intima und der äußeren Subintima. Eine gesunde Intima bildet 1-2 Zell-Deckschichten, mit einer Höhe von bis zu 40µm im Querschnitt. In dieser Schicht finden sich Typ A- und Typ B-Synoviozyten, welche respektive aus der Linie der Makrophagen beziehungsweise der Fibroblasten stammen. Eine normale Subintima weist eine Höhe von bis zu 5µm im Querschnitt auf und

beherbergt neben Fibroblasten und Makrophagen auch Blut-, Lymphgefäße und Nerven.(67, 105)

Neben den oben genannten Zellen finden sich außerdem CD3+ T-Lymphozyten diffus im Gewebe, wobei sich perivaskulär die höchste Konzentration findet. Der Anteil an CD4+ zu CD8+ Zellen war dabei in einer kleinen Studienkohorte von zehn Probandinnen und Probanden 1:1. HLADR+ Zellen wurden bei allen Probandinnen und Probanden gefunden, während B-Lymphozyten in keinem der untersuchten Gewebe nachweisbar waren.(106) In einer anderen Studie wurden bei fünf von 40 Probandinnen und Probanden dendritische Zellen in der gesunden Synovialmembran gefunden.(107)

Zwischen der Deckzellschicht der Intima und dem Bindegewebe der Subintima existiert keine Basalmembran, obwohl sich einige ihrer Bestandteile in der extrazellulären Matrix wiederfinden. Diese enthält: Hyaluron, Chondroitin 4-, Chondroitin 6-, Heparan-, Keratansulfat, Ectactin, Fibronectin, Laminin und Typ III-VI Kollagen.(108)

Histologisch lässt sich gesunde Synovialmembran in drei Typen einteilen, die auf der Zusammensetzung der jeweiligen Subintima beruhen: Der areoläre-, adipöse-, und faserreiche-Typ.(109, 110)

Beim areolären Typ liegt das Gewebe meist in Falten, welche durch Straffung verschwinden. Unter einer kontinuierlichen Deckschicht finden sich zahlreiche, kleine Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven im lockeren Bindegewebe.(111)

Der adipöse Typ ist gekennzeichnet durch Adipozyten im Bereich der Subintima. Dieser Typ findet sich meist in unmittelbarer Nähe zu Fettgewebe, kann aber auch Villi synoviales auskleiden. Mit zunehmendem Alter nimmt der Fettgehalt des Gewebes ab und es findet sich vermehrt faserreiches Gewebe.

Der faserreiche Typ findet sich vor allem bei Bändern und Sehnen und enthält in erster Linie Bindegewebsstrukturen.(110)

Typ A Synoviozyten (auch: macrophage-like-synoviocytes [MLS]) unterscheiden sich in einigen Punkten von den Makrophagen der Subintima: MLS sind vor allem CD163+ und CD68+, haben eine hohe nichtspezifische Esterase Aktivität und exprimieren die Immunoglobulin Rezeptoren FcγRII und FcγRIII.

Die Makrophagen der Subintima sind vor allem CD14+, haben eine geringe nichtspezifische Esterase Aktivität und exprimieren die Immunoglobulin Rezeptoren FcγRI, FcγRII und FcγRIII, wobei der Letztere geringer exprimiert wird als in der Intima.(67, 112)

MLS und Makrophagen der Subintima stammen aus dem Knochenmark und erreichen die Synovialmembran als im Blut zirkulierende Monozyten, wie anhand eines Mausmodells gezeigt werden konnte.(113)

Typ B Synoviozyten (auch: fibroblast-like-synoviocytes [FLS]) sind an der Bildung von Hyaluron beteiligt, wobei sie durch das Enzym Uridindiphosphat (UDP)-Glucose-6-Dehydrogenase (UDPGDH) UDP-Glukose in UDP-Glukuronat umwandeln. UDP-Glukuronat gilt als einer der Ausgangsstoffe des Hyaluron, welches schließlich in die Synovialflüssigkeit abgegeben wird.(114)

FLS exprimieren verschiedene Adhäsionsmoleküle wie beispielsweise CD55, „Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), „intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), Cadherin-11, CD44 und  $\beta 1$  Integrine.(115-119)

Es wird angenommen, dass FLS durch Eigenreplikation entstehen, oder sie aus den Fibroblasten der Subintima hervorgehen.(67)

Die Synovialflüssigkeit ist ein Ultrafiltrat des Blutplasmas, in dem sich zusätzlich Proteine (i.e.L. Albumin), Proteoglykane (i.e.L. Hyaluron) und Glykoproteine (i.e.L. Lubricin) finden. Kleine Moleküle wie Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid, Laktat, Harnstoff, Glukose und Kreatinin diffundieren durch das fenestrierte Endothel der Gefäße der Subintima und gelangen so in die Synovialflüssigkeit. Der Abtransport der Synovialflüssigkeit erfolgt über die Lymphgefäße der Subintima.

Hyaluron gibt der Synovialflüssigkeit ihre Viskosität und bewirkt außerdem die Retention kleiner Moleküle in der Flüssigkeit.(120)

Das Glykoprotein Lubricin wird von Synoviozyten der Intima sowie Chondrozyten gebildet und dient der Schmierung des Gelenks.(121, 122)

## 1.3.4 Das Synovialgewebe bei Erkrankungen

### 1.3.4.1 Die Synovialmembran bei RA

Die Entzündung der Synovialmembran bei RA zeigt sich durch die Hyperplasie der Deckzellschicht, sowie der Invasion von Entzündungszellen in das Stroma der Subintima. Die Oberfläche der Deckzellschicht kann multinukleäre Riesenzellen aufweisen und mit Fibrin-Belägen bedeckt sein, welche sich bis in die Subintima ausbreiten können.(120)

Bei der Hyperplasie der Deckzellschicht, sowie bei der Destruktion des Gewebes, spielen FLS eine wichtige Rolle.(55) Die Hyperplasie der Deckzellschicht wird erklärt durch übermäßige Proliferation und verminderte Apoptose der FLS(123, 124), sowie mögliche Migration der FLS aus anderen Geweben in die Synovialmembran.(125)

FLS produzieren des Weiteren Matrix Metalloproteasen und Cathepsine welche den Abbau der extrazellulären Matrix fördern.(126)

FLS produzieren bei RA auch vermehrt Adhäsionsmoleküle wie Cadherin-11, welches bei der Organisation der Entzündungszellen eine wichtige Rolle zu spielen scheint.(119)

Die Invasion von Entzündungszellen in die Synovialmembran erfolgt über Blutgefäße, welche durch Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 oder I-CAM die Leukozyten-Extravasation fördern.(127) Die Anregung zur Expression dieser Adhäsionsmoleküle sowie die generelle Neoangiogenese in der synovialen Membran erfolgt durch Zytokine, die unter anderem von Makrophagen und Endothelzellen produziert werden.(128)

In der Pathogenese der Synovitis, bei der RA, spielen sowohl Zellen des erworbenen als auch des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle.(55)

#### *1.3.4.1.1 Zellen des erworbenen Immunsystems*

In der Synovialmembran finden sich bei RA, im Vergleich zu gesundem Gewebe, vermehrt T- und B-Lymphozyten.

Das Verhältnis zwischen T-Helferzellen (CD4+) und T-Killerzellen (CD8+) in der Synovialmembran liegt bei 4:1. CD4+ Zellen unterteilt man nochmals in T-Helferzellen 1 (Th 1), Th2, Th17 und T-regulatorische Zellen (T-regs).(120)

Diese Subtypen unterscheiden sich anhand der Zytokine, die sie exprimieren. Th1 Zellen exprimieren Interferon  $\gamma$  und IL2 und sind bei der Entwicklung von

Autoimmunerkrankungen von Bedeutung, während Th2 Zellen IL4, IL5, IL10 exprimieren und dadurch zum Teil die Immunantwort regulieren.(129) Im Vergleich zu den seronegativen Spondyloarthropathien (SpA) ist das Th1/Th2 Verhältnis bei der RA erhöht.(130)

Th17 exprimieren unter anderem IL-17. IL-17 wird in RA, nicht aber in Osteoarthritis gebildet, und besitzt proinflammatorische Eigenschaften.(131)

CD25+ T-regs haben eine antiinflammatorische Wirkung, wie in ex-vivo Zellkultur-Studien gezeigt werden konnte. Des Weiteren zeigten sich verhältnismäßig weniger T-regs in der Synovialmembran als in der Synovialflüssigkeit und im Blut von Patientinnen und Patienten mit RA, was für eine Rolle der T-regs in der Pathogenese der RA spricht. (132)

Th17 exprimieren neben IL-17 auch TNF $\alpha$ , welches die Aktivität der T-regs mindert.(133, 134)

B-Lymphozyten finden sich in erster Linie aggregiert zu Keimzentren in der Synovialmembran, die man auch als ektope Lymphfollikel bezeichnet(135, 136)

Eine Studie aus dem Jahr 1998 zeigte, dass CD20-, CD38+ Plasmazellen IgM-RF in der Synovialflüssigkeit von Patientinnen und Patienten mit RA bilden. Es wird angenommen, dass diese Plasmazellen aus den Keimzentren der Synovialmembran entstammen.(137, 138) Der RF der sich im peripheren Blut nachweisen lässt, entstammt hingegen vermutlich aus dem Knochenmark.(139)

Anhand der Struktur des Entzündungszellinfiltrats in der Synovialis kann man bei der RA drei verschiedene Subtypen unterscheiden. Der erste Typ ist der diffuse Typ bei welchem Entzündungszellen diffus in der Synovialmembran vorkommen. Bei dem zweiten Typ finden sich Keimzentren in der Membran. Der dritte Typ, oder auch der „pauci-immune Typ“ beschreibt eine Synovialmembran mit verhältnismäßig wenigen Entzündungszellen. (136)

#### ***1.3.4.1.2 Zellen des angeborenen Immunsystems***

Der Granulozyten-koloniestimulierende Faktor und der Granulozyten-Makrophagen stimulierende Faktor sind zwei Wachstumsfaktoren, die Zellen des angeborenen Immunsystems aus dem Knochenmark in die Synovialmembran rekrutieren und dort ihre weitere Proliferation begünstigen.(140)

Makrophagen finden sich in der Synovialmembran an verschiedenen Orten. Die MLS finden sich in der Intima und exprimieren unter anderem den Komplementrezeptor Z39Ig.

Bei Patientinnen und Patienten mit RA gibt es weitere Makrophagen in der Intima, welche an der Hyperplasie der Deckzellschicht beteiligt sind. Diese exprimieren ebenfalls Z39Ig, sowie zusätzlich CD11c. Das Verhältnis dieser Zellen scheint des Weiteren bei RA zugunsten der CD11c+ Zellen verschoben zu sein. (141)

Ein weiterer Makrophagen Typ findet sich in der Subintima („sublining layer“) und ist deshalb von großer Bedeutung, da dessen Anzahl mit dem DAS28 bei RA korreliert. Dadurch ist er ein potentieller zukünftiger Biomarker zur Messung der Krankheitsaktivität, sowie zur Kontrolle des Therapieerfolgs.(142, 143)

Die Funktion der Makrophagen bei der RA liegt darin Zytokine, Sauerstoffradikale, Prostanoid, Matrix Metalloprotease und Stickstoffmoleküle zu bilden, sowie Phagozytose zu betreiben und an der Antigenpräsentation teilzunehmen.(55)

Weitere Zellen, die an der Antigenpräsentation teilnehmen, sind die plasmazytoiden- und myeloischen dendritischen Zellen, die zusätzlich auch proinflammatorische Zytokine produzieren.(144)

Weitere Zellen der angeborenen Immunantwort, die sich in der Synovialmembran finden sind neutrophile Granulozyten, wobei ein großer Anteil dieser Zellen bei der RA durch die Synovialmembran in die Synovialflüssigkeit einwandert.(145)

Des Weiteren finden sich auch vermehrt Mastzellen, die Proteasen und Zytokine ausschütten(146), und natürliche Killerzellen, die vor allem Interferon  $\gamma$  bilden (147) in der Synovialmembran.

#### ***1.3.4.1.3 Zytokine und intrazelluläre Signalwege***

Zytokine werden von nahezu allen Zellen, die sich in der Synovialmembran bei RA Patientinnen und Patienten befinden, gebildet.

Ein, in Hinblick auf die Therapie wichtiges Zytokin, ist TNF $\alpha$ . Es blockiert die Aktivität von T-regs, ist an der Aktivierung der Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und weiteren Zytokinen beteiligt, regt die Angiogenese an und induziert Schmerz.(148, 149)

Ein weiteres bedeutsames Zytokin ist IL6. Es ist beteiligt an der Proliferation und Aktivierung von B- und T-Lymphozyten, Makrophagen, Osteoklasten und Endothelzellen, hat einen direkten Einfluss auf die Hämatopoese und wirkt in der Leber bei der Produktion von Akute-Phase-Proteine mit.

Zytokine der IL1 Familie regen Granulozyten und Fibroblasten zur Bildung weiterer proinflammatorischer Zytokine, Prostanoiden und Metalloproteinasen an. Des Weiteren fördern sie den katabolen Metabolismus von Chondrozyten und die Bildung von Erosionen durch Osteoklasten Aktivierung.

IL17 hat ebenfalls eine Reihe an Funktionen bei der Pathogenese der RA. IL17 reguliert mitunter den Transkriptionsfaktor „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- $\kappa$ B)“, steigert die Expression weiterer Zytokine und Wachstumsfaktoren und fördert den Knochenabbau durch Osteoklasten. (150)

#### ***1.3.4.1.4 Knorpel- und Knochenveränderungen bei RA***

Die entzündlich, destruktive Synovialmembran (Pannus) kann sich bei der RA auch über den Knorpel ausdehnen und den Knochen im Bereich der Knochen-Knorpel Grenze infiltrieren..(120)

FLS dringen in den Knorpel ein und produzieren unter anderem Metalloproteasen, welche das Kollagenetzwerk des hyalinen Knorpels zersetzen.(151)

Die Zytokine des Pannus, vor allem Interleukin 1 und 17, sowie Stickstoffradikale führen zur Apoptose von Chondrozyten.(55)

Erosionen und Knochenabbau werden von Osteoklasten verursacht, deren Vorläuferzellen zur Makrophagen/Monozyten Familie gehören. Die Differenzierung dieser Vorläuferzellen zu Osteoklasten erfolgt vor allem durch das Protein „Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)“, welches von FLS gebildet wird, sowie durch die Zytokine IL1, TNF $\alpha$  und den Makrophagen – stimulierenden Faktor.(152)

Die Destruktion des Knochens kann schließlich dazu führen, dass die Entzündungszellen des Pannus das Knochenmark infiltrieren. Dort finden sich dann in erster Linie B – Lymphozyten Aggregate. (153)

Das regulatorische Molekül Dickkopf-1 (DKK-1) wird durch die hohen TNF $\alpha$  Spiegel vermehrt exprimiert. DKK-1 verhindert die Knochenbildung nach zuvor erfolgter Knochendestruktion bei RA. Durch das Inhibieren dieses Moleküls konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass es wieder zur vermehrten Knochenbildung nach Knochendestruktion kommt.(154)

### **1.3.4.2 Die Synovialmembran bei anderen Erkrankungen**

Veränderungen der Synovialmembran finden sich bei vielen Erkrankungen mit Gelenksbeteiligung, wobei die Synovialmembran zur Differenzierung verschiedener Arthritiden, sowie zur Diagnose von Synoviatumoren eingesetzt werden kann.(65, 84)

#### ***1.3.4.2.1 Arthritiden und Tumor Diagnostik***

Es ist oft nicht leicht anhand von Schmerzen und Schwellungen im Gelenk eine passende Diagnose zu stellen. Anamnese, körperliche Untersuchung und Blutwerte spielen eine wichtige Rolle bei der Diagnosefindung, wobei auch die Analyse der Synovialflüssigkeit und der Synovialmembran, wichtige, zusätzliche Informationen liefern kann.

Die bakterielle Kultur von Synovialflüssigkeit ist mit einer Sensitivität von 75%-95% und einer Spezifität von 90% bei von Streptokokken und Staphylokokken verursachten Arthritiden der Goldstandard bei Verdacht auf septische Arthritis. Sollte eine Antibiotika-Therapie der Entnahme des Kultur-Gewebes zuvorkommen, sinkt die Sensitivität und Spezifität dieser Untersuchung jedoch deutlich. Zur Diagnose von Gonokokken-Arthritiden liegt die Sensitivität der bakteriellen Kultur außerdem bei 10%-50%.(155)

Eine weitere Möglichkeit bei infektiösen Arthritiden Bakterien nachzuweisen, ist die Analyse bakterieller DNA aus sowohl Synovialflüssigkeit als auch Synovialmembran. (156, 157) Der Vorteil einer Analyse bakterieller DNA ist, dass der Nachweis eines Keimes auch nach Beginn einer Antibiotika-Therapie noch mehrere Tage lang möglich ist.(157)

Des Weiteren lassen sich auch schwer und langsam kultivierbare Bakterien wie *Borrelia burgdorferi*(158), *Chlamydia trachomatis*(159), *Neisseria gonorrhoe*(160) und Mykobakterien(161, 162) so erkennen.

Im Falle eines Verdachts auf eine infektiöse Arthritis bei gleichzeitigem Mangel an Synovialflüssigkeit im Aspirat, ist die Biopsie der Synovialmembran zur Analyse von bakterieller DNA möglich.(65) Studien zum Vergleich zwischen Synovialmembran und Synovialflüssigkeit, in Bezug auf Sensitivität und Spezifität der DNA Analyse, liegen jedoch nicht vor.

Bei der Amyloid-Arthropathie, können Amyloidablagerungen mit einer Kongorot-Färbung nachgewiesen werden.(163)

Tuberkulose und Sarkoidose können an Hand von Granulomen im Gewebe diagnostiziert werden. Pilzinfektionen können mit Hilfe der Gomori-Färbung dargestellt werden.(120)

Die Synovialmembran bei der SpA weist viele Ähnlichkeiten mit jener der RA auf, wobei einzelne Unterschiede gefunden werden konnten.(120)

Bei den SpA finden sich mehr neutrophile Granulozyten, sowie CD163+ Makrophagen in der Synovialmembran, während die Anzahl der Zellen in der Deckzellschicht und die Anzahl an CD83+ dendritischen im Vergleich zur RA vermindert ist.

