

Aus der
Orthopädischen Universitätsklinik mit Poliklinik Tübingen

**Effekt der photodynamischen Therapie auf die einzelnen
Bestandteile des Gelenks – eine in vitro Untersuchung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Diel, Felix Hubertus

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Traub, Ph.D.
2. Berichterstatter: Professorin Dr. T. Histing

Tag der Disputation: 20.03.2023

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Gelenk allgemein und Kniegelenk Anatomie.....	1
1.2	Gelenkpathologien – Synovitis, Arthritis, Arthrose	4
1.2.1	Chronische, uncharakteristische Synovitiden	5
1.2.2	Arthritis	7
1.2.3	Arthrose	10
1.2.4	Tenovsynovialer Riesenzelltumor (ehemals: Pigmentierte villonoduläre Synovitis)	14
1.3	Photodynamische Therapie & 5 – ALA.....	20
1.3.1	5 – Aminolävulinat als Photosensitizer und seine Wirkungsweise	23
1.4	Bisherige Behandlung und Ziel dieser Dissertation	25
2	Material und Methoden	28
2.1	Material	28
2.1.1	Verwendete Zellreihen & Gewebe	28
2.1.2	Zellkulturmedien & Zusätze	30
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.4	Geräte.....	32
2.1.5	Lösungen, Chemikalien & Farbstoffe.....	33
2.2	Methoden	35
2.2.1	Zellkultur	35
2.2.2	Vorexperimente	38
2.2.3	Migrations – Assay	46
2.2.4	MTT – Assay.....	48
2.2.5	Viability Assay.....	50
2.2.6	Kernfragmentierungs – Assay der Fibroblasten-1 Zellreihe	53

2.2.7	Photodynamische Therapie	55
3	Ergebnisse	57
3.1	Migrations – Assay	57
3.1.1	Migration der PVNS-1 Zellreihe	57
3.1.2	Migration der Fibroblasten-1 Zellreihe	63
3.2	MTT – Assay	69
3.2.1	MTT – Assay der PVNS-1 Zellreihe	69
3.2.2	MTT – Assay der Fibroblasten-1 Zellreihe	72
3.3	Viability Assay	76
3.4	Kernfragmentierung der Fibroblasten-1 Zellreihe	78
4	Diskussion	81
4.1	Zielsetzung dieser Dissertation	83
4.2	Migrations – Assay	84
4.2.1	Migration der pigmentierten villonoduären Synovitis Zellreihe	84
4.2.2	Migration der Fibroblasten- Zellreihe	86
4.3	MTT – Assay	87
4.4	Viability Assay	92
4.5	Kernfragmentierung	96
4.6	Ausblick	97
5	Zusammenfassung	101
6	Literaturverzeichnis	104
7	Erklärung zum Eigenanteil	114
8	Danksagung	115

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
5 – ALA	5 – Aminolävulinat (Photosensitizer)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetal calf serum
GNP	Gold Nanopartikel
Gy	Gray (Einheit der Strahlendosis)
LED	Light emitting diodes
Lig	Ligamentum
Min	Minuten
PBS	Phosphate buffered saline (Waschpuffer)
PDT	Photodynamische Therapie
PI	Propidium Iodid
PpIX	Protoporphyrin IX
PVNS	Pigmentierte villonoduläre Synovitis
RA	Rheumatoide Arthritis
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
Sek	Sekunden
TGCT	Tenosynovial Giant Cell Tumor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schemadarstellung des Kniegelenks.....	2
Abbildung 2: Synovitis – Score zur Graduierung chronischer Synovitiden	6
Abbildung 3: ACR/EULAR Klassifikationskriterien für die RA.....	9
Abbildung 4: Sagittales MRT in T1 Wichtung des Knies einer 47 jährigen Patientin mit lokalisiertem TGCT (hypointens) im Bereich des Hoffa Fettkörpers und des anterioren Kapselanteils.....	16
Abbildung 5: Sagittales MRT in T1 Wichtung eines 23 jährigen Patienten mit diffusem TGCT (PVNS). Zu sehen sind deutlich hypointense proliferative Prozesse der Synovia im Bereich der Kreuzbänder, des Recessus suprapatellaris und dorsal im Bereich der Baker Zyste.....	17
Abbildung 6: Absorptionsmaxima von Porphyrinen.	23
Abbildung 7: Pigmentierte villonoduläre Synovialitis (angefertigt durch Felix Diel am 12.12.2018).....	28
Abbildung 8: Zellmengen der Fibroblasten-1 & PVNS-1 auf jeder Seite eines Culture Inserters (je 2x: Negativplatte und Migrationsplatte)	37
Abbildung 9: Bild eines Culture – Inserters mit 70µl Zellmedium pro Inserterhälfte. Nach 24 Stunden Inkubation sind die Zellpopulationen am Wellboden adhärent und durch den Inserter exakt 500µm voneinander getrennt.	38
Abbildung 10: Fibroblasten-1 ohne Migration bei 2×10^4 Zellen (d0 – Platte).....	39
Abbildung 11: Fibroblasten-1 nach 18h Migration bei 2×10^4 Zellen.....	39
Abbildung 12: PVNS-1 ohne Migration bei 10^4 Zellen (d0 – Platte).....	40
Abbildung 13: PVNS-1 nach 10h Migration bei 10^4 Zellen	40
Abbildung 14: gleiche 5 - ALA Konzentrationen (in mM) wurden an verschiedenen Lokalisationen unter der Lichtquelle platziert (N: Negativprobe, also kein 5 – ALA, nur Medium)	42
Abbildung 15: Verdünnungsreihe 5 - ALA für Fibroblasten-1 & PVNS-1 Zellen zur Ermittlung der optimalen 5 – ALA Konzentration.....	43
Abbildung 16: Beispiel zur Auszählung der grünen, vitalen Knorpelzellen mithilfe von blauen Zählhilfen und der roten, avitalen Knorpelzellen mithilfe von türkisfarbenen Zählhilfen in der Software ImageJ©	52

Abbildung 17: Schemadarstellung der PDT in dieser Dissertation (angefertigt durch Felix Diel am 14.07.2019)	55
Abbildung 18: Versuchsaufbau der PDT mit Belichtung einer 6 Well – plate aus 16,5cm Entfernung (angefertigt durch Felix Diel, 20.01.19)	55
Abbildung 19: Distanz der Zellpopulationen der PVNS-1 ohne Belichtung und 10-stündiger Migration	57
Abbildung 20: Distanz der Zellpopulationen der PVNS-1 nach 300 Sekunden Belichtung und 10- stündiger Migration	57
Abbildung 21: Distanz der Zellpopulationen der PVNS-1 nach 1000 Sekunden Belichtung und 10- stündiger Migration	58
Abbildung 22: Distanz der Zellpopulationen der PVNS-1 nach 2000 Sekunden Belichtung und 10- stündiger Migration	58
Abbildung 23: Dargestellt sind Migrationen der PVNS-1 Zelllinie nach 10 stündiger Inkubation bei 37°C. Oberes Bild: d0 – Probe ohne Migration. Unteres Bild: Stattgefundene Migration bei 1mM 5 – ALA Konzentration und 300 Sekunden Belichtung im Vergleich dazu. Es ist deutlich sichtbar, dass eine Migration über 200µm stattgefunden hat.....	60
Abbildung 24: beide Bilder nach 3mM 5 – ALA und 2000 Sekunden belichtet. Die PVNS-1 Migration fällt deutlich geringer aus, jedoch noch immer signifikant (>200µm). Die Zellen sind hierbei deutlich morphologisch verändert. Oberes Bild: Auffallend ist die verminderte Zellmenge bei vergrößertem Zellabstand zueinander. Unteres Bild: Vor allem in der linken Zellpopulation verschmälertes Zytoplasma mit Veränderung der Kern – Plasma – Relation zugunsten des Kerns.	61
Abbildung 25: Distanz der Zellpopulationen der Fibroblasten-1 ohne Belichtung und 18 stündiger Migration	63
Abbildung 26: Distanz der Zellpopulationen der Fibroblasten-1 nach 300 Sekunden Belichtung und 18 stündiger Migration	63
Abbildung 27: Distanz der Zellpopulationen der Fibroblasten-1 nach 1000 Sekunden Belichtung und 18 stündiger Migration	64
Abbildung 28: Distanz der Zellpopulationen der Fibroblasten-1 nach 2000 Sekunden Belichtung und 18 stündiger Migration	64
Abbildung 29: Dargestellt sind Migrationen der Fibroblasten-1 nach 18 stündiger Inkubation bei 37°C. Oberes Bild: d0 – Probe ohne Migration. Unteres Bild: Stattgefundene Migration bei 50µM 5 – ALA Konzentration und 300 Sekunden	

Belichtung im Vergleich dazu. Es ist deutlich sichtbar, das über 200µm ausmigriert wurde und die Zellen morphologisch den unbehandelten Zellen ähneln.	66
Abbildung 30: Fibroblasten-1 Migration mit einer 250µM 5 – ALA Konzentration und 2000 Sekunden belichtet. Es fand keine signifikante Migration statt. Im Vergleich zur d0 – Probe mit 500µm Distanz hat sich diese sogar auf 543,94µm (rote Linie) vergrößert. Die Zellen sind ebenfalls deutlich morphologisch verändert. Auffallend ist die verminderte Zellmenge bei vergrößertem Zellabstand zueinander. Darüber hinaus eine Veränderung der Kern – Plasma – Relation zugunsten des Kerns.	67
Abbildung 31: Prozentuale Viabilität der PVNS-1 Zellen unbelichtet im MTT – Assay	68
Abbildung 32: Prozentuale Viabilität der PVNS-1 Zellen nach 300 Sekunden Belichtung im MTT – Assay.....	69
Abbildung 33: Prozentuale Viabilität der PVNS-1 Zellen nach 1000 Sekunden Belichtung im MTT – Assay. Der Einbruch bei 250µM bzw. 1500µM gilt unter dem Vorbehalt zu betrachten, dass auch hier die Viabilität im niedrigsten Fall noch bei 97 % liegt.	69
Abbildung 34: Prozentuale Absorption der PVNS-1 Zellen nach 2000 Sekunden Belichtung im MTT – Assay.....	70
Abbildung 35: Prozentuale Viabilität der Fibroblasten-1 Zellen unbelichtet im MTT – Assay	72
Abbildung 36: Prozentuale Viabilität der Fibroblasten-1 Zellen nach 300 Sekunden Belichtung im MTT – Assay.....	73
Abbildung 37: Prozentuale Viabilität der Fibroblasten-1 Zellen nach 1000 Sekunden Belichtung im MTT – Assay.....	73
Abbildung 38: Prozentuale Viabilität der Fibroblasten-1 Zellen nach 2000 Sekunden Belichtung im MTT – Assay.....	74
Abbildung 39: prozentuale Vitalität der Knorpelzellen nach 5 – ALA Gabe und ohne Belichtung.....	75
Abbildung 40: prozentuale Vitalität der Knorpelzellen nach 5 – ALA Gabe und 300 Sekunden Belichtung	76
Abbildung 41: prozentuale Vitalität der Knorpelzellen nach 5 – ALA Gabe und 2000 Sekunden Belichtung	76
Abbildung 42: Bild der Kernfragmentierung von Fibroblasten-1 Zellen bei Positivprobe mit 500µl Staurosporin (Verdünnung 1:1000 (v/v)).....	78

Abbildung 43: Oberes Bild: Kernfragmentierung der Fibroblasten-1 Zellreihe bei 250µM 5 – ALA und 2000 Sekunden Belichtung mit deutlichen Zytoplasmaeinschlüssen im Kern Unteres Bild: Kernfragmentierung bei 500µM 5 – ALA und 2000 Sekunden Belichtung. Es sind deutliche Zytoplasmaeinschlüsse innerhalb der Nuklei sichtbar. In beiden Fällen bestehen somit starke Hinweise für eingetretene Apoptose.79

Abbildung 44: 100µM 5 - ALA bei 300 Sekunden Belichtung; Patientenknorpelprobe mit stark fortgeschrittener Arthrose, die Zellen haben sich bereits zu Clustern zusammengefunden. Viele dieser Cluster sind avital (rot angefärbt). Die prozentuale Vitalität liegt hier bei 71,3 % verglichen zur Referenz.92

Abbildung 45: 500µM 5 – ALA Konzentration bei 2000 Sekunden Belichtung; im Vergleich zum vorherigen Bild eine Knorpelprobe, die deutlich weniger arthrotisch verändert ist (hauptsächlich double strings Anordnung). Die Vitalität liegt trotz höchster 5 – ALA Konzentration und maximaler Belichtungsdauer bei 94,1% verglichen zur unbelichteten Referenz.92

Abbildung 46: 100µM 5 – ALA und 300 Sekunden Belichtung: Noch sehr physiologischer und intakter Knorpel (hauptsächlich single strings), die Vitalität liegt in diesem Versuchsansatz bei 94,3% verglichen zur Referenz.93

Abbildung 47: 100µM 5 – ALA und 2000 Sekunden Belichtung: Der Knorpel ist noch sehr physiologisch und gesund (single strings Anordnung). Die Vitalität der Knorpelprobe liegt bei 89,2% verglichen zur Referenz.....93

1 Einleitung

1.1 Gelenk allgemein und Kniegelenk Anatomie

Im menschlichen Bewegungssystem nehmen Gelenke eine essentielle Rolle ein. Einzelne Knochen des menschlichen Skeletts stehen an einem Gelenk miteinander in Verbindung und ermöglichen entsprechend der anatomischen Gegebenheiten, verschiedene Richtungen und Ausmaße an Bewegung. Bewegung und Fixierung der Gelenke in einer entsprechenden Stellung werden von der Skelettmuskulatur übernommen, die auf beiden Seiten des Gelenks am Knochen fixiert ist.

Solche Knochenverbindungen können in Synarthrosen (unechte Gelenke mit keiner bis minimaler Beweglichkeit) und Diarthrosen (echte Gelenke) eingeteilt werden. Das in dieser Arbeit verwendete Modell soll die Situation im Kniegelenk wiedergeben, welches einem echten Gelenk (Diarthrose, Junctura synovialis) entspricht.

Obligatorischer Bestandteil einer Diarthrose ist ein flüssigkeitsgefüllter Gelenkspalt zwischen den artikulierenden Knochen, der eine Bewegung ermöglicht. Die am Gelenk beteiligten Knochen können grundsätzlich in einen Gelenkkopf (Caput articulare) und eine Gelenkpfanne (Fossa articularis) unterschieden werden; sowohl Kopf als auch Pfanne sind mit einer ca. 0,2 – 6mm dicken hyalinen Knorpelschicht überzogen.¹ Diese bildet in einem physiologischen, gesunden Gelenk eine glatte Oberfläche, die den Druck auf die Gelenkflächen verteilt und eine reibungsarme Bewegung ermöglicht. Die Versorgung des Gelenkknorpels erfolgt über Diffusion aus der Gelenkflüssigkeit (Synovia).² Der Gelenkknorpel besteht zu über 90% aus Knorpelmatrix und zu 1 – 5% aus Chondrozyten, den ortständigen Knorpelzellen. Die Matrix wird aus 80% Wasser, ca. 10% Kollagen Typ 2, etwa 10% Proteoglykanen von den Chondrozyten gebildet. Der Knorpel untergliedert sich im Querschnitt in vier Zonen, die Superficialzone, Transitionalzone, tiefe Zone und kalzifizierende Zone.³

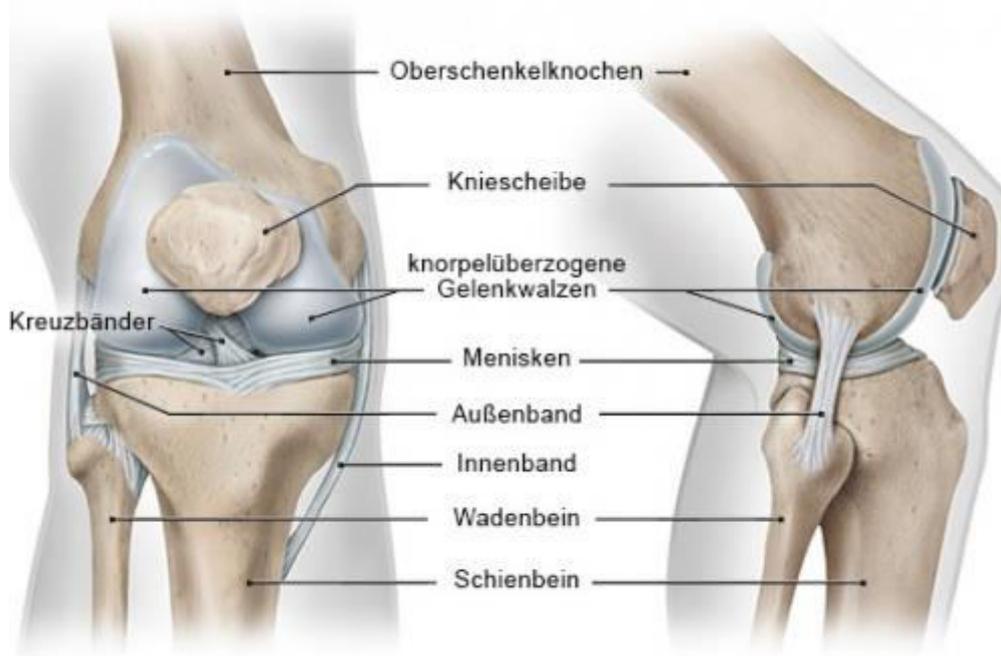


Abbildung 1: Schemadarstellung des Kniegelenks

Quelle: *Duale Reihe Anatomie. 4., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2017. doi:10.1055/b-005-143674*

Nach außen ist das Gelenk durch die Gelenkkapsel (*Capsula articularis*) luftdicht abgeschlossen. Die Capsula besteht aus einer äußeren Faserschicht, die jenseits des Gelenks am Periost (Knochenhaut) fixiert ist und einer inneren Zellschicht (*Membrana synovialis*). Diese innere Zellschicht ist aus sog. Synoviozyten aufgebaut. Hierbei handelt es sich um modifizierte Fibroblasten (ortsständige Zelle des Bindegewebes) mesenchymalen Ursprungs. Sie produzieren und sezernieren die Synovialflüssigkeit, welche den Knorpel ernährt, eine reibungsarme Verschiebung der Gelenkflächen garantiert und ebenfalls stoßdämpfend wirkt. Die Flüssigkeit setzt sich zusammen aus einem Ultrafiltrat des Blutplasmas und Hyaluronsäure.⁴ Die Punktion eines Gelenks und die Synovianalyse ist in der klinischen Diagnosestellung von Gelenkkrankheiten oft verwendet und essentiell.⁴

Neben diesen Bestandteilen einer Diathrose gibt es weitere obligatorische und fakultative Hilfsstrukturen des Gelenks. Zu den obligatorischen gehört der Bandapparat des Gelenkes, dieser unterscheidet sich in extraartikuläre Bänder

zur Gelenkverstärkung und Führung der Bewegung bzw. fakultative intraartikuläre Bänder wie beispielsweise die beiden Kreuzbänder im Kniegelenk. Darüber hinaus besitzt vor allem das Knie einige weitere relevante Strukturen. Neben dem Hoffa Fettkörper zusätzlich die Menisci, die als sichel- beziehungsweise kreisförmige Faserknorpelscheiben die Gelenkflächen bedecken und zusätzliche Unebenheiten kompensieren.

Die Situation im Knie soll näher betrachtet werden.

Das Knie ist ein aus mehreren Teilgelenken bestehendes Gelenk, der Femur (Caput) und die Tibia (Fossa) artikulieren zur *Articulatio femorotibialis*, einem Dreh- Scharniergelenk mit 2 Freiheitsgraden (Flexion/Extension: 150/0/5° & Innenrotation/Außenrotation 10/0/30°). Die Rotation ist hierbei nur in gebeugtem Zustand möglich, am stärksten bei Flexion von 90°. ⁵ Darüber hinaus artikuliert die Kniescheibe (Patella) mit dem Femur in einem planen Gelenk zur *Articulatio femoropatellaris*. Die Patella als größtes Sesambein des Körpers befindet sich in der distalen Sehne des *Musculus quadriceps femoris* und ist an ihrer Dorsal-seite, wie alle anderen artikulierenden Strukturen des Knies, ebenfalls von hyalinem Knorpel bedeckt. Hierbei finden sich im Bereich des Knies die höchsten Dicken an Gelenkknorpel im menschlichen Körper, im Bereich der Tibiakondylen bis zu 6mm. ⁶ Trotz der Dicke dieses Gelenkknorpels ist er im Bereich des Kniegelenks hohen Drücken ausgesetzt, weswegen sich zwischen Femurkondylen und Tibiaplateau zwei Menisken befinden, die den Druck gleichmäßiger verteilen und Druckspitzen abfedern. ⁷ Sie bestehen aus Faserknorpel und sind beide mit ihrer äußeren Basis an der Synovialmembran der Gelenkkapsel fixiert. Dadurch gleichen sie leichte Inkongruenzen der artikulierenden Flächen aus. ⁵ Der innere, stärker C – förmig gekrümmte Meniscus ist zusätzlich mit den medialen Kollateralband verwachsen und aufgrund seiner stärkeren Fixierung häufiger von Verletzungen betroffen, beispielsweise im Rahmen einer „unhappy triad“ mitsamt gerissenem medialen Kollateralband und vorderem Kreuzband. ⁶

Das Kniegelenk ist durch einen sehr ausgeprägten Band – Apparat stabilisiert. Zu den extraartikulären Bändern, die in die Gelenkkapsel inserieren, zählen ventral das *Ligamentum patellae*, lateral und medial je ein Kollateralband, wel-

ches in Flexion entspannt ist und so Rotationen des Kniegelenks zulässt. Dorsal wird die Gelenkkapsel durch das Lig. popliteum obliquum bzw. das Lig. popliteum arcuatum verstärkt. Zusätzlich zu den extraartikulären Bändern ziehen im Kniegelenk zwei intraartikuläre, intrakapsuläre Kreuzbänder (Lig. cruciatum anterior & posterior). Beide sind mit Synovialmembran überzogen und liegen somit nicht frei in der Gelenkhöhle. Durch ihre Faserarchitektur sind in jeder Stellung des Kniegelenks Teile der Kreuzbänder gespannt und stellen so beispielsweise im gebeugten Zustand, wenn die Kollateralbänder entspannt sind, die einzige ligamentäre Sicherung des Kniegelenks dar.⁶

Innerhalb der Kapsel liegen zwischen fibröser äußerer Membran und der Synovialmembran einerseits die Kreuzbänder und ventral das Corpus adiposum infrapatellare, auch Hoffa Fettkörper genannt, der das Ligamentum patellae an seinem Insertionspunkt an der ventralen Tibia unterfüttert. Im Rahmen einer Synovitis können Synovialzotten des Corpus adiposum bei Bewegung im Gelenkspalt eingeklemmt werden, was sich in Gelenkblockaden und Schmerzen äußern kann.⁸

1.2 Gelenkpathologien – Synovitis, Arthritis, Arthrose

An Gelenken und hierbei im Besonderen an ihrer Synovia manifestiert sich eine Vielzahl von Erkrankungen. Diese können traumatischer, degenerativer, primär entzündlicher, metabolischer, inflammatorischer oder auch neoplastischer Natur sein. Die meisten dieser Erkrankungen sind chronisch und daher über die Zeit mit Bewegungseinschränkungen, Schwellungen, Rötung und Schmerzen, anfangs belastungsabhängig, später auch in Ruhe vergesellschaftet. Das Knie ist hierbei eines der am häufigsten betroffenen Gelenke.⁹ Nicht alle dieser Krankheiten lassen sich histopathologisch nachweisen, daher wird eine Diagnose oft anhand klinischer, radiologischer und laborchemischer Kriterien gestellt. Zur Diagnosesicherung werden darüber hinaus Synovialzottenbiopsate verwendet.⁹
¹⁰ Bei der Synovialitis, auch Synovitis, handelt es sich um eine Entzündung der Gelenkschleimhaut. Die Ursachen hierfür können mannigfaltig sein. Neben Kristallopathien, wie beispielsweise Gicht, können auch granulomatöse Entzündun-

gen zum Beispiel im Rahmen von Tuberkulose oder einer Sarkoidose auftreten.¹⁰ Eine Differentialdiagnose der Synovitis nach Synovialzottenbiopsie ist ebenso der tenosynoviale Riesenzelltumor (ehemals: pigmentierte villonoduläre Synovitis).