Des Weiteren lassen sich bei der RA in 44% intrazelluläre citrullinierte Proteine sowie in 46% MHC-II Glykoprotein 39 Peptid Komplexe finden, welche bei den SpA nicht vorkommen.(164)

Blutgefäße der Synovialmembran können gerade oder gewunden sein. Der gewundene Typ findet sich vermehrt bei den SpA, während bei der RA die Blutgefäße meist gerade ausgerichtet sind. Es finden sich jedoch auch Mischtypen aus beiden Varianten.(165)

Die Bildung von Keimzentren ist nicht spezifisch für die RA, da solche Zellaggregationen auch bei Psoriasisarthritis (PsA) und Ankylosierender Spondylitis (AS) und sogar bei der Osteoarthritis gefunden werden können.(166-168)

Bei der Arthritis der systemischen Sklerose finden sich eine leichte Hyperplasie der Deckzellschicht mit Fibrinbelägen, sowie diffuse und perivaskuläre Infiltrationen von Lymphozyten und Plasmazellen.(169) Diese Veränderungen der Synovialmembran finden sich in ähnlicher Form auch bei Arthritis im Rahmen einer Dermato- und Polymyositis.(120, 170)

Beim systemischen Lupus erythematosus (SLE) finden sich eine Hyperplasie der Deckzellschicht, eine geringe Anzahl an Entzündungszellen, Proliferation der Blutgefäße, ödematöses Gewebe, Fibrinbeläge und fibrinöse Nekrosen.(171)

Bei der Hemochromatose kommt es zur Proliferation der Villi synoviales, Hyperplasie der Deckzellschicht, sowie zur Einlagerung von Hämosiderin, vorwiegend in Typ B Synoviozyten.(172)

Neben der Synovialflüssigkeit, können auch mit Hilfe der Synovialmembran Kristallarthritis festgestellt werden. So finden sich beispielsweise bei der Chondrocalcinose sowohl Kristalle als auch Tophus-ähnliche Strukturen in der Synovialmembran und im Gelenksknorpel.(173, 174)

In der Auflichtmikroskopie der Synovialmembran finden sich bei der Ochronose braun pigmentierte Knorpelstücke oberflächlich auf der Intima, sowie bräunlich pigmentierte Granula in den Synovia Zellen der tieferen Schichten.(175)

Die pigmentierte villonoduläre Synovialitis (tendosynovialer Riesenzelltumor) ist gekennzeichnet von mononukleären und multinukleären Zelleinfiltraten, intra- und

extrazellulären Hämosiderin Ablagerungen, lipidhaltigen Makrophagen und Hypervaskularisierung.(176)

Zur allgemeinen Beurteilung der Synovialmembran, von sowohl entzündlichen als auch nicht entzündlichen Arthropathien, wurde ein Score entwickelt, der die Entzündung der Synovialmembran in keine, niedriggradige und hochgradige-Synovialits einteilt. Zur Validierung bewerteten zwei Pathologen insgesamt 559 Präparate von Patientinnen und Patienten mit verschiedenen Gelenkserkrankungen (RA, PsA, reaktive Arthritis, Osteoarthritis und posttraumatische Arthritis). Hierbei ergab sich eine signifikante Korrelation der Ergebnisse der beiden Pathologen. Die „cutt offs“ wurden gewählt zur Differenzierung von rheumatisch und nicht rheumatisch bedingten Synovialitiden. Im Falle einer hochgradigen Synovialitis wäre die Ursache der Synovialits, mit einer Sensitivität von 60% und einer Spezifität von 95%, eine rheumatische Erkrankung.(177) (vgl. Tab. 3)  
Der Score wurde auch schon in anderen Studien verwendet.(70, 178, 179)

Punkte	Histologische Beurteilung
<b>Verbreiterung der synovialen Deckzellschicht</b>	
0	Die synoviale Deckzellschicht ist nur 1 Zellschicht breit
1	Die synoviale Deckzellschicht ist 2 oder 3 Zellschichten breit
2	Die synoviale Deckzellschicht ist 4 oder 5 Zellschichten breit
3	Die synoviale Deckzellschicht ist >5 Zellschichten breit, multinukleäre Riesenzellen und Palisadenbildung können vorkommen oder es findet sich eine Ulzeration mit Fibrinexsudation
<b>Zelldichte des synovialen Stroma</b>	
0	Das synoviale Stroma zeigt eine normale Zelldichte
1	Das synoviale Stroma zeigt eine gering erhöhte Zelldichte
2	Das synoviale Stroma zeigt eine mittelgradig erhöhte Zelldichte, vereinzelt können multinukleäre Riesenzellen vorkommen
3	Das synoviale Stroma zeigt eine hohe Zelldichte, multinukleäre Riesenzellen kommen vor, evtl. sind rheumatoide (Hemi-)Granulome zu erkennen Leukozytäre entzündliche Infiltration
<b>Leukozytäre entzündliche Infiltration</b>	
0	Kein Nachweis eines entzündlichen Infiltrats
1	Einzelne, meist perivaskulär gelegene Lymphozyten oder Plasmazellen und kleine Lymphozytenaggregate
2	Größere Lymphozytenaggregate
3	Dichtes konfluentes lymphozytäres Infiltrat oder Lymphfollikel mit Keimzentren
<b>Ergebnisse</b>	
Summe 0 oder 1	Keine Synovialitis
Summe 2-4	Niedriggradige Synovialitis
Summe 5-9	Hochgradige Synovialitis

**Tab. 3: Schema zur histologischen Beurteilung der 3 Kompartimente der chronischen Synovialitis. Tab. abgeändert aus/modified from: (177)**

### 1.3.4.3 Die Synovialflüssigkeit bei Erkrankungen

Die Analyse von Synovialflüssigkeit in der Klinik erfolgt regelmäßig zur Differenzierung verschiedener Gelenkerkrankungen. Die Eigenschaften der Flüssigkeit geben so Aufschluss über die verschiedenen Arten von Arthritiden: entzündliche-, infektiöse-, degenerative- und kristallinduzierte Arthritiden.(180) (vgl. Tab. 4)

	Aussehen	Viskosität	Zellen pro mm <sup>3</sup>	Granulozyten	Kristalle	Kultur
<b>Normal</b>	Transparent	Hoch	<200	<10%	Negativ	Negativ
<b>Osteoarthritis</b>	Transparent	Hoch	200 - 2.000	<10%	teilweise CPPD und HA Kristalle	Negativ
<b>Rheum. Arthritis</b>	Lichtdurchlässig	Niedrig	2.000 - 50.000	Variabel	Negativ	Negativ
<b>Gicht</b>	Lichtdurchlässig bis trüb	Niedrig	2.000 - >50.000	>90%	Uratkristalle	Negativ
<b>Chondrocalcinose</b>	Lichtdurchlässig bis trüb	Niedrig	2.000 - 50.000	<90%	CPPD Kristalle	Negativ
<b>Bakterielle Arthritis</b>	Trüb	Variabel	2.000 - >50.000	>90%	Negativ	Positiv

**Tab. 4: Die Synovialflüssigkeit bei ausgewählten Erkrankungen.**

Tab. abgeändert aus/modified from: (120)

Calciumpyrophosphatdihydrat (CPPD); Hydroxylapatit (HA).

An Hand der Anzahl der Leukozyten, lassen sich die Pathologien der Synovialflüssigkeit als nicht entzündlich (<2.000 Zellen pro mm<sup>3</sup>), entzündlich (2.000-50.000 Zellen pro mm<sup>3</sup>) und septisch (>50.000 Zellen pro mm<sup>3</sup>) einteilen.

Nasspräparate der Synovialflüssigkeit können in der Auflichtmikroskopie bezüglich ihrer Zellart analysiert werden. So ist beispielsweise der Fund von Ragozyten, (Granulozyten, welche Immunkomplexe phagozytiert haben), bei RA, ein Hinweis auf eine schlechtere klinische Prognose der Erkrankung.(120, 181)

Unter einem Polarisationsmikroskop lassen sich kristallinduzierte Arthritiden an Hand der Lichtbrechung und Form der Kristalle unterteilen.

Zur Differenzierung von bakteriellen Arthritiden werden die Gramfärbung und, wie im letzten Kapitel erwähnt, die bakterielle Kultur und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Amplifikation von DNA verwendet.(120, 156)

Durch biochemische Untersuchungen von Synovialflüssigkeit erhält man Informationen zum Glukose-, Protein- und Laktatdehydrogenase (LDH) -Gehalt der Probe. Die klinische Relevanz dieser Informationen wurde in einer prospektiven Studie mit 119 Probandinnen und Probanden hinterfragt. Glukose- und Protein-Gehalt der Synovialflüssigkeit gaben dabei keine Rückschlüsse, ob es sich bei dem gewonnen Präparat um eine entzündliche oder nicht entzündliche Arthropathie handelte. Der LDH-Gehalt konnte zwar besser zwischen Ursachen für Gelenksergüssen unterscheiden, brachte jedoch im Vergleich zu Blutuntersuchungen keine neuen Informationen.(182)

## **2. Material und Methoden**

Ziel unserer Studie war es die ultraschallgezielte Synovialgewebsbiopsie an Patientinnen und Patienten der rheumatologischen Abteilung zu erproben, das gewonnene Gewebe histologisch und erstmals mittels FACS zu verarbeiten und diese Ergebnisse mit der klinischen Präsentation und Ergebnissen der Analysen von Blut und Synovialflüssigkeit zu vergleichen. Des Weiteren erfolgten ultraschallgezielte Synovialgewebsbiopsie an Leichen zur Erprobung der Methode und zur Gewinnung von gesundem Vergleichsgewebe.

Vor dem Studienstart erhielten wir ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz zur Synovialgewebsbiopsie an Patientinnen und Patienten der rheumatologischen Abteilung, sowie an kürzlich Verstorbenen ohne rheumatische Vorerkrankung.

### **2.1 Studienpopulation**

Die Studie enthielt zwei unterschiedliche Studienpopulationen:

Die erste ergab sich aus Patientinnen und Patienten der rheumatologischen Abteilung Graz, bei denen die diagnostische oder therapeutische Indikation einer Gelenkspunktion bestand. Diese Indikationen waren beispielsweise die Frage nach Kristallarthropathien, intraartikulärem Keimwachstum oder die Verabreichung von Lokalanästhetika und Glukokortikoiden in das Gelenk.

Ausschlusskriterien waren dieselben einer routinemäßigen Gelenkspunktion. (vgl. Tab. 5)

Ausschlusskriterien zur Synovialgewebsbiopsie
Laufende orale Antikoagulation
Thrombozytenzahl < 50.000
Bekannte Gerinnungs-, beziehungsweise Blutungsstörungen
Schwere allgemeine Erkrankungen
Allergien auf Lokalanästhetika
Aufgetretene Komplikationen bei Gelenkpunktionen oder Biopsien in der Vergangenheit

**Tab. 5: Ausschlusskriterien bei Patientinnen und Patienten der rheumatologischen Abteilung.**

Bei der zweiten Studienpopulation handelte es sich um kürzlich verstorbene Personen (maximal 48 Stunden). Das einzige Ausschlusskriterium war die bekannte Diagnose einer rheumatischen Erkrankung, dies wurde anhand der Krankengeschichte überprüft.

## **2.2 Ultraschallgezielte Gewebsgewinnung**

### **2.2.1 Biopsie an Patientinnen und Patienten der rheumatologischen Abteilung**

Nach Aufklärung im Rahmen des ärztlichen Gesprächs und Unterzeichnung einer Einverständniserklärung wurden die Probandinnen und Probanden in die Studie eingeschlossen. Es erfolgten Routinebefragung und eine routinemäßig durchgeführte klinische Untersuchung, sowie die Prüfung der Indikation zur diagnostisch/therapeutischen Gelenkpunktion und mögliche Ausschlusskriterien durch den Untersucher (Assoz.Prof. C. Dejaco, Facharzt für Rheumatologie mit mehrjähriger Erfahrung im Gelenksultraschall und in der Gelenkpunktion).

Für das Verfahren wurde das „MyLab™Twice“ Ultraschallgerät der Firma „Esaote“ mit einem Linearschallkopf 4-13 MhZ (große Gelenke) oder 6-18MhZ (kleine Gelenke) verwendet. (vgl. Abb. 4)

Die Gelenkpunktion und Entnahme von Synovialmembran erfolgte nach dem Verfahren von Kelley S et al. (70) im Punktionsraum der Rheumaambulanz der Medizinischen Universität Graz, welcher alle hygienischen Voraussetzungen zur Durchführung von

Gelenkspunktionen erfüllte und in welchem routinemäßig Gelenkspunktionen durchgeführt wurden.

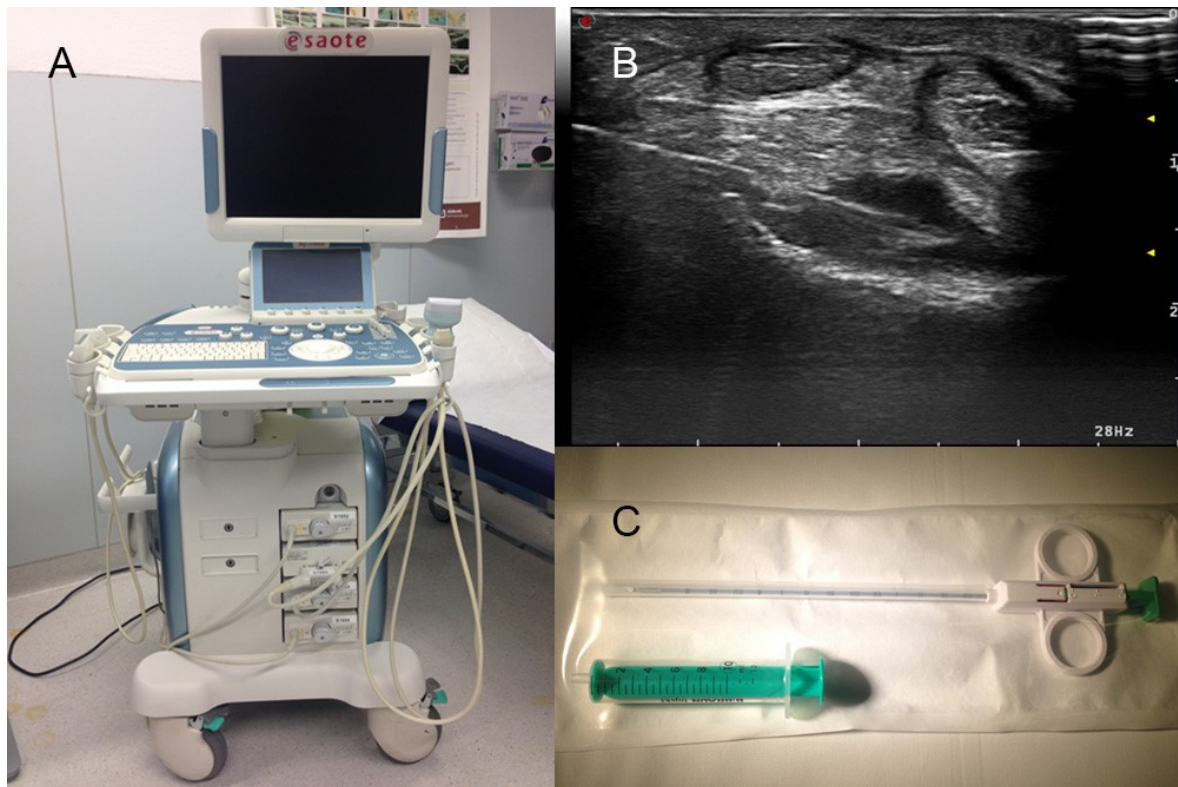
Es erfolgte die sterile Waschung und im Anschluss die Injektion von 1-3 ml Lokalanästhetikum (Xyloneural®) in das Gewebe um die geplante Punktionsstelle. Anschließend erfolgte, nach steriler Abdeckung des Ultraschallkopfes, die Gelenkspunktion mit Hilfe einer 14 Gauge Koaxialnadel (Climed®). Diese wurde mit der „ein Personen Technik“ durchgeführt, bei welcher der Ultraschallkopf in einer Hand gehalten wird und die Punktion mit Hilfe der zweiten Hand erfolgt.

Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe einer 10ml Spritze Synovialflüssigkeit entnommen.

Im Anschluss wurden 2 ml Lokalanästhetikum (Xyloneural®) in kleine Gelenke und 5 ml Lokalanästhetikum in große Gelenke injiziert. Die Position der Koaxialnadel wurde mit Hilfe des Ultraschalles monitorisiert.

Es erfolgte daraufhin die Entnahme von maximal zehn Biopsien mit Hilfe eines 16 Gauge Supercore Biopsie Instruments (Climed®) über die liegende Koaxialnadel. (vgl. Abb. 4)

Anschließend wurde die Koaxialnadel entfernt, die Wunde desinfiziert und verbunden. Eine Wundnaht der Biopsiestelle war bei diesem Verfahren nicht notwendig.



**Abb. 4: Vorrichtungen und Instrumente zur ultraschallgezielten Synovialgewebsbiopsie**  
A, „MyLab™ Twice“. B, Punktionsnadel im Ultraschall. C, Climed® Punktionsnadel.

## **2.2.2 Biopsie an kürzlich Verstorbenen**

Vor der Biopsie wurde anhand der elektronischen Krankenakte überprüft, dass die Verstorbenen unter keiner rheumatischen Erkrankung litten.

Die Biopsien erfolgten im Sezierraum des Instituts für Pathologie an der Medizinischen Universität Graz, wenige Stunden bis 48 Stunden nach dem Ableben. Ich führte die Biopsien unter Aufsicht von Assoz.Prof. C. Dejaco und Dr. Husic durch. Zur Darstellung der Strukturen wurde das tragbare Ultraschallgerät „SonoAce R3“ der Firma „Samsung“ verwendet.

Als Biopsiestelle wurde, anders als bei den Patientinnen und Patienten der rheumatologischen Abteilung, nur der Rezessus suprapatellaris je eines Knies verwendet.

Zur besseren Darstellung der Strukturen wurden vor der Biopsie 20ml Wasser in den Rezessus gespritzt.

Synovialmembran wurde stets an drei Stellen abgenommen: medial, median und lateral in der Bursa, mit Hilfe eines 16 Gauge Supercore Biopsie Instruments (Climed®) ohne Zuhilfenahme einer Koaxialnadel. Es wurde keine Synovialflüssigkeit entnommen.

## **2.3 Verarbeitung des Gewebes**

### **2.3.1 Gewebe der Patientinnen und Patienten der rheumatologischen Abteilung**

Die gewonnenen Proben der Synovialmembran der Patientinnen und Patienten wurden aufgeteilt:

Drei Proben wurden in Formaldehyd fixiert, um sie später in Paraffin einzubetten und histologisch zu färben. Bis zu drei Gewebeproben wurden zur Analyse des Zellinfiltrates mit Hilfe von FACS weiter verarbeitet. Bis zu drei Gewebeproben wurden an die Biobank zur weiteren Konservierung gegeben.

Die bei einer therapeutischen Gelenkspunktion gewonnene Synovialflüssigkeit wurde teilweise zur Durchführung von Routinetests verwendet, die übrig gebliebene Flüssigkeit wurde, falls vorhanden, mit FACS weiterverarbeitet.

Bei den Patientinnen und Patienten wurden außerdem 20ml Blut entnommen, zur Bestimmung von Gerinnungsparametern, Blutbild (gesamt 10ml) und immunologischen Faktoren (10ml).

### **2.3.1.1 Histologische Verarbeitung**

Gewebsproben wurden geschnitten und histologisch gefärbt. Jede Probe wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und einige Proben unterliefen einer Spezialfärbung bei bestimmten Fragestellungen, beispielsweise mit einer immunhistochemischen Färbung für IgG4 bei Verdacht auf IgG4 assoziierte Erkrankungen.

Anschließend wurden die histologischen Präparate von einem Pathologen je nach Fragestellung befundet.

### **2.3.1.2 Zellpopulationsanalyse mit der FACS**

Aus der Synovialmembran, der Synovialflüssigkeit und dem entnommenen Blut wurden mithilfe einer Kollagenase - Lösung Zellen gewonnen. Diese wurden mittels Fluoreszenzmarkierter Antikörper gefärbt und hinsichtlich ihrer Subpopulation am Durchflusszytometer analysiert. Hierbei wurde der prozentuale Anteil an T Zellen, gemessen an der Gesamt-Lymphozytenzahl, festgestellt und von diesen Zellen nochmals der prozentuale Anteil an CD4, CD8 und doppelt-negativen (DN) Zellen bestimmt.

### **2.3.2 Gewebe der kürzlich Verstorbenen**

Drei Synovialgewebsproben wurden gewonnen und in Formaldehyd fixiert, anschließend in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Diese histologischen Schnitte wurden dann durch einen Pathologen begutachtet und das Vorhandensein von Synovialmembran wurde überprüft.

Zusätzlich erfolgte die Überprüfung einer möglichen Synovialitis anhand des Synovialitisscores.(177)

## **2.4 Ausarbeitung der Daten von Patientinnen und Patienten**

Zur Präsentation der Fälle der Patientinnen und Patienten der rheumatologischen Abteilung wurden die Krankenakten der rheumatologischen Ambulanz sowie die elektronische Krankenakte „RCQM“ verwendet.

## **2.5 Statistik**

Es erfolgte die Ausarbeitung der demographischen Daten und der deskriptiven Statistik für die Patientinnen und Patienten der rheumatologischen Abteilung.

## **3. Ergebnisse – Resultate**

### **3.1 Studienpopulation der Patientinnen und Patienten der rheumatologischen Abteilung**

Der Studienzeitraum erstreckte sich von 19.01.2016 bis 15.09.2016. In diesem Zeitraum wurde acht Patientinnen und Patienten Gewebe entnommen, fünf von Frauen und drei von Männern. Das Alter der Studienteilnehmer erstreckte sich von 43 Jahre bis 80 Jahre. In Tabelle 6 finden sich allgemeine Patientendaten, Krankheitsaktivität und Laborparameter zum Zeitpunkt der Biopsie sowie die Punktionsstelle und eine Kurzfassung des histologischen Befunds. Unter den biopsierten Patientinnen und Patienten, fanden sich vier Fälle von RA und je ein Fall von PsA, Arthritis urica, undifferenzierter Arthritis und Bursitis subdeltoidea. Bei sechs der acht Fälle konnte in der Histologie eine Synovialmembran dargestellt werden. Lediglich bei der Patientin mit der undifferenzierten Arthritis, sowie bei dem Patienten mit der Bursitis konnte keine Membran nachgewiesen werden.