1.2.1 Chronische, uncharakteristische Synovitiden

Chronische, uncharakteristische Synovitiden zeichnen sich vor allem durch 3 Merkmale aus:¹⁰

- 1.) Verbreiterung der synovialen Deckzellschicht
- 2.) Aktivierung der residenten Zellen (vor allem Fibroblasten)
- 3.) lymphozytäres Infiltrat

Innerhalb dieser Dissertation werden Synovitiden genauer im Hinblick auf die Wirksamkeit einer Photodynamischen Therapie (PDT) untersucht. Neben der PVNS Zellen werden auch Fibroblasten – Zellreihen der PDT unterzogen. Wie unter PUNKT 2.) ersichtlich, ist eines der 3 Merkmale einer chronischen, uncharakteristischen Synovitis die Aktivierung und Vermehrung von den residenten Zellen, in erster Linie den Synovia – Fibroblasten. Die drei oben genannten Elemente werden mit einem sog. Synovitis – Score jeweils von 0 – 3 Punkten quantifiziert.¹⁰ Die Punktwerte werden anschließend addiert und mithilfe einer Tabelle wird die Synovitis in „low – grade“ oder „high – grade“ klassifiziert. Dazu wird eine Tabelle (ABBILDUNG 2) verwendet, wie sie bei Morawietz et al. (2008) abgebildet ist.¹⁰

Tab. 1 Gradierung der 3 Aspekte chronischer Synovialitiden anhand des Synovialitis-Scores	
<i>Verbreiterung der synovialen Deckzellschicht:</i>	
0 Punkte	Die synoviale Deckzellschicht ist im Mittel bis 1,7 Zelllagen breit
1 Punkt	Die synoviale Deckzellschicht ist im Mittel 1,8–3,5 Zelllagen breit
2 Punkte	Die synoviale Deckzellschicht ist im Mittel 3,6–5,3 Zelllagen breit
3 Punkte	Die synoviale Deckzellschicht ist mehr als 5,3 Zelllagen breit, oder es findet sich eine Ulzeration mit Fibrinexsudation
<i>Zelldichte des synovialen Stromas:</i>	
0 Punkte	Das synoviale Stroma zeigt eine normale Zelldichte
1 Punkt	Das synoviale Stroma zeigt eine gering erhöhte Zelldichte
2 Punkte	Das synoviale Stroma zeigt eine mittelgradig erhöhte Zelldichte, vereinzelt können multinukleäre Riesenzellen vorkommen
3 Punkte	Das synoviale Stroma zeigt eine hohe Zelldichte, multinukleäre Riesenzellen kommen vor, evtl. sind rheumatoide Granulome zu erkennen
<i>Leukozytäre entzündliche Infiltration:</i>	
0 Punkte	Kein Nachweis eines entzündlichen Infiltrats
1 Punkt	Einzelne, meist perivaskulär gelegene Lymphozyten oder Plasmazellen und kleine Lymphozytenaggregate
2 Punkte	Größere Lymphozytenaggregate
3 Punkte	Dichtes konfluentes lymphozytäres Infiltrat oder Lymphfollikel mit Keimzentren
Gradierung:	
Summe 0 oder 1	Keine Synovialitis
Summe 2–4	Niedriggradige („Low-grade-“) Synovialitis
Summe 5–9	Hochgradige („High-grade-“) Synovialitis

Abbildung 2: Synovitis – Score zur Graduierung chronischer Synovitiden

Quelle: Morawietz L, Fernahl G, Krenn V. *Differentialdiagnosis of synovitis*. 2008;29(S2):218-222. doi:10.1007

Der Score soll laut Definition immer in dem Areal angewendet werden, wo die synoviale Entzündung am stärksten ausgeprägt ist.

Die chronische, uncharakteristische Synovitis ist in ihrer Ätiologie oft unbekannt, tritt jedoch häufig im Rahmen der rheumatoiden Arthritis auf. Oft wird eine auto-immune Pathogenese beschrieben, die schnell fortschreitet und dennoch erst spät diagnostiziert wird.¹¹ Die Symptomatik umfasst hierbei die erythematöse Schwellung des betroffenen Gelenks und die schmerzbedingte Bewegungseinschränkung. Je länger diese Symptome bestehen, desto wahrscheinlicher wird die Diagnose einer rheumatoiden Arthritis.¹¹ Die Diagnose ist am besten mithilfe des MRT zu stellen, bei dem in T1 – Gewichtung ein Gelenkerguss und eine

deutlich verdickte Synovia zu erkennen ist.¹¹ In aller Regel beginnt diese Synovitis als Frühphase der rheumatoiden Arthritis (RA) monoartikulär und breitet sich im Laufe der Erkrankung auf mehrere Gelenke aus.¹¹

Eine stets relevante Differentialdiagnose insbesondere bei monoartikulärem Befall ist eine septische Arthritis, da sich insbesondere atypische Erreger der septischen Arthritis (beispielsweise Chlamydien oder Borrelien) der Synovitis sehr ähnlich darstellen können.¹¹ Ebenso muss bei monoarthritischer Synovitis an eine mechanisch ausgelöste Synovitis gedacht werden, welche oft post-traumatisch auftritt.⁹

1.2.2 Arthritis

Die Arthritis ist eine akute oder chronische Entzündung eines Gelenks. Oftmals resultiert aus einer Synovitis eine Arthritis, da neben der Synovia benachbarte Gelenkstrukturen von dem inflammatorischen Prozess befallen werden.¹² Darüber hinaus kann der Beginn einer Arthritis sich zunächst als Synovitis äußern.¹¹ Die rheumatoide Arthritis (RA) bildet hierbei die häufigste Form der Arthritis, weltweit sind etwa 0,5 – 1% der Weltbevölkerung von der rheumatoiden Arthritis betroffen.^{12, 13, 14} Sie ist eine chronische, autoimmunvermittelte Krankheit, die weltweit in allen Ethnien und in jedem Alter auftritt, jedoch ihren Inzidenzhöhepunkt zwischen dem 40. & 60. Lebensjahr hat.^{9, 12, 13} Frauen sind 2,5 bis 3x häufiger betroffen als Männer.^{9, 12, 13, 14} Wie bereits erwähnt, ist die chronische, unspezifische Synovitis ein Hauptsymptom der RA.

Die RA entwickelt sich in genetisch prädisponierten Individuen, wenngleich ein auslösendes Ereignis oft unbekannt bleibt.^{9, 13} Durch Aktivierung des Immunsystems resultiert ein entzündlicher Prozess, der selbsterhaltend ist und chronifiziert.⁹ 80% der RA – Patienten besitzen mindestens ein HLA B27 – Allel, Individuen die 2 HLA B27 – Allele exprimieren haben meist schwerere Verläufe der RA.⁹ Umweltfaktoren, wie Rauchen oder Infektionen können Schwere und Progression der Erkrankung verschlechtern, ebenfalls ist der Therapieerfolg unter Rauchern vermindert.^{13, 14}

Die proinflammatorischen Cytokine TNF α und IL-6 in Kombination mit den Effektorzellen im Gelenk wie beispielsweise Makrophagen sind für den Gelenkschaden verantwortlich, welcher üblicherweise mit einer Synovitis beginnt.¹³ Zunächst sind in den meisten Fällen kleine Gelenke wie Metacarpophalangealgelenke und proximale Interphalangealgelenke betroffen, im Verlauf der Krankheit werden zunehmend große Gelenke, vor allem das Knie befallen.⁹

Symptomatisch imponieren an betroffenen Gelenken typische Entzündungszeichen, am Kniegelenk kann es zur Ausbildung einer Bakerzyste kommen. Häufig besteht eine sogenannte „Morgensteifigkeit“ der erkrankten Gelenke, die sich im Laufe des Tages durch Bewegung und Beübung bessert. Systemische Symptome wie Müdigkeit, Fieber und Gewichtsverlust können auftreten. Hierbei korrelieren die laborchemischen CRP – Level des Patienten häufig mit dem Grad der synovialen Entzündungen.⁹

Diagnostiziert wird die RA anhand der ‚American Community Of Rheumatism‘ und der europäischen Fachgesellschaft ACR/ EULAR – Klassifikation von 2010.¹² Diese erstellt nach den Gesichtspunkten Gelenkbefall, Serologie, Akutephase – Parameter und Beschwerdedauer mithilfe eines Punktesystems einen Score (SIEHE ABBILDUNG 3). Bei einem Ergebnis von 6 von 10 maximalen Punkten, kann eine rheumatoide Arthritis diagnostiziert werden.

1. Gelenkbefall	
großes Gelenk (Schulter, Ellbogen, Hüften, Knie, Sprunggelenk)	= 0
2–10 große Gelenke	= 1
1–3 kleine Gelenke (MCP, PIP, HG, MTP 2–5)	= 2
4–10 kleine Gelenke	= 3
> 10 Gelenke, davon mindestens ein kleines Gelenk	= 5
2. Serologie	
RF und ACPA negativ	= 0
niedrig-titrig* RF oder ACPA positiv	= 2
hoch positiv** RF oder ACPA positiv	= 3
3. Akutphase-Parameter	
BSG und CRP normal	= 0
BSG oder CRP erhöht	= 1
4. Dauer der Beschwerden	
< 6 Wochen	= 0
≥ 6 Wochen	= 1

Abbildung 1: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien für die Rheumatoide Arthritis 2010 (nach 5)
Bei 6 von maximal 10 Punkten liegt eine definitive RA vor.

* maximal das Dreifache der Norm

** mehr als das Dreifache der Norm

Abbildung 3: ACR/EULAR Klassifikationskriterien für die RA

Quelle: <https://www.akdae.de/Arzneimitteltherapie/AVP/Artikel/201603/137h/index.php>

Therapieansatz bei der RA ist laut aktueller EULAR Empfehlung die subkutane Applikation von 15 – 20mg Methotrexat einmal wöchentlich und die Kortisontherapie.¹² Diese Therapie soll engmaschig kontrolliert werden und hat die Vollremission zum Ziel.^{12, 14} Bei schweren Verläufen kommen zusätzlich Biologicals (TNF α Inhibitoren) zum Einsatz. Aufgrund der Dissemination der Erkrankung ist eine Synovektomie nicht primäre Therapie und soll nur bei therapierefraktären Verläufen und lokal erfolgen.¹²

1.2.3 Arthrose

Die Arthrose ist eine degenerative Erkrankung eines Gelenks, die mit dem Verlust von hyalinem Knorpel an den artikulierenden Flächen innerhalb des Gelenkspalts einhergeht und mit ihren Leitsymptomen des Belastungs- später auch Ruheschmerzes und der Bewegungseinschränkung assoziiert ist.^{8, 15} Heutzutage ist Arthrose die häufigste Gelenkerkrankung des erwachsenen Menschen und häufigste Ursache von Gehbehinderungen.^{15, 16} Schätzungen zur Epidemiologie der Erkrankung variieren, da beispielsweise nicht alle Patienten mit Arthrose typischen Symptomen einen Arzt konsultierten.¹⁵ In der Studie „Gesundheit in Deutschland aktuell“ (GEDA 2010) wurde die 12 Monatsprävalenz der Arthrose mit 23,8% bei Frauen und 14,3% bei Männern angegeben.¹⁵ Während vor dem 50. Lebensjahr Männer häufiger betroffen sind, wechselt dies nach dem 50. Lebensjahr und Frauen sind aufgrund hormoneller Umstellungen in der Menopause (Östrogendefizit) gefährdeter.¹⁶ Bei der Arthrose ist eine starke Assoziation zum Patientenalter feststellbar, 90% der Patienten zeigen bereits mit 40 Jahren (prä)arthrotische Veränderungen in stark belasteten Gelenken, vor allem Hüfte, Knie und Wirbelsäule.¹⁶ Ab dem sechsten Lebensjahrzehnt sind gut die Hälfte der Frauen und ein Drittel der Männer von Arthrose betroffen.¹⁵

Arthrose kann in eine primäre und eine sekundäre Form unterschieden werden, wobei der primären Form keine eindeutige Ursache zugeschrieben werden kann. Sekundäre Arthrose ist die Konsequenz von Verletzungen oder angeborenen, bzw. erworbenen Krankheiten oder Achsfehlstellungen.¹⁵ Beide Formen sind sich insofern pathophysiologisch ähnlich, als dass es ein Ungleichgewicht im Knorpelstoffwechsel gibt und dieses zugunsten der knorpelabbauenden Prozesse verschoben ist. Der Knorpel – aus Chondrozyten und perizellulärer Matrix bestehend – reagiert auf dieses Ungleichgewicht mit verstärkter Bildung von extrazellulären Komponenten, die jedoch qualitativ dem physiologischen Knorpel unterlegen sind und gegenüber Gelenkbelastungen eine geringere Resistenz aufweisen.¹⁵ In Untersuchungen im Orthopädie Zelllabor der Universität Tübingen konnte von Danalache et al. (2019) zusätzlich nachgewiesen werden,

dass sich im Verlauf der Arthrose die Chondrozyten der superfiziellen Knorpelschicht (300µm) mikroskopisch unterschiedlich anordnen.¹⁷ Die Studie demonstrierte, dass die Chondrozytenanordnung als mikroskopisches Korrelat einer Progression der Arthrose angesehen werden kann.¹⁷ Während physiologischer Knorpel der Femurkondyle in sogenannten ‚single strings‘ angeordnet ist, sprich die Chondrozyten liegen je in einzelnen Strängen aus 5 bis 10 Chondrozyten vor, finden sich mit zunehmender Arthrose die Chondrozyten anfänglich zu double strings zusammen, ehe sie mit weiterer Progression der Knorpeldegeneration zu small clusters und später big clusters zusammenkommen.¹⁷ Mit dem Übergang von single zu double strings nimmt aufgrund von verminderter Proteinsekretion der Chondrozyten zusätzlich die Steifheit der perizellulären Matrix signifikant ab, wobei der Knorpel – selbst beim mikroskopischen Vorhandensein von double strings – makroskopisch im Rahmen der Arthroskopie noch intakt scheint.¹⁷ Diese Zellanordnung der Chondrozyten wird zu einem späteren Zeitpunkt innerhalb dieser Dissertation einen hohen Stellenwert einnehmen. Dieser Prozess, der sich oftmals über Jahre erstrecken kann, hat mit der Zeit eine irreversible Schädigung des Knorpels zur Konsequenz.¹⁵ Entstehende Knorpelunebenheiten können gegeneinander reiben und mitunter großflächig abgetragen werden (Abrasionen). Diese Knorpelfragmente gelangen in die Synovia und rufen dort eine Entzündungsreaktion hervor, die sogenannte Begleitsynovitis mit konsekutivem Gelenkerguss und Entzündungssymptomen.¹⁵ Ist über Jahre hinweg das Knorpelgewebe vollständig abgetragen, kommt es zu typischen radiologischen Röntgenbefunden, wie Gelenkspaltverschmälerung, osteophytären Anbauten, subchondrale Sklerosierung und möglicherweise Geröllzysten.

Die Arthrose ist ein langsamer aber stetiger Prozess, der mit wiederholten entzündlichen Episoden einhergeht. Aufgrund fehlender Schmerzrezeptoren im Knorpel beginnt die Degeneration mit ihrer latenten Phase oftmals unbemerkt, erstes Anzeichen sind oft Steifheits- oder Ermüdungserscheinungen.¹⁵

Dieser latenten Phase folgt die aktivierte Phase mit den entzündlichen Episoden inklusive Synovitis und resultiert in der dekompensierten Phase mit Ruhe-

schmerzen, Gelenksteifigkeit und Schädigung angrenzender Gelenkstrukturen. Diese Phase schränkt die Patienten stark ein und geht mit stärksten Einbußen der Lebensqualität einher.

Die Diagnose ist eine Kombination aus Anamnese, klinischer Präsentation des Patienten und bildgebender Verfahren, in erster Linie dem Röntgenbild in zwei Ebenen. Zur Diagnosestellung reicht die Bildgebung alleine jedoch nicht. Nur etwa 30% der Patienten mit radiologischen Auffälligkeiten beschreiben auch entsprechende Symptome.¹⁶ Laborchemische Parameter sind für die Diagnosestellung ungeeignet, die Blutsenkungsgeschwindigkeit ist außerhalb akuter Entzündungsphasen unauffällig. Auch die Synovia ist bei Gelenkpunktion klar und die Zellzahl normal. Auskunft über die makroskopische Beschaffenheit des Knorpels gibt nur die Arthroskopie.¹⁶

Therapieziel der Arthrose ist Schmerzfreiheit der Betroffenen und die Erhaltung der Funktionsfähigkeit, wenngleich Arthrosen bis heute nicht heilbar sind.¹⁸ Die Therapiemethoden erstrecken sich über konservative Therapien bis zu operativen und werden je nach Stadium und Ausmaß der Arthrose individuell gewählt. Nichtmedikamentöse konservative Ansätze sind Aufklärung und Schulung der Patienten (Gewichtsreduktion) und Physio- bzw. Ergotherapie.^{16, 18} Eine medikamentöse Therapie ist vor allem bei aktivierter bzw. dekompensierter Arthrose sinnvoll. Sie wird mit Analgetika anhand des WHO – Stufenschemas durchgeführt. Bei Stufe 1 ist vor allem Paracetamol Mittel der ersten Wahl.¹⁸ Ziel der Analgesie ist ein Wiedereinsetzen der Bewegung nach schmerzbedingter Schonung, da die Knorpelernährung durch Bewegung gesteigert wird.¹⁵ Sogenannte „slow acting drugs in osteoarthritis“ (SADOA) wie D-Glucosaminsulfat oder Hyaluronsäure sind aufgrund unsicherer Studienlage bis heute noch nicht konkret empfohlen.¹⁵

Sind alle konservativen Therapieansätze ausgeschöpft, können invasive Therapiemethoden nötig werden.^{16, 18, 19} Im aktivierten Stadium der Arthrose kann die antientzündliche Wirkung von intraartikulär injizierten Glukokortikoiden eine vorübergehende Beweglichkeitsverbesserung für einige Wochen schaffen.¹⁵ Aufgrund möglicher knorpelschädigender Effekte soll diese Gelenksinjektion jedoch

maximal viermal pro Jahr stattfinden.¹⁵ Bei therapierefraktären Schmerzen ist operativ zunächst die gelenkerhaltende Operation indiziert, bei der ein Débridement, ein Shaving von Aufrauungen des Knorpels und eine anschließende Spülung (Lavage) durchgeführt werden.¹⁸ Oftmals ist der Erfolg dieses Eingriffs jedoch nur von kurzer Dauer.

Die Radiosynoviorthese (RSO) stellt ein Verfahren dar, bei dem im Stadium der entzündlichen Phase ein radioaktives Präparat intraartikulär lokal injiziert und die Synovia lokalisiert intraartikulär bestrahlt wird.²⁰ Ziel dieser Therapieform ist eine entzündungshemmende Wirkung, vor allem bei rezidivierenden Synovitiden im Rahmen der Arthrose. Aufgrund erhöhter Komplikationsraten (Osteonekrosen, Infektionen) hat die ‚Osteoarthritis Research Society International‘ (OARSI) jedoch keine Empfehlung zur Therapie ausgesprochen.²⁰

Aktuell werden hauptsächlich andere (invasive) Therapieverfahren genutzt, beispielsweise die Pridie – Bohrung, bei der die Grenzlamelle zwischen Knorpel und Knochen durchbohrt wird.¹⁵ Ziel ist Einwanderungen von Stammzellen des Knochenmarks in das Gelenk und anschließende Knorpelbildung. Jedoch entsteht hier anstelle des physiologischen, hyalinen Knorpels ein biomechanisch weniger belastbarer Faserknorpel. Eine weitere Therapiemöglichkeit stellt die autologe Knorpeltransplantation dar, in beiden Fällen gibt es keine Langzeitergebnisse über den Erfolg dieser Therapieverfahren.¹⁵ Diese Knorpelersatztechniken sind laut Deutscher Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC) für kleine Knorpeldefekte indiziert und werden klinisch eingesetzt. Im Falle einer vollständigen Gonarthrose sind sie nicht indiziert, umso weniger, je höhergradig der Knorpel arthrotisch verändert ist.²⁰

Bei Arthrose aufgrund von Achsdeformitäten können Korrektur-Operationen notwendig sein. Diese können auch längerfristig eine deutliche Linderung der Beschwerden oder ein Voranschreiten der Arthrose verhindern.

Die ultima ratio Therapie ist bis heute die Gelenkersatztherapie. Die Indikation dazu sollte vor allem bei jungen Patienten kritisch gestellt werden, da die Standzeit solcher Prothesen durch Lockerung im Knochen begrenzt ist und ein

Prothesenwechsel mit vermehrtem Verlust der Knochensubstanz verbunden ist. Daher sollte diese Therapieform für das Patientenklintel mit therapierefraktären Beschwerden reserviert bleiben.¹⁹ In einigen Fällen kann das betroffene Gelenk teilweise mit einer unikondylären Prothese versorgt werden, die suffizienteste Intervention mit dem besten Langzeiterfolg bietet jedoch die totale Endoprothese (TEP).^{19, 20, 8}

Liegt darüber hinaus ein ausgedehnter Knochen- und Weichteildefekt vor und ist der muskuläre und ligamentäre Apparats des Gelenks insuffizient, bleibt nur die chirurgische Versteifung des Gelenks (Arthrodese) als therapeutische Option.²⁰

Ebenso wie die Synovitis, in Form einer Begleitsynovitis, Folge und Bestandteil der Arthrose ist, kann auch die Arthrose als Folge einer Synovitis entstehen. Proinflammatorische Cytokine im Rahmen einer Synovitis beeinträchtigen ebenso den Metabolismus der Chondrozyten negativ und können so konsekutiv zu Arthritis und anschließender Arthrose führen.^{9, 12}

1.2.4 Tenovsynovialer Riesenzelltumor (ehemals: Pigmentierte villonoduläre Synovitis)

Die pigmentierte villonoduläre Synovitis (PVNS) beschrieb bis zur WHO Definition von 2013 die diffuse Unterform des tenosynovialen Riesenzelltumors (Tenosynovial Giant Cell Tumor, im Folgenden TGCT abgekürzt).^{21, 22} Heute ist der Begriff der PVNS weitestgehend oboslet und es wird ausschließlich von TGCT gesprochen. Da in dieser Dissertation unter anderem mit Literaturangaben gearbeitet wird, die den Begriff PVNS noch verwenden, wird im Folgenden der Begriff PVNS ebenfalls noch genutzt und synonym zu TGCT verwendet. Klinisch werden zwei Formen des TGCT unterschieden, der diffuse Typ (ehemals: PVNS) und der lokalisierte Typ.^{23, 24, 25} Lange Zeit wurde die PVNS für die deutlich häufigere Unterform gehalten, jedoch beschreiben Mastboom et al. (2017) in ihrer Kohortenstudie den lokalisierten Typ als meist vertreten.^{26, 27} Die Inzidenz des diffusen TGCT (PVNS) liegt entgegen bisherigen Schätzungen bei etwa 4 Patienten pro 1 Million pro Jahr und somit etwa doppelt so hoch wie bis-

her angenommen, der lokalisierte Typ ist mit 10 Fällen pro 1 Millionen Patienten pro Jahr etwa 2,5x häufiger.²⁶ Diese Inzidenzen sind sicherlich nicht exakt und werden aufgrund hoher Dunkelziffern kontrovers diskutiert. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen vierter und fünfter Lebensdekade, in selteneren Fällen wird der tenosynoviale Riesenzelltumor im Kindesalter diagnostiziert (ca. 2 Fälle pro 1 Million pro Jahr).^{28, 29, 30, 27} Laut Mastboom et al. (2017) liegt das mittlere Erkrankungsalter der lokalen Form bei 45 Jahren, das der diffusen Form bei etwa 47 Jahren.²⁶ Beide Typen treten bei Frauen vermehrt auf (Verhältnis Männer zu Frauen 1:1,5).^{26, 31}

Bei dem tenosynovialen Riesenzelltumor handelt es sich um eine inflammatorisch proliferative, jedoch meist benigne Erkrankung der Gelenksynovia, fakultativ können Sehnen und Schleimbeutel (Bursae), vor allem der unteren Extremität betroffen sein.^{9, 27, 29} Er tritt in aller Regel monoartikulär auf, beide Typen betreffen in den meisten Fällen (47 bis 64%) das Kniegelenk.^{30, 31, 32, 28} Die obere Extremität ist deutlich seltener betroffen, hier ist am ehesten die Handwurzel befallen.^{29, 30}

Die Ätiologie des TGCT ist bis heute umstritten.²⁵ Annahmen, er sei Folge von wiederholten Traumata oder wiederholten Gelenkergüssen werden von verschiedenen Studien unterschiedlich in ihrer Bedeutung für den Krankheitsausbruch bewertet.^{33, 31} Tyler et al. (2014) beruft sich auf die Zellpopulationsanalyse von Oehler et al. und unterstützt die Ansicht, dass es sich bei dem tenosynovialen Riesenzelltumor um einen chronisch entzündlichen Prozess handelt.³³ Ursächlich für die chronische Inflammation sind Mutationen, sowohl Cassier et al. (2012) als auch van der Heijden et al. (2014) haben bei 30 – 60% der diffusen Form (PVNS) eine Überexpression des Macrophage Colony stimulating factors M – CSF – 1 beobachtet, die aus einer t(1:2) Translokation resultieren.^{23, 29} Die Überexpression dieses Faktors lockt nicht neoplastische Makrophagen und weitere Entzündungszellen an, fördert die Bildung der osteoklastenähnlichen Riesenzellen und resultiert so in der chronischen Inflammation der Synovia und der Formation einer tumorähnlichen Masse im Gelenkbereich.^{23, 29} Wenngleich der Tumor als nicht lebensbedrohlich anzusehen ist, so geht von

ihm jedoch eine massive Reduktion der Lebensqualität und Leistungsfähigkeit für Betroffene aus.²⁷

Die lokalisierte Form ist dadurch gekennzeichnet, dass sie nur in einem Gebiet der artikulären Synovia auftritt, häufig im Bereich der Finger. Im Falle des Knies ist meist die anteriore meniscocapsuläre Verbindung des medialen Meniskus betroffen. Die Symptome ähneln hierbei der Symptomatik einer medialen Meniskuspathologie inkl. Erguss (50 - 90%), diffuser Schmerz (66 – 100%), Bewegungseinschränkungen (30 – 100%), palpable Verhärtungen (11 – 80%).^{28, 29, 33} Durch die oftmals sehr geringe Ausbreitung hat der lokalisierte TGCT nach arthroskopischer Synovektomie eine sehr gute Prognose und zeigt postoperativ gute Ergebnisse und geringe Rezidivraten (0 – 6%).^{33, 21, 29}

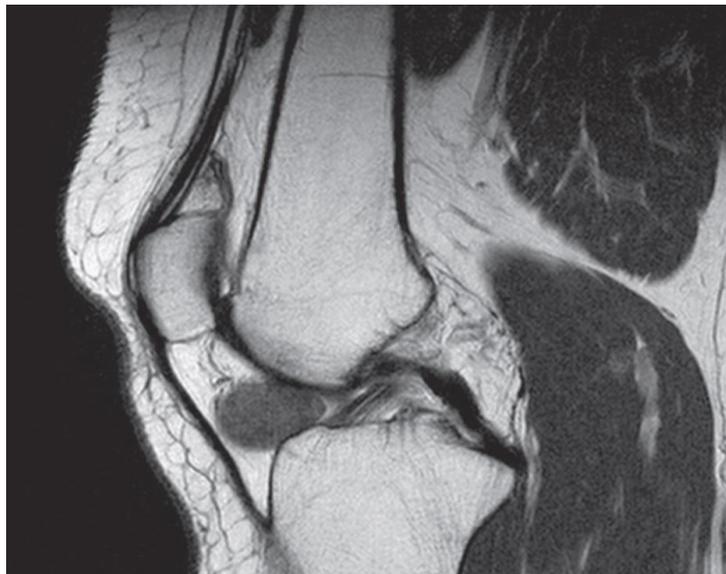


Abbildung 4: Sagittales MRT in T1 Wichtung des Knies einer 47-jährigen Patientin mit lokalisiertem TGCT (hypointens) im Bereich des Hoffa Fettkörpers und des anterioren Kapselanteils

Quelle: Mastboom MJL, Verspoor FGM, Verschoor AJ, et al. Higher incidence rates than previously known in tenosynovial giant cell tumors: A nationwide study in The Netherlands. Acta Orthop. 2017;88(6):688-694. doi:10.1080/17453674.2017.1361126

Der diffuse Typ des TGCT (PVNS) ist dadurch charakterisiert, dass meist die komplette Synovia des Gelenks betroffen ist, die Bildgebung in Kombination mit der Histologie sind entscheidend für die Diagnose der diffusen Form in Abgrenzung zur lokalen Form. Eine Progression des lokalen TGCT zur PVNS ist

durchaus möglich. Die Symptomatik äußert sich als Schmerz, Schwellung, Rötung des Gelenks, oftmals in Verbindung mit serösem oder blutigem Gelenkerguss (Hämarthros).^{29, 33, 31} Die PVNS zeigt eine schnellere und höhergradige Destruktion des Gelenks und somit eine deutlich schlechtere Prognose. Eine Diagnose wird nach Eintritt der Beschwerden in den meisten Fällen erst spät gestellt, oftmals erst nach Monaten oder Jahren.²⁸ Dies erlaubt vor allem der diffusen Form extraartikuläre Sturkturen wie Bursen, Sehnenscheiden, Muskeln und Knochen zu befallen.^{28, 33} Bei einer PVNS zeigen sich im fortgeschrittenen Stadium Knochenzysten und kortikale Erosionen.^{34, 29} Mit der Zeit resultiert die PVNS in einer Zerstörung des Gelenks (sekundäre Arthrose) und seiner umliegenden Strukturen.²³ Trotz großzügiger Exzision sind die Rezidivraten aufgrund Residuen um einiges höher als bei der lokalen Form und variieren je nach Schwere zwischen 25 – 48%.^{33, 31, 29}

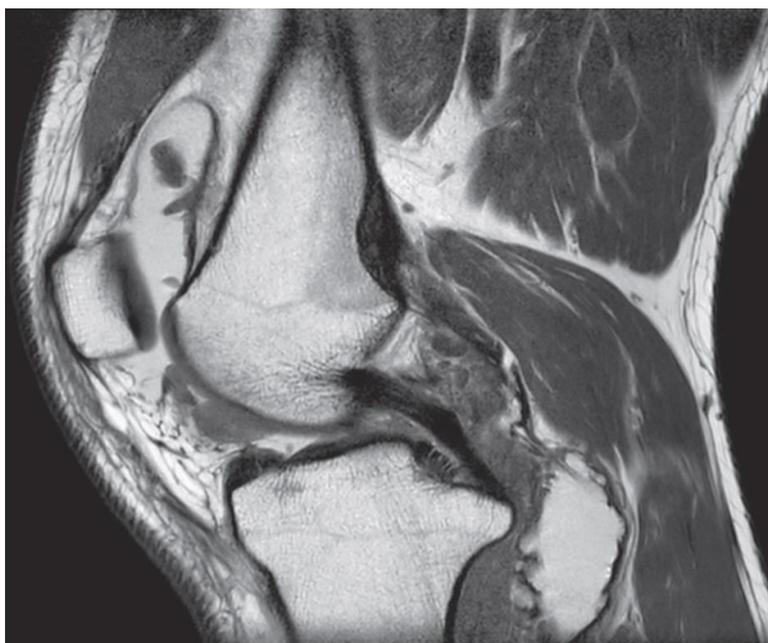


Abbildung 5: Sagittales MRT in T1 Wichtung eines 23 jährigen Patienten mit diffusem TGCT (PVNS). Zu sehen sind deutlich hypointense proliferative Prozesse der Synovia im Bereich der Kreuzbänder, des Recessus suprapatellaris und dorsal im Bereich der Baker Zyste.

Quelle: Mastboom MJL, Verspoor FGM, Verschoor AJ, et al. Higher incidence rates than previously known in tenosynovial giant cell tumors: A nationwide study in The Netherlands. *Acta Orthop.* 2017;88(6):688-694. doi:10.1080/17453674.2017.1361126

Die Bildgebung der Wahl zur Diagnose bei beiden Formen (lokal und diffus) ist das MRT, in dem eine diffuse Synoviaverdickung, fakultativ mit Knochenerosion sichtbar ist.^{31, 24} Im MRT besteht ebenfalls die Möglichkeit anhand des Ausmaßes die Formen und die Schwere der diffusen Form zu unterscheiden und zu evaluieren, ob genannte extraartikuläre Herde vorliegen.²¹ Verspoor et al. (2018) haben in Ihrer Studie anhand sechs MRT Parametern die PVNS in vier Schweregrade (mild localized – severe localized – moderate diffuse – severe diffuse) eingeteilt, anhand derer Rezidivraten angegeben werden können.²¹ Hierbei wurde die Lokalrezidivfreiheit nach vier Jahren verglichen – von 94% im mild localized Stadium, 88% im severe localized, über 59% im moderat diffusen Stadium bis hin zu nur 36% im severe diffusen Stadium.²¹ Somit ist das MRT vor allem für die Therapie- und OP – Planung beziehungsweise die postoperative Rezidivüberwachung geeignet.^{21, 31, 33} Oft benötigt man zur definitiven Diagnosestellung zusätzlich eine histopathologische Untersuchung einer vom Patienten entnommenen Synovialbiopsie.^{31, 34} Makroskopisch stellt sich sowohl bei der lokalen als auch der diffusen Variante eine villös oder nodulär umgebaute, bräunlich bis sandfarbene Synovia dar.^{10, 31} Histopathologisch zeigen sich lipidgefüllte Makrophagen, sowie mehrkernige, osteoklastenähnliche Riesenzellen, die bei Eisenfärbung deutliche Hämosiderineinschlüsse zeigen.^{28, 31, 25} Diese Hämosiderineinschlüsse sind Konsequenz von wiederholten Hämorrhagien.⁹

Aktuell besteht die Primärtherapie aus der (sub-)totalen Synovektomie je nach Form und Ausmaß.^{31, 23, 9} Während bei der lokalisierten Form die arthroskopische Synovektomie sehr gute Ergebnisse erzielt (s.o.), sollte im Falle der diffusen Form die totale Synovektomie nur von sehr routinierten Operateuren arthroskopisch durchgeführt werden.³⁵ Die offene Synovektomie wird bevorzugt um das Risiko für Residuen der PVNS zu mindern und so die Rezidivraten zu senken, insbesondere wenn das posteriore Kniekompartiment betroffen ist.^{33, 21, 31, 24} Die Arthroskopie ist im posterioren Kompartiment deutlich erschwert und somit selten ausreichend. Bei sorgfältiger und totaler Exzision, die leider oft nicht möglich ist, können laut van der Heijden et al. Rezidivwahrscheinlichkeiten auf unter 15% gesenkt werden.²⁹ In der von Mastboom et al (2018) durchgeführten prospektiven Kohortenstudie konnten anhand von patientenberichteten outco-

me – Messungen ebenfalls statistisch signifikante Verbesserungen der Lebensqualität nach radikaler OP bewiesen werden.²²

Aufgrund genannter hoher Rezidivraten bei Residuen und extraartikulären Verläufen wird neben offener Synovektomie bei PVNS des Weiteren ein auf MRT und Histopathologie basierender, multidisziplinärer Therapieansatz verfolgt.^{29, 35}

Die adjuvante Radiotherapie ist Teil dieser multimodalen Therapie. Unter anderem Tyler et al. (2014) berichtet von der adjuvanten Radiotherapie entweder intraartikulär oder extraartikulär im Falle von subtotaler Synovektomie oder bei Rezidiven.³³ Intraartikuläre Radiosynovektomie sechs bis acht Wochen postoperativ in Form von artikulär injiziertem Yttrium⁹⁰ stellt allerdings nur bei ausschließlich intraartikulärem Befall der PVNS eine mögliche Therapie dar und hat heutzutage nahezu keinen Stellenwert.²⁹ Percutane Bestrahlung mit 30 – 50Gy als Primärtherapie bei nicht resektabler PVNS oder als Add-on bei unvollständiger Resektion ist hingegen auch bei extraartikulärem Befall adjuvant möglich.^{27, 33} Mollon et al. (2015) stellt eine Studie vor, bei der sich bei einem Kollektiv von 630 PVNS Patienten die Rezidivraten verringerten, wenn post oder sogar perioperativ bestrahlt wurde.²⁴ Befürchtungen über höhergradige postoperative Steifheit des Gelenks nach Bestrahlung durch Fibrosierung oder Toxizität bestätigten sich bisher nicht.^{24, 29} Laut Ma et al. (2013) ist die adjuvante Radiotherapie jedoch gerade bei jungen Patienten mit Vorsicht zu verwenden, da in Einzelfällen eine maligne Transformation der PVNS nach Radiotherapie beobachtet wurde.^{31, 25}

Neben operativen Verfahren und Radiatio ist eine Tyrosinkinase Inhibition auch neoadjuvant ein möglicher Therapieansatz. Imatinib als Tyrosinkinase Inhibitor wirkt über die Makrophagen via Inhibition des Zytokins CSF-1 und reduziert die Ausreifung bzw. Einwanderung von Makrophagen in das Gelenk. Die artikuläre Inflammation wird vermindert.^{23, 29} Die Mehrzahl der mit Imatinib behandelten Patienten (74%) zeigten laut der Studie von Cassier et al. (2012) ein stabiles Krankheitsniveau als bestes Ergebnis.²³ Daher stellen Imatinib und weitere Tyrosinkinase Inhibitoren eine vielversprechende Alternative zur Radiotherapie bei

progredierender oder rezidivierender PVNS dar und können Progression der PVNS mitunter verhindern.^{23, 29}

In der Mehrzahl der Fälle können die Symptome nach multimodaler Therapie gelindert werden. Völlige Beschwerdefreiheit ist insbesondere bei diffusem Subtyp, nach zweiter Operation, beziehungsweise bei rezidivierenden Krankheitschüben nur selten zu erreichen.^{27, 35}

1.3 Photodynamische Therapie & 5 – ALA

Innerhalb dieser Dissertation soll die Wirksamkeit einer photodynamischen Therapie (PDT) auf Synovitiden getestet werden. Überlegungsansatz ist hierbei, ob die PDT eine wirksame alternative Therapiemöglichkeit neben Synovektomie und Bestrahlung darstellt bzw. als Adjuvans verwendet werden kann.

Die PDT ist eine heute viel genutzte Therapieform für eine große Reihe an Krankheitsbildern. Sie wird in der Dermatologie häufig in der Behandlung der aktinischen Keratose und des Basalzellkarzinoms verwendet.^{36, 37} Darüber hinaus ist sie auch bei onkologischen Erkrankungen, wie dem Blasenkarzinom oder dem kindlichen Rhabdomyosarkom wirksam.^{38, 39, 40} Im Gegensatz zur Radiotherapie, nutzt die PDT nichtionisierende Strahlung und kann wiederholt angewendet werden. Sie vermittelt ihre Wirkung nicht über DNA Beeinflussung sondern über die Bildung von molekularem Sauerstoff und ruft so keine kumulative Langzeitnebenwirkungen hervor.⁴¹

Erstmalig beschrieben wurde die PDT Anfang des 20. Jahrhunderts von Oscar Raab und Prof. Hermann von Tappeiner in München. Sie beobachteten ein schnelles Absterben des Protozoon *Paramecium caudatum* im Licht, nachdem zuvor ein Farbstoff dazugegeben wurde.³⁶ So kam es nach einigen weiteren Experimenten zur Identifikation von mehreren Photosensitizern. Große Aufmerksamkeit erreichte die PDT erst in den 1990er Jahren, als Kennedy et al. 1990 eine Methode entwickelte, bei der er den heute meist verwendeten Photosensitizer 5 – Aminolävulinat (5 – ALA), topisch verabreichte.⁴²

Die PDT kann als eine Form der Photochemotherapie angesehen werden, für die ein Photosensitizer, Licht und Sauerstoff benötigt wird.^{36, 38, 40} Zu den heute meist verwendeten Photosensitizern gehört unter anderem 5 – ALA und sein lipophiles Derivat Methyl – Aminolävulinat (MAL).⁴³ Bei dem Prinzip der PDT handelt es sich um eine photochemische Reaktion, die zum Ziel hat, selektiv ein bestimmtes Gewebe zu zerstören. Die Therapie besteht aus zwei Phasen, bei der im ersten Schritt ein nichttoxisches Medikament topisch oder systemisch verabreicht wird, welches von Zellen aufgenommen wird und diese lichtsensibel macht, der sogenannte Photosensitizer.³⁶ Diesem ersten Schritt folgt die Bestrahlung der Zellen mit sichtbarem Licht. Der Photosensitizer wird hierbei durch das Licht von seinem Grundzustand in einen aktivierten Zustand überführt und überträgt diese Energie auf molekularen Sauerstoff. Dadurch werden reaktive Sauerstoffspezies gebildet (ROS)^{40, 41}, welche wiederum durch Oxidation von Proteinen und Lipiden die Membranen der Zelle zerstören und mitochondriale Enzyme inhibieren.³⁸ Es kommt zu einer inflammatorischen Reaktion, die vor allem zur Erhöhung der Interleukine IL-1 β , IL-2 und dem Tumor Nekrose Faktor α (TNF – α) führt und somit den Zelltod einleitet.^{36, 40} Zelltyp, Konzentration des Photosensitizers, Lichtdosis und der Sauerstoffpartialdruck des Gewebes determinieren, ob der Zelltod durch Apoptose oder Nekrose eintritt.⁴⁴ Je höher entsprechende Parameter gewählt werden, desto eher wird eine Nekrose eingeleitet.⁴⁴ Der Vorteil der PDT besteht darin, dass nicht bestrahltes Gebiet von dem Effekt völlig verschont bleibt.^{40, 41} Somit werden nur sehr geringe bis keine systemischen Nebenwirkungen oder phototoxische Hauterscheinungen beobachtet.³⁸

Zur Behandlung von Tumoren des Gehirns oder des Gastrointestinaltrakts wird der Photosensitizer oral oder intravenös und somit systemisch verabreicht. Für Blasenkarzinome kann er über einen Katheter in die Harnblase eingebracht werden und wirkt somit nur topisch.³⁶ Der perfekte Photosensitizer zeichnet sich durch eine Reihe von Eigenschaften aus: Dazu zählen die Fähigkeit, vor allem in neoplastischem Gewebe aufgenommen zu werden, ein kurzes Intervall zwischen Applikation und maximaler Akkumulation im Gewebe, aber auch seine kurze Halbwertszeit und rasche Elimination.^{36, 44} Lipophile Photosensitizer kön-

nen die Zellmembran des Zielgewebes einfach passieren, hydrophile werden von den Zellen per Pilozytose aufgenommen.³⁶ Des Weiteren besitzt jeder Photosensitizer eine spezifische Wellenlänge, bei der er das später einfallende Licht maximal absorbiert und somit am stärksten aktiviert wird. Diese maximale Absorption muss in einem Wellenlängenbereich liegen, der das Zielgewebe gut penetrieren kann.

Als Lichtquellen zur Aktivierung des Photosensitizers werden hauptsächlich light emitting diodes (LED) oder Laser verwendet, wobei der teurere und aufwändigere Laser keinen signifikanten Vorteil gegenüber der LED besitzt.³⁶ Diese Lichtquellen müssen ein Lichtspektrum emittieren, welches das Absorptionsmaximum des Photosensitizers besitzt. Für 5 – ALA wird hierbei oft mit blauem Licht gearbeitet, da die maximale Absorption von Porphyrinabkömmlingen wie dem 5 – ALA bei etwa 405nm liegt.³⁷

In dieser Dissertation wird eine weiße Lichtquelle in Form einer handelsüblichen Arthroskopielampe (300 Watt) verwendet. Das polychromatische, weiße Licht enthält alle Wellenlängen sichtbaren Lichts und somit auch die entsprechenden Wellenlängen des Absorptionsmaximums vom 5 – ALA.⁴⁵ Laut einer Studie von Marra et al. (2018) in der die Wirksamkeit von blauem und weißem Licht bei der ALA – PDT der aktinischen Keratose verglichen wurde, stellten sich beide Lichtquellen als wirksam heraus, wobei das weiße Licht sogar geringfügig effektiver war.⁴³ Dieser Effekt könnte durch den Zusammenhang erklärt werden, dass blaues Licht aufgrund der kurzen Wellenlänge weniger tief in bestrahltes Gewebe eindringt. Weißes Licht hingegen emittiert zusätzlich Photonen mit höheren Wellenlängen. Diese können im Gewebe gestreut werden und so tiefer und weiter das Gewebe penetrieren.^{43, 44}

1.3.1 5 – Aminolävulinat als Photosensitizer und seine Wirkungsweise

In der PDT finden verschiedene Subtypen der Photosensitizer Verwendung, wobei die Gruppe der Porphyrine bis heute am besten untersucht ist und am meisten genutzt wird. ‚Porphyrin‘ leitet sich von dem griechischen Wort ‚pophura‘ ab und bedeutet ‚violett‘. Porphyrine sind eine Gruppe ringförmiger Moleküle und bilden das Grundgerüst wichtiger Proteine mit verschiedensten Aufgaben. Zu den Porphyrinen gehören Sauerstoffspeicher- und Transferproteine wie das Häm aber auch Elektronentransferproteine, wie beispielsweise Cytochrom c.⁴⁶ Porphyrine sind intermediäre Produkte des Hämstoffwechsels, die bei etwa 400 – 450nm ihr Absorptionsmaximum haben, den sogenannten Soret – Peak.⁴⁶ Darüber hinaus finden sich zwischen 500 und 600nm zusätzliche kleinere Absorptionspeaks, sogenannte Q – Banden (SIEHE ABBILDUNG 6).⁴⁶ Diese Q Banden macht man sich bei der PDT Therapie zunutze, da wie unter *Punkt 1.3* erwähnt höhere Wellenlängen mit tieferer Gewebepenetration einhergehen. In dieser Dissertation wird weißes Licht mit allen Wellenlängen sichtbaren Lichts verwendet.⁴⁵ Dadurch werden sowohl Soret – Peak als auch die Q Banden abgedeckt und eine maximale Aktivierung des Photosensitizers erwartet.