Bei all den vorhandenen Synovialmembranen zeigte sich eine Synovialitis. Die klinische Diagnose einer Entzündung (z.B. bei Flare einer RA) war stets mit einer Entzündungsreaktion im histologischen Bild assoziiert. Eine klare Korrelation zwischen histologischem Bild und Krankheitsaktivität zeigte sich jedoch nicht. Auffallend war bei einer Patientin (Pat.5) mit RA eine hohe Krankheitsaktivität und hohe CRP und BSG Werte bei gleichzeitiger low grade Synovialitis im Gewebsschnitt.

Ein entzündliches Punktat in der Synovialflüssigkeitsanalyse korrelierte stets mit einer Synovialitis im histologischen Bild. Bei Pat.3 und Pat.6 konnten kristallinduzierte Arthritiden in der Sonographie und durch Kristalle in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden. In den entsprechenden Synovialmembranen zeigte sich zwar eine hyperplastische Deckzellschicht, jedoch waren keine Kristalle auffindbar.

In vier der acht Fälle (drei Fälle von RA und ein Fall von PsA), wurde die Zellpopulation des gewonnenen Gewebes mittels FACS analysiert (vgl. Tab. 7).

Eine Prädominanz von T-Zellen fand sich bei Pat.2 (PsA) in der Synovialflüssigkeit und bei Pat.5 (RA) in der Synovialmembran, Synovialflüssigkeit und im Blut. Bei beiden Patientinnen lag eine hohe Krankheitsaktivität vor. Bei Pat. 1 (RA) und Pat. 4 (RA) konnte keine Prädominanz von T-Zellen nachgewiesen werden. In beiden Fällen ergab die Berechnung der Krankheitsaktivität eine moderate disease activity.

Der Anteil an CD4+ Zellen war deutlich höher als der der CD8+ Zellen bei allen Patientinnen und Patienten in allen untersuchten Geweben. (vgl. Tab. 8)

Ein Vergleich der Ergebnisse der FACS Analyse zwischen Synovialmembran, Synovialflüssigkeit und Blut war aufgrund der geringen Datenmenge schwer möglich. Auffallend war bei Pat. 5 das CD8:CD4 Verhältnis von 1:9,9 im Blut bei Verhältnissen von 1:2 in der Synovialflüssigkeit und in der Synovialmembran.

Bei keinem der acht biopsierten Patientinnen und Patienten traten Komplikationen auf

	Alter	m/w	Diagnose	Basistherapie	KA	SJC/TJC	CRP	BSG	Punktions- stelle	Histologie
Pat 1	62	w	seroneg. RA	Abatacept 125mg 1/Wo	CDAI 19,1 (MDA)	1/10 <sup>a</sup>	n.a.	10	Knie re	chronische Entzündung
Pat 2	60	w	PsA	Leflunomid 20mg 1x/d, Certolizumab Pegol 200mg 1x/2Wo	DAPSA 39 (HDA)	3/17 <sup>b</sup>	50	38	Knie li	Entzündung
Pat 3	43	m	Arthritis Urica	-	n.a.	2/0	1,4	14	ACC re	Gichtatropathie
Pat 4	51	m	seropos. RA	Etanercept 50mg 1x/Wo, Salazopyrin 500mg 1x/d	DAS28 CRP 3,3 (MDA)	1/4 <sup>a</sup>	19	n.a.	Ellbogen re	chronische RA
Pat 5	56	w	seropos. RA	MTX 15mg 1x/Wo	CDAI 25 (HDA)	17/10 <sup>a</sup>	11,9	39	Knie re	low grade Synovitis
Pat 6	80	w	seroneg. RA	Etanercept 25mg 2x/Wo, MTX 10mg 1x/Wo	DAS28 CRP 2,7 (LDA)	0/1 <sup>a</sup>	20,9	26	Knie li	chronische Synovitis
Pat 7	71	w	Arthritis MCP III re	-	n.a.	1/1	4,1	10	MCP III re	keine Synovia
Pat 8	63	m	Bursitis subdeltoidea	-	n.a.	0/0	3	2	Schulter re	keine Synovia

Tab. 6: Patientenübersicht.

Krankheitsaktivität (KA); swollen joint count/tender joint count (SJC/TJC): <sup>a</sup>(0-28/0-28), <sup>b</sup>(0-66/0-68); C-reaktives Protein (CRP) (0-5mg/l); Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) 1h (<50Jahre: m: <15, w: <20 mm/h), (>50 Jahre: m: >20, w: >30 mm/h); (35, 183, 184)

Rheumatoide Arthritis (RA); Psoriasisarthritis (PsA); Metacarpophalangealgelenk (MCP); Methotrexat (MTX); Acromioclaviculargelenk (ACC); not available (n.a.)

**Clinical disease activity index (CDAI): remission (REM):  $\leq 2,8$ , low disease activity (LDA):  $>2,8 - \leq 10$ , moderate disease activity (MDA):  $>10 - \leq 22$   
high disease activity (HDA):  $>22$ ; (35)**

**Disease activity index in PsA (DAPSA): REM:  $\leq 4$ , LDA:  $>4 - \leq 14$ , MDA:  $>14 - \leq 28$ , HDA:  $>28$ ; (183)**

**Disease activity index 28 CRP (DAS28CRP): REM:  $< 2,6$ , LDA:  $2,6 - < 3,2$ , MDA:  $3,2 - \leq 5,1$ , HDA:  $> 5,1$ ; (185)**

**Histologischer Kurzbefund aus pathologischem Befund entnommen.**

	Pat 1	Pat 2	Pat 4	Pat 5
<b>Syn. Membran T Zellen</b>	<b>0,60%</b>	<b>12,10%</b>	<b>14,40%</b>	<b>75,40%</b>
<i>Syn. Membran CD4</i>	42%	68,20%	58,80%	62,20%
<i>Syn. Membran CD8</i>	22,50%	25,70%	35,60%	31,10%
<i>Syn. Membran DN</i>	7,70%	4,90%	4%	5,70%
<b>Syn. Flüssigkeit T Zellen</b>	<b>32%</b>	<b>61,80%</b>	<b>n.a.</b>	<b>73,50%</b>
<i>Syn. Flüssigkeit CD4</i>	62,50%	76,30%	n.a.	65,80%
<i>Syn. Flüssigkeit CD8</i>	32,50%	17,10%	n.a.	27,30%
<i>Syn. Flüssigkeit DN</i>	3,20%	5,80%	n.a.	5,80%
<b>Blut T Zellen</b>	<b>n.a.</b>	<b>n.a.</b>	<b>n.a.</b>	<b>63,70%</b>
<i>Blut CD4</i>	n.a.	n.a.	n.a.	81,30%
<i>Blut CD8</i>	n.a.	n.a.	n.a.	8,20%
<i>Blut DN</i>	n.a.	n.a.	n.a.	9%

Tab. 7: FACS Analyse der Synovialmembran, der Synovialflüssigkeit und des Blutes. Doppelt-negativ (DN); Not available (n.a.).

	Syn. Membran CD8 : CD4	Syn. Flüssigkeit CD8 : CD4	Blut CD8 : CD4
Pat 1	1 : 1,9	1 : 1,9	n.a.
Pat 2	1 : 2,7	1 : 4,5	n.a.
Pat 4	1 : 1,7	n.a.	n.a.
Pat 5	1 : 2	1 : 2,4	1 : 9,9

Tab. 8: Verhältnis der CD8+ : CD4+ Zellen der FACS. Not available (n.a.)

### **3.1.1 Präsentation der Fallserie**

Zur Darstellung der Studienpopulation werden nun einzeln die acht Patientinnen und Patienten vorgestellt. Die Nummerierung erfolgt entsprechend der Gliederung in Tabelle 6.

#### **3.1.1.1 Patientin 1 – langjährige RA mit Knieschwellung**

Die 62 jährige Patientin kam im Jänner 2016 in die rheumatologische Ambulanz mit einer Zunahme der Krankheitsaktivität ihrer RA, gekennzeichnet durch vermehrte Schmerzen in einzelnen Fingergelenken sowie im rechten Kniegelenk.

Die Patientin hatte die Basistherapie mit Leflunomid im November 2015 abgesetzt, da sie dieses Medikament für eine seit mehreren Jahren immer wieder kehrende orale Aphthose verantwortlich machte. Zur Abklärung der oralen Aphthose war die Patientin bereits 2014 am Institut für Dermatologie vorstellig, wo in einer Biopsie der Mundschleimhaut der Verdacht auf einen Lichen planus mucosae gestellt wurde.

Seitdem an ihr 2011 eine seronegative RA diagnostiziert wurde, war sie in regelmäßiger Betreuung an der rheumatologischen Ambulanz. Neben ihrer RA hatte die Patientin eine langjährige Krankengeschichte von Gon- und Fingerpolyarthrosen, sowie diverse Infektionen.

Die in der Vergangenheit eingesetzte Basismedikation bestand aus: MTX und Sarilimumab (im Rahmen einer klinischen Prüfung).

Ihre Basistherapie zum Zeitpunkt ihres Ambulanztermins bestand aus: Leflunomid 20mg 1x täglich (selbstständig seit 11/15 abgesetzt) und Abatacept 125mg 1x Woche s.c.

Bei der klinischen Untersuchung äußerte sie Druckschmerz im Bereich der Articulatio radiocarpalis, im Daumensattelgelenk, in den MCP II und III und dem Kniegelenk, jeweils beidseitig. Eine Schwellung konnte außerdem im rechten Kniegelenk festgestellt werden. Eine zuvor abgenommene Blutprobe zeigte keine Erhöhung der Entzündungsparameter während der CDAI mit 19,1 auf eine moderate Krankheitsaktivität schließen ließ. (vgl. Tab. 6)

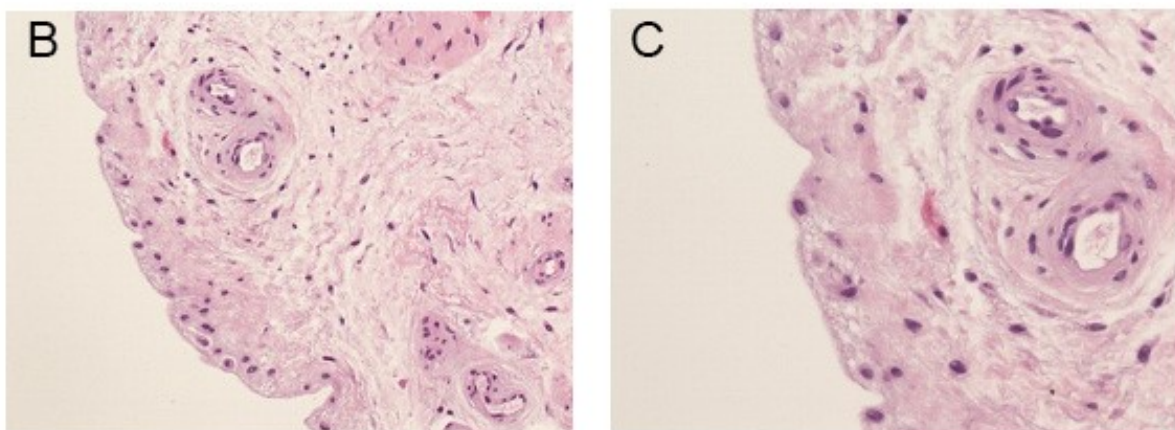
Die Indikation einer Punktion des rechten Knies zur Aspiration von Synovialflüssigkeit und Injektion von Glukokortikoiden war gegeben. Zusätzlich erfolgte die Entnahme von Synovialmembran, welche im histologischen Schnitt den Befund einer chronischen Entzündung erbrachte.

Die Analyse der Synovialflüssigkeit und der FACS der Patientin sowie die histologische Beschreibung ihrer Synovialmembran sind in Tabelle 9 dargestellt. Die histologischen Schnitte finden sich in Abbildung 5.

Im Follow-up der Patientin ergab sich, dass sich der Zustand der oralen Aphtose und auch die Krankheitsaktivität gebessert hatten. Da auch im Röntgen der Hände, Vorfüße, Knie- und Hüftgelenke keine neuen Erosionen gefunden wurden, verblieb man vorerst bei der Monotherapie mit Abatacept.

Synovialflüssigkeit Patientin 1		FACS Patientin 1		
Makroskopisch	gelblich, trüb, fadenziehend	Syn. Gewebe	0,6% T-Zellen	v.a. CD4 pos
Mikroskopisch	keine Kristalle	Syn. Flüssigkeit	32% T-Zellen	v.a. CD4 pos
Manuelle Differenzierung	nicht färbbar			
Zytologie	3500 Zellen/ $\mu$ l			
Befund	Punktat wie bei entzündlichem Erguss			
Punktatkultur	Kein Wachstum			
Synovialmembran Patientin 1				
Befund	Synoviaanteile mit fokal minimal chronischer Entzündung. Keine akute Entzündung, keine Malignität.			

**Tab. 9: Patientin 1 Synovialbefund**



**Abb. 5: Pat 1 Hämatoxylin-Eosin Färbung. A, 10fache- B, 20fache- C, 40fache Vergrößerung**

### **3.1.1.2 Patientin 2 – langjährige PsA mit Knieschwellung**

Im März 2016 kam die 60 jährige Patientin in die Ambulanz der rheumatologischen Abteilung zur Routineuntersuchung ihrer PsA, welche 2002 erstdiagnostiziert wurde.

Die Patientin klagte über Schmerzen und Schwellungen im Bereich des Handgelenks rechts, mehrerer Zehen beidseits und vor allem des linken Kniegelenks. Da ihr drei Wochen zuvor ein vermuteter Rheumaknoten aus dem linken Handgelenk entfernt wurde (welche in der Histologie aber als Synovialhyperplasie herausstellte), hatte sie eines ihrer Basismedikamente, Certolizumab Pegol, abgesetzt. Seit Absetzen des Medikaments hatte sich ihre Grunderkrankung deutlich verschlechtert.

Neben ihrer PsA sine Psoriasis hatte die Patientin eine Krankengeschichte von Depressionen, akuten Lumbalgien bei Diskopathien im Bereich L5/S1, einen Netzhautriss ohne Netzhautablösungen sowie eine fragliche Osteomyelitis des rechten Vorfußes. Für ihre PsA hatte sie in der Vergangenheit MTX, Leflunomid, Adalimumab, Ciclosporin, Infliximab, Tocilizumab, Abatacept und Golimumab als Therapie erhalten, wobei sich bei jedem Medikament eine unzureichende Wirkung oder ein Wirkungsverlust zeigte.

Ihre Basistherapie zum Zeitpunkt des Ambulanztermins bestand aus: Leflunomid 20mg 1x täglich, Certolizumab Pegol 200mg 1x alle zwei Wochen (pausiert wegen Operation).

Zur weiteren Abklärung wurde eine Sonografie veranlasst, die eine hoch aktive Synovitis im linken Knie und mittelgradige Synovitiden im Bereich des MCP II links und beider Handgelenke ergab. Entzündungsparameter im Blut waren erhöht und eine Berechnung des DAPSA Scores ergab eine hohe Krankheitsaktivität (vgl. Tab. 6).

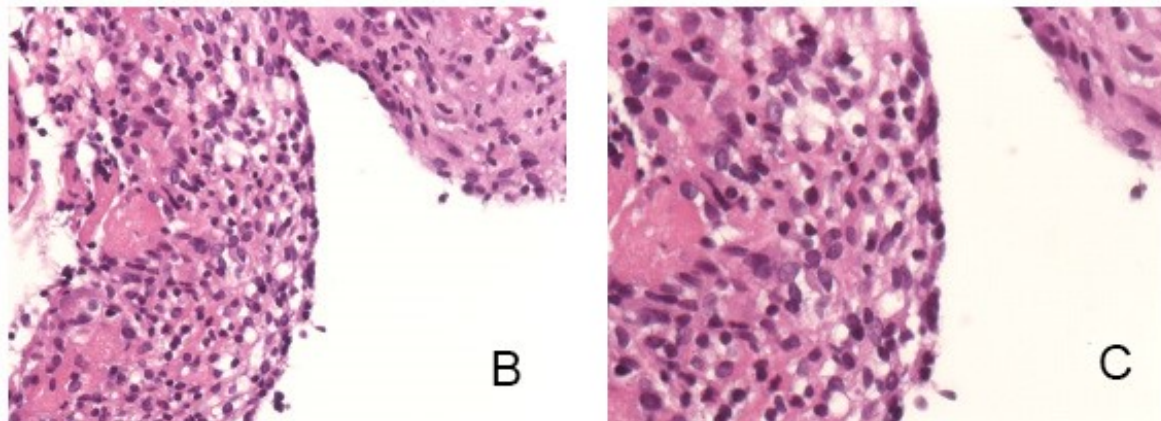
Zur Behandlung der Knieschwellung wurde die Indikation der Gelenkspunktion gestellt, bei der 120ml Synovialflüssigkeit und Synovialmembran entnommen und anschließend Glukokortikoide injiziert wurden. Die Synovialmembran zeigte im histologischen Schnitt das Vorhandensein eines akuten und chronischen Entzündungsinfiltrats.

Die Patientin bekam einen Folgetermin nach einer Woche, bei der eine deutlich subjektive Besserung der Schmerzen im linken Kniegelenk angegeben wurde. Des Weiteren wurde Certolizumab Pegol mit Apremilast ersetzt.

Die Analyse der Synovialflüssigkeit, der FACS und die histologische Beschreibung der Synovialmembran sind in Tabelle 10 dargestellt und die histologischen Bilder in Abbildung 6.

Synovialflüssigkeit Patientin 2		FACS Patientin 2		
Makroskopisch	gelblich, trüb, fadenziehend	Syn. Gewebe	12,1% T-Zellen	v.a. CD4 pos
Mikroskopisch	mäßig zellreich, keine Kristalle, 21% Ragozyten	Syn. Flüssigkeit	61,8% T-Zellen	v.a. CD4 pos
Manuelle Differenzierung	Granulozyten 55% Lymphozyten 45%			
Zytologie	6812 Zellen/ $\mu$ l			
Befund	Entzündlicher Erguss			
Punktatkultur	Kein Wachstum			
Synovialmembran Patientin 2				
Befund	Weichgewebe, fokal mit synovialer Deckzellschicht überkleidet mit einem akuten und chronischen Entzündungsinfiltrat. Keine follikulären Strukturen abgrenzbar.			
Spezialfärbung	CD15 neutrophile Granulozyten.			

**Tab. 10: Patientin 2 Synovialbefund**



**Abb. 6: Pat 2 Hämatoxylin-Eosin Färbung. A, 10fache- B, 20fache- C, 40fache Vergrößerung**

### **3.1.1.3 Patient 3 – Arthritis urica mit Schwellung im AC-Gelenk**

Die stationäre Aufnahme des 43-jährigen Patienten an die Abteilung für Rheumatologie erfolgte im März 2016 durch Überweisung von einem peripheren Krankenhaus bei Verdacht auf systemische Vaskulitis. Dieser Verdacht wurde aufgrund von Schwellungen beider Knie mit rezidivierenden Gelenksergüssen, erhöhter c-Anti-neutrophiler cytoplasmatischer Antikörper (c-ANCA) Werte (1:1280), jahrelang bestehender Rhinitis und einer Bluteosinophilie von 9% im Differentialblutbild geäußert.

Im peripheren Krankenhaus war der Patient zuletzt mehrfach stationär aufgenommen worden, unter anderem wegen einer Pneumonie, Urosepsis mit Begleitperikarderguss, rezidivierenden Exanthenen, sowie eines akuten Nierenversagens.

Der Patient bekam weder in der Vergangenheit, noch zum Zeitpunkt der Untersuchungen eine Basismedikation für rheumatologische Erkrankungen.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Knie unauffällig, während im Großzehengrundgelenk links sowie im Acromioclavikulargelenk (AC-Gelenk) Gelenk rechts Schmerzen und Schwellungen auftraten.

Eine Gelenkssonographie des Großzehengrundgelenks zeigte Tophi und Doppelkonturen wie bei einer akuten Arthritis urica, sowie eine destruktiv, mittelgradig aktive Arthritis mit ausgeprägter synovialer Proliferation im AC-Gelenk. Ein zusätzliches Röntgen der Schulter zeigte das Bild einer Tendinosis calcarea.