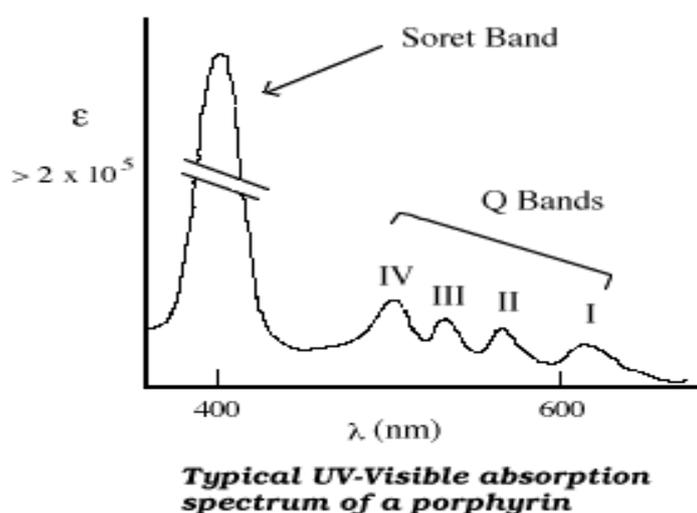


Abbildung 6: Absorptionsmaxima von Porphyrinen.

Quelle: <http://www1.lasalle.edu/~prushan/Abs%20and%20Fluor%20of%20TPPH2.pdf>

In dieser Dissertation wird 5 – Aminolävulinat (5 – ALA) als Photosensitizer verwendet. 5 – ALA ist ein Intermediärprodukt in der Hämsynthese. Im Vorherigen und Folgenden wird der Einfachheit halber immer von 5 – ALA als Photosensitizer gesprochen. Um genau zu sein ist jedoch 5 – ALA selbst nicht der Photosensitizer, sondern ein Prodrug des enzymatisch metabolisierten Protoporphyrins IX (PpIX), dem eigentlichen Photosensitizer.^{41, 47}

Als intermediärer Vorgänger von Häm, welches essentiell für den Energiemetabolismus jeder kernhaltigen Zelle ist, besitzt auch jede Zelle die Fähigkeit zu mindestens kleinen Mengen an PpIX selbst zu produzieren.⁴² Dabei entsteht im Mitochondrium aus Succinyl – CoA, einem Metabolit des Citratzyklus, und der essentiellen Aminosäure Glycin durch die 5 – ALA – Synthase das 5 – ALA.⁴⁸ Über weitere enzymatische Zwischenschritte innerhalb des Zytosols der Zelle entsteht das PpIX. Dieses bekommt über die Ferrochelatase ein zentrales Eisenion eingebaut und bildet somit das fertige Häm.^{49, 50}

Unter normalen Bedingungen ist diese Produktion innerhalb der Zelle streng über einen negativen Feedback - Mechanismus reguliert, sodass im Gewebe niemals PpIX – Dosen akkumulieren, die hoch genug sind um eine photosensitive Wirkung zu erzielen.⁴²

Aus diesem Grund wird von extern zusätzliches 5 – ALA appliziert. Der enzymatische Metabolismus von PpIX zu Häm durch die Ferrochelatase ist sehr langsam und so akkumuliert bei 5 – ALA Gabe der Photosensitizer in den Zellen. Die sehr spezifische Anreicherung von PpIX in neoplastischem Gewebe ist bis heute nicht eindeutig geklärt, jedoch bestehen deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Tumorentitäten.⁴⁸ Eine Hypothese ist, dass in neoplastischem Gewebe die Enzyme zum Aufbau von PpIX verstärkt gebildet werden, während die Ferrochelatase in diesen Zellen gehemmt ist. PpIX wird somit schnell aufgebaut, jedoch nicht zu Häm metabolisiert und kann sich so in neoplastischem Gewebe verhältnismäßig stark intrazellulär anreichern.⁴⁸

Die photochemische Reaktion beginnt dadurch, dass PpIX durch Absorption eines Photons bei Belichtung aus seinem Grundzustand (S_0) in seinen angereg-

ten, energiereicheren Zustand (S_1) übergeht. Die aufgenommene Energie überträgt PpIX auf molekularen Sauerstoff und überführt ihn in die hochreaktive Singulett – Sauerstoff Variante, welche vorher beschriebene Oxidationen der Lipide und Proteine katalysiert.⁴¹ PDT – induzierte Zytotoxizität ist gerade bei topischer Applikation des Photosensitizers 5 - ALA nur auf das Applikationsgebiet begrenzt wirksam und kurzlebig.⁴⁴ Somit entsteht keine systemische Phototoxizität, die bei einigen anderen Photosensitizern noch wochenlang besteht und durch Sonnenlicht aktiviert werden kann.

Über die direkte phototoxische Wirkung des PpIX hinaus macht man sich auch seine fluoreszierenden Eigenschaften zunutze. Durch intraoperative Bestrahlung mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops mit Wellenlängen zwischen 375 – 440nm fluoresziert PpIX rot mit einem Emissionsmaximum bei 635nm.⁵¹ Somit ergibt sich beispielsweise in der Glioblastomchirurgie die Möglichkeit, durch die spezifische Aufnahme von 5 – ALA, anhand der roten Fluoreszenz die Tumorränder visuell darzustellen und anhand derer die Resektionsränder intraoperativ zu bestimmen.⁵¹

1.4 Bisherige Behandlung und Ziel dieser Dissertation

An Gelenken und insbesondere an der Gelenkschleimhaut (Synovialmembran) manifestiert sich eine Reihe von Erkrankungen verschiedenster Genese, diese verlaufen in den meisten Fällen chronisch. Der Begriff der Synovitis beschreibt hierbei die Entzündung der Gelenkschleimhaut und kann sowohl ein eigenes Krankheitsbild darstellen, als auch im Rahmen einer Arthritis (Gelenkentzündung) oder Arthrose (degenerative Abnutzung des Gelenkknorpels) auftreten. Der diffuse tenosynoviale Riesenzelltumor (auch PVNS) als eigenständige Erkrankung ist ein Schwerpunkt dieser Arbeit. Nach aktueller Studienlage ist der Goldstandard die operative Sanierung. Diese Synovektomie kann sowohl offen-chirurgisch als auch arthroskopisch durchgeführt werden und wird teilweise, vor allem bei der diffusen Form zur Rezidivprophylaxe, um eine peri- oder postoperative Radiotherapie erweitert.^{33, 24}

Die photodynamische Therapie (PDT) hat sich bei verschiedensten Krankheitsentitäten als wirkungsvolle Therapieoption etabliert und wird weit verbreitet angewandt.

Fragestellung dieser Dissertation ist, ob auch die Synovitiden, insbesondere die PVNS mithilfe einer PDT wirksam therapiert werden können. Grundvoraussetzung für die Möglichkeit dieses Therapieverfahrens ist, dass physiologisches Gewebe des Gelenks wie der hyaline Gelenkknorpel unbeeinträchtigt von der Therapie bleibt. Deshalb muss im Versuchsansatz als Negativprobe auch vitales Knorpelmaterial mit gleichen Voraussetzungen der PDT unterzogen werden.

Praktische Überlegung ist es, die PDT mit einer Arthroskopie zu verknüpfen. Wie bereits erwähnt, ist eine Diagnose der PVNS durch eine Biopsie zu sichern. Im Rahmen einer arthroskopischen Biopsie zur Diagnosesicherung beziehungsweise der arthroskopischen Resektion der PVNS oder sonstiger Synovitis wird perioperativ eine handelsübliche Arthroskopielampe zur Ausleuchtung des Gelenks verwendet. Das weiße, polychromatische Licht mit allen Wellenlängen sichtbaren Lichts und somit auch den Wellenlängen des Absorptionsmaximums des 5 – ALA (Soret Peak) inkl. der Q Banden dient damit als zweite Phase der PDT, bei der das zuvor photosensitivierte Gewebe, zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies angeregt wird. Nach vorheriger topischer Applikation des Photosensitizers 5 – ALA in Form einer Gelenksinfiltration und einer Einwirkzeit von vier Stunden wird die Arthroskopie zur Biopsie / Resektion durchgeführt. Hierbei soll das verdächtige Synovialareal inklusive der näheren Umgebung für mindestens 300 Sekunden direkt mit der Arthroskopielampe belichtet werden, um den phototoxischen Effekt zu erzielen. Belichtetes Gewebe (verdächtiges Synovitisareal) soll hierbei nach vorheriger 5 – ALA Aufnahme photodynamisch therapiert werden.

Von hohem Interesse ist, ob durch diese Therapieform möglicherweise das Resektionsausmaß bei PVNS reduziert werden kann. Ob bereits bei der arthroskopischen Probeentnahme eine PDT durchgeführt werden soll, muss insofern kritisch hinterfragt werden, da bei negativem Biopsiebefund das Gelenk unnötigerweise mit der PDT anbehandelt wird und auch physiologische Synovia-

fibroblasten nekrotisch werden können. Zwar soll die Arthroskopielampe für mehrere Minuten auf eine Stelle fixiert werden, um den nekrotischen Effekt innerhalb der Zellen zu induzieren, dennoch ist eine Nekrose auch von gesunden Synovialzellen ohne die fixierte Lichtquelle nicht sicher auszuschließen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Zellreihen & Gewebe

2.1.1.1 Fibroblasten

Die Zelllinie „Fibroblasten-1“ entstammt der Isolation und Kultivierung des Zelllabors der Universitätsklinik für Orthopädie in Tübingen. Sie wurde 2015 aus der Hautbiopsie des Oberarms einer 37 jährigen weiblichen Patientin etabliert, die im Rahmen einer Naevusentfernung entnommen wurde. Es handelt sich hierbei also um Bindegewebszellen mesenchymaler Herkunft der Haut und nicht der Synovia. Die Fibroblasten – Zellreihe bildet in dieser Dissertation die chronische, uncharakteristische Synovitis ab. Die Entnahme der Patientenprobe wurde durch das Ethikkommissionvotum (Nr: 008/2014/B2) abgedeckt. Die Patientin wurde über die Probeentnahme und deren Verwendung aufgeklärt und willigte ein.

2.1.1.2 Pigmentierte Villonoduläre Synovialitis (PVNS)

Die in dieser Arbeit genutzte Zelllinie „PVNS-1“ ist 2018 ebenfalls im Zelllabor der Universitätsklinik für Orthopädie in Tübingen isoliert und kultiviert worden. Der Tumor manifestierte sich im Knie eines 18 – jährigen männlichen Patienten. Im Rahmen einer Arthroskopie in den Crona – Kliniken Tübingen wurde aus dem Resektat ein Teil der Probe zur Etablierung einer Zelllinie entnommen. Die Entnahme der Patientenprobe wurde ebenfalls durch das Ethikkommissionvotum (Nr: 008/2014/B2) abgedeckt. Der Patient wurde über die Probeentnahme und deren Verwendung aufgeklärt und gab seine Zustimmung.

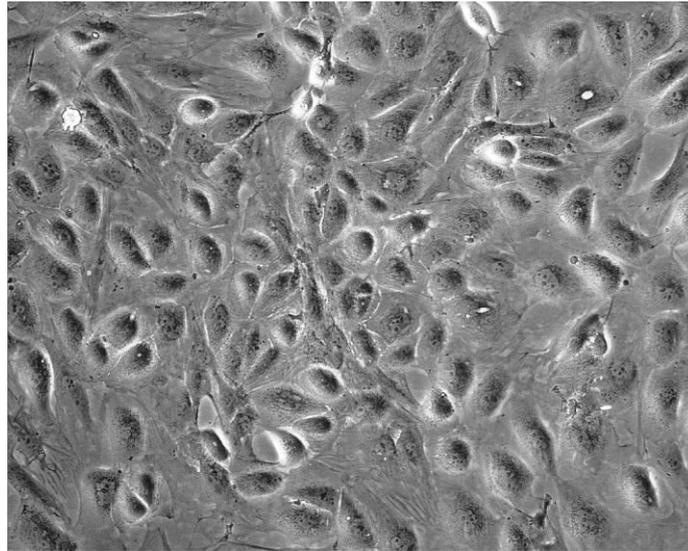


Abbildung 7: Pigmentierte villonoduläre Synovialitis (angefertigt durch Felix Diel am 12.12.2018)

2.1.1.3 Knorpel – Gewebeproben

Die Untersuchung der Knorpelzellen erfolgte in primären Kulturen. Im Rahmen von Knie – Totalendoprothetik Operationen wurde natives Knorpelgewebe der Tibia für Forschungszwecke von drei Patienten aus der Winghofer Medicum Klinik Rottenburg verwendet. Diese wurden dem Zelllabor der Universitätsklinik für Orthopädie in Tübingen freundlicherweise für entsprechende Forschungszwecke zur Verfügung gestellt und dort im Labor aufbereitet. Der Knorpel wurde mit Skalpell von dem Tibiaresektat abgetragen und in Discs von je 4mm Durchmesser gestanzt. Mithilfe einer Rasierklinge wurden die oberen 300µm (Knorpel – Superfizialschicht) von tieferen Knorpelschichten getrennt. Auch hier wurde die Entnahme der Patientenproben durch das Ethikkommissionvotum abgedeckt. Die Patienten wurden über die Probeentnahme und deren Verwendung aufgeklärt und willigten ein.

2.1.2 Zellkulturmedien & Zusätze

Tabelle 2: Zellkulturmedien und Zusätze

Name	Bezeichnung	REF – Nummer	Hersteller
Zellkulturmedium	DMEM (1x) + GlutaMax -I	31966-021	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Zellkulturmedium	RPMI 1640 (1x)	21875-034	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	Dulbecco's PBS pH 7,2	14190-094	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Fetal calf serum (FCS)	FCS Superior	S0615	Biochrom, Berlin, Germany
Trypsin EDTA	TE 10x	T4174	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin / Streptomycin	Pen. – Strep.	P4333	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Name	REF – Nummer	Hersteller
6 – Loch Wellplatten	657160	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany
8 – Well tissue chambers	94.6140.802	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
24 – Loch Wellplatten	662160	Greiner Bio-One, Fri-

		ckenhausen, Germany
96 – Loch Wellplatten	655180	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany
Culture – Insert 2 Well		Ibidi, Martinsried, Germany
Cryo – Röhrchen 1,5 ml	72379004	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Deckglas 24 x 50 mm	1131085	Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Germany
Einmalbiopsiestanze 4mm	49401	Pfm medical, Köln, Germany
Eppendorfgefäße 0,5ml 1,5 ml 2 ml	0030124537 0030120086 0030120094	Eppendorf, Hamburg, Germany
Nitril Handschuhe Gr. M	942206	Hartmann, Heidenheim, Germany
Objektträger superfrost 25 x 75 x 1mm	03-0060	Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Germany
Pipettenspitzen mit Filter 1 – 10 µl 10 – 100 µl 100 – 1000 µl	692063 692066 790058	Biozym, Hessisch Oldendorf, Germany
Einmalskalpell No. 21	02.001.30.021	Pfm medical, Köln, Germany
Stangenpipetten 5 ml 10 ml 25 ml	357543 357551 357525	Falcon Life Sciences, Durham, NC, USA

Zentrifugationsgefäße 15 ml 50 ml	188261 210261	Greiner Bio-One, Fric- kenhausen, Germany
Zellkulturflaschen 250 ml	658170	Greiner Bio-One, Fric- kenhausen, Germany
Zellkulturflaschen 550 ml	660160	Greiner Bio-One, Fric- kenhausen, Germany

2.1.4 Geräte

Tabelle 4: Geräte

Name	Modell	Hersteller
Absaugpumpe	KNF Laboport	neoLab, Heidelberg, Germany
Brutschrank	WTB CB 150	neoLab, Heidelberg, Germany
Elektrische Pipettierhilfe	Pipetus akku	Hirschmann Laborgerä- te, Eberstadt, Germany
Gefrierschrank – 20 °C	Liebherr	Liebherr, Bulle, Switzer- land
Gefrierschrank – 70 °C	n.a.	GFL, Burgwedel, Ger- many
Horizontalschüttelplatte	MTS 4	IKA, Staufen, Germany
Kolbenhubpipetten 1 – 10 µl 10 – 100 µl 100 – 1000 µl	Research Plus	Eppendorf, Hamburg, Germany
Kühlschrank 4 °C	30 GT/N1201V	Haier, Qingdao, China
Magnetrührer	MAG RCT	IKA, Staufen, Germany
Mikroskop	Fluovert FS	Leitz, Wetzlar, Germany
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen,

		Germany
Mikroskop	Axiophet	Zeiss, Oberkochen, Germany
Mikroskopkamera	Axiocam Mrm	Zeiss, Oberkochen, Germany
Mikroskopkamera	500D	Canon, Tokyo , Japan
Mikroskopkameraobjektiv	451265	Zeiss, Oberkochen, Germany
Neubauer Zählkammer	T=0,1mm; 0,0025 mm ²	Assistent, Sondheim, Germany
Sterilwerkbank	n.a.	BDK, Sonnenbühl – Genkingen, Germany
Tischzentrifuge	Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Germany
Vortexmischer	REAXtop	Heidolph, Schwabach, Germany
Wasserbad	WB 22	Memmert, Schwabach, Germany
Endoskoplicht (300W)	LS – 3000X	MGB endoscopy, Berlin, Germany
Endoskop – Hochleistungslichtkabel	LG 300W	MGB endoscopy, Berlin, Germany

2.1.5 Lösungen, Chemikalien & Farbstoffe

Tabelle 5: Lösungen, Chemikalien, Farbstoffe

Name	REF – Nummer	Hersteller
5 – aminolevulinic acid hydrochloride	A7793-10MG	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calcein Fluoeszenzfarbstoff		Cayman chemichals, Ann Arbor, MI, USA

Celltracker	C7025	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
DAPI – Fluoreszenzfarbstoff		Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxide (DMSO)	C6295 – 50ml	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol 99%	20171027	SAV liquid production, Flintsbach am Inn, Germany
Flächendesinfektion Descosept AF	00 – 311 – 010	Dr. Schuhmacher, Malsfeld, Germany
Floureszenz mounting medium	S3023	Agilent Dako Technologies, Santa Clara, CA, USA
Formaldehyd 30%	4235.2	Roth, Karlsruhe, Germany
Methanol 99%	32213-2,5L	Honeywell Riedel-de Haen AG, Seelze, Germany
MTT Reagenz CellTiterAqueous	G358A	Promega Corportation, WI, USA
Propidium-Iodid Fluoreszenzfarbstoff		Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA
Serva G Farbstoff	n.a.	n.a.
Staurosporin	075M4073V	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypanblau	T8154	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die verwendeten Zellreihen befinden sich in Zellkulturflaschen und sind mit einem Nährmedium bedeckt. Die Zellkultur findet im Inkubator statt (37°C, 5% CO₂). Hierbei wachsen die vitalen Zellen adhäsiv an dem Flaschenboden, abgestorbene Zellen schwimmen im Medium und werden bei einem Mediumwechsel entsorgt.

2.2.1.1 Medien

Die Zelllinie PVNS-1 wurde in DMEM (1x) + GlutaMAX – I Medium kultiviert. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) enthält hohe Konzentrationen an Aminosäuren und Vitaminen, sowie Glukose, allerdings keine Lipide oder Wachstumsfaktoren. Für gute Proliferation der Zellen wurde das Medium mit 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) angereichert. Um eine Kontamination mit Bakterien (z.B. Mycoplasmen) zu verhindern, wurde das Medium darüber hinaus mit 1% (v/v) Penicillin – Streptomycin versetzt.

Die Zellreihe Fibroblasten-1 wird mit dem RPMI Medium 1640 (1x) kultiviert. RPMI 1640 Medium unterscheidet sich deutlich von anderen Medien, da es das Reduktionsmittel Glutathion sowie hohe Konzentrationen an Vitaminen enthält. Ähnlich wie bei der Zelllinie PVNS-1 findet ohne FCS kein Wachstum statt. Aus diesem Grund erfordert auch RPMI 1640 Medium eine Supplementierung mit 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), darüber hinaus zur Kontaminationsprophylaxe 1% (v/v) Penicillin – Streptomycin – Lösung.

2.2.1.2 Mediumwechsel

Das Kulturmedium wurde dreimal pro Woche gewechselt. Dazu wird mit einer Stabpipette das Medium der Flasche inklusive der avitalen Zellen abgesaugt und verworfen. Anschließend wird die Zellkulturflasche mit frischem Medium aufgefüllt (Medium vorsichtig an der den Zellen abgewandten Seite einfließen lassen).

2.2.1.3 Zellen splitten und für Experimente verwenden

Bei Erreichen von 80% konfluentem Wachstum (etwa alle 2 - 4 Tage) wurden die Zellen abgelöst und subkultiviert, nach Absaugen des Mediums und zweimaligem Spülen mit PBS wurden die Tumorzellen mit 10ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin / 0,02% EDTA; in PBS) 5 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in ein 50ml Falcon – Zentrifugationsröhrchen überführt und 7 min bei 1500rpm und 7°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in DMEM resuspendiert und die Zellzahl in der Fuchs-Rosenthal-Kammer nach folgender Gleichung bestimmt:

$$y = \frac{x}{4} * 10^4 * 10$$

Formel 1: zu Errechnung der Gesamtzellzahl /ml Lösung

y= gesamte Zellzahl pro ml

x: gezählter Wert aus allen vier Quadranten

4: Quotient für 4 Quadranten

10⁴: Kammerfaktor

10: 10-fache Verdünnung

Die Zellen wurden je im 80%-igen subkonfluenten Wachstumsstadium in die Versuche eingesetzt. Nicht verwendete Zellen wurden erneut in Kultur genommen („Splitten“). Durch Splitten der Zellen erreicht die Zellreihe eine höhere Passage (Bsp: Zellen der Passage 15 sind nach dem Splitting in Passage 16).

2.2.1.4 Auftauen von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung befinden sich die Zelllinien in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Zur Vergleichbarkeit der Versuchsansätze wurden in den Experimenten

ausschließlich PVNS-1 bzw. Fibroblasten-1 Zellen der Passagen p4 bis p20 verwendet. Zelllinien oberhalb Passage 20 wurden verworfen, jüngere Passagen aufgetaut. Nach Entnahme der Kryo Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank und vorsichtiger Erwärmung werden die Zellen durch Zentrifugation (7°C, 1500 rpm, 7 Min) von ihrem Einfriermedium Dimethylsulfoxid (DMSO) getrennt und anschließend in Kultur genommen.

2.2.1.5 Einfrieren von Zellen

Um Zellreihen in einer bestimmten Passage für spätere Experimente zu konservieren, wurden frühe Passagen eingefroren. Dafür wurden die Zellen – wie unter PUNKT 2.2.1.3 beschrieben – abgelöst, subkultiviert und zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml eines 10% (v/v) Einfriermediums (5ml DMSO auf 45 ml FCS) gelöst. In einem Kryo – Einfrierröhrchen wurden die Zellen anschließend stufenweise bis auf -196°C runtergekühlt und in flüssigem Stickstoff konserviert.

2.2.2 Vorexperimente

2.2.2.1 Konzentrations- & Zeittest für Migration

Für kommende Migrationsexperimente wurde eine Testung durchgeführt, wie viele Zellen für entsprechende Zellreihen pro Inserterseite eingesetzt werden müssen, dass verwertbare Zellmigration stattfindet. Der genaue Ablauf einer Migration wird zu einem späteren Zeitpunkt unter *Punkt 2.2.3* erläutert. Zusätzlich soll die Zeit ermittelt werden, die das Zellmaterial, das 500µm räumlich voneinander durch einen Inserter getrennt ist, benötigt, um aufeinander zuzuwachsen.

Dazu wird in 6er – Well – Platten ein Culture Inserter eingesetzt. Jede Zellreihe (Fibroblasten-1 und PVNS-1) bekommt 2 Platten (eine d0 – Platte, die nicht migrieren soll und sofort fixiert und gefärbt wird & eine Platte, die migriert und bei der die Zeit ermittelt wird, bis eine auswertbare Migration stattgefunden hat). Pro Well kommt eine verschiedene Zellanzahl je auf beide Seiten des Inserters. Es wurden drei Zellmengen getestet: 10^4 , 2×10^4 & 3×10^4 Zellen pro Inserterseite (SIEHE ABBILDUNG 8). Im Nachhinein wird ermittelt, welche Zellkonzentration und welche Zeit bei welcher Zellreihe eine optimale Beurteilung möglich macht.

Die PVNS-1 und die Fibroblasten-1 Zellreihen werden je mit folgenden Zellanzahlen pro Inserterseite (70µl) überprüft:

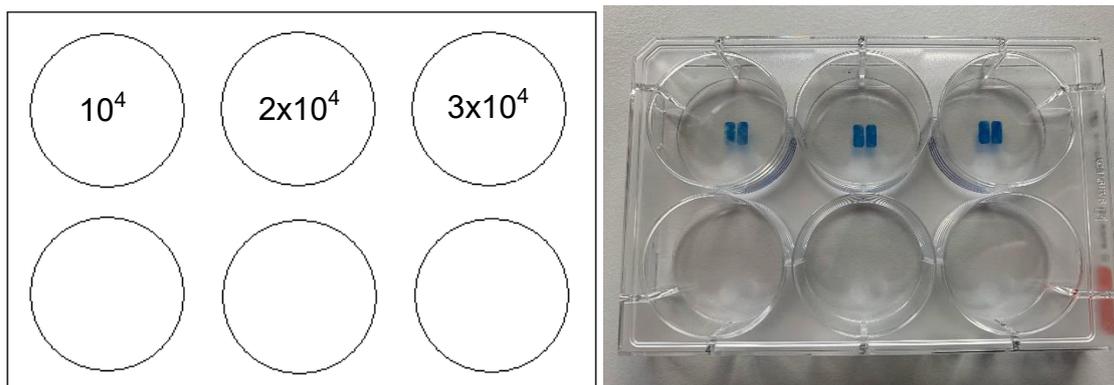


Abbildung 8: Zellmengen der Fibroblasten-1 & PVNS-1 auf jeder Seite eines Culture Inserters (je 2x: Negativplatte und Migrationsplatte)

Dazu wurde für jedes Well die entsprechende Verdünnung berechnet, um auf beide Iserterseiten (70µl pro Seite) die entsprechende Zellmenge zu erhalten. Anschließend wurden für beide Zellarten je beide Platten (d0 – Platte und Migration) für 24h bei 37°C inkubiert. Nach 24h wurden die Inserter aus dem Well genommen. Die d0 – Platte wurde sofort fixiert und gefärbt, wohingegen die Migration auf der entsprechenden Platte nun bei t0 beginnt. Anschließend wurde die Migrationsplatte halbstündig kontrolliert, um die optimale Migrationszeit zu ermitteln.

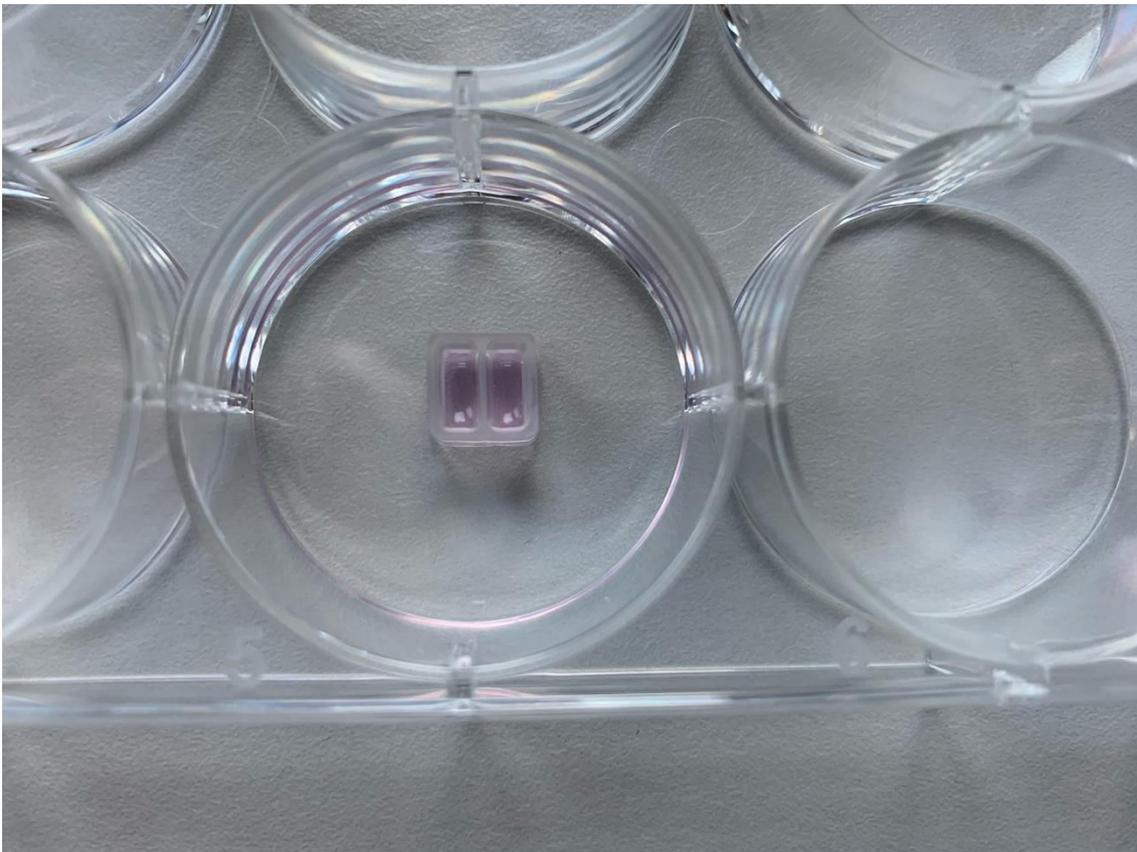


Abbildung 9: Bild eines Culture – Inseters mit 70µl Zellmedium pro Inserterhälfte. Nach 24 Stunden Inkubation sind die Zellpopulationen am Wellboden adhären und durch den Inserter exakt 500µm voneinander getrennt.

Ergebnis:

- Fibroblasten-1:
 - Optimale Zellmenge pro Inserterseite (70µl): 2×10^4
 - Optimale Migrationszeit: 18h

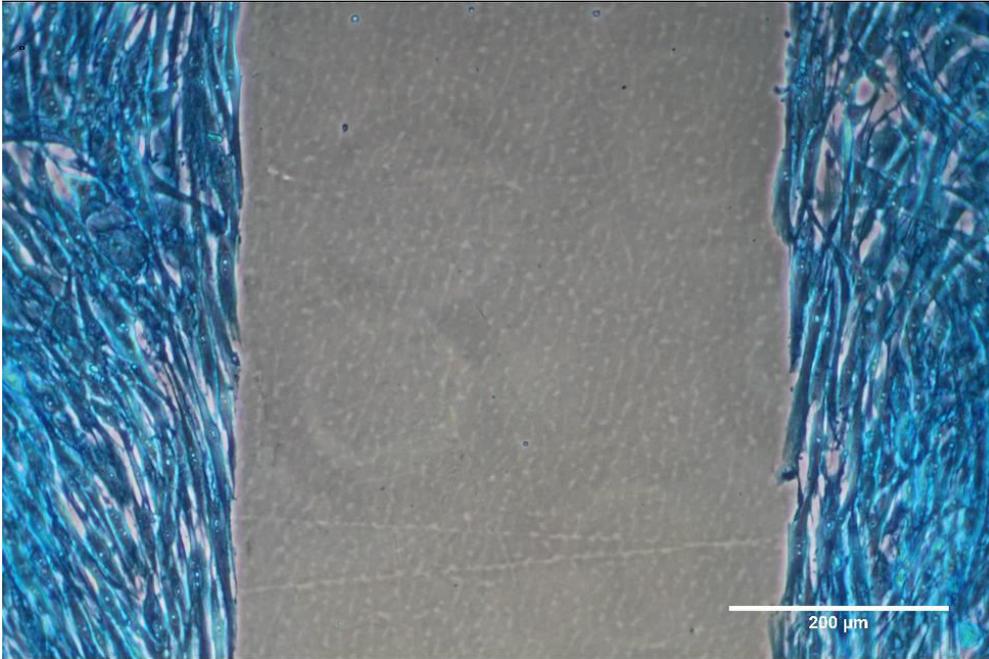


Abbildung 10: Fibroblasten-1 ohne Migration bei 2×10^4 Zellen (d0 – Platte)

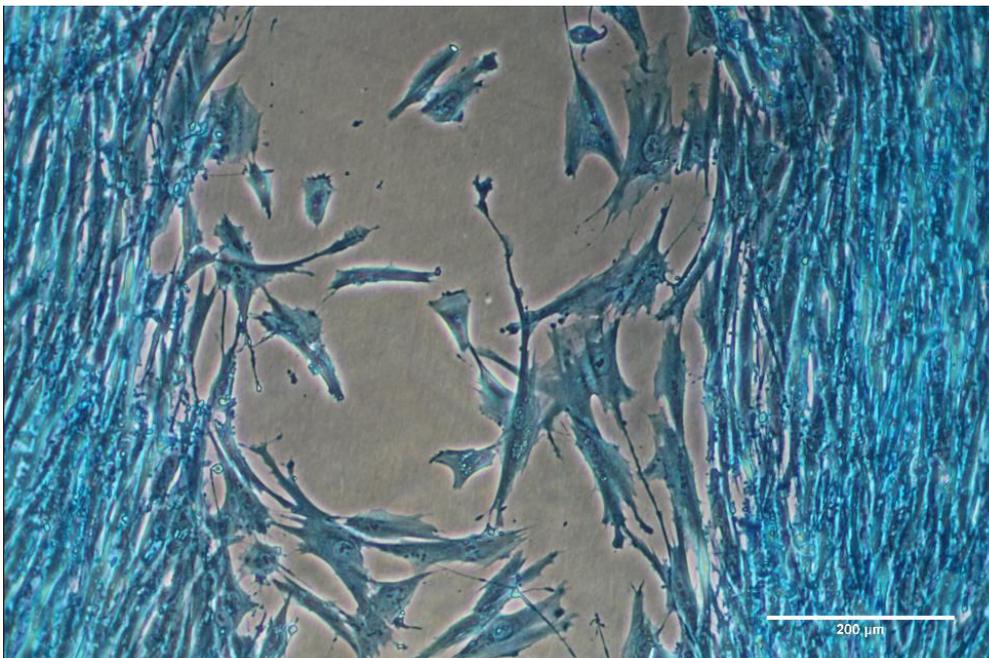


Abbildung 11: Fibroblasten-1 nach 18h Migration bei 2×10^4 Zellen

- PVNS-1:
 - Optimale Zellmenge pro Inserterseite (70µl): 10^4
 - Optimale Migrationszeit: 10h

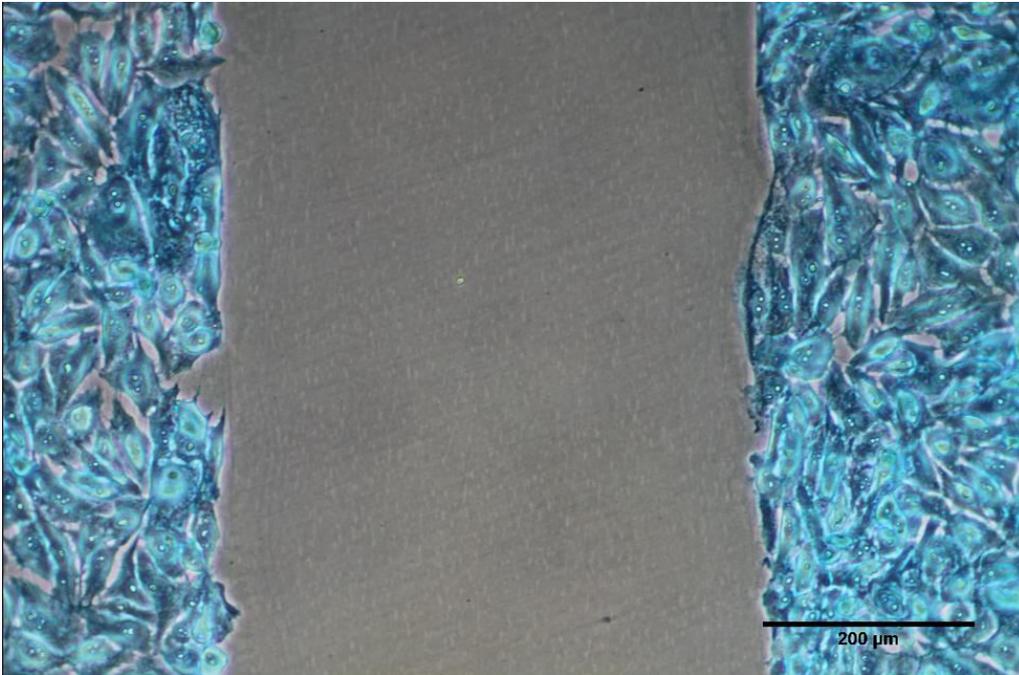


Abbildung 12: PVNS-1 ohne Migration bei 10^4 Zellen (d0 – Platte)

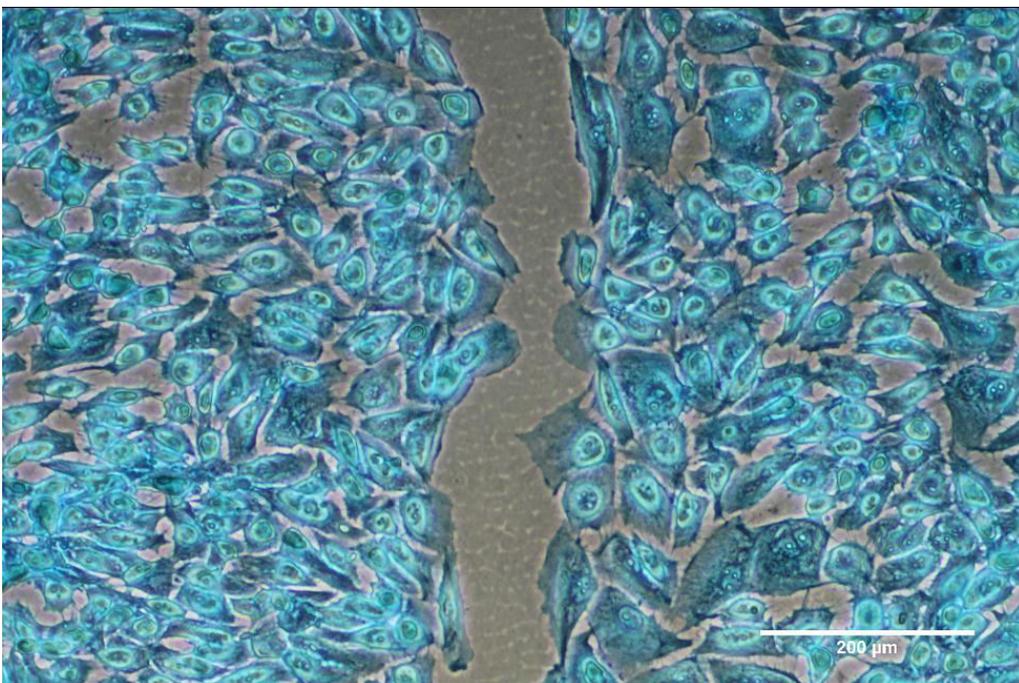


Abbildung 13: PVNS-1 nach 10h Migration bei 10^4 Zellen

2.2.2.2 Höhe & Umgebung der Beleuchtung und Temperaturtestung

Um den Versuchsaufbau reproduzierbar zu gestalten, wurden die Bedingungen der Belichtung objektiviert. Eine optimale und gleichmäßige Ausleuchtung der Wellplatte durch den Lichtkegel ist bei fixierter Lichtquelle zwischen 16 und 17cm oberhalb der Wellplatte sichergestellt. (SIEHE ABBILDUNG 17). Zusätzlich wird die Umgebung verdunkelt.

Um eine Hitzeentwicklung der 300W starken Arthroskopielampe in belichtetem Gebiet und eine mögliche Beeinflussung der Versuchsergebnisse auszuschließen wurde eine Wellplatte mit Medium befüllt und die Temperatur des Mediums gemessen (22°C). Anschließend wurde das Well aus nächster Nähe (2cm Abstand) für 35 Minuten mit der Arthroskopielampe bestrahlt. In späteren Experimenten beträgt die maximale Belichtungsdauer 2000 Sek (33 Min 20 Sek).

Ergebnis: nach 35 Minuten Belichtung betrug die Temperatur des Mediums 25°C. Dieser Temperaturunterschied bedingte keine signifikanten Veränderungen.

2.2.2.3 Einfluss der Well – Position auf das Ergebnis

Ein Vorexperiment sollte beweisen, dass die Position unterhalb der Lichtquelle keinen Einfluss darauf hat, wie das Zellwachstum und Zellmigration ablaufen. Dazu wurden drei Fibroblasten-1 – Platten vorbereitet: 1x d0- Platte & 2x Migrationsplatten. Bei den Migrationsplatten wurden in 12 Wells, wie auch in der d0 – Platte je 2×10^4 Zellen pro Inserterseite pipettiert, anschließend für 24h bei 37°C inkubiert. Die d0 – Platte wird nach 24h Inkubation sofort fixiert und gefärbt. Bei den Migrationsplatten wurden nach 24h die Inserter aus den Wells genommen und die Migration gestartet. Eine der beiden Migrationsplatten wurde mit 5 – ALA beimpft, aber nicht belichtet und die andere mit 5 – ALA versetzt und anschließend 2000 Sek belichtet. Daraufhin wurden beide Platten fixiert und gefärbt. In unten stehender ABBILDUNG 14 ist die Verteilung der 5 – ALA Konzentrationen in mM dargestellt.

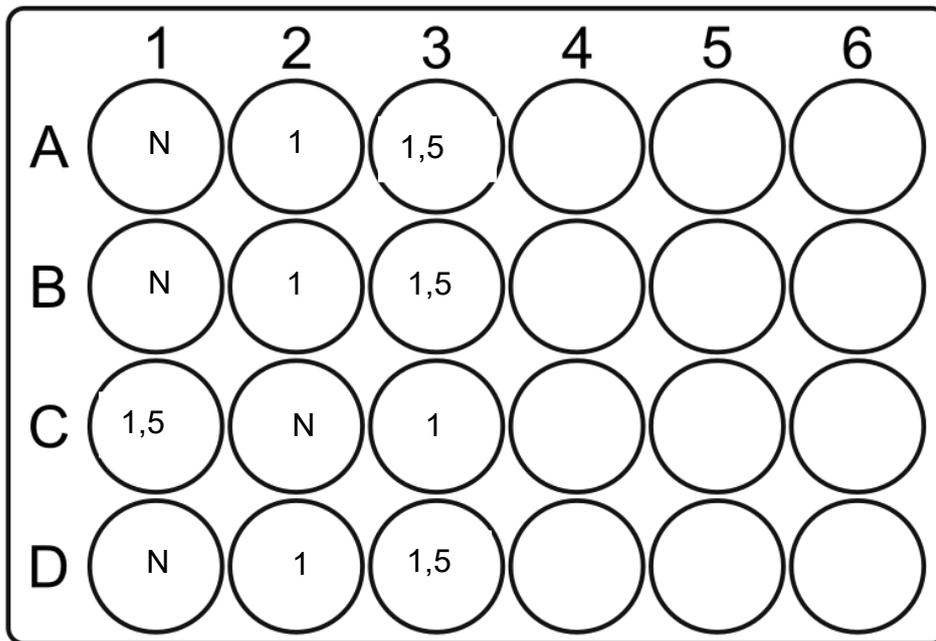


Abbildung 14: gleiche 5 - ALA Konzentrationen (in mM) wurden an verschiedenen Lokalisationen unter der Lichtquelle platziert (N: Negativprobe, also kein 5 – ALA, nur Medium)

Bei der Auswertung konnte ermittelt werden, dass die Position des Wells mit entsprechender 5 – ALA Konzentration keinen Einfluss auf die Migration der Fibroblasten hatte. Alle Wells mit gleicher Konzentration des Photosensitizer betrieben in gleichem Maße Migration unabhängig von ihrer Lokalisierung.

2.2.2.4 Konzentrationsversuch 5 – ALA bei PVNS-1 & Fibroblasten-1

Für jede Zellreihe wurden je 4 Wellplatten (1x Negativplatte ohne Belichtung, 1x 300 Sek Belichtung, 1x 1000 Sek Belichtung & 1x 2000 Sek Belichtung) mit aufsteigenden 5 – ALA Konzentrationen hergestellt. Sowohl für die Fibroblasten-1, als auch die PVNS-1 Zellreihe wurde hierfür eine 5 – ALA Verdünnungsreihe aufgestellt, wie sie in ABBILDUNG 15 angegeben ist.