Aufgrund der unklaren Arthritis mit synovialer Proliferation im AC-Gelenk, erfolgte der Versuch einer Spülung und Aspiration mit 10ml NaCl des Gelenks, wobei jedoch keine Flüssigkeit gewonnen werden konnte.

Es wurde zusätzlich eine Synovialgewebsprobe aus dem AC-Gelenk entnommen, welche im histologischen Schnitt eine chronische Entzündung im Rahmen einer Gichtatropathie darstellte. Der vollständige histologische Befund der Synovialmembran ist in Tabelle 11 dargestellt, die histologischen Bilder finden sich in Abbildung 7.

Zusätzlich wurden ein Computertomographie (CT) der Nasennebenhöhlen, sowie eine Biopsie des harten Gaumens gemacht, wobei kein Nachweis für eine systemische Vaskulitis erbracht werden konnte. Laborchemisch zeigten sich keine erhöhten Entzündungswerte (vgl. Tabelle 6). In der Kontrolle der c-ANCA zeigten sich diese mit einem Titer von 1:80 nur mehr gering erhöht.

Aufgrund der Diagnose der Arthritis urica, sowohl in der Gelenksonographie als auch in der Synovialgewebsbiopsie, bekam der Patient Allopurinol und Colchizin als Therapie und wurde anschließend aus dem Krankenhaus entlassen.

Bei einer Kontrolluntersuchung drei Monate nach Entlassung, zeigte sich der Patient subjektiv und objektiv beschwerdefrei.

Synovialmembran Patient 3	
Befund	Synovialwandbiopsien mit Veränderung einer Gichtatropathie mit überwiegend chronischer, gering akuter Synovitis.  Kein Anhalt für eine IgG4 assoziierte Erkrankung. Kein Anhalt für Malignität.
Spezialfärbung	Keine IgG4-positiven Plasmazellen.  Tuberkuloseausschluss durch negative Ziehl Neelsen Färbung bei zentraler Nekrose.

Tab. 11: Patient 3 Synovialbefund

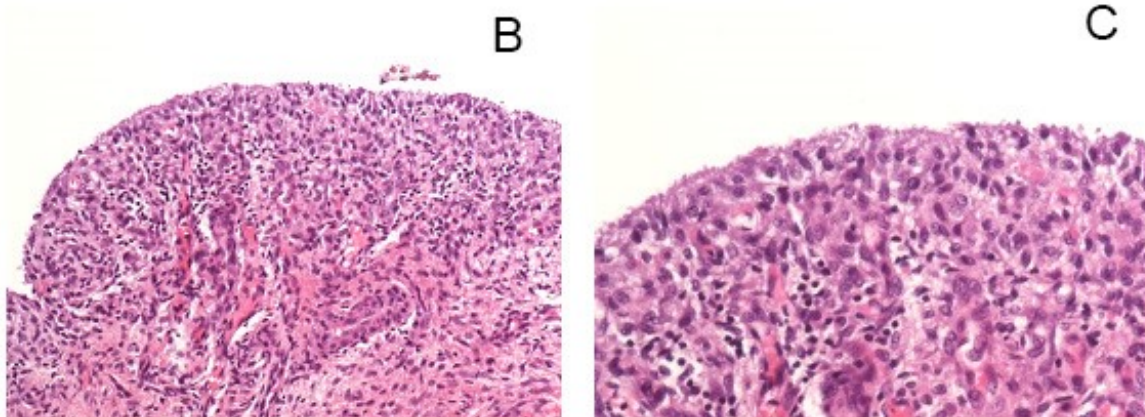


Abb. 7: Pat 3 Hämatoxylin-Eosin Färbung. A, 10fache- B, 20fache- C, 40fache Vergrößerung

#### **3.1.1.4 Patient 4 – Chron. Synovitis im Ellbogen bei RA**

Der 51 jährige Patient kam im April 2016 in die rheumatologische Ambulanz zur Folgeuntersuchung seiner seropositiven RA. Die Erstdiagnose der RA erfolgte im Jahre 2000.

Zum Zeitpunkt des Ambulanztermins beklagte der Patient Schmerzen, Schwellung und eingeschränkte Beweglichkeit des rechten Ellbogens.

Die in der Vergangenheit eingesetzte Basismedikation bestand aus: MTX und Leflunomid.

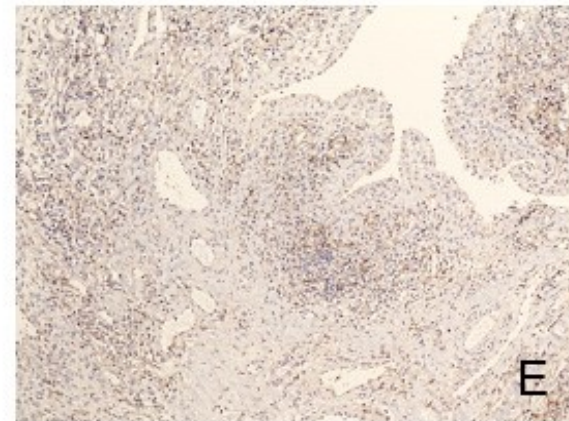
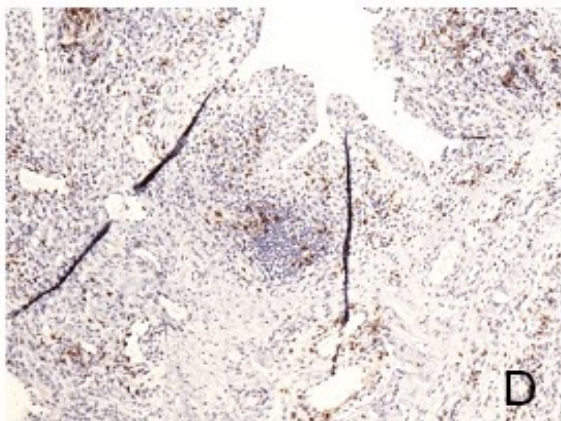
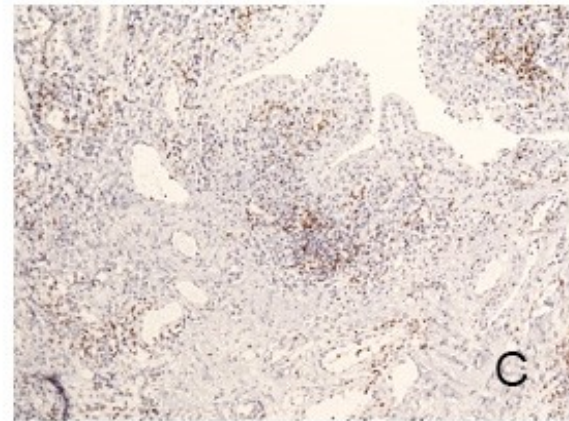
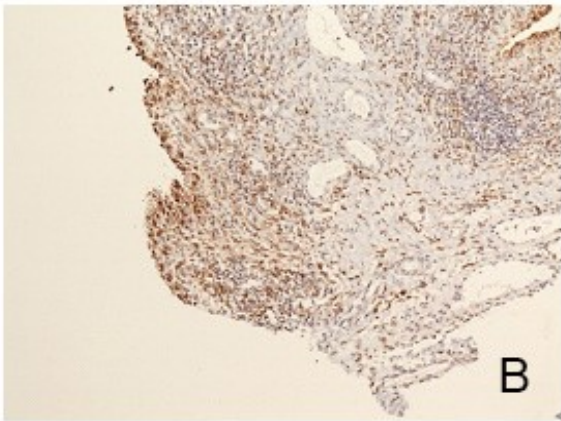
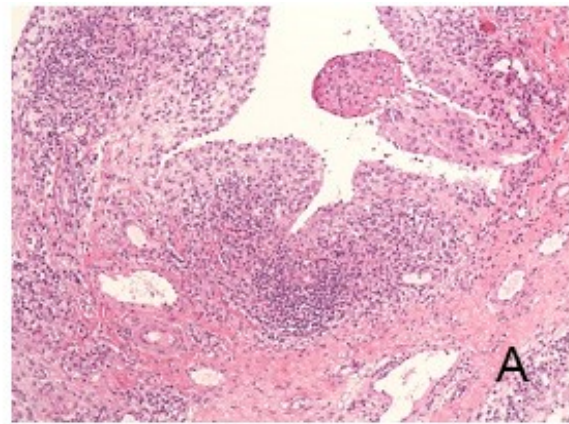
Die Basistherapie zum Zeitpunkt des ambulanten Termins bestand aus: Etanercept 50mg 1x wöchentlich subkutan (s.c.) und Sulfasalazin 500mg 1x täglich.

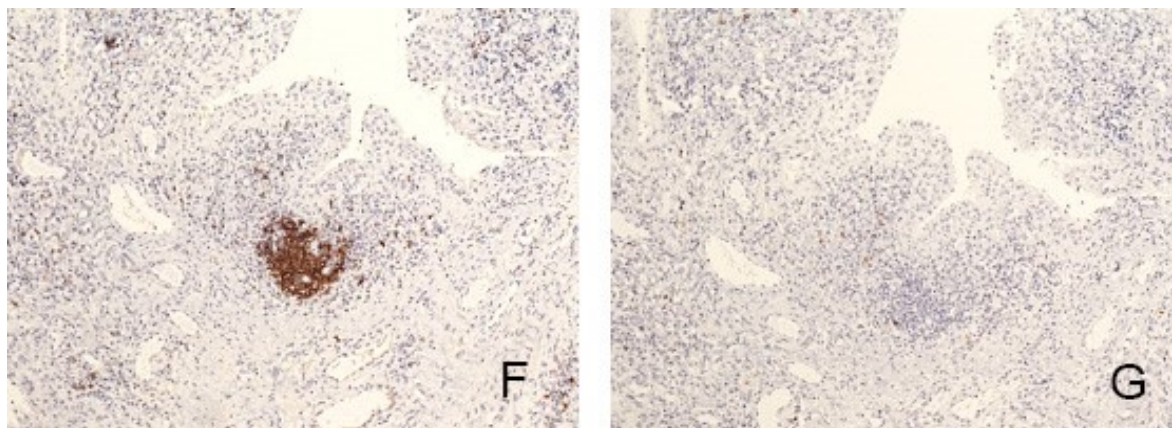
Der DAS-28 betrug 3.3 was einer moderaten Krankheitsaktivität entsprach. (vgl. Tab. 6).

Es erfolgte schließlich eine Punktion des rechten Ellbogengelenks mit Entnahme von Synovialmembran, sowie eine Injektion von Glukokortikoiden und Lokalanästhetika. Der histologische Befund ergab eine chronische Entzündung im Rahmen einer langjährigen RA. Das Ergebnis der FACS findet sich in Tabelle 12, eine Sammlung der histologischen Färbungen in Abbildung 8. Die Dosis von Sulfasalazin wurde in Folge erhöht. Beim anschließenden Ambulanztermin einen Monat später zeigte sich eine deutliche Besserung der Krankheitsaktivität, insbesondere auch ein Rückgang der Schwellung und Schmerzen des Ellbogens.

Synovialmembran Patient 4		FACS Patient 4		
Befund	<p>Synovialbiopsien mit einer chronischen Synovitis, in erster Linie vereinbar mit Veränderungen im Rahmen einer überwiegend chronischen, mäßig aktiven rheum. Arthritis.</p> <p>Kein Anhalt für eine IgG4-assoziierte Erkrankung. Kein Anhalt für Malignität.</p>	Syn. Gewebe	14,4% T-Zellen	v.a. CD4 pos
Spezialfärbung	<p>CD68 pos. Histozyten innerhalb der Entzündungsinfiltrate</p> <p>CD3 pos. T-Lymphozyten</p> <p>mehr CD8 pos. Zellen als CD4 pos. Zellen</p> <p>CD20 pos. B-Lymphozyten in Lymphfollikeln aggregiert</p> <p>Einzelne IgG4 pos. Plasmazellen.</p>			

**Tab. 12: Patient 4 Synovialbefund**





**Abb. 8: Pat 4 10fache Vergrößerung folgender Färbungen: A, Hämatoxylin-Eosin. B, CD68 pos. C, CD3 pos. D, CD8 pos. E, CD4 pos., F, CD20 pos. G, IgG4 pos.**

### **3.1.1.5 Patientin 5 – langjährige RA mit multipler Gelenksschwellung**

Die 56 jährige Patientin kam im Mai 2016 erstmals in die Ambulanz der rheumatologischen Abteilung zur Therapieoptimierung ihrer seropositiven RA. Die Erstdiagnose war im Jahre 2006 erfolgt und seit 2010 bekam sie 15mg Methotrexat als Monotherapie, wodurch sie bis dahin zufriedenstellend eingestellt war.

Eine zusätzliche Basismedikation in der Vergangenheit war Adalimumab.

Seit drei Monaten hatte sich ihre Situation jedoch verschlechtert und sie berichtete von deutlich verstärkten Schmerzen und Schwellungen in multiplen Gelenken. Sie berichtete außerdem von einer verlängerten Morgensteifigkeit, die über 15 Minuten andauerte.

Die klinische Untersuchung zeigte Schwellungen und Schmerzen in multiplen Fingergelenken, den Ellbogen, dem rechten Knie und dem linken Sprunggelenk.

Entzündungsparameter im Blut zeigten sich erhöht und der CDAI lag bei 25, was einer hohen Krankheitsaktivität entspricht (vgl. Tab. 6).

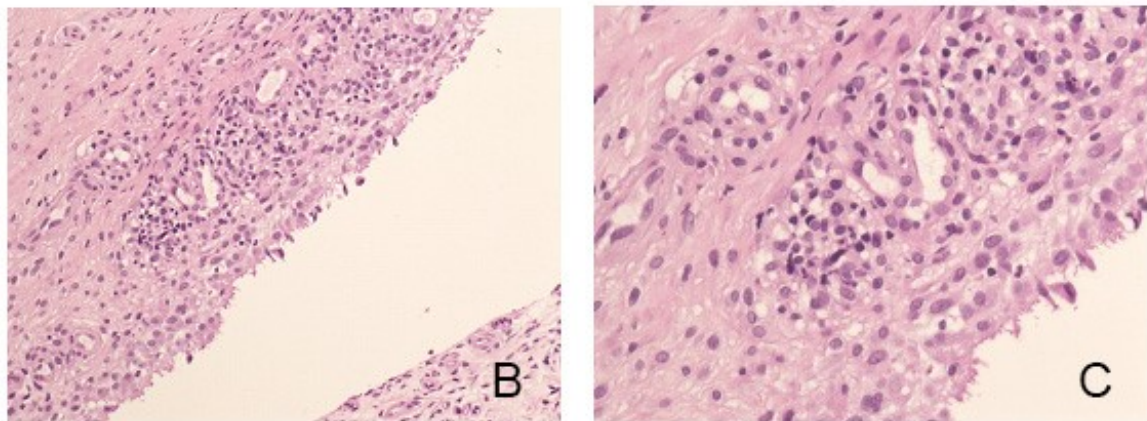
Im Röntgen der Hände und Vorfüße fanden sich mehrere Erosionen. Die Sonographie ergab eine hochgradig aktive Synovitis im rechten Knie. Eine Synovitis fand sich auch in mehreren kleinen Gelenken der Hände und Füße.

Es folgte die Punktion des rechten Knies mit Aspiration von Synovialflüssigkeit und Entnahme von Synovialmembran. Die Synovialmembran zeigte im histologischen Schnitt Zeichen einer low grade Synovialitis. Der vollständige Befund der Biopsie und der FACS sind in Tabelle 13 und die histologischen Schnitte sind in Abbildung 9 dargestellt.

Auf Grund der klinischen und sonographischen Krankheitsaktivität wurde die Therapie mit Adalimumab erweitert.

Synovialflüssigkeit Patientin 5		FACS Patientin 5		
Makroskopisch	gelblich, trüb, fadenziehend	Syn. Gewebe	75,4% T-Zellen	v.a. CD4 pos
Mikroskopisch	mäßig zellreiches Punktat mit Leukozyten. Keine Kristalle	Syn. Flüssigkeit	73,5% T-Zellen	v.a. CD4 pos
Manuelle Differenzierung	Granulozyten 99% Lymphozyten 1%	Blut	63,7% T-Zellen	v.a. CD4 pos
Zytologie	12100 Zellen/µl			
Befund	Entzündliches Punktat			
Punktatkultur	Kein Wachstum			
Synovialmembran Patientin 5				
Befund	Low grade Synovialitis. Im vorliegenden Untersuchungsmaterial kein Hinweis auf eine aktive rheumatische Erkrankung. Keine Malignität.			

**Tab. 13: Patientin 5 Synovialbefund**



**Abb. 9: Pat 5 Hämatoxylin-Eosin Färbung. A, 10fache- B, 20fache- C, 40fache Vergrößerung**

### **3.1.1.6 Patientin 6 – Chondrocalcinose bei langjähriger RA**

Die 80 jährige Patientin kam im Juni 2016 zur Kontrolluntersuchung in die rheumatologische Ambulanz. Seit dem Jahre 2000 war die Patientin aufgrund einer seronegativen RA in Behandlung. Die Patientin litt auch an einer Psoriasis vulgaris, dennoch wurde sie als RA klassifiziert.

Sie berichtete, dass sie seit einigen Monaten zunehmende Schmerzen im linken Kniegelenk verspürte. Die Schmerzen waren in Ruhe, bei Bewegung und auch in der Nacht vorhanden. Zusätzlich hatte die Patientin eine sklerosierender Glomerulonephritis, Hypertonie, Rhizarthrosen sowie eine Struma nodosa regressiva per magna in ihrer Krankengeschichte. Zum Zeitpunkt des Ambulanztermins bestand die Therapie der RA aus Etanercept 25 mg 2x 1 Ampulle wöchentlich s.c. und MTX 10mg 1x wöchentlich. Bei der Patientin zeigte sich eine niedrige Krankheitsaktivität ihrer RA gemessen am DAS28 CRP von 2,7 sowie erhöhte Entzündungsparameter (vgl. Tab. 6).

In der Sonographie des Kniegelenks zeigte sich ein geringer Erguss mit hyperechogenen Veränderungen mit Schallauslöschungen. In einem Knie Röntgen zeigte sich eine Meniskusverkalkung.

Um die Verdachtsdiagnose einer Chondrocalcinose zu bestätigen, wurde eine Kniegelenkspunktion zur Synovialflüssigkeitsanalyse durchgeführt. Bei einem anschließenden Ambulanztermin einen Monat später, wurde der Patientin ein Glukokortikoid in das linke Knie verabreicht und es erfolgte zusätzlich eine Synovialgewebsbiopsie. Die Biopsie zeigte im histologischen Schnitt Zeichen einer chronischen Entzündung, im Rahmen der langjährigen RA. Es fanden sich jedoch keine positiv, doppelbrechenden Kristalle in der Synovialmembran, während diese in der Synovialflüssigkeit vorkamen. Die vollständigen Ergebnisse der Synovialflüssigkeit, und der Synovialmembran, finden sich in Tabelle 14. Bei einem weiteren Ambulanztermin zwei Wochen später, gab die Patientin eine deutliche Besserung der Schmerzen im linken Knie an. Man verblieb bei der Diagnose einer RA mit Chondrocalcinose.

Synovialflüssigkeit Patientin 6	
Makroskopisch	hellgelb, klar, fadenziehend
Mikroskopisch	zellarm, vereinzelt intra und extrazellulär positive doppelbrechende Kristalle nachweisbar
Zytologie	100 Zellen/ $\mu$ l
Befund	Chondrocalcinose, DD: Aktive Arthrose,
Punktatkultur	Kein Wachstum
Synovialmembran Patientin 6	
Befund	Synovialbiopsieanteile mit einer chronischen Synovitis entsprechend einer ausgeprägt chronischen, gering aktiven RA. Keine Keimzentrumbildung, kein Anhalt für eine IgG4 assoziierte Erkrankung bzw. kein Anhalt für eine IgG4 assoziierte Arthropathie. Kein Anhalt für Malignität.
Spezialfärbung	CD68 pos. Histozyten subepithelial CD3 und CD20 pos. Zellen im Bereich des Lymphfollikels Mehr CD4 als CD8 pos. Zellen keine IgG4 pos. Plasmazellen.