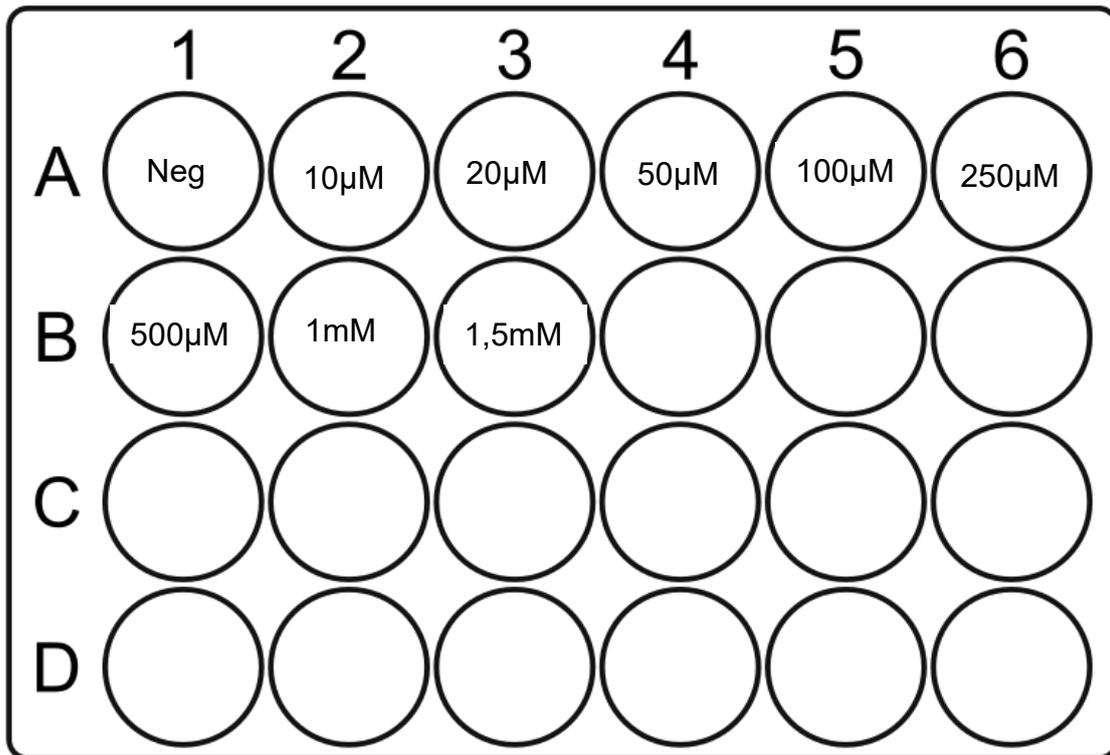


Abbildung 15: Verdünnungsreihe 5 - ALA für Fibroblasten-1 & PVNS-1 Zellen zur Ermittlung der optimalen 5 – ALA Konzentration

Die Platten wurden mit 2×10^5 Zellen pro Well bei den Fibroblasten-1 (10^5 Zellen bei den PVNS-1) angesetzt, nach 24 h Inkubation bei 37°C mit entsprechenden 5 – ALA Konzentrationen beimpft und je für 300 Sekunden, 1000 Sekunden und 2000 Sekunden belichtet.

Anhand morphologischer Veränderungen unter dem Mikroskop wurden 5 – ALA – Konzentrationen für die entsprechenden Zellreihen festgelegt, mit denen die kommenden Experimente (Migrations – Assays, MTT – Assays, KernfrAGMENTIERUNG der Fibroblasten-1) durchgeführt wurden:

Tabelle 6: verwendete 5 – ALA Konzentrationen bei Fibroblasten-1 Zellreihe

Zellreihe	Konzentrationen
Fibroblasten-1	0µM
	50µM
	100µM
	250µM
	500µM

Tabelle 7: verwendete 5 – ALA Konzentrationen bei der PVNS-1 Zellreihe

<i>Zellreihe</i>	<i>Konzentrationen</i>
<i>PVNS-1</i>	0µM
	0,5mM
	1mM
	1,5mM
	3mM

2.2.2.5 Ermittlung eines Verfahrens für den Viability Assay der Knorpelzellen

In dieser Dissertation wird ein Viability Assay an vitalen Knorpelproben angewandt. Bisher gibt es in der Literatur keinen vergleichbaren Test oder Verfahren zur Vitalitätsbestimmung von Knorpelproben aus dem in vivo Präparat. Daher wurde im Rahmen dieser Dissertation ein Verfahren etabliert, mit dessen Hilfe es möglich ist, vitale Knorpelzellen aus in vivo Präparaten so aufzubereiten, dass sie in Well – Platten ausgesät und fixiert werden können, um mit 5 – ALA und dem Endoskoplicht behandelt zu werden. Grundvoraussetzung hierbei ist, dass der Knorpel durch die Aufbereitung vital bleibt und jede Knorpelprobe anschließend gleichmäßig mit 5 – ALA versetzt und von dem Endoskoplicht beleuchtet wird.

Der Knorpel wurde dazu vom Operationsresektat (proximale Tibia) mithilfe eines Skalpells abgetragen und mit einer Stanze in Knorpeldiscs von je 4mm Durchmesser gestanzt. Durch Einlegen der Discs in eine Schablone wurden mithilfe einer Rasierklinge die oberen 300µm Superfizialschicht von tieferen Knorpelschichten getrennt und je eine Knorpeldisc der Superfizialschicht pro Well einer 96 – Well Platte ausgesät. So konnte sichergestellt werden, dass jede Knorpeldisc in anschließenden Versuchsansätzen optimal mit 5 – ALA benetzt ist und gleichmäßig belichtet werden kann. Um zu beweisen, dass die Knorpeldiscs bei diesem Aufbereitungsverfahren vital bleiben, wurden sie in der

Wellplatte – ohne zuvor einer PDT unterzogen worden zu sein – immunfluoreszierend gefärbt und mikroskopiert. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Knorpelzellen entsprechend ihres arthrotischen Grades vital waren. Somit kann hinreichend sicher die These aufrechterhalten werden, dass dieses Verfahren der Knorpelaufbereitung keinen Einfluss auf die Vitalität der Probe hat und wurde für die folgenden Versuchsansätze verwendet.

Für diesen Assay wurden in folgenden Experimenten die Belichtungszeiten von 300 und 2000 Sekunden gewählt. Die 5 – ALA Konzentrationen orientierten sich hierbei an denen der Fibroblasten-1 Zellreihe. Die 50µM Gruppe wurde gegen die Konzentration von 20µM 5 – ALA substituiert um Auswirkungen einer noch geringeren Konzentration auf die Knorpelzellen zu testen.

2.2.3 Migrations – Assay

Unter Zellmigration versteht man die aktive Bewegung von Zellen. Diese findet – wenn nicht durch Geißelschlag bei speziellen Zellen – vor allem durch amöboide Bewegung statt. Nur vitale Zellen sind auch in vitro in der Lage Migration zu betreiben, daher wird der Migrationsassay in dieser Arbeit als ein Hinweis auf Vitalität von Zellen verwendet.

Um die Migration zu quantifizieren werden sog. Culture Inserter (SIEHE ABBILDUNG 9) innerhalb der Well – Platten verwendet. Die Kunststoff – Inserter besitzen zwei 500µm voneinander getrennte Kammern.

Für jedes Experiment werden pro Zellreihe fünf 6 – Well – Platten vorbereitet. 1x d0 – Platte (Negativprobe), 1x unbelichtet, und je 1x für 300 Sek, 1000 Sek und 2000 Sek Belichtung. In jedes der Wells wird ein Inserter geklebt und in jede Inserterhälfte 70µl Zellsuspension pipettiert (Fibroblasten-1 – Zellreihe: 2×10^4 Zellen pro 70µl /// PVNS-1: 10^4 Zellen/ 70µl). Die Wellplatten werden anschließend zur Adhäsion für 24h bei 37°C inkubiert. Daraufhin werden die Inserter entfernt, die beiden Zellpopulationen pro Well mit je 2×10^4 (bzw 10^4) Zellen sind nun 500µm voneinander entfernt. Die Negativprobe d0 wird nach Entfernung des Inserters sofort fixiert und gefärbt. Hier hat keine Migration stattgefunden.

den und diese Platte dient später als Referenz mit bekannter 500µm Distanz zwischen den Zellpopulationen pro Well.

Die übrigen vier Wellplatten werden pro Well mit 2ml der entsprechenden 5 – ALA Konzentrationen – wie in TABELLEN 6 & 7 ermittelt – (bzw. 2 ml Medium bei 0 µM) beimpft, gemäß der 5 – ALA Einwirkzeit für 4h bei 37°C inkubiert und damit die Migration gestartet. Nach 4h Inkubation bleibt eine Platte unbelichtet, die drei übrigen werden je 300, 1000 oder 2000 Sekunden belichtet und anschließend für weitere 14h (6h bei PVNS) bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit ist die Migration so weit abgelaufen, wie im Vorexperiment (*siehe 2.2.2.1*) ermittelt wurde: Fibroblasten-1: 18h /// PVNS-1: 10h. Auch diese Platten werden fixiert und gefärbt (*Siehe 2.2.3.1*). Am Folgetag werden mit einem speziellen Fotomikroskop Axiophet der Firma Zeiss© bei 10- facher Vergrößerung Bilder aufgenommen. Mithilfe der Software ImageJ© kann nun die Distanz zwischen den beiden Zellpopulationen gemessen werden. Anhand dieser Distanz wird ermittelt, in welchem Maße eine Migration im Vergleich zu der Referenz (d0 – Probe), stattgefunden hat. Neben der Distanz der beiden Zellpopulationen zueinander, ist es zusätzlich möglich die Zellen morphologisch zu beurteilen. Anhand dieser beiden Parameter soll auf die Vitalität der behandelten Zellen geschlossen werden.

Um diese semiquantitative Methodik soweit als möglich zu objektivieren, wurden die Abstandsmessungen auf den Bildern mithilfe der Software ImageJ© stets an der engsten Stelle durchgeführt und mithilfe einer vollständig waagerechten Linie zwischen den beiden Zellpopulationen ermittelt. Hierbei galt stets die Distanz der Zellverbände zueinander. Einzelne Zellen, die etwas weiter aufeinander zu migriert waren, aber in keinem Kontakt mehr zu dem restlichen Zellverbund standen, wurden nicht berücksichtigt. Bei einer bekannten Distanz von 500µm der beiden Zellpopulationen zueinander zu Beginn der Migration, wurde eine Migration als signifikant bewertet, wenn die Zellverbände während der Inkubation mindestens 200µm aufeinander zuwuchsen, also ein ausgemessener Abstand 300µm oder weniger betrug.

Anhand folgender optischer Kriterien wurde die morphologische Beurteilung vorgenommen:

- Kern – Plasma – Relation → Verschiebung zugunsten des Kerns bei Apoptose
- Zell- & Zellkerngröße → Schrumpfung / Fragmentierung
- Zellmenge & Zelldichte → Reduktion

Dieser Versuchsansatz wurde für jede Zellpopulation in Tripletten durchgeführt und die gemessenen Werte für entsprechende 5-ALA – Konzentrationen und Belichtungsdauern gemittelt.

Ziel der Untersuchung ist zu erkennen, ob Zellen, die nach Beginn der Migration einer PDT unterzogen wurden, in gleichem Maße ausmigrieren wie Zellen, die keine Belichtungstherapie nach 5 – ALA Gabe erhielten.

2.2.3.1 Fixieren und Färben von Zellen

Nach der Migration werden Zellen fixiert und gefärbt und die stattgefunden Migration mit dem Mikroskop gemessen. Jedes Well wird zunächst mit PBS – Waschpuffer gespült, mit einer 4% (v/v) Formalin – Lösung fixiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diesem Schritt schließt sich eine erneute Waschung mit 70% (v/v) Ethanolösung und folgende Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur an. Das Ethanol wird abgezogen, das Well lufttrocknen gelassen (etwa 20 Minuten). Pro Well wird mit 2ml der Serva G Farblösung gefärbt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die komplette Well – Platte wird im letzten Schritt mit destilliertem Wasser ausgeschwenkt und über Nacht trocken gelassen.

2.2.4 MTT – Assay

Der MTT – Assay ist ein kolorimetrischer Assay, der die metabolische Aktivität von Zellen bestimmt und in zellbiologischen Studien häufig zum Einsatz kommt. Das Maß der metabolischen Zellaktivität korreliert stark mit der Zellviabilität, somit gibt der MTT – Assay Hinweis auf die Vitalität untersuchter Zellen. Hierbei

wurde für jede Zellreihe (Fibroblasten-1: 2×10^4 Zellen pro Well, PVNS-1: 10^4) und Belichtungszeit (Negativprobe, 300 Sekunden, 1000 Sekunden, 2000 Sekunden) je eine 96 – Wellplatte mit entsprechenden 5 – ALA Konzentrationen entsprechend TABELLE 6 & 7 vorbereitet und nach 4 stündiger Inkubationszeit bei 37°C mit dem Endoskoplicht (300W) belichtet. Nach der 5 – ALA Behandlung, Belichtung und der weiteren Inkubation bei 37°C wurden die Wells mit $15\mu\text{l}$ eines flüssigen, gelben MTT – Reagenz (MTT Reagenz Cell Titer Aqueous©) befüllt. Nach 90 Minuten Einwirkzeit wurde mit dem Photometer, durch Farbveränderung vitaler Zellen, der Anteil vitaler Zellen im Vergleich zu einer 100% lebendigen Kontrollprobe (ohne 5 – ALA) gemessen.

MTT – Reagenz ist ein Tetrazoliumsalz, genauer **Methyl- Thiazolyl- Tetrazolium**. Dieses ist wasserlöslich und wird durch die Succinat – Dehydrogenase, einem Enzym der Atmungskette (Komplex II), zu braun – violetter Formazan reduziert. Neuere Studien zeigen auf, dass hierbei neben der mitochondrialen Succinat Dehydrogenase zusätzlich eine Reduktion des MTTs im Zytosol stattfindet.⁵² Damit ist der MTT – Assay hauptsächlich abhängig von der mitochondrialen Atmungskette und gibt indirekte Aussage über die Funktion der Zellatmung, von der angenommen wird, dass sie nur in vitalen Zellen stattfindet.⁵³ Die Menge des reduzierten Farbstoffs entspricht damit der Stoffwechselrate der Zelle und evaluiert somit die Zellviabilität. In diesem Rahmen ist es im Umkehrschluss auch möglich die Zytotoxizität der PDT nachzuweisen.

Das Ergebnis der Absorptionsmessung aus dem Photometer ergibt eine Dezimalzahl, aus welcher sich die Zellviabilität in Prozent errechnen lässt und in einen Graphen übertragen werden kann.

$$\text{Zellviabilität in \%} = \frac{\text{Absorption behandelte Zellen}}{\text{Absorption der Kontrollzellen}} * 100$$

Formel 2: Zur Errechnung der prozentualen Zellviabilität bei MTT - Assay

Die Ergebnisse nach PDT – Therapie wurden mit Zellen aus einer Referenzgruppe verglichen, die keiner PDT unterzogen wurden.

Von der PDT nicht beeinflusste Zellen betreiben auch während und nach der Belichtung ihren physiologischen Stoffwechsel weiter und so wird auch weiterhin MTT – Reagenz in bräunliches Formazan umgesetzt. Dadurch steigt während des Experiments die Absorption der vitalen Zellen (SIEHE FORMEL 2) kontinuierlich. Verglichen damit wird die Vitalität einer Kontrollprobe, die kein 5 – ALA und PDT erhielt und als Referenz mit 100% Vitalität gilt. Somit erklärt sich bei der anschließenden Ergebnisauswertung, wie bei vitalen Zellen nach PDT, Vitalitätswerte von >100% zustande kommen.

Der erste der drei Ansätze der Experimente enthält, sowohl bei den Fibroblasten-1 als auch bei der PVNS-1 Zellreihe, noch eine größere Anzahl verschiedener 5 – ALA Konzentrationen (SIEHE 2.2.2.4). Mit Hilfe dieses ersten MTT – Assays wurden im Vorversuch die optimalen Konzentrationen erhoben, mit denen spätere Experimente durchgeführt wurden.

Aufgrund steigender Umsetzungsraten des MTT Reagenz bei zunehmenden 5 – ALA Konzentrationen und PDT der PVNS-1 Zellreihe (SIEHE 3.2.1.) wurden bei dieser Zellreihe zusätzlich zu den drei ursprünglichen Versuchsansätzen zwei weitere Experimente durchgeführt, die diesen Trend erklären sollten. Dieser Umstand wird in der Diskussion ausführlich beleuchtet. Beim ersten der beiden weiteren Gedankenansätze wurde bereits nach **zweistündiger** Einwirkzeit des 5 – ALA die PDT an den PVNS-1 Zellen durchgeführt. Der andere Experimentalansatz zielt auf die Frage des enzymatischen 5 – ALA Abbaus ab. Aus diesem Grund wurde eine **zweimalige** 5 – ALA Gabe der entsprechenden Konzentrationen durchgeführt. Einerseits wurde vor der 24 stündigen Inkubation zur Zelladhäsion bereits einmalig die entsprechende 5 – ALA Konzentration hinzugefügt, darüber hinaus nach Adhäsion die reguläre 5 – ALA Gabe. Anschließend wurden die Proben nach weiterer vierstündiger Inkubation belichtet.

2.2.5 Viability Assay

Bei dem Viability Assay handelt es sich um eine Methode mit deren Hilfe Lebensfähigkeit von Zellen, Geweben oder ganzen Organen nachgewiesen werden kann. Diese Lebensfähigkeit (engl. Viability) kann auf mehrere Arten analy-

sirt werden: Zellmotilität, mitotische Teilungsrate oder auch anhand von Immunfluoreszenz, welche in dieser Dissertation verwendet wird. Mithilfe dieser soll die Viabilität gesunder Knorpelzellen nach der PDT beurteilt und quantifiziert werden.

Zunächst wird mit einem Skalpell der Knorpel der Tibia abgetragen und mit einer Stanze kreisrund ausgestanzt. Diese Knorpelscheiben mit 4mm Durchmesser werden mithilfe einer Rasierklinge auf 300 µm Dicke geschnitten, um für den eigentlichen Versuch nur Knorpeldiscs der Knorpel – Superfizialschicht (ca. 300 µm) zu verwenden. Diese Schicht ist in vivo der Belichtung direkt ausgesetzt und wird daher für diese Versuchsreihe verwendet. Drei 96 – Wellplatten werden vorbereitet. Die erste Platte entspricht der Negativprobe und wird zwar mit 5 – ALA beimpft, aber nicht belichtet, die Zweite wird für 300 Sekunden, die Dritte für 2000 Sekunden belichtet. Die Discs werden in allen drei Platten mit entsprechenden 5 – ALA Konzentrationen (0µM, 20µM, 100µM, 250µM, 500µM) beimpft, für 4 Stunden inkubiert und anschließend belichtet. Nach der Belichtung wird der Knorpel mit 200µl der immunhistologischen Farbstoffe (jeweils 1:1000 (v/v) in PBS verdünnt) versetzt und weitere 30 Minuten bei 37°C und Dunkelheit inkubiert.

Verwendet werden hierbei die Farbstoffe Propidium – Iodid (PI) und Calcein – AM. Propidium – Iodid ist ein fluoreszierender Farbstoff, der Licht der Wellenlänge 488nm maximal absorbiert und sein Emissionsmaximum zwischen 625 und 640nm hat.⁵⁴ Vitale Zellen mit intakter Zellmembran können von PI nicht angefärbt werden, da der Farbstoff die Membran nicht penetriert. Bei apoptotischen Zellen perforiert die Zellmembran und ist nicht mehr intakt. PI kann die Membran nun passieren, sich per Interkalation in die DNA einbauen und unter dem Immunfluoreszenzmikroskop bei entsprechender Absorption ein rotes Signal emittieren.⁵⁴ Avitale Knorpelzellen werden so in den Bildern (*siehe Ergebnisse*) rot dargestellt sein.

Calcein – AM (AM = Acetoxymethyl) ist der zweite eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 494nm und einem Emissionsmaximum von 517nm (grün). Es wird durch die Zellmembran in lebendige Zellen

transportiert und dort von Esterasen (durch Abspaltung von Acetoxymethylgruppen) in Calcein umgewandelt. Vitale Zellen zeichnen sich hierbei durch die Anwesenheit dieser Esterasen aus, die diesen Stoffwechselweg katalysieren können.⁵⁵ Calcein ist damit in der Zelle fixiert und kann Ca^{2+} – Ionen chelatisieren. Es entsteht eine starke grüne Fluoreszenz innerhalb der Zelle. Avitale Zellen verlieren im Rahmen der Apoptose / Nekrose ihre Esterasen. Dadurch kann kein Calcein entstehen und Ca^{2+} – Ionen im Zytosol werden in keinen Chelat – Komplex eingebaut. Somit entfällt bei abgestorbenen Zellen die grüne Fluoreszenz, diese Zellen bleiben unter dem Fluoreszenzmikroskop schwarz.

Beide Farbstoffe werden in Kombination den Knorpeldiscs zugeführt und für 30 Minuten bei Dunkelheit - aufgrund starker Lichtempfindlichkeit der Farbstoffe - und 37°C inkubiert. Anschließend werden die Knorpelschnitte aus den Wells entfernt und auf Objektträger übertragen. Dort werden sie sofort mit „Fluorescence Mounting Medium“ und Deckglas gegen Austrocknen abgedeckt und bei 10- facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop Fluovert FS[®] mikroskopiert. Dabei wird für die Calcein – Fluoreszenz [Em:496nm / Ex 461nm] eine Belichtungszeit von 50ms und für die PI – Fluoreszenz [Em:493nm / Ex: 516nm] eine Belichtungszeit von 200 – 500ms gewählt. Die Bilder werden übereinander gelegt und so entsteht ein Bild, das sowohl avitale Zellen als auch vitale Zellen fluoreszierend darstellt. So erscheinen vitale Knorpelzellen in den Bildern grün (Calcein – AM) und abgestorbene Knorpelzellen werden rot angefärbt (Propidium – Iodid). Mithilfe des Programmes ImageJ[®] wurde im Folgenden aus den Bildern die Anzahl der vitalen bzw. der avitalen Zellen ausgezählt (SIEHE ABB. 16) und in Tabellen aufgetragen. Aus diesen Tabellen konnte der Prozentsatz der lebendigen Knorpelzellen mithilfe folgender Formel errechnet werden.

$$\frac{\text{vitale Zellen}}{\text{vitale} + \text{avitale Zellen}} * 100 = \text{vitale Zellen in \%}$$

Formel 3: Errechnung der prozentualen Zellvitalität beim Viability Assay der Chondrozyten

Der Versuchsansatz wurde in Triplets durchgeführt und die Prozentsätze der vitalen Zellen gemittelt.

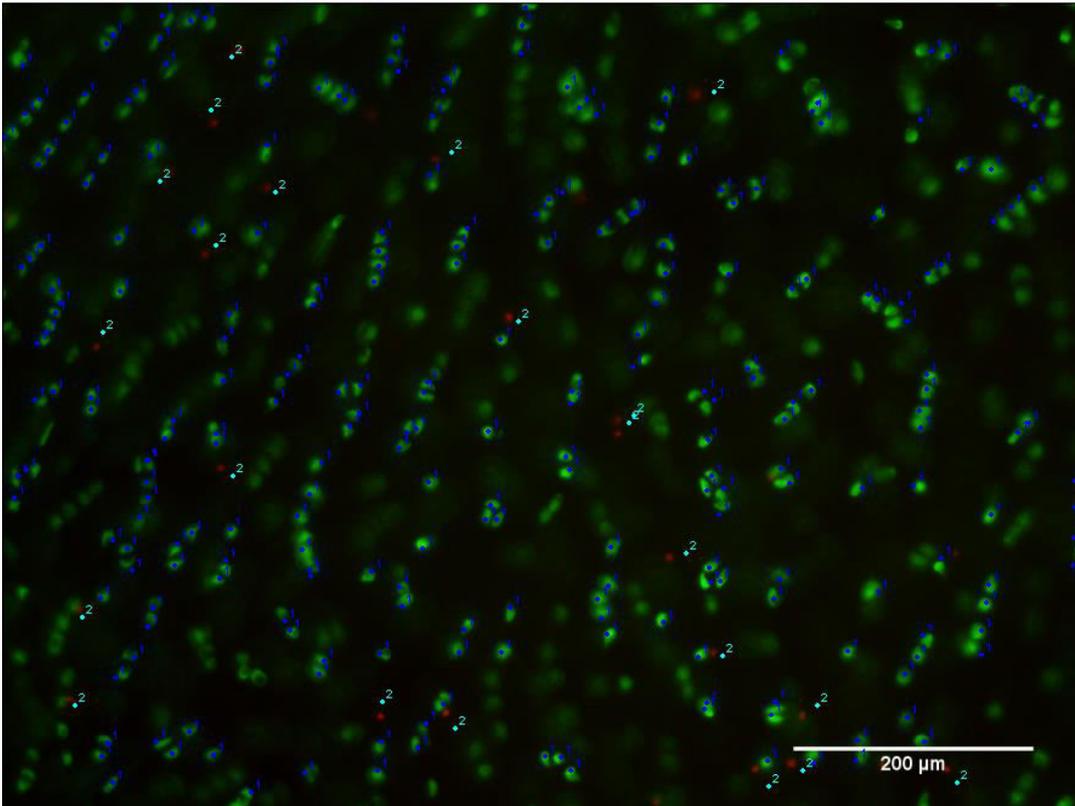


Abbildung 16: Beispiel zur Auszählung der grünen, vitalen Knorpelzellen mithilfe von blauen Zählhilfen und der roten, avitalen Knorpelzellen mithilfe von türkisarbenen Zählhilfen in der Software ImageJ©

2.2.6 Kernfragmentierungs – Assay der Fibroblasten-1 Zellreihe

Mithilfe des Kernfragmentierungs – Assays soll durch ein weiteres Verfahren der mögliche zytotoxische Effekt der PDT auf die Fibroblasten-1 Zellreihe untersucht werden. Das Verfahren beruht darauf, Zellkern und Zytoplasma mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen anzufärben. Kernfragmentierung (Karyorrhexis), kann sowohl bei Apoptose als auch bei Nekrose beobachtet werden. Es ist durch Farbstoffe möglich, Kernfragmente innerhalb des Zytoplasmas darzustellen, bzw. Zytoplasmaeinschlüsse innerhalb des Kerns sichtbar zu machen. Beides gilt als optischer Hinweis auf Karyorrhexis und wird als Goldstandard der visuellen Identifikation von Apoptose gesehen.⁵⁶

Der Versuchsansatz wurde singulär anhand eines Protokolls „Kernfragmentierung“ durchgeführt, welches im orthopädischen Zellforschungslabor der Universität Tübingen 2017 etabliert wurde. Es wurden zwei 8 – well – tissue – cham-

bers vorbereitet. In jedes Well wurden 2×10^4 Zellen der Fibroblasten-1 Zellreihe ausgesät und diese für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Eine der beiden chambers entspricht der Positivprobe einer Kernfragmentierung und damit als Referenz. Diese 8 – well – chamber wurde nach 24 – stündiger Inkubation einmalig mit $500\mu\text{l}$ PBS gewaschen und mit $500\mu\text{l}$ des Apoptoseinduktors Staurosporin (1:1000 (v/v) Verdünnung in PBS) versetzt. Durch Staurosporin wird bei Fibroblasten-1 die Apoptose eingeleitet und es stellt sich das mikroskopische Bild einer Karyorrhesis dar. Nach 4 – 6h Inkubation bei 37°C wurde Staurosporin entzogen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit $500\mu\text{l}$ des Farbstoffs „CellTracker“ versetzt. Der Farbstoff wurde zuvor aus einer $500\mu\text{M}$ Lösung auf eine Konzentration von $2,5\mu\text{M}$ in PBS verdünnt (1:200 (v/v)). Das Zytoplasma der Zellen wird durch den Farbstoff „CellTracker“ grün angefärbt. Anschließend wurde die Platte für 30 Minuten bei 37°C und Dunkelheit inkubiert. Der Farbstoff wurde abgesaugt, pro Well durch $500\mu\text{l}$ Medium ersetzt und erneut für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte erneut ein zweimaliger Waschvorgang und daraufhin die Fixierung. Hierbei wurden die Zellen für 10 Minuten bei 4°C und Dunkelheit inkubiert, nachdem $250\mu\text{l}$ eiskaltes Methanol pro Well pipettiert wurde. Nach dieser Inkubation und sorgfältigem Waschen wurden pro Well $500\mu\text{l}$ des Farbstoffs „DAPI“ hinzugefügt. Zuvor wurde eine 1ng/ml „DAPI“ – Farbstoff Lösung (1:1000 (v/v) aus einer 1mg/ml Stock Lösung in PBS verdünnt) hergestellt. DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) besitzt eine hohe Affinität zu DNA und färbt daher bei einem Absorptionsmaximum von 405nm den Zellkern blau an. Erneute Inkubation für 10 Minuten bei 4°C und Dunkelheit. Nach einem letzten Waschvorgang wurden die Kammern von dem Objektträger entfernt und der Objektträger sofort mit „Fluorescence Mounting Medium“ und einem Deckglas abgedeckt.

Die Zweite der beiden 8 – well – tissue – chambers wurde nach 24 stündiger Inkubation bei 37°C mit entsprechenden 5 – ALA Konzentrationen der Fibroblasten-1 (SIEHE TABELLE 6) versetzt. Nach weiterer Inkubation für 4 Stunden bei 37°C wurde die Platte für 2000 Sekunden (Maximalbelichtungsdauer) belichtet. Die Platte wurde weitere 14 Stunden inkubiert und danach entsprechend

oben genanntem Verfahren mit den Farbstoffen „CellTracker“ und „DAPI“ gefärbt und fixiert.

Beide Platten wurden nach Färbung und Fixierung sofort mithilfe des Fluoreszenzmikroskops „Fluovort FS“ mikroskopiert und dokumentiert. Hierbei wurden bei 40-facher Vergrößerung die Kanäle DAPI (Belichtungszeit 150ms) für die Kerndarstellung und der Kanal Cy5 (Belichtungszeit 400ms) für die „CellTracker“ – Färbung des Zytoplasmas verwendet. Die Bilder wurden übereinander gelegt und so entsteht ein Bild, das Zytoplasma und Zellkern verschieden farbig fluoreszierend zeigt. Mithilfe dieses Bildes können Zytoplasmaeinschlüsse innerhalb des Nukleus beziehungsweise Kernfragmente innerhalb des Zytoplasmas detektiert werden.

2.2.7 Photodynamische Therapie

Zur photodynamischen Therapie (PDT) wurden die zu behandelnden Zellen in Well – Platten ausgesät und 24h in Kultur genommen, bis sie am Wellboden anheften. Nach 24h wurden PVNS-1 bzw Fibroblasten-1 Zellen mit zuvor ermittelten 5 – ALA Konzentrationen beimpft und weitere 4 Stunden inkubiert. Die Platten wurden anschließend aus 16 – 17 cm Entfernung (ermittelte Entfernung *siehe* 2.2.2.2.) belichtet (ABBILDUNG 17 & 18). Als Lichtquelle wird in den Experimenten eine handelsübliche Endoskopiellampe LS – 3000X (300W) der Marke MGB endoscopy© verwendet, wie sie auch bei arthroskopischen Operationen zur Anwendung kommt. Sie emittiert weißes, polychromatisches Licht mit einer Leistung von 300Watt. Im Rahmen dieser Arbeit werden 3 Belichtungszeiten genutzt und untersucht: 300 Sekunden (→ 5 Min), 1000 Sekunden (→ 16 Min 40 Sek) & 2000 Sekunden (→ 33 Min 20 Sek). Anschließend wird anhand der zuvor genannten Assays die Vitalität der Zellen nach der PDT evaluiert.

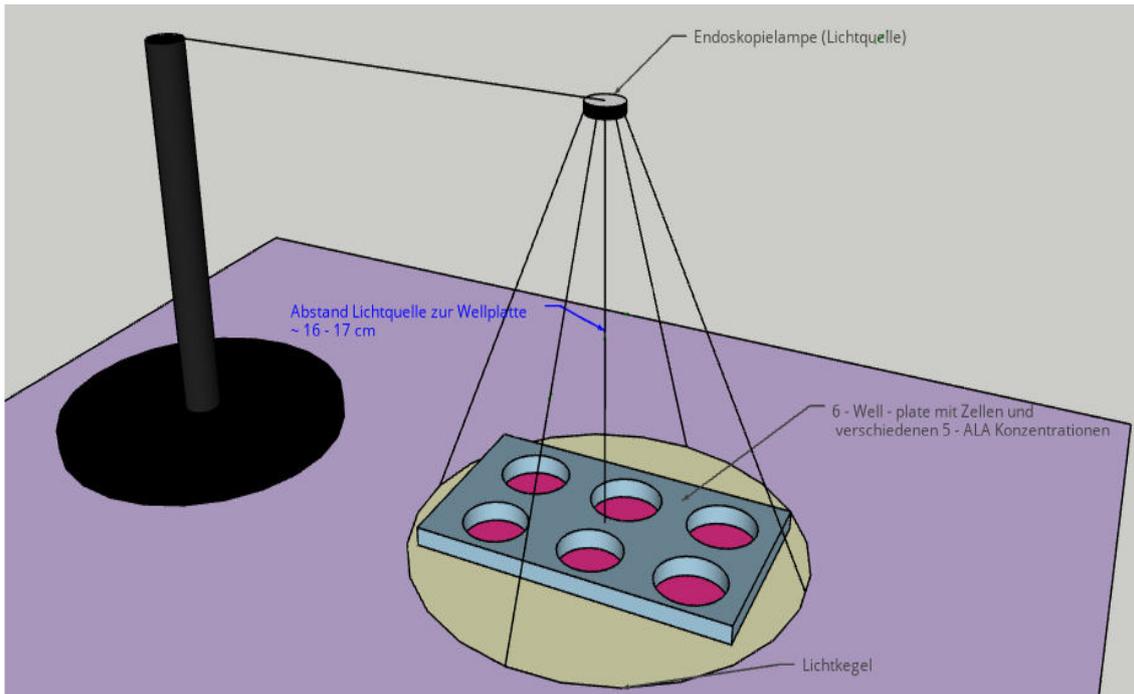


Abbildung 17: Schemadarstellung der PDT in dieser Dissertation (angefertigt durch Felix Diel am 14.07.2019)

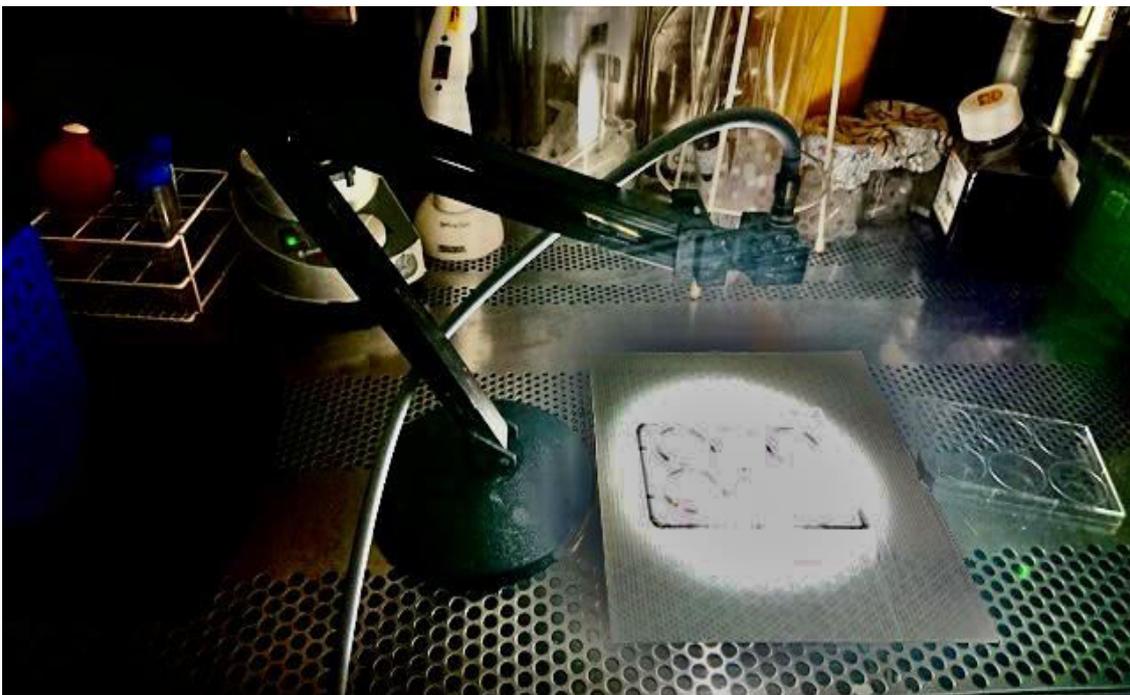


Abbildung 18: Versuchsaufbau der PDT mit Belichtung einer 6 Well – plate aus 16,5cm Entfernung (angefertigt durch Felix Diel, 20.01.19)

3 Ergebnisse

3.1 Migrations – Assay

3.1.1 Migration der PVNS-1 Zellreihe

Die gemessenen Mittelwerte der durchgeführten Experimente sind in ABBILDUNGEN 19 - 22 graphisch dargestellt. Die Distanz der Zellpopulationen in μm in Abhängigkeit von entsprechenden Photosensitizer Konzentrationen und Belichtungsdauern aufgetragen. Ein flacher Balken repräsentiert im Diagramm eine geringe Distanz der Zellverbände zueinander und entsprechend eine höhergradige Migration.

Wie in den ABBILDUNGEN 19 - 22 ersichtlich, fand bei der Zellreihe PVNS-1 bei allen Konzentrationen und allen Belichtungsdauern und dem in dieser Dissertation gewählten cut – off Wert ($200\mu\text{m}$) eine signifikante Migration statt. Bei zunehmend höheren Konzentrationen und Belichtungsdauern, reduzierte sich die Migrationsstrecke, jedoch wurde in allen Versuchsansätzen die als signifikant definierte Distanz von $200\mu\text{m}$ überschritten.

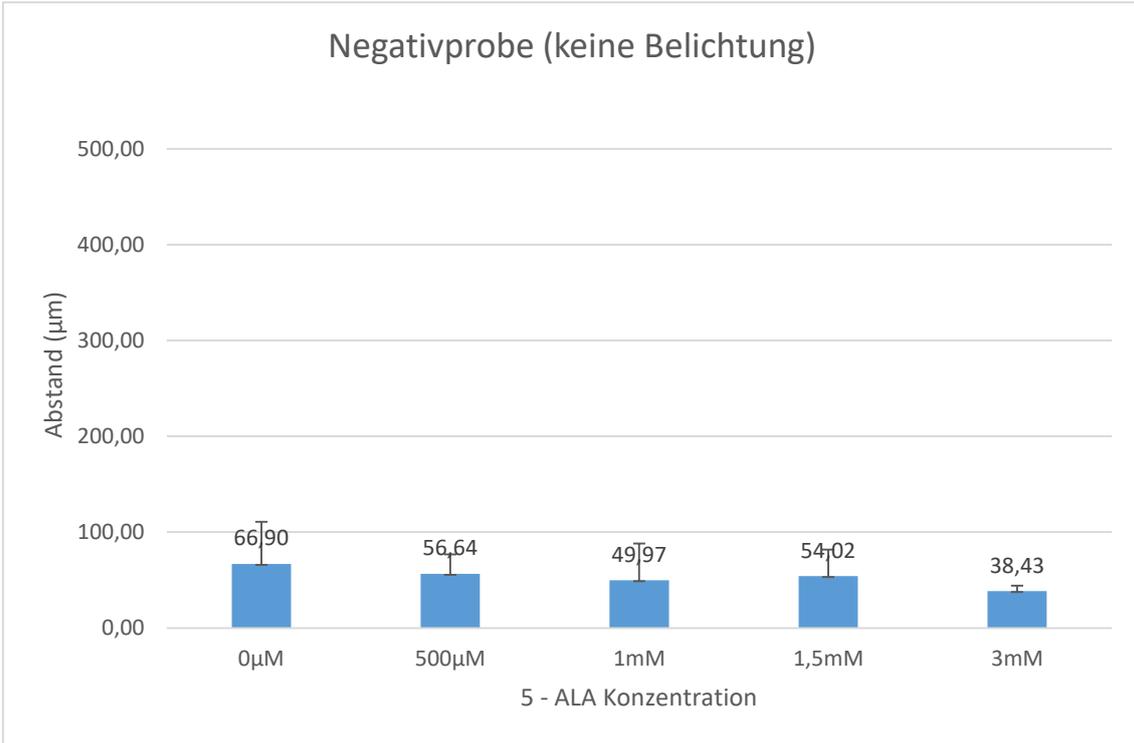


Abbildung 19: Distanz der Zellpopulationen der PVNS-1 ohne Belichtung und 10- stündiger Migration

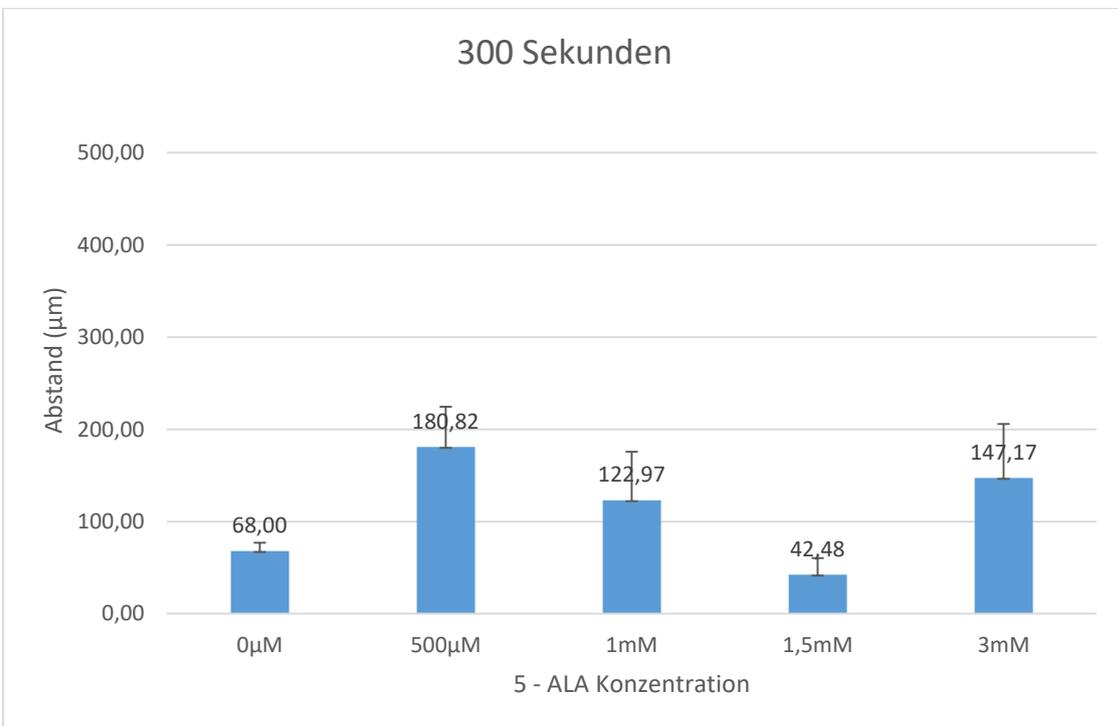


Abbildung 20: Distanz der Zellpopulationen der PVNS-1 nach 300 Sekunden Belichtung und 10- stündiger Migration

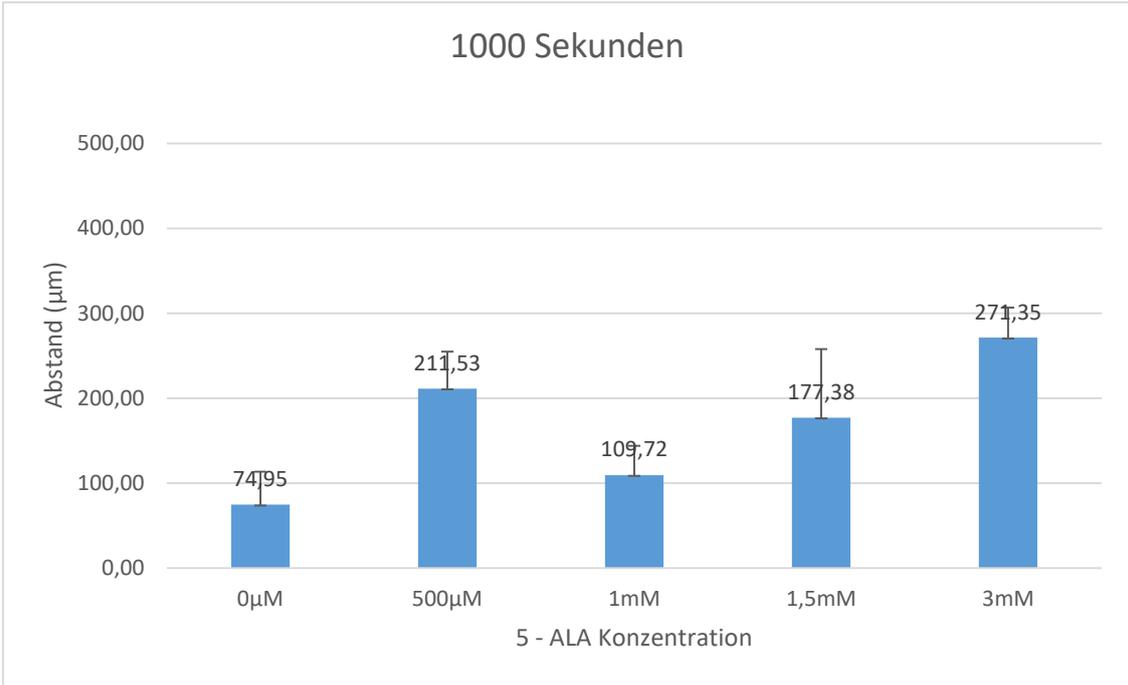


Abbildung 21: Distanz der Zellpopulationen der PVNS-1 nach 1000 Sekunden Belichtung und 10-stündiger Migration

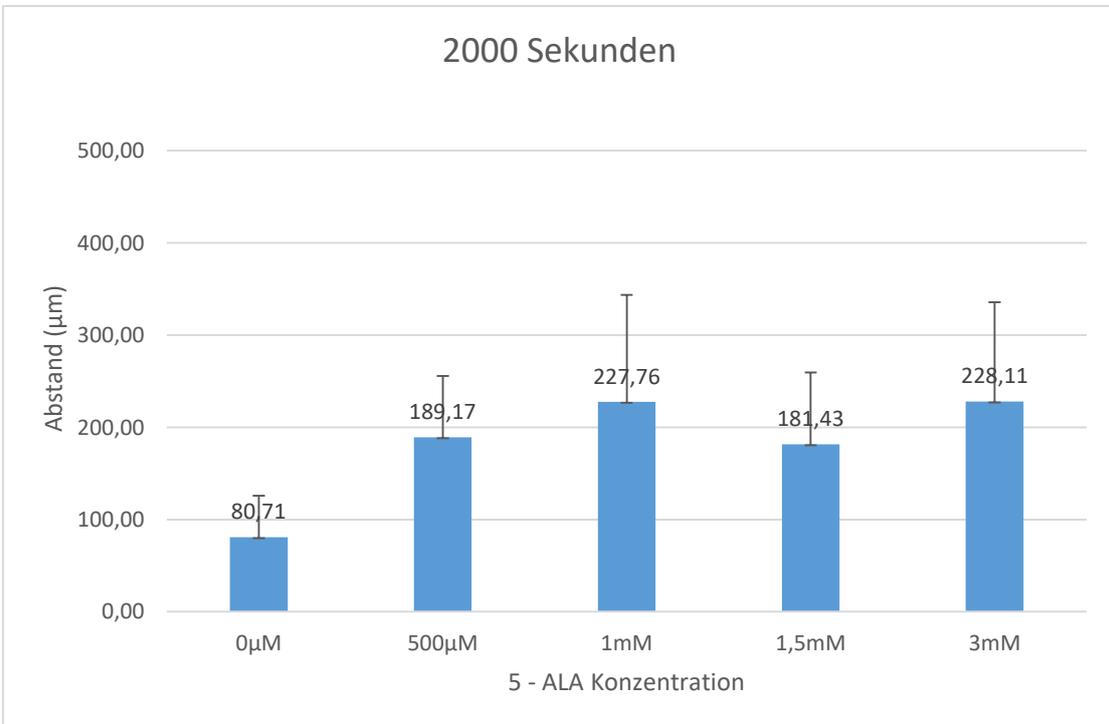


Abbildung 22: Distanz der Zellpopulationen der PVNS-1 nach 2000 Sekunden Belichtung und 10-stündiger Migration

Verglichen zur Referenzgruppe ohne Belichtung, ist zu erkennen, dass sich die Migrationsstrecken der PVNS-1 Zellreihe unter Belichtung reduzierten, wenngleich bei festgelegten cut – off nicht signifikant. Neben der Migrationsdistanz wurde die Morphologie der Zellen bewertet. Wie in ABBILDUNGEN 23 & 24 ersichtlich, stellten sich hierbei morphologische Veränderungen der PVNS-1 Zellen heraus, die in allen drei Versuchsansätzen bei entsprechenden Belichtungsdauern wiederholt bei gleichen 5 – ALA Konzentrationen einsetzen. Diese Morphologieveränderungen fielen hierbei bis auf einzelne Ausnahmen mit der reduzierten Migration zusammen; Zellen die geringfügiger migrierten, waren auch morphologisch verändert.