Tab. 14: Patientin 6  
Synovialbefund

### 3.1.1.7 Patientin 7 – Undifferenzierte Arthritis mit Schmerzen im MCP III

Die 71 jährige Patientin kam im Februar 2016 erstmals in die Ambulanz der rheumatologischen Abteilung mit Verdacht auf RA. Die Patientin gab an, seit drei Jahren intermittierende, belastungsbedingte Schmerzen im MCP III rechts, dem Handgelenk rechts, der HWS, sowie dem Sprunggelenk rechts zu haben. Die Schmerzen verbesserten sich in Ruhe, durch Wärmeapplikation, sowie durch die Einnahme von Ibuprofen. Seit einigen Monaten bemerkte die Patientin außerdem eine zunehmende Schwellung und Verformung des MCP III. Die Familienanamnese war leer.

Die Patientin gab an, noch nie eine Basistherapie für eine rheumatische Krankheit erhalten zu haben. Die klinische Untersuchung ergab Zeichen einer Fingerpolyarthrose, Daumensattelgelenksarthrose, sowie ein druckschmerzhaftes und geschwollenes MCP III Gelenk.

Entzündungsparameter, RF (IgA) und ACPA waren negativ. Eine Sonographie des MCP III zeigte eine hochgradige synoviale Proliferation und Hypervaskularisation mit mittelgradiger Ergussbildung, starker Hyperostose mit unregelmäßiger Gelenksoberfläche

und kleinen erosiven Defekten. Im rechten Handgelenk konnte eine synoviale Hyperproliferation nachgewiesen werden, während die restlichen Gelenke sonographisch unauffällig waren.

Ein MR der rechten Hand zeigte synoviales Enhancement, Erosionen, exzentrische Gelenkspaltschmälerungen und ein kleinzystisch konfiguriertes Markraumödem im MCP III.

Zur weiteren Analyse erfolgte eine Synovialgewebsbiopsie, bei der jedoch keine Synovia im histologischen Schnitt vorhanden war. Der Befund ist in Tabelle 15 dargestellt.

Es erfolgte des Weiteren die Bestimmung des „High iron Fe (HFE)“ – Gens bei Verdacht auf Hämochromatose, sowie eine Bestimmung des HLA B27 Typs, wobei beide Ergebnisse negativ waren. Da aufgrund der Bildgebung eine entzündlich rheumatische Erkrankung angenommen wurde, die Patientin jedoch die Kriterien für eine RA nicht erfüllte, erfolgte die primäre Behandlung durch Injektion von Glukokortikoiden in das MCP III Gelenk.

Synovialmembran Patientin 7	
Befund	Tumor- und entzündungsfreies Binde- und Fettgewebe mit einem größeren Blutgefäß. Granulome, sowie kristalloide Strukturen sind nicht miterfasst, auch ist keine synoviale Membran nachweisbar.
Spezialfärbung	Keine Hämosiderinablagerungen in Eisenfärbung.

**Tab. 15: Patientin 7 Synovialbefund**

### **3.1.1.8 Patient 8 – Bursitis subdeltoidea**

Der 63 jährige Patient wurde erstmals im September 2016 in der rheumatologischen Ambulanz vorstellig. Seit zehn Jahren bestanden bei ihm Schmerzen und intermittierende Schwellungen im Bereich der rechten Schulter. Die Schmerzen waren am stärksten in der Nacht und den frühen Morgenstunden. Seit kurzem strahlten die Schmerzen in den rechten Unterarm aus.

In der klinischen Untersuchung zeigten sich Abduktionsschmerzen in der rechten Schulter ab 75°, sowie Provokationsschmerzen in der langen Bizepssehne, sowie im Bereich der Halswirbelsäule mit Ausstrahlung in den rechten Unterarm bei Rotation und Extension. Es fand sich kein neurologisches Defizit.

Eine Eiweißelektrophorese gab Hinweise auf eine Hypogammaglobulinämie. Der RF (IgA) war positiv (35 U/mL), während ACPA sowie die Entzündungsparameter nicht erhöht waren (vgl. Tab. 6).

Ein MRT der rechten Schulter ergab das Bild einer Bursitis subdeltoidea, subacromialis mit zottigen Veränderungen.

In der Gelenksonographie zeigte sich eine Ergussbildung um die lange Bizepssehne, sowie synoviale Proliferation, Erguss und Hypervaskularisierung der Bursa subdeltoidea.

Es wurde zusätzlich eine Punktion des Bursa mit Entnahme von Synovialflüssigkeit, sowie der Synovialmembran vorgenommen. Im histologischen Bild zeigte sich jedoch keine Synovialmembran, sondern nur Fett- und Muskelgewebe. Die Ergebnisse dieser Befunde finden sich in Tabelle 16.

Aufgrund der klinischen Präsentation und der Bildgebung ergab sich die Diagnose einer Periarthropathia humeroscapularis, einer Bursitis subacromialis und subdeltoidea, sowie ein unteres Cervicalsyndrom jeweils auf der rechten Seite.

Zur Therapie erhielt der Patient ein Nichtsteroidales Antirheumatikum (NSAR) und er wurde auf die orthopädische Ambulanz überwiesen.

Synovialflüssigkeit Patient 8	
Mikroskopisch	Keine Kristalle
Manuelle Differenzierung	zu geringe Punktatmenge
Zytologie	zu geringe Punktatmenge
Punktatkultur	Kein Wachstum
Synovialmembran Patient 8	
Befund	Fett-, und Skelettmuskel- und spärlich Bindegewebsbiopsieanteile ohne Zeichen einer akuten Entzündung und ohne Anhalt für Malignität. Synovia am vorliegenden Material nicht erfasst.
Molekularpath. Befund	Mycobacterium tuberculosis Komplex DNA, mycobakterielle DNA, Tropheryma whipplei DNA alle negativ und auch sonstige Keime nicht nachweisbar.

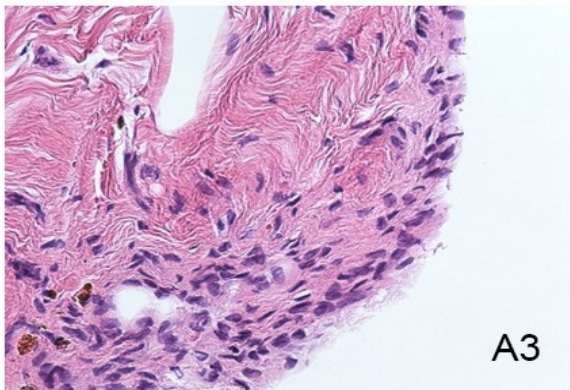
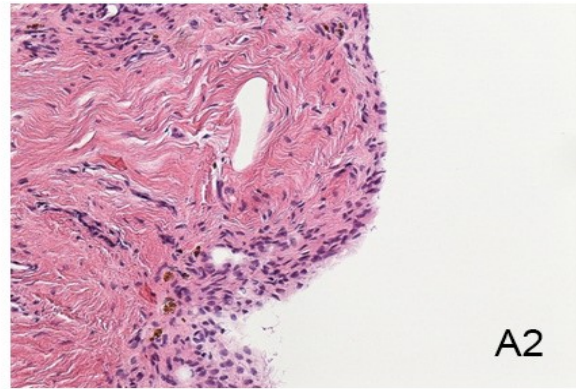
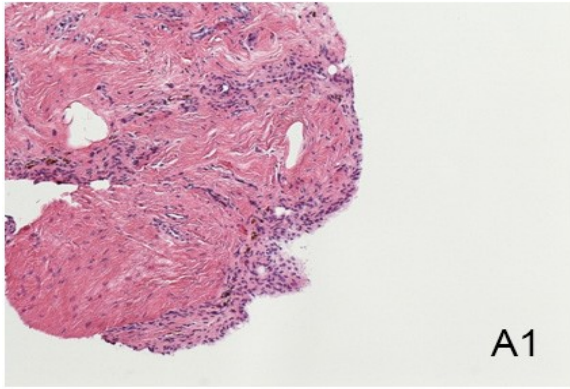
Tab. 16: Patient 8 Synovialbefund

### 3.2 Studienpopulation der kürzlich Verstorbenen

Der Studienzeitraum erstreckte sich von 14.12.2015 – 2.3.2016. In diesem Zeitraum wurden an 15 kürzlich Verstorbenen Synovialgewebsbiopsien an den Knien durchgeführt. Acht der Verstorbenen waren Frauen, während sieben Männer waren. Das Alter bei der Punktion erstreckte sich von 44 bis 94 Jahre. In Tabelle 17 finden sich demographische Daten, die biopsierte Knieseite und das Vorhandensein von Gewebe bei den 15 Leichen.

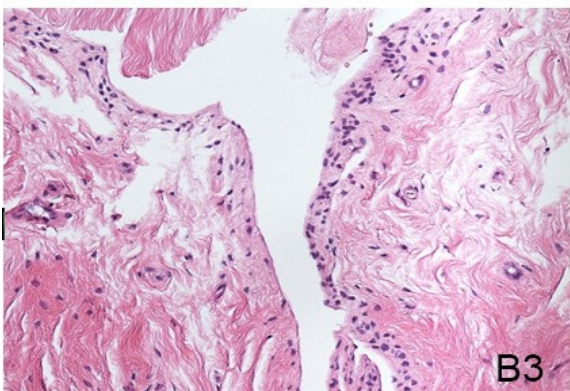
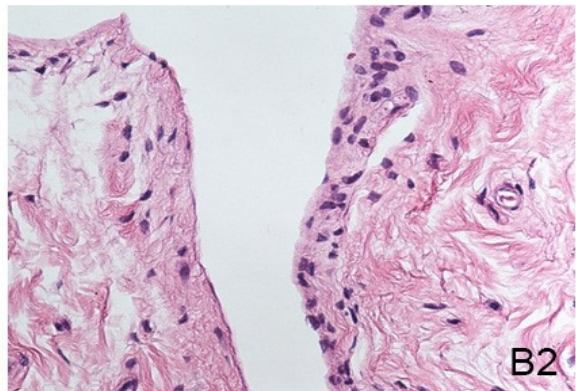
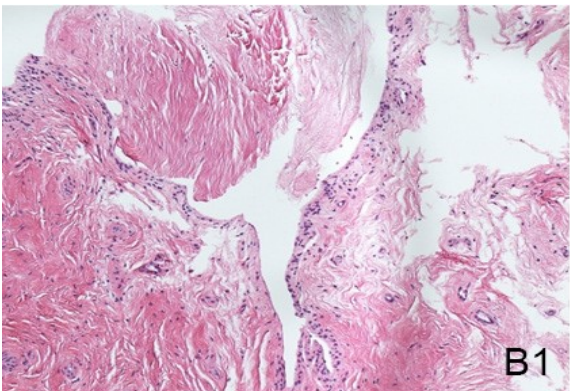
	Alter	Geschlecht	Knieseite	Vorhandenes Gewebe (hist. Abb.)
<b>Leiche 1</b>	65	W	Links	Median (A1-A3), lateral (B1-B3)
<b>Leiche 2</b>	55	W	Links	n.a.
<b>Leiche 3</b>	63	M	Links	Medial (C1-C3), median (D1-D3)
<b>Leiche 4</b>	57	W	Links	n.a.
<b>Leiche 5</b>	86	W	Rechts	Medial (E1-E3), lateral (F1-F3)
<b>Leiche 6</b>	86	W	Links	Medial (G1-G3), median (H1-H3)
<b>Leiche 7</b>	69	M	Rechts	n.a.
<b>Leiche 8</b>	57	M	Rechts	n.a.
<b>Leiche 9</b>	75	M	Rechts	n.a.
<b>Leiche 10</b>	66	M	Links	n.a.
<b>Leiche 11</b>	73	W	Rechts	Median (I1-I3)
<b>Leiche 12</b>	78	M	Links	Median (J1-J3), lateral (K1-K3)
<b>Leiche 13</b>	94	M	Rechts	n.a.
<b>Leiche 14</b>	86	W	Links	Medial (L1-L3)
<b>Leiche 15</b>	44	W	Rechts	n.a.

**Tab. 17: Allgemeine Daten zu den kürzlich Verstorbenen**  
**A1-A3, B1-B3 etc. entspricht den nachfolgenden Bildern; not available (n.a.)**



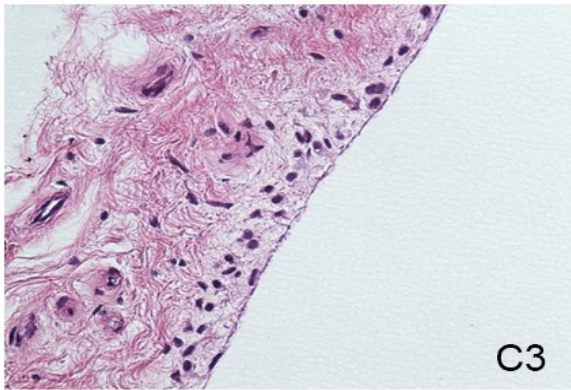
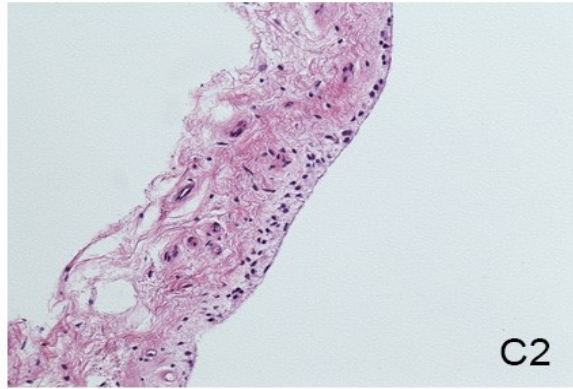
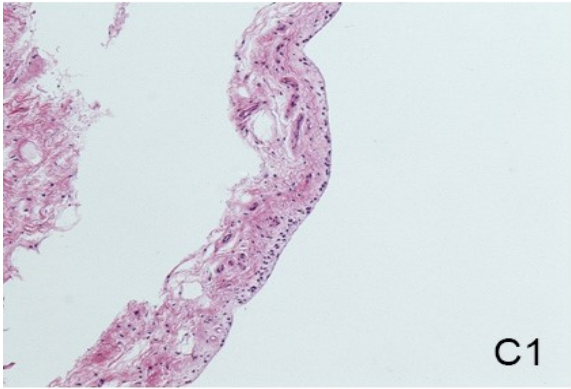
Punkte	Histologischer Befund (A1-A3)
1	Synoviale Deckzellschicht 2-3 Zelllagen breit
0	Normale Zelldichte im synovialen Stroma
0	Kein Nachweis eines entzündlichen Infiltrats
<b>Ergebnis: keine Synovialitis</b>	

Abb. 10: Leiche 1 median Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x. Tab. 18: Leiche 1 median



Punkte	Histologischer Befund (B1-B3)
1	Synoviale Deckzellschicht 2-3 Zelllagen breit
0	Normale Zelldichte im synovialen Stroma
0	Kein Nachweis eines entzündlichen Infiltrats
<b>Ergebnis: keine Synovialitis</b>	

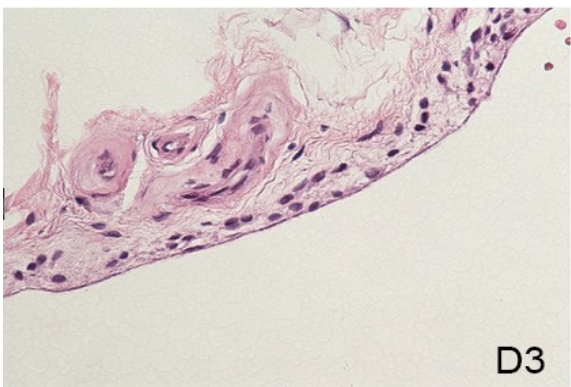
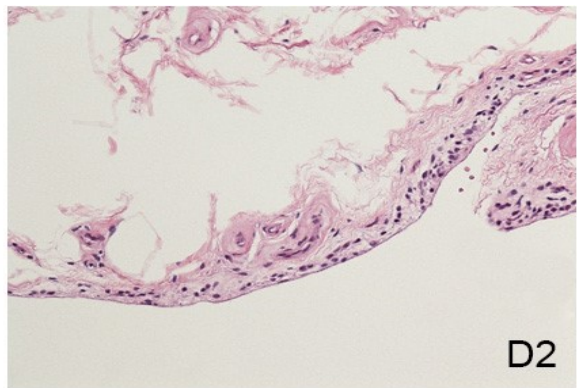
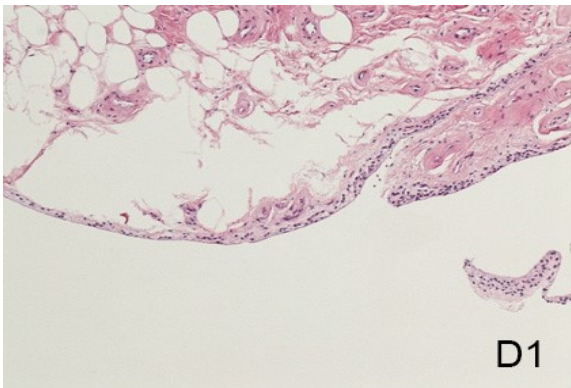
Abb. 11: Leiche 1 lateral Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x. Tab. 19: Leiche 1 lateral



Punkte	Histologischer Befund (C1-C3)
1	Synoviale Deckzellschicht 2-3 Zelllagen breit
0	Normale Zelldichte im synovialen Stroma
0	Kein Nachweis eines entzündlichen Infiltrats
<b>Ergebnis: keine Synovialitis</b>	

Abb. 12: Leiche 3 medial Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x.

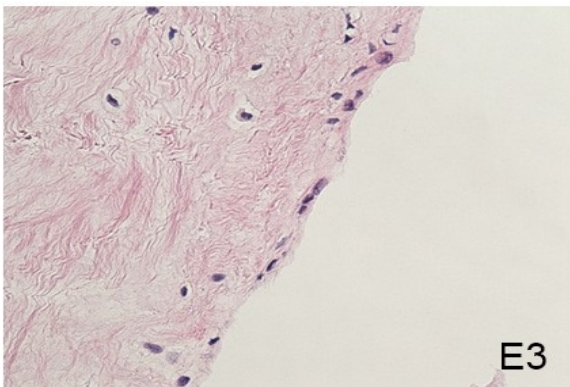
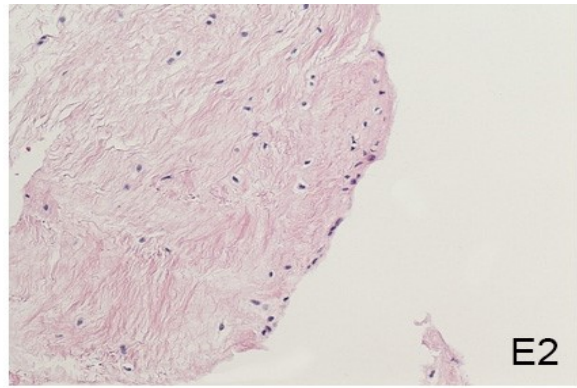
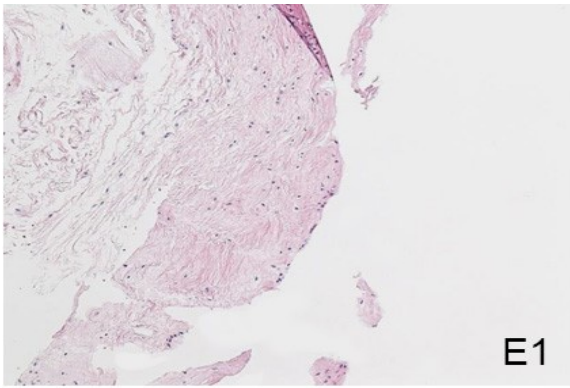
Tab. 20: Leiche 3 medial



Punkte	Histologischer Befund (D1-D3)
1	Synoviale Deckzellschicht 2-3 Zelllagen breit
0	Normale Zelldichte im synovialen Stroma
0	Kein Nachweis eines entzündlichen Infiltrats
<b>Ergebnis: keine Synovialitis</b>	

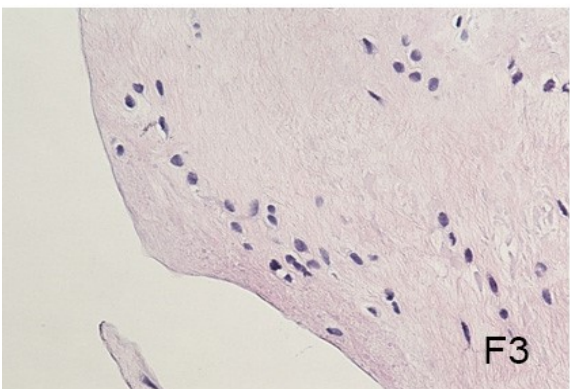
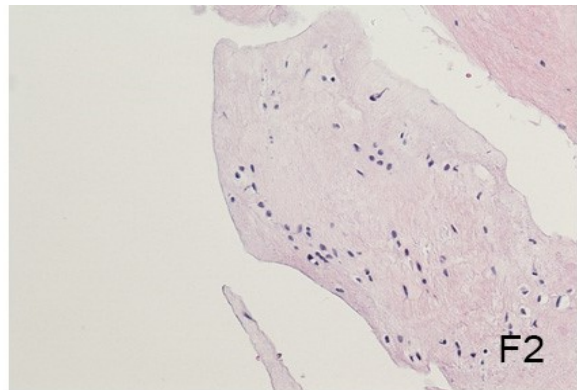
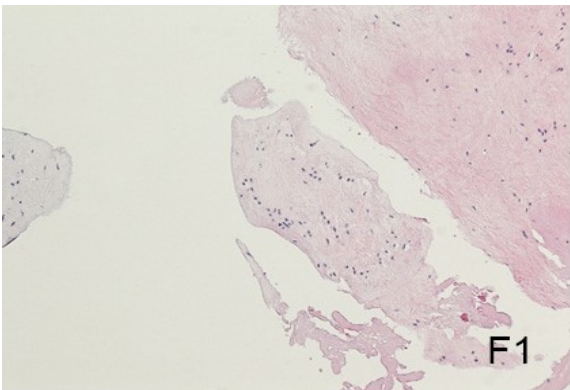
Abb. 13: Leiche 3 median Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x.

Tab. 21: Leiche 3 median



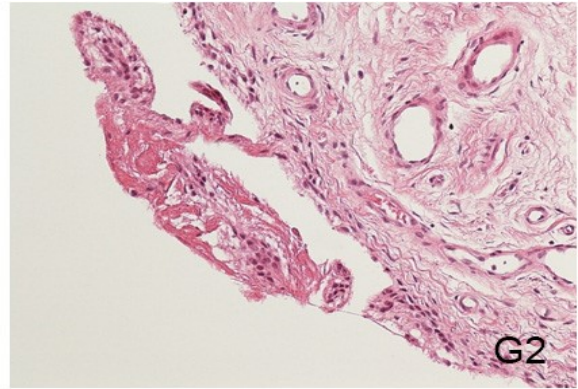
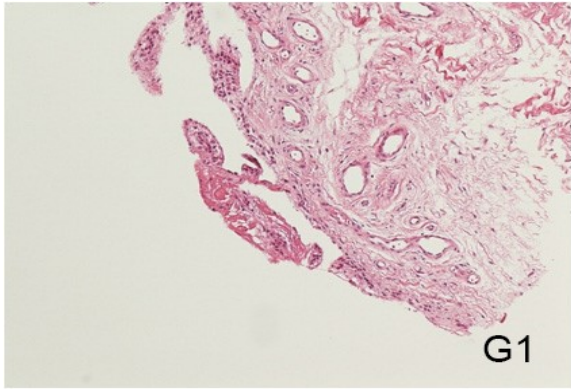
Punkte	Histologischer Befund (E1-E3)
0	Synoviale Deckzellschicht 1 Zelllagen breit
0	Normale Zelldichte im synovialen Stroma
0	Kein Nachweis eines entzündlichen Infiltrats
<b>Ergebnis: keine Synovialitis</b>	

Abb. 14: Leiche 5 medial Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x. Tab. 22: Leiche 5 medial



Punkte	Histologischer Befund (F1-F3)
0	Synoviale Deckzellschicht 1 Zellage breit
0	Normale Zelldichte im synovialen Stroma
0	Kein Nachweis eines entzündlichen Infiltrats
<b>Ergebnis: keine Synovialitis</b>	

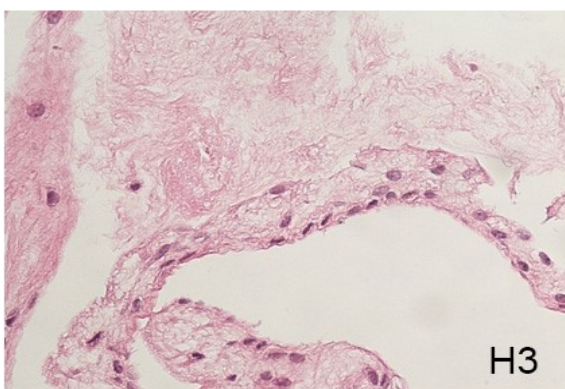
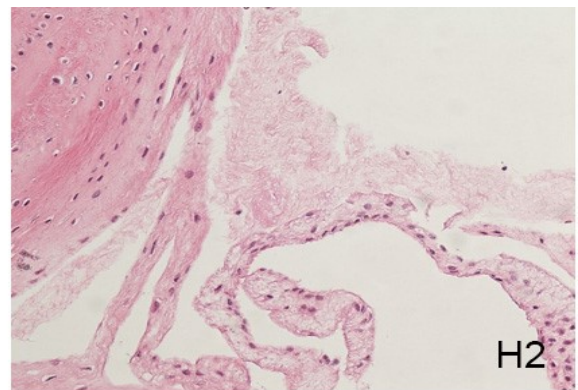
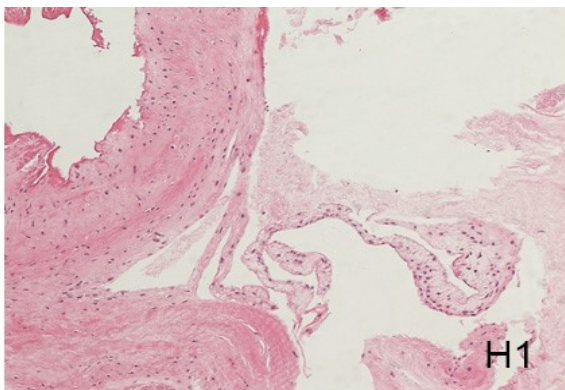
Abb. 15: Leiche 5 lateral Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x. Tab. 23: Leiche 5 lateral



Punkte	Histologischer Befund (G1-G3)
1	Synoviale Deckzellschicht 2-3 Zelllagen breit
0	Normale Zelldichte im synovialen Stroma
0	Kein Nachweis eines entzündlichen Infiltrats
<b>Ergebnis: keine Synovialitis</b>	

Abb. 16: Leiche 6 medial Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x.

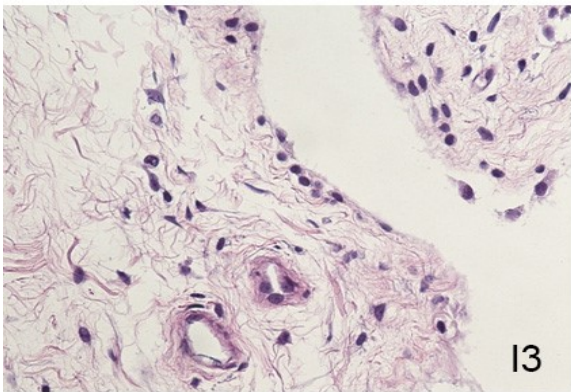
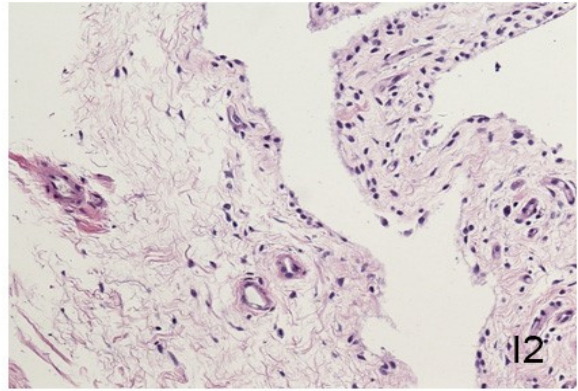
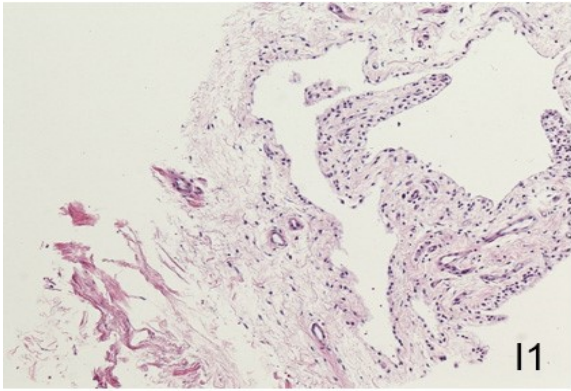
Tab. 24: Leiche 6 medial



Punkte	Histologischer Befund (H1-H3)
1	Synoviale Deckzellschicht 2-3 Zelllagen breit
0	Normale Zelldichte im synovialen Stroma
0	Kein Nachweis eines entzündlichen Infiltrats
<b>Ergebnis: keine Synovialitis</b>	

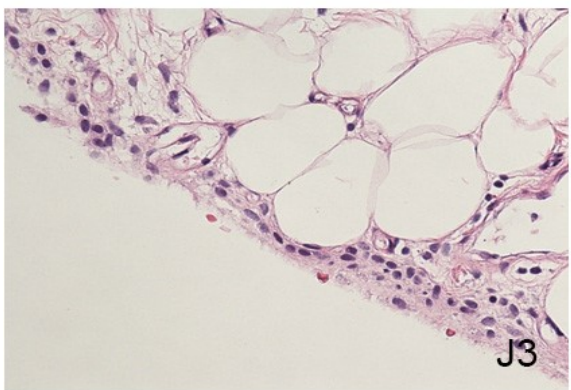
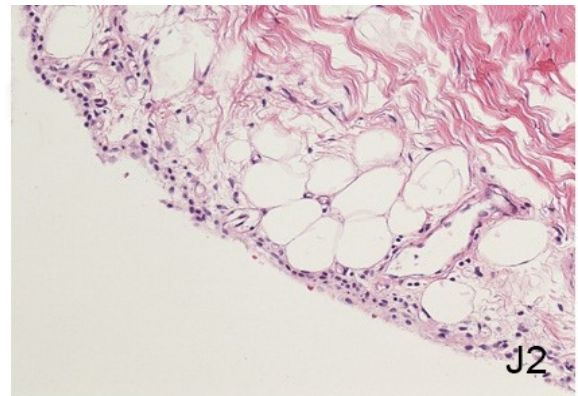
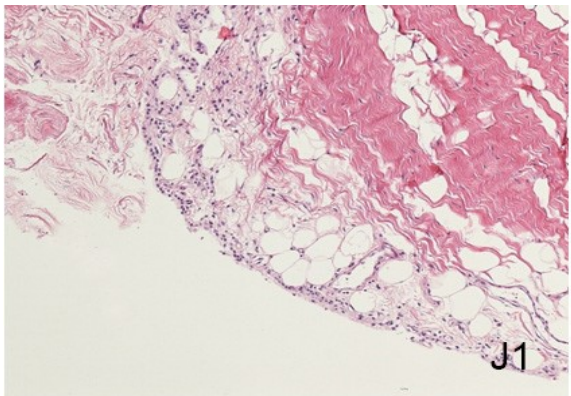
Abb. 17: Leiche 6 median Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x.

Tab. 25: Leiche 6 median



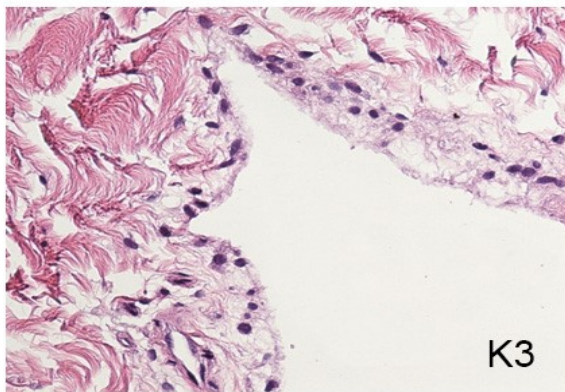
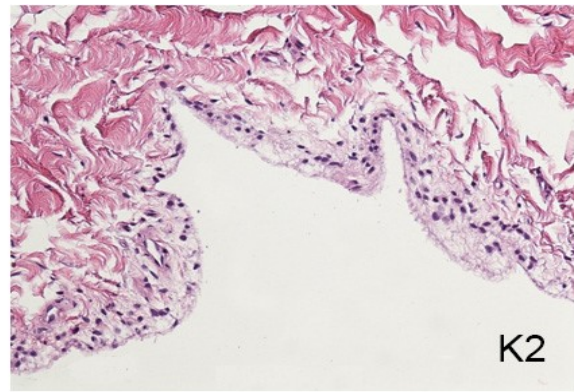
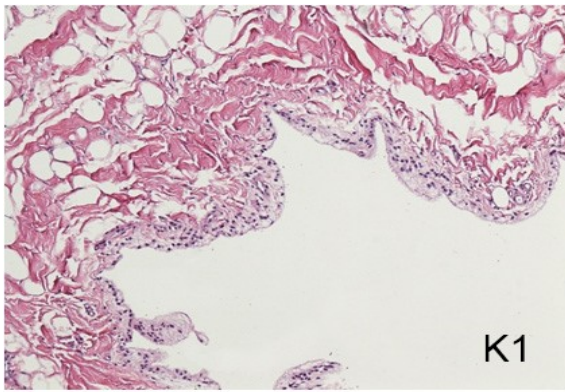
Punkte	Histologischer Befund (I1-I3)
0	Synoviale Deckzellschicht 1 Zellage breit
0	Normale Zelldichte im synovialen Stroma
0	Kein Nachweis eines entzündlichen Infiltrats
<b>Ergebnis: keine Synovialitis</b>	

Abb. 18: Leiche 11 median Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x. Tab. 26: Leiche 11 median



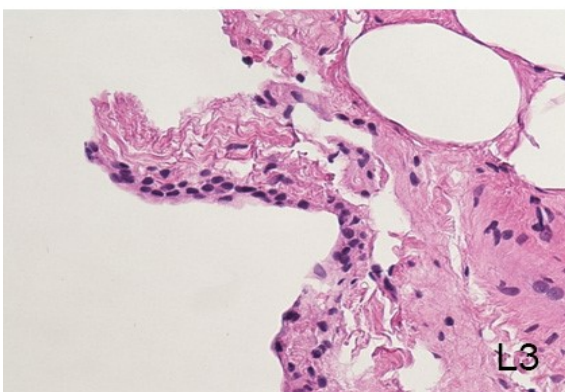
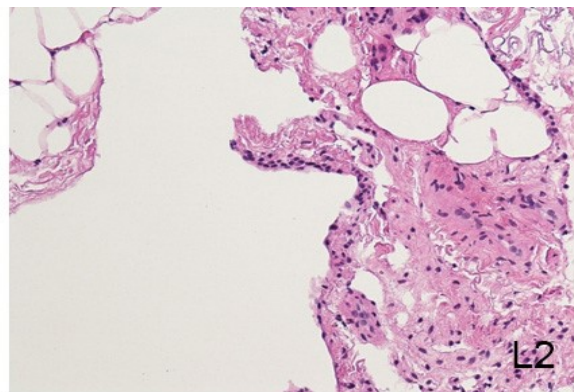
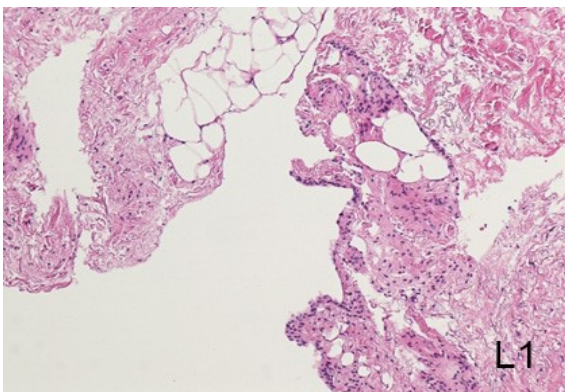
Punkte	Histologischer Befund (J1-J3)
1	Synoviale Deckzellschicht 2-3 Zelllagen breit
0	Normale Zelldichte im synovialen Stroma
0	Kein Nachweis eines entzündlichen Infiltrats
<b>Ergebnis: keine Synovialitis</b>	

Abb. 19: Leiche 12 median Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x. Tab. 27: Leiche 12 median



Punkte	Histologischer Befund (K1-K3)
1	Synoviale Deckzellschicht 2-3 Zelllagen breit
0	Normale Zelldichte im synovialen Stroma
0	Kein Nachweis eines entzündlichen Infiltrats
<b>Ergebnis: keine Synovialitis</b>	

Abb. 20: Leiche 12 lateral Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x. Tab. 28: Leiche 12 lateral



Punkte	Histologischer Befund (L1-L3)
1	Synoviale Deckzellschicht 2-3 Zelllagen breit
0	Normale Zelldichte im synovialen Stroma
0	Kein Nachweis eines entzündlichen Infiltrats
<b>Ergebnis: keine Synovialitis</b>	

Abb. 21: Leiche 14 medial Hämatoxylin-Eosin Färbung 10/20/40x. Tab. 29: Leiche 14 medial

## 4. Diskussion

Die Synovialmembran spielt bei vielen rheumatischen Krankheiten, wie beispielsweise der RA eine zentrale Rolle in der Pathogenese und ist eine aussichtsreiche Quelle möglicher Biomarker.(55, 92, 142) Mit Hilfe der ultraschallgezielten Biopsie der Synovialmembran, lässt sich dieses Gewebe in guter Qualität und Quantität entnehmen und zeigt sich für Patientinnen und Patienten als sichere und gut tolerierbare Methode.(70)

In unserer Studie erprobten wir die ultraschallgezielte Biopsie der Synovialmembran an acht Patientinnen und Patienten, verarbeiteten das Gewebe histologisch, analysierten die darin enthaltenen Zellen erstmals mit der FACS und stellten die gewonnenen Ergebnisse, der klinischen Präsentation und Ergebnissen der Analysen von Blut und Synovialflüssigkeit gegenüber.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigten, dass bei der klinischen Diagnose einer Gelenkentzündung, eine Synovialitis im entsprechenden histologischen Schnitt erkennbar war. Eine Korrelation des histologischen Bilds mit der Krankheitsaktivität und den Blutwerten der Patientinnen und Patienten war jedoch nicht ersichtlich, wobei eine mögliche Erklärung die bekannte morphologische Heterogenität der RA ist. Hierbei geben einzelne Gelenksabschnitte nicht den eigentlichen Krankheitszustand des Gelenks wider.(177) Es ist außerdem möglich, dass die Basistherapie der Patientinnen und Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie einen größeren Effekt auf das histologische Bild als auf die klinische Präsentation hatte.

Unsere Ergebnisse zeigten des Weiteren, dass die Histologie der Synovialmembran ähnliche Aussagen zu Entzündungen im Gelenk wie die Synovialflüssigkeitsanalyse zu liefern scheint. Ein entzündliches Punktat in der Synovialflüssigkeitsanalyse korrelierte stets mit einer Synovialitis im histologischen Bild.

Dementgegen konnten Kristalle, welche in der Synovialflüssigkeit gefunden wurden, nicht in der Synovialmembran nachgewiesen werden. Berichte aus den 1970er Jahren beschreiben zwar das Vorkommen von Kristallen in der Synovialmembran, machen jedoch keine Aussagen über die Sensitivität dieser Untersuchung und verwendeten andere Methoden als die ultraschallgezielte Biopsie.(173, 174)

Wir untersuchten erstmalig ultraschallgezielt gewonnene Synovialgewebsbiopsien mittels FACS. FACS Analysen wurden zuvor nur an Geweben durchgeführt, welche durch Methoden wie Arthroskopie und Arthrotomie gewonnen wurden.(186-188)

Aus den FACS Daten, konnten wir eine klare Prädominanz der T-Lymphozyten bei RA, wie sie in der Literatur beschrieben wird, nicht ableiten.(120) Nur bei einer Patientin, mit hoher Krankheitsaktivität, zeigte sich ein großer Anteil von T Zellen im Ausmaß von circa 70% sowohl in der Synovialmembran als auch in der Synovialflüssigkeit und im Blut.

Die Verteilung von CD8+ zu CD4+ Zellen hingegen zeigte eine klare Prädominanz der CD4+ Zellen in der Synovialmembran und im Blut, ähnlich wie sie in der Literatur beschrieben wird.(120) Interessant war, dass diese Prädominanz auch in der Synovialflüssigkeit vorkam, was den Ergebnissen einer älteren Studie widersprach, welche T-Lymphozyten Subtypen durch Immunhistochemie untersuchte. In dieser Studie war das Verhältnis zwischen CD4+ zu CD8+ Zellen nahezu 1:1.(189) Die verhältnismäßig geringe Ausbeute an Synovialmembran bei den Leichen (vorhandenes Gewebe bei 7 von 15 Leichen) im Vergleich zu Patientinnen und Patienten assoziieren wir damit, dass aufgrund der nicht vorhandenen Synovialitis die gesuchte Synovialmembran deutlich schwerer zu biopsieren war. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine hochgradige Synovialitis das beste Ausgangsgewebe für eine erfolgreiche Synovialgewebsbiopsie ist.(65, 70) Wenn Synovialmembran bei den Leichen gewonnen werden konnte, konnte diese jedoch gut histologisch bewertet werden.

Zusammenfassend, lässt sich aus unserer Studie schließen, dass ultraschallgezielte Synovialgewebsbiopsien sowohl an kleinen als auch an großen Gelenken möglich sind. Wir untersuchten erstmalig ultraschallgezielte Synovialgewebsbiopsien mittels FACS und stellten sowohl eine gute Qualität als auch Quantität des Gewebes fest. Diese Erkenntnisse und die gesammelten Daten können für zukünftige Studien zur Erforschung von Biomarkern verwendet werden.

Für die Aussagekraft des histologischen Bilds in Bezug auf klinische Präsentation und Krankheitsprognose, bedarf es jedoch noch Studien mit größeren Patientenpopulationen.

Wir konnten in unserer Studie des Weiteren die Sicherheit dieser Methode für Patientinnen und Patienten bestätigen, wie erst zuletzt in einer Studie gezeigt werden konnte.(70)

Anhand der vorhandenen Literatur und durch unsere eigenen Erfahrungen glauben wir, dass durch ultraschallgezielte Synovialgewebsbiopsien in der Zukunft weitere Rückschlüsse auf die Pathogenese rheumatischer Erkrankungen gezogen werden können.

Derzeit werden Biopsien hauptsächlich zu Forschungszwecken verwendet um nach möglichen Biomarkern zu suchen, die bei der Therapiewahl und beim Abschätzen des Therapieerfolgs helfen sollen.

Aktuelle Studien wie die “National Institute for Health Research: Response, Resistance to Rituximab study” oder die “Stratification of Biologic Therapies for Rheumatoid Arthritis by Pathobiology study” befassen sich ebenso mit diesen Themen.(92)

Synovialgewebsbiopsien könnten unserer Meinung nach zukünftig aber auch zur Hilfe in der Diagnostik, zumindest in unklaren Fällen, in Betracht gezogen werden.

Individuelle Diagnosen und Therapien sind für künftige Behandlungsprinzipien essentiell, um eine bestmögliche Behandlung für jede Patientin und jeden Patienten zu ermöglichen

Die ultraschallgezielte Synovialgewebsbiopsie könnte hierbei künftig eine ähnlich wichtige Rolle spielen wie die Biopsien von Tumoren in der Behandlung von Krebserkrankungen.(190, 191)

## 5. Literaturverzeichnis

1. Tobon GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*. 2010;35(1):10-4.
2. Thomas R, Cope AP. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Watts RA, Conaghan PG, Denton C, Foster H, Isaacs J, Müller-Ladner U, editors. *Oxford Textbook of Rheumatology*. 4 ed. New York City: Oxford University Press; 2013. p. 839-48.
3. Cross M, Smith E, Hoy D, Carmona L, Wolfe F, Vos T, et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2014;73(7):1316-22.
4. Murray CJL, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 2013;380(9859):2197-223.
5. Gruen JR, Weissman SM. Evolving Views of the Major Histocompatibility Complex. *Blood*. 1997;90(11):4252-65.
6. Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum*. 2005;52(11):3433-8.
7. Thomson W, Harrison B, Ollier B, Wiles N, Payton T, Barrett J, et al. Quantifying the exact role of HLA-DRB1 alleles in susceptibility to inflammatory polyarthritis: results from a large, population-based study. *Arthritis & Rheumatism*. 1999;42(4):757-62.
8. Gregersen PK, Olsson LM. Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:363-91.
9. Silman A, Kay A, Brennan P. Timing of pregnancy in relation to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1992;35(2):152-5.
10. Brennan P, Silman A. Breast-feeding and the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1994;37(6):808-13.
11. Liao KP, Gunnarsson M, Källberg H, Ding B, Plenge RM, Padyukov L, et al. A specific association exists between type 1 diabetes and anti-CCP positive rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(3):653-60.
12. Silman AJ, Ollier WE, Bubel MA. Autoimmune thyroid disease and thyroid autoantibodies in rheumatoid arthritis patients and their families. *Br J Rheumatol*. 1989;28(1):18-21.
13. Brennan P, Bankhead C, Silman A, Symmons D. Oral contraceptives and rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study. *Semin Arthritis Rheum*. 1997;26(6):817-23.
14. Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, Lindblad S, Lundberg I, Klareskog L, et al. Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2003;62(9):835-41.
15. Scher JU, Ubeda C, Pillinger MH, Bretz W, Buischi Y, Rosenthal PB, et al. Characteristic Oral and Intestinal Microbiota in Rheumatoid Arthritis (RA): A Trigger for Autoimmunity? [abstract]. *Arthritis & Rheumatism*. 2010;62 Suppl:1390.
16. Feist E, Burmester GR. Rheumatoid arthritis-clinical features. In: Watts RA, Conaghan PG, Denton C, Foster H, Isaacs J, Müller-Ladner U, editors. *Oxford Textbook of Rheumatology*. 4 ed. New York City: Oxford University Press; 2013. p. 858-66.
17. Eberhardt K, Johnson PM, Rydgren L. The occurrence and significance of hand deformities in early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. 1991;30(3):211-3.

18. Chamberlain MA, Corbett M. Carpal tunnel syndrome in early rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1970;29(2):149-52.
19. Wolfe F, Zwillich SH. The long-term outcomes of rheumatoid arthritis: a 23-year prospective, longitudinal study of total joint replacement and its predictors in 1,600 patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 1998;41(6):1072-82.
20. Louie GH, Ward MM. Changes in the rates of joint surgery among patients with rheumatoid arthritis in California, 1983–2007. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010.
21. Boden SD, Dodge LD, Bohlman HH, Rehtine GR. Rheumatoid arthritis of the cervical spine. A long-term analysis with predictors of paralysis and recovery. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*. 1993;75(9):1282-97.
22. Turesson C, O'Fallon WM, Crowson CS, Gabriel SE, Matteson EL. Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(8):722-7.
23. McGavin DD, Williamson J, Forrester JV, Foulds WS, Buchanan WW, Dick WC, et al. Episcleritis and scleritis. A study of their clinical manifestations and association with rheumatoid arthritis. *The British Journal of Ophthalmology*. 1976;60(3):192-226.
24. Saag KG, Kolluri S, Koehnke RK, Georgou TA, Rachow JW, Hunninghake GW, et al. Rheumatoid arthritis lung disease. Determinants of radiographic and physiologic abnormalities. *Arthritis Rheum*. 1996;39(10):1711-9.
25. Lindhardsen J, Ahlehoff O, Gislason GH, Madsen OR, Olesen JB, Torp-Pedersen C, et al. The risk of myocardial infarction in rheumatoid arthritis and diabetes mellitus: a Danish nationwide cohort study. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(6):929-34.
26. Nam JL, Winthrop KL, van Vollenhoven RF, Pavelka K, Valesini G, Hensor EM, et al. Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of RA. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(6):976-86.
27. Nell VPK, Machold KP, Eberl G, Stamm TA, Uffmann M, Smolen JS. Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2004;43(7):906-14.
28. Aletaha D, Radner H. Rheumatoid arthritis-diagnosis. In: Watts RA, Conaghan PG, Denton C, Foster H, Isaacs J, Müller-Ladner U, editors. *Oxford Textbook of Rheumatology*. 4 ed. New York City: Oxford University Press; 2013. p. 849-57.
29. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010;69(9):1580-8.
30. Sutton B, Corper A, Bonagura V, Taussig M. The structure and origin of rheumatoid factors. *Immunology today*. 2000;21(4):177-83.
31. Carson DA, Pasquali JL, Tsoukas CD, Fong S, Slovin SF, Lawrance SK, et al. Physiology and pathology of rheumatoid factors. *Springer seminars in immunopathology*. 1981;4(2):161-79.
32. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Annals of internal medicine*. 2007;146(11):797-808.
33. Avouac J, Gossec L, Dougados M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2006;65(7):845-51.
34. Visser K, Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Roodman HK, Seys PE, Kerstens PJ, et al. A matrix risk model for the prediction of rapid radiographic progression

in patients with rheumatoid arthritis receiving different dynamic treatment strategies: post hoc analyses from the BeSt study. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(7):1333-7.

35. Aletaha D, Smolen J. The Simplified Disease Activity Index (SDAI) and the Clinical Disease Activity Index (CDAI): a review of their usefulness and validity in rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology.* 2005;23(5 Suppl 39):S100-8.

36. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38(1):44-8.

37. Smolen JS, Breedveld FC, Schiff MH, Kalden JR, Emery P, Eberl G, et al. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology.* 2003;42(2):244-57.

38. Aletaha D, Nell VP, Stamm T, Uffmann M, Pflugbeil S, Machold K, et al. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis research & therapy.* 2005;7(4):R796-806.

39. Stucki G, Liang MH, Stucki S, Bruhlmann P, Michel BA. A self-administered rheumatoid arthritis disease activity index (RADAI) for epidemiologic research. Psychometric properties and correlation with parameters of disease activity. *Arthritis Rheum.* 1995;38(6):795-8.

40. Salaffi F, Ciapetti A. Clinical disease activity assessments in rheumatoid arthritis. *International Journal of Clinical Rheumatology.* 2013;8(3):347-60.

41. Leeb BF, Haindl PM, Maktari A, Nothnagl T, Rintelen B. Patient-centered rheumatoid arthritis disease activity assessment by a modified RADAI. *Journal of Rheumatology.* 2008;35(7):1294-9.

42. Brower AC. Use of the radiograph to measure the course of rheumatoid arthritis. The gold standard versus fool's gold. *Arthritis Rheum.* 1990;33(3):316-24.

43. Ostergaard M, Szkudlarek M. Imaging in rheumatoid arthritis - Why MRI and ultrasonography can no longer be ignored. *Scandinavian Journal of Rheumatology.* 2003;32(2):63-73.

44. McQueen FM, Stewart N, Crabbe J, Robinson E, Yeoman S, Tan PL, et al. Magnetic resonance imaging of the wrist in early rheumatoid arthritis reveals a high prevalence of erosions at four months after symptom onset. *Ann Rheum Dis.* 1998;57(6):350-6.

45. Anderson JJ, Wells G, Verhoeven AC, Felson DT. Factors predicting response to treatment in rheumatoid arthritis: the importance of disease duration. *Arthritis Rheum.* 2000;43(1):22-9.

46. Finckh A, Liang MH, van Herckenrode CM, de Pablo P. Long-term impact of early treatment on radiographic progression in rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 2006;55(6):864-72.

47. Schoels M, Knevel R, Aletaha D, Bijlsma JWJ, Breedveld FC, Boumpas DT, et al. Evidence for treating rheumatoid arthritis to target: results of a systematic literature search. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2010;69(4):638-43.

48. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(6):964-75.

49. Felson DT, Smolen JS, Wells G, Zhang B, van Tuyl LH, Funovits J, et al. American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism provisional

definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials. *Arthritis Rheum.* 2011;63(3):573-86.

50. Salliot C, van der Heijde D. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(7):1100-4.

51. Deighton C. Rheumatoid arthritis-management. In: Watts RA, Conaghan PG, Denton C, Foster H, Isaacs J, Müller-Ladner U, editors. *Oxford Textbook of Rheumatology*. 4 ed. New York City: Oxford University Press; 2013. p. 867-76.

52. Choy EH, Smith C, Dore CJ, Scott DL. A meta-analysis of the efficacy and toxicity of combining disease-modifying anti-rheumatic drugs in rheumatoid arthritis based on patient withdrawal. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2005;44(11):1414-21.

53. van Everdingen AA, Jacobs JW, Siewertsz Van Reesema DR, Bijlsma JW. Low-dose prednisone therapy for patients with early active rheumatoid arthritis: clinical efficacy, disease-modifying properties, and side effects: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Annals of internal medicine*. 2002;136(1):1-12.

54. Hoes JN, Jacobs JW, Verstappen SM, Bijlsma JW, Van der Heijden GJ. Adverse events of low- to medium-dose oral glucocorticoids in inflammatory diseases: a meta-analysis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(12):1833-8.

55. McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(23):2205-19.

56. Galloway JB, Hyrich KL, Mercer LK, Dixon WG, Fu B, Ustianowski AP, et al. Anti-TNF therapy is associated with an increased risk of serious infections in patients with rheumatoid arthritis especially in the first 6 months of treatment: updated results from the British Society for Rheumatology Biologics Register with special emphasis on risks in the elderly. *Rheumatology*. 2011;50(1):124-31.

57. Gomez-Reino JJ, Carmona L, Angel Descalzo M. Risk of tuberculosis in patients treated with tumor necrosis factor antagonists due to incomplete prevention of reactivation of latent infection. *Arthritis Rheum.* 2007;57(5):756-61.

58. Clifford DB, Ances B, Costello C, Rosen-Schmidt S, Andersson M, Parks D, et al. Rituximab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in rheumatoid arthritis. *Archives of neurology*. 2011;68(9):1156-64.

59. Yamaoka K. Janus kinase inhibitors for rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2016;32:29-33.

60. Conaghan PG, Østergaard M, Bowes MA, Wu C, Fuerst T, van der Heijde D, et al. Comparing the effects of tofacitinib, methotrexate and the combination, on bone marrow oedema, synovitis and bone erosion in methotrexate-naive, early active rheumatoid arthritis: results of an exploratory randomised MRI study incorporating semiquantitative and quantitative techniques. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2016.

61. van Vollenhoven RF, Fleischmann R, Cohen S, Lee EB, García Mejjide JA, Wagner S, et al. Tofacitinib or Adalimumab versus Placebo in Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*. 2012;367(6):508-19.

62. Filler T, Peuker E, Pera F, Schulte E, Fanghänel J, Cornelius L. Waldeyer – Anatomie des Menschen In: Anderhuber F, Fanghänel J, Nitsch R, Pera F, Bade H, Bechmann I, et al., editors. 18. 18 ed. Berlin: De Gruyter; 2009. p. 32-41.

63. Reith W. Ultraschall. In: Vogl TJ, Reith W, Rummeny EJ, editors. *Diagnostische und Interventionelle Radiologie*. Heidelberg: Springer Medizin; 2011. p. 49-54.

64. Backhaus M, Burmester GR, Gerber T, Grassi W, Machold KP, Swen WA, et al. Guidelines for musculoskeletal ultrasound in rheumatology. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2001;60(7):641-9.

65. Sitt JC, Griffith JF, Wong P. Ultrasound-guided synovial biopsy. *British Journal of Radiology*. 2015;89(1057):20150363.
66. Naredo E, Valor L, De la Torre I, Martínez-Barrio J, Hinojosa M, Aramburu F, et al. Ultrasound Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis in Clinical Remission: How Many and Which Joints Should Be Assessed? *Arthritis Care & Research*. 2013;65(4):512-7.
67. Smith MD. The normal synovium. *Open Rheumatology Journal*. 2011;5(SPEC. ISSUE 1):100-6.
68. Kane D, Grassi W, Sturrock R, Balint PV. Musculoskeletal ultrasound—a state of the art review in rheumatology. Part 2: Clinical indications for musculoskeletal ultrasound in rheumatology. *Rheumatology*. 2004;43(7):829-38.
69. Wakefield RJ, Balint PV, Szkudlarek M, Filippucci E, Backhaus M, D'Agostino M-A, et al. Musculoskeletal ultrasound including definitions for ultrasonographic pathology. *The Journal of rheumatology*. 2005;32(12):2485-7.
70. Kelly S, Humby F, Filer A, Ng N, Di Cicco M, Hands RE, et al. Ultrasound-guided synovial biopsy: a safe, well-tolerated and reliable technique for obtaining high-quality synovial tissue from both large and small joints in early arthritis patients. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2015;74(3):611-7.
71. Naredo E, Moller I, Cruz A, Carmona L, Garrido J. Power Doppler ultrasonographic monitoring of response to anti-tumor necrosis factor therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2008;58(8):2248-56.
72. Tamborrini G. 64 year old female rheumatoid arthritis (RA) patient with anterior shoulder pain in internal and external rotation [28.02.2017]. Available from: <http://eular-dam.brix.ch/anura-eular/asset.do?preview=212433&img=a.jpg>  
[http://www.eular.org/eular\\_imaging\\_library\\_portal.cfm](http://www.eular.org/eular_imaging_library_portal.cfm).
73. Af Klint E, Kisten Y, Faustini F, Ziegelasch M, Rezaei H, Van Vollenhoven R. Psoriatic Arthritis (PsA) patient with knee joint active inflammation [28.02.2017]. Available from: <http://eular-dam.brix.ch/anura-eular/asset.do?preview=207490&img=a.jpg>  
[http://www.eular.org/eular\\_imaging\\_library\\_portal.cfm](http://www.eular.org/eular_imaging_library_portal.cfm).
74. Szkudlarek M, Court-Payen M, Strandberg C, Klarlund M, Klausen T, Ostergaard M. Power Doppler ultrasonography for assessment of synovitis in the metacarpophalangeal joints of patients with rheumatoid arthritis: a comparison with dynamic magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum*. 2001;44(9):2018-23.
75. Iagnocco A, Naredo E, Wakefield R, Bruyn GA, Collado P, Jousse-Joulin S, et al. Responsiveness in rheumatoid arthritis. a report from the OMERACT 11 ultrasound workshop. *Journal of Rheumatology*. 2014;41(2):379-82.
76. D'Agostino MA, Wakefield RJ, Berner-Hammer H, Vittecoq O, Filippou G, Balint P, et al. Value of ultrasonography as a marker of early response to abatacept in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: results from the APPRAISE study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2016;75(10):1763-9.
77. D'Agostino MA, Boers M, Wakefield RJ, Berner Hammer H, Vittecoq O, Filippou G, et al. Exploring a new ultrasound score as a clinical predictive tool in patients with rheumatoid arthritis starting abatacept: results from the APPRAISE study. *RMD Open*. 2016;2(1):e000237.
78. Baillet A, Gaujoux-Viala C, Mouterde G, Pham T, Tebib J, Saraux A, et al. Comparison of the efficacy of sonography, magnetic resonance imaging and conventional radiography for the detection of bone erosions in rheumatoid arthritis patients: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology*. 2011;50(6):1137-47.
79. Wakefield RJ, Gibbon WW, Conaghan PG, O'Connor P, McGonagle D, Pease C, et al. The value of sonography in the detection of bone erosions in patients with rheumatoid

- arthritis: a comparison with conventional radiography. *Arthritis Rheum.* 2000;43(12):2762-70.
80. Saaibi DL, Schumacher HR, Jr. Percutaneous needle biopsy and synovial histology. *Bailliere's Clinical Rheumatology.* 1996;10(3):535-54.
81. Polley HF, Bickel WH. Punch biopsy of synovial membrane. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 1951;10(3):277-87.
82. Parker RH, Pearson CM. A simplified synovial biopsy needle. *Arthritis & Rheumatism.* 1963;6(2):172-6.
83. Gerlag DM, Tak PP. How to perform and analyse synovial biopsies. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology.* 2009;23(2):221-32.
84. Gerlag D, Tak PP. Synovial biopsy. *Best practice & research Clinical rheumatology.* 2005;19(3):387-400.
85. Arayssi T, Schumacher H. Evaluation of a modified needle for small joint biopsies. *J Rheumatol.* 1998;25:876 - 8.
86. Youssef PP, Kraan M, Breedveld F, Bresnihan B, Cassidy N, Cunnane G, et al. Quantitative microscopic analysis of inflammation in rheumatoid arthritis synovial membrane samples selected at arthroscopy compared with samples obtained blindly by needle biopsy. *Arthritis Rheum.* 1998;41(4):663-9.
87. van de Sande MG, Gerlag DM, Lodde BM, van Baarsen LG, Alivernini S, Codullo V, et al. Evaluating antirheumatic treatments using synovial biopsy: a recommendation for standardisation to be used in clinical trials. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2011;70(3):423-7.
88. Kane D, Veale DJ, FitzGerald O, Reece R. Survey of arthroscopy performed by rheumatologists. *Rheumatology.* 2002;41(2):210-5.
89. Baeten D, Van den Bosch F, Elewaut D, Stuer A, Veys EM, De Keyser F. Needle Arthroscopy of the Knee with Synovial Biopsy Sampling: Technical Experience in 150 Patients. *Clinical Rheumatology.* 1999;18(6):434-41.
90. Rooney M, Condell D, Quinlan W, Daly L, Whelan A, Feighery C, et al. Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31:956 - 63.
91. Lindblad S, Hedfors E. Intraarticular variation in synovitis. Local macroscopic and microscopic signs of inflammatory activity are significantly correlated. *Arthritis & Rheumatism.* 1985;28(9):977-86.
92. Humby F, Kelly S, Bugatti S, Manzo A, Filer A, Mahto A, et al. Evaluation of Minimally Invasive, Ultrasound-guided Synovial Biopsy Techniques by the OMERACT Filter--Determining Validation Requirements. *Journal of Rheumatology.* 2015;43(1):208-13.
93. Van Vugt RM, van Dalen A, Bijlsma JWW. Ultrasound Guided Synovial Biopsy of the Wrist. *Scandinavian Journal of Rheumatology.* 1997;26(3):212-4.
94. Soudack M, Nachtigal A, Vladovski E, Brook O, Gaitini D. Sonographically guided percutaneous needle biopsy of soft tissue masses with histopathologic correlation. *Journal of Ultrasound in Medicine.* 2006;25(10):1271-7.
95. Koski JM, Helle M. Ultrasound guided synovial biopsy using portal and forceps. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2005;64(6):926-9.
96. Scirè CA, Epis O, Codullo V, Humby F, Morbini P, Manzo A, et al. Immunohistological assessment of the synovial tissue in small joints in rheumatoid arthritis: validation of a minimally invasive ultrasound-guided synovial biopsy procedure. *Arthritis research & therapy.* 2007;9(5):R101.
97. Marin F, Lasbleiz J, Albert J, Askri A, Werner-Leyval S, Duval H, et al. Synovial biopsy under US guidance: technical considerations and results. *J Radiol.* 2006;87:561 - 5.

98. Clark DP, Pazdernik NJ. Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung. *Molekulare Biotechnologie - Grundlagen und Anwendung*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009. p. 185-7.
99. Fearon U, Mullan R, Markham T, Connolly M, Sullivan S, Poole AR, et al. Oncostatin M induces angiogenesis and cartilage degradation in rheumatoid arthritis synovial tissue and human cartilage cocultures. *Arthritis Rheum*. 2006;54(10):3152-62.
100. van der Pouw Kraan TC, van Gaalen FA, Huizinga TW, Pieterman E, Breedveld FC, Verweij CL. Discovery of distinctive gene expression profiles in rheumatoid synovium using cDNA microarray technology: evidence for the existence of multiple pathways of tissue destruction and repair. *Genes Immun*. 2003;4(3):187-96.
101. Lindberg J, af Klint E, Ulfgrén A, Stark A, Andersson T, Nilsson P, et al. Variability in synovial inflammation in rheumatoid arthritis investigated by microarray technology. *Arthritis research & therapy*. 2006;8:R47.
102. Clark DP, Pazdernik NJ. *Genomik und Genexpression*. *Molekulare Biotechnologie - Grundlagen und Anwendung*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009. p. 225-63.
103. Clark DP, Pazdernik NJ. *Proteomik*. *Molekulare Biotechnologie - Grundlagen und Anwendung*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009. p. 263-94.
104. Hueber W, Kidd BA, Tomooka BH, Lee BJ, Bruce B, Fries JF, et al. Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2005;52(9):2645-55.
105. Barland P, Novikoff AB, Hamerman D. Electron microscopy of the human synovial membrane. *J Cell Biol*. 1962;14:207-20.
106. Singh JA, Arayssi T, Duray P, Schumacher HR. Immunohistochemistry of normal human knee synovium: a quantitative study. *Ann Rheum Dis*. 2004;63(7):785-90.
107. Wilkinson LS, Worrall JG, Sinclair HD, Edwards JC. Immunohistological reassessment of accessory cell populations in normal and diseased human synovium. *Br J Rheumatol*. 1990;29(4):259-63.
108. Revell PA, al-Saffar N, Fish S, Osei D. Extracellular matrix of the synovial intimal cell layer. *Ann Rheum Dis*. 1995;54(5):404-7.
109. Key J. *Special Cytology*. 2. New York: PB Hoeber; 1932. p. 1055-76.
110. Smith M, Wechalekar M. *Hochberg's Rheumatology*. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, editors. 6 ed: Elsevier; 2014.
111. Wilkinson LS, Edwards JC. Microvascular distribution in normal human synovium. *J Anat*. 1989;167:129-36.
112. Bhatia A, Blades S, Cambridge G, Edwards JC. Differential distribution of Fc gamma RIIIa in normal human tissues and co-localization with DAF and fibrillin-1: implications for immunological microenvironments. *Immunology*. 1998;94(1):56-63.
113. Edwards JC, Willoughby DA. Demonstration of bone marrow derived cells in synovial lining by means of giant intracellular granules as genetic markers. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1982;41(2):177-82.
114. Wilkinson LS, Pitsillides AA, Worrall JG, Edwards JC. Light microscopic characterization of the fibroblast-like synovial intimal cell (synoviocyte). *Arthritis Rheum*. 1992;35(10):1179-84.
115. Stevens CR, Mapp PI, Revell PA. A monoclonal antibody (Mab 67) marks type B synoviocytes. *Rheumatol Int*. 1990;10(3):103-6.
116. Edwards JC, Wilkinson LS, Pitsillides AA. Palisading cells of rheumatoid nodules: comparison with synovial intimal cells. *Ann Rheum Dis*. 1993;52(11):801-5.

117. Henderson KJ, Edwards JC, Worrall JG. Expression of CD44 in normal and rheumatoid synovium and cultured synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis.* 1994;53(11):729-34.
118. Smith MD, Barg E, Weedon H, Papangelis V, Smeets T, Tak PP, et al. Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(4):303-7.
119. Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GF, Chisaka O, et al. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science.* 2007;315(5814):1006-10.
120. El-Gabalwy H. Synovial Fluid Analyses, Synovial Biopsy, and Synovial Pathology. In: Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, MCinnes IB, O'Dell JR, editors. *Kelley's & Firestein's Textbook of Rheumatology.* 1. 10 ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. p. 784-801.
121. Rhee DK, Marcelino J, Baker M, Gong Y, Smits P, Lefebvre V, et al. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest.* 2005;115(3):622-31.
122. Swann DA, Radin EL. The molecular basis of articular lubrication. I. Purification and properties of a lubricating fraction from bovine synovial fluid. *J Biol Chem.* 1972;247(24):8069-73.
123. Aupperle KR, Boyle DL, Hendrix M, Seftor EA, Zvaifler NJ, Barbosa M, et al. Regulation of synoviocyte proliferation, apoptosis, and invasion by the p53 tumor suppressor gene. *American Journal of Pathology.* 1998;152(4):1091-8.
124. Amano T, Yamasaki S, Yagishita N, Tsuchimochi K, Shin H, Kawahara K, et al. Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy. *Genes & Development.* 2003;17(19):2436-49.
125. Lefevre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nature Medicine.* 2009;15(12):1414-U10.
126. Tolboom TCA, Pieterman E, van der Laan WH, Toes REM, Huidekoper AL, Nelissen RGHH, et al. Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2002;61(11):975-80.
127. Szekanecz Z, Koch AE. Cell-cell interactions in synovitis. Endothelial cells and immune cell migration. *Arthritis Res.* 2000;2(5):368-73.
128. Szekanecz Z, Pakozdi A, Szentpetery A, Besenyei T, Koch AE. Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Frontiers in bioscience (Elite edition).* 2009;1:44-51.
129. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 1996;383(6603):787-93.
130. Canete JD, Martinez SE, Farres J, Sanmarti R, Blay M, Gomez A, et al. Differential Th1/Th2 cytokine patterns in chronic arthritis: interferon gamma is highly expressed in synovium of rheumatoid arthritis compared with seronegative spondyloarthropathies. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(4):263-8.
131. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, et al. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 1999;42(5):963-70.
132. Behrens F, Himsel A, Rehart S, Stanczyk J, Beutel B, Zimmermann SY, et al. Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2007;66(9):1151-6.
133. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine.* 2005;201(2):233-40.

134. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(1):33-9.
135. Young CL, Adamson TC, Vaughan JH, Fox RI. Immunohistologic characterization of synovial membrane lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 1984;27(1):32-9.
136. Pitzalis C, Kelly S, Humby F. New learnings on the pathophysiology of RA from synovial biopsies. *Current opinion in rheumatology*. 2013;25(3):334-44.
137. Reparón-Schuijt CC, van Esch WJE, van Kooten C, Levarht EWN, Breedveld FC, Verweij CL. Functional analysis of rheumatoid factor-producing B cells from the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis & Rheumatism*. 1998;41(12):2211-20.
138. Van Esch WJE, Reparón-Schuijt CC, Hamstra HJ, Van Kooten C, Logtenberg T, Breedveld FC, et al. Human IgG Fc-binding phage antibodies constructed from synovial fluid CD38(+) B cells of patients with rheumatoid arthritis show the imprints of an antigen-dependent process of somatic hypermutation and clonal selection. *Clinical and Experimental Immunology*. 2003;131(2):364-76.
139. Breedveld FC, Otten HG, Daha MR. Rheumatoid factor production in the joint. *Scandinavian journal of rheumatology Supplement*. 1995;101:183-5.
140. Cornish AL, Campbell IK, McKenzie BS, Chatfield S, Wicks IP. G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2009;5(10):554-9.
141. Tanaka M, Nagai T, Tsuneyoshi Y, Sunahara N, Matsuda T, Nakamura T, et al. Expansion of a unique macrophage subset in rheumatoid arthritis synovial lining layer. *Clinical & Experimental Immunology*. 2008;154(1):38-47.
142. Haringman J, Gerlag D, Zwinderman A, Smeets T, Kraan M, Baeten D, et al. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:834 - 8.
143. Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1996;39:115 - 24.
144. Lebre MC, Jongbloed SL, Tas SW, Smeets TJM, McLInnes LB, Tak PP. Rheumatoid arthritis synovium contains two subsets of CD83(-)DC(-)LAMP(-) dendritic cells with distinct cytokine profiles. *American Journal of Pathology*. 2008;172(4):940-50.
145. Cascao R, Rosario HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmunity reviews*. 2010;9(8):531-5.
146. Nigrovic PA, Lee DM. Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunological Reviews*. 2007;217:19-37.
147. Dalbeth N, Callan MF. A subset of natural killer cells is greatly expanded within inflamed joints. *Arthritis Rheum*. 2002;46(7):1763-72.
148. Hess A, Axmann R, Rech J, Finzel S, Heindl C, Kreitz S, et al. Blockade of TNF-alpha rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(9):3731-6.
149. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell*. 1996;85(3):307-10.
150. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(11):3537-45.
151. Sabeh F, Fox D, Weiss SJ. Membrane-Type I Matrix Metalloproteinase-Dependent Regulation of Rheumatoid Arthritis Synoviocyte Function. *Journal of Immunology*. 2010;184(11):6396-406.

152. Schett G, Teitelbaum SL. Osteoclasts and Arthritis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2009;24(7):1142-6.
153. Jimenez-Boj E, Redlich K, Turk B, Hanslik-Schnabel B, Wanivenhaus A, Chott A, et al. Interaction between synovial inflammatory tissue and bone marrow in rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology*. 2005;175(4):2579-88.
154. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nature Medicine*. 2007;13(2):156-63.
155. Swan A, Amer H, Dieppe P. The value of synovial fluid assays in the diagnosis of joint disease: a literature survey. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(6):493-8.
156. Jalava J, Skurnik M, Toivanen A, Toivanen P, Eerola E. Bacterial PCR in the diagnosis of joint infection. *Ann Rheum Dis*. 2001;60(3):287-9.
157. van der Heijden IM, Wilbrink B, Vije AE, Schouls LM, Breedveld FC, Tak PP. Detection of bacterial DNA in serial synovial samples obtained during antibiotic treatment from patients with septic arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999;42(10):2198-203.
158. van der Heijden IM, Wilbrink B, Rijpkema SG, Schouls LM, Heymans PH, van Embden JD, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* by reverse line blot in the joints of Dutch patients with Lyme arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999;42(7):1473-80.
159. Nikkari S, Puolakkainen M, Yli-Kerttula U, Luukkainen R, Lehtonen OP, Toivanen P. Ligase chain reaction in detection of *Chlamydia* DNA in synovial fluid cells. *Br J Rheumatol*. 1997;36(7):763-5.
160. Muralidhar B, Rumore PM, Steinman CR. Use of the polymerase chain reaction to study arthritis due to *Neisseria gonorrhoeae*. *Arthritis Rheum*. 1994;37(5):710-7.
161. van der Heijden IM, Wilbrink B, Schouls LM, van Embden JD, Breedveld FC, Tak PP. Detection of mycobacteria in joint samples from patients with arthritis using a genus-specific polymerase chain reaction and sequence analysis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 1999;38(6):547-53.
162. Titov AG, Vyshnevskaya EB, Mazurenko SI, Santavirta S, Kontinen YT. Use of polymerase chain reaction to diagnose tuberculous arthritis from joint tissues and synovial fluid. *Arch Pathol Lab Med*. 2004;128(2):205-9.
163. Bernhard GC, Hensley GT. Amyloid arthropathy. *Arthritis & Rheumatism*. 1969;12(4):444-53.
164. Kruithof E, Baeten D, De Rycke L, Vandooren B, Foell D, Roth J, et al. Synovial histopathology of psoriatic arthritis, both oligo- and polyarticular, resembles spondyloarthropathy more than it does rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2005;7(3):R569-80.
165. Canete JD, Rodriguez JR, Salvador G, Gomez-Centeno A, Munoz-Gomez J, Sanmarti R. Diagnostic usefulness of synovial vascular morphology in chronic arthritis. A systematic survey of 100 cases. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2003;32(6):378-87.
166. Canete JD, Santiago B, Cantaert T, Sanmarti R, Palacin A, Celis R, et al. Ectopic lymphoid neogenesis in psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(6):720-6.
167. Voswinkel J, Weisgerber K, Pfreundschuh M, Gause A. B lymphocyte involvement in ankylosing spondylitis: the heavy chain variable segment gene repertoire of B lymphocytes from germinal center-like foci in the synovial membrane indicates antigen selection. *Arthritis Res*. 2001;3(3):189-95.
168. Da RR, Qin Y, Baeten D, Zhang Y. B cell clonal expansion and somatic hypermutation of Ig variable heavy chain genes in the synovial membrane of patients with osteoarthritis. *Journal of Immunology*. 2007;178(1):557-65.
169. Schumacher HR, Jr. Joint involvement in progressive systemic sclerosis (scleroderma): a light and electron microscopic study of synovial membrane and fluid. *American journal of clinical pathology*. 1973;60(5):593-600.

170. Schumacher HR, Schimmer B, Gordon GV, Bookspan MA, Brogadir S, Dorwart BB. Articular manifestations of polymyositis and dermatomyositis. *American Journal of Medicine*. 1979;67(2):287-92.
171. Natour J, Montezzo LC, Moura LA, Atra E. A study of synovial membrane of patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clinical and experimental rheumatology*. 1991;9(3):221-5.
172. Schumacher HR, Jr. Ultrastructural characteristics of the synovial membrane in idiopathic haemochromatosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1972;31(6):465-73.
173. Schumacher HR. Ultrastructural findings in chondrocalcinosis and pseudogout. *Arthritis Rheum*. 1976;19 Suppl 3:413-25.
174. Moskowitz RW, Harris BK, Schwartz A, Marshall G. Chronic synovitis as a manifestation of calcium crystal deposition disease. *Arthritis & Rheumatism*. 1971;14(1):109-16.
175. Reginato AJ, Schumacher HR, Martinez VA. Ochronotic arthropathy with calcium pyrophosphate crystal deposition. A light and electron microscopic study. *Arthritis & Rheumatism*. 1973;16(6):705-14.
176. Darling JM, Goldring SR, Harada Y, Handel ML, Glowacki J, Gravallesse EM. Multinucleated cells in pigmented villonodular synovitis and giant cell tumor of tendon sheath express features of osteoclasts. *Am J Pathol*. 1997;150(4):1383-93.
177. Krenn V, Morawietz L, Konig B, Otto M, Kriegsmann J, Kopenik A, et al. Low-grade-/high-grade-synovitis. Synovitis-score as a gold standard?. [German]. *Orthopade*. 2006;35(8):853-9.
178. Jakobs M, Häupl T, Krenn V, Guenther R. MMP- und FAP-vermittelte inflammationsunabhängige Destruktion von Knochen und Knorpel in der rheumatoiden Arthritis. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2009;68(8):683-94.
179. Pessler F, Ogdie A, Diaz-Torne C, Dai L, Yu X, Einhorn E, et al. Subintimal Ki-67 as a synovial tissue biomarker for inflammatory arthropathies. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(2):162-7.
180. A. Shah EWSC. *Harrison's principles of internal medicine*. Chapter 280: Rheumatoid Arthritis. 19 ed. DL Kasper SH, JL Jameson, AS Fauci, DL Longo, J Loscalzo editor. New York: McGraw-Hill Education; 2015.
181. Davis MJ, Denton J, Freemont AJ, Holt PJ. Comparison of serial synovial fluid cytology in rheumatoid arthritis: delineation of subgroups with prognostic implications. *Ann Rheum Dis*. 1988;47(7):559-62.
182. Shmerling RH, Delbanco TL, Tosteson AN, Trentham DE. Synovial fluid tests. What should be ordered? *JAMA*. 1990;264(8):1009-14.
183. Schoels MM, Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Disease activity in psoriatic arthritis (PsA): defining remission and treatment success using the DAPSA score. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(5):811-8.
184. Herold G. *Klinisch-chemische und hämatologische Laborparameter*. Herold - Innere Medizin. Köln: Herold, G.; 2017. p. 962.
185. Anderson J, Caplan L, Yazdany J, Robbins ML, Neogi T, Michaud K, et al. Rheumatoid Arthritis Disease Activity Measures: American College of Rheumatology Recommendations for Use in Clinical Practice. *Arthritis care & research*. 2012;64(5):640-7.
186. Kunisch E, Fuhrmann R, Roth A, Winter R, Lungershausen W, Kinne RW. Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2004;63(7):774-84.

187. Moradi B, Schnatzer P, Hagmann S, Rosshirt N, Gotterbarm T, Kretzer JP, et al. CD4+CD25+/highCD127low/- regulatory T cells are enriched in rheumatoid arthritis and osteoarthritis joints--analysis of frequency and phenotype in synovial membrane, synovial fluid and peripheral blood. *Arthritis research & therapy*. 2014;16(2):R97.
188. Teng YKO, Levarht EWN, Toes REM, Huizinga TWJ, van Laar JM. Residual inflammation after rituximab treatment is associated with sustained synovial plasma cell infiltration and enhanced B cell repopulation. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2009;68(6):1011-6.
189. Fox RI, Fong S, Sabharwal N, Carstens SA, Kung PC, Vaughan JH. Synovial fluid lymphocytes differ from peripheral blood lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1982;128(1):351-4.
190. Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, Kirkwood JM. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist*. 2011;16(1):5-24.
191. Kaufmann M, Puzstai L, Biedenkopf Expert Panel M. Use of standard markers and incorporation of molecular markers into breast cancer therapy: Consensus recommendations from an International Expert Panel. *Cancer*. 2011;117(8):1575-82.