- Nach 300 Sekunden Belichtung: es bestehen leichte Schwankungen in den Migrationsabständen, morphologisch veränderten sich die Zellen jedoch bei keiner Konzentration.
- Nach 1000 Sekunden Belichtung: ab einer Konzentration von 1,5mM sind wiederholt Morphologie Auffälligkeiten der PVNS-1 Zelllinie sichtbar. Die Migration ist reduziert im Vergleich zur Negativprobe, jedoch nicht signifikant.
- 2000 Sekunden: bei doppelter Belichtungszeit stellen sich bereits ab einer Konzentration von 500µM 5 – ALA deutliche morphologische Auffälligkeiten dar. Diese nehmen bei steigenden 5 – ALA Konzentrationen zu (Vgl. ABBILDUNG 24). Auch die Migrationstendenz reduziert sich weiterhin, jedoch auch hier nicht signifikant.
- Die Zellmigration wurde in dieser Dissertation als signifikant gewertet, wenn die Zellverbände eine Strecke von mehr als 200µm zurücklegten. Bei den PVNS – Zellen fand **bei diesem definierten cut – off** bei jeder 5 – ALA Konzentration beziehungsweise Belichtungsdauer signifikante Migration statt (mehr als 200µm). Es bestehen somit keine signifikanten Migrationsunterschiede zwischen PDT – Probe und Negativprobe.

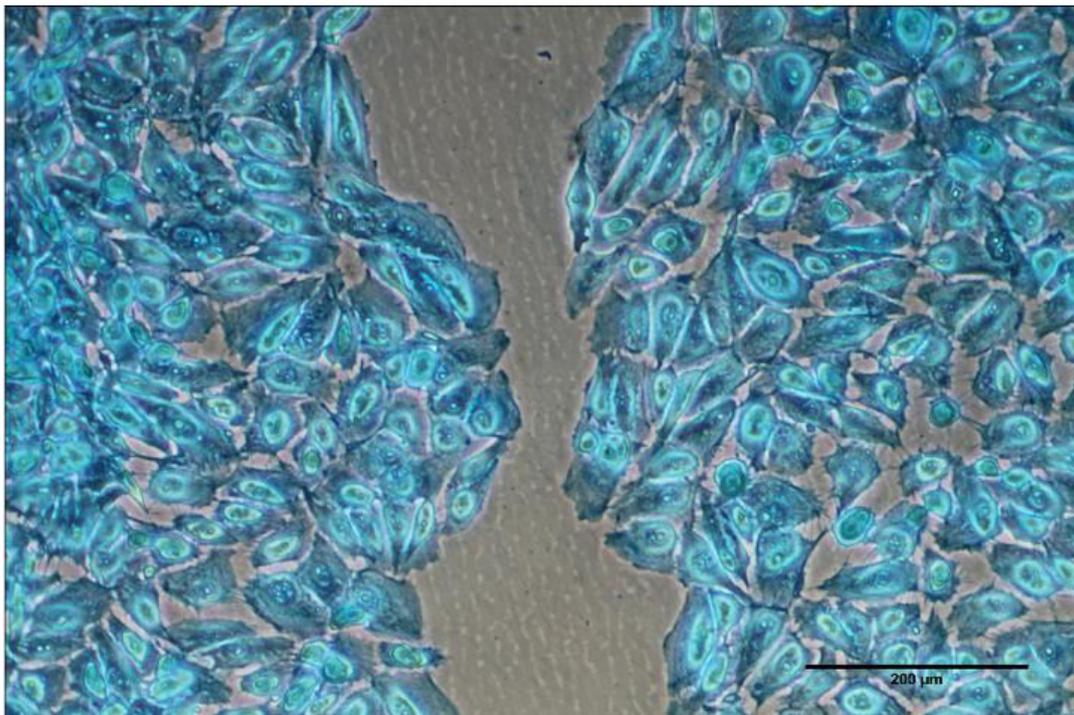
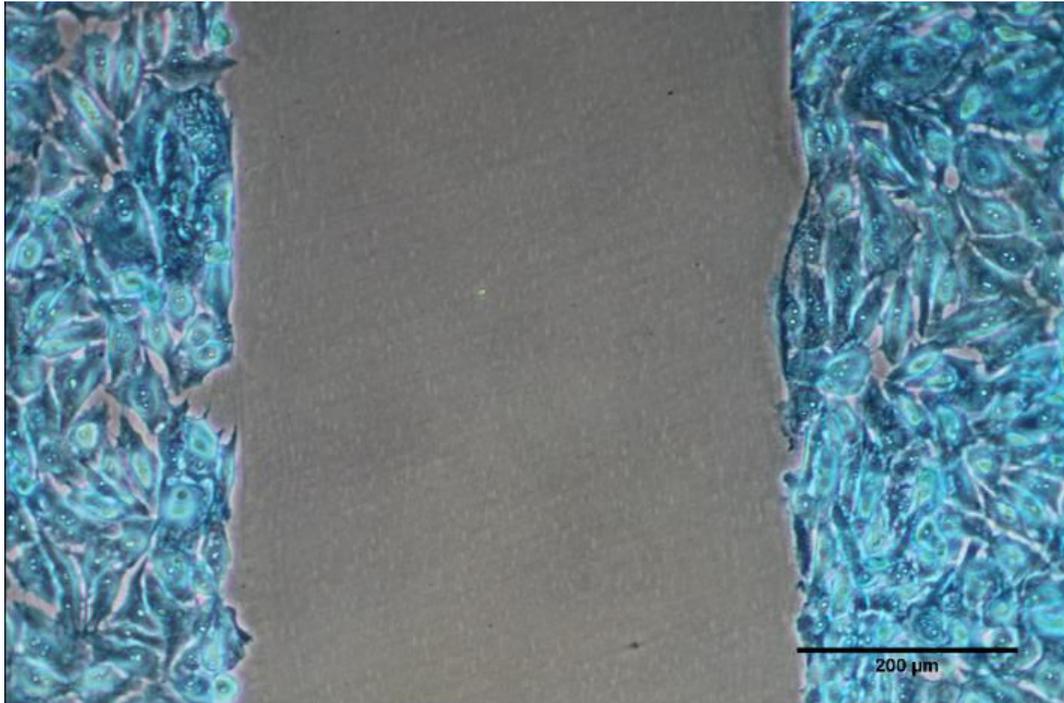


Abbildung 23: Dargestellt sind Migrationen der PVNS-1 Zelllinie nach 10 stündiger Inkubation bei 37°C. Oberes Bild: d0 – Probe ohne Migration. Unteres Bild: Stattgefundene Migration bei 1mM 5 – ALA Konzentration und 300 Sekunden Belichtung im Vergleich dazu. Es ist deutlich sichtbar, dass eine Migration über 200µm stattgefunden hat.

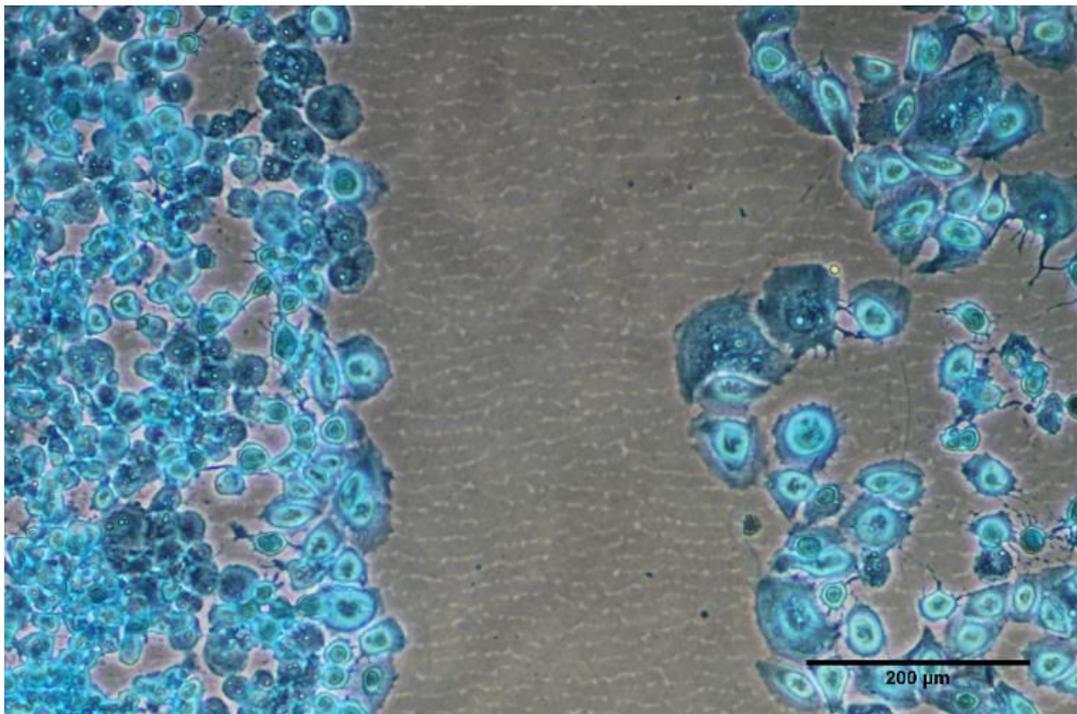
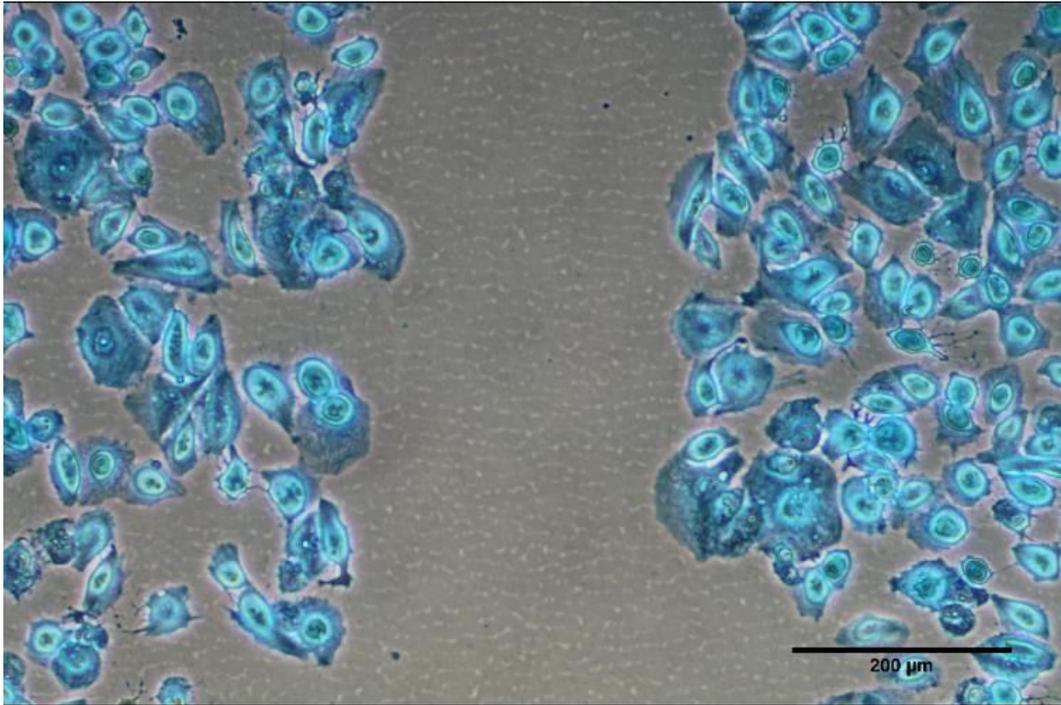


Abbildung 24: beide Bilder nach 3mM 5 – ALA und 2000 Sekunden belichtet. Die PVNS-1 Migration fällt deutlich geringer aus, jedoch noch immer signifikant (>200μm). Die Zellen sind hierbei deutlich morphologisch verändert. Oberes Bild: Auffallend ist die verminderte Zellmenge bei vergrößertem Zellabstand zueinander. Unteres Bild: Vor allem in der linken Zellpopulation verschmälertes Zytoplasma mit Veränderung der Kern – Plasma – Relation zugunsten des Kerns.

3.1.2 Migration der Fibroblasten-1 Zellreihe

Die Migrationsexperimente der Fibroblasten-1 Zellreihe wurden mit den 5 – ALA Konzentrationen – wie in TABELLE 6 angeführt – bei 18 stündiger Migrationszeit durchgeführt.

In den ABBILDUNGEN 25 – 28 sind die ermittelten Werte in Abhängigkeit der Belichtungsdauer aufgetragen. Es stellten sich entsprechende Werte dar, ab welchen keine signifikante Migration mehr stattfindet (200µm oder weniger):

- In der Negativprobe (ABBILDUNG 25), also ohne Belichtung, findet bei allen 5 – ALA Konzentrationen deutlich signifikante Migration statt (>200µm).
- 300 Sekunden Belichtung (Vgl. ABBILDUNG 26): Unterhalb 5 – ALA Konzentrationen von 100µM findet signifikante Migration der Zellpopulationen statt. Die gemessene Distanz liegt bei deutlich unter 300µm und somit wurden über 200µm durch die Zellverbände zurückgelegt. Bei einer Konzentration von 100µM ist zu sehen, dass die Migration nicht mehr die 200µm Grenze erreicht, es findet somit keine signifikante Migration mehr statt. Ab einer Konzentration von 250µM 5 – ALA vergrößert sich der Abstand der Zellpopulationen im Vergleich zur Referenz (500µm bei Migrationsbeginn).
- Auch bei 1000 bzw. 2000 sekundiger Belichtung (Vgl. ABBILDUNG 27 & 28) tritt das Phänomen auf, dass bei Konzentrationen von 100µM 5 – ALA keine signifikante Migration mehr stattfindet. Ab einer Konzentration von 250µM 5 – ALA vergrößern sich auch hier die Distanz der Zellpopulationen zueinander auf größere Werte als zu Migrationsbeginn (ABBILDUNG 28: 543,94µm bei 250µM und 2000 Sek Belichtung; 538µm bei 500µM 5 – ALA und 2000 Sek Belichtung)

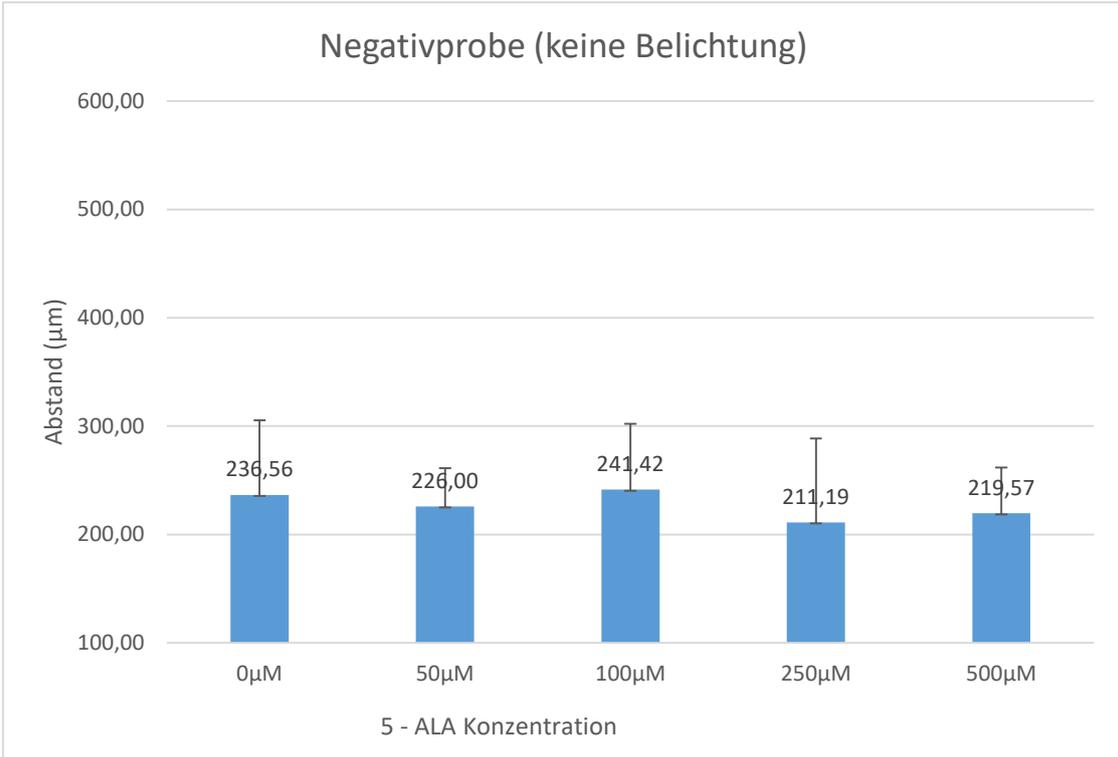


Abbildung 25: Distanz der Zellpopulationen der Fibroblasten-1 ohne Belichtung und 18 stündiger Migration

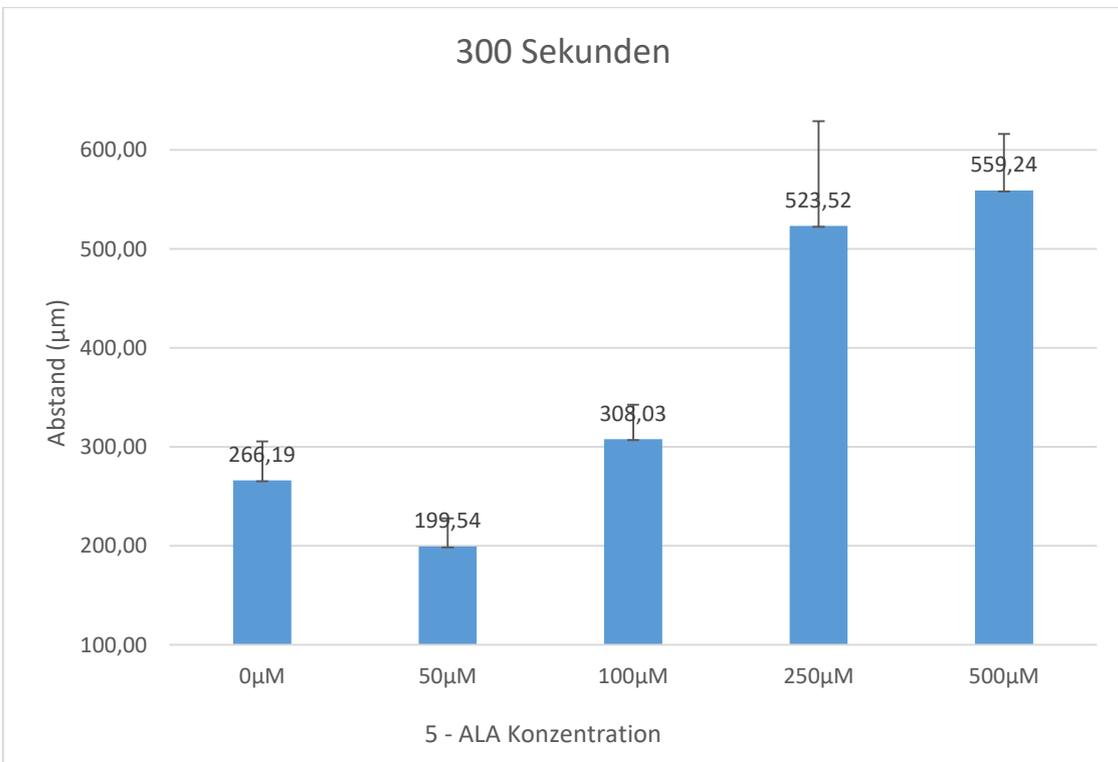


Abbildung 26: Distanz der Zellpopulationen der Fibroblasten-1 nach 300 Sekunden Belichtung und 18 stündiger Migration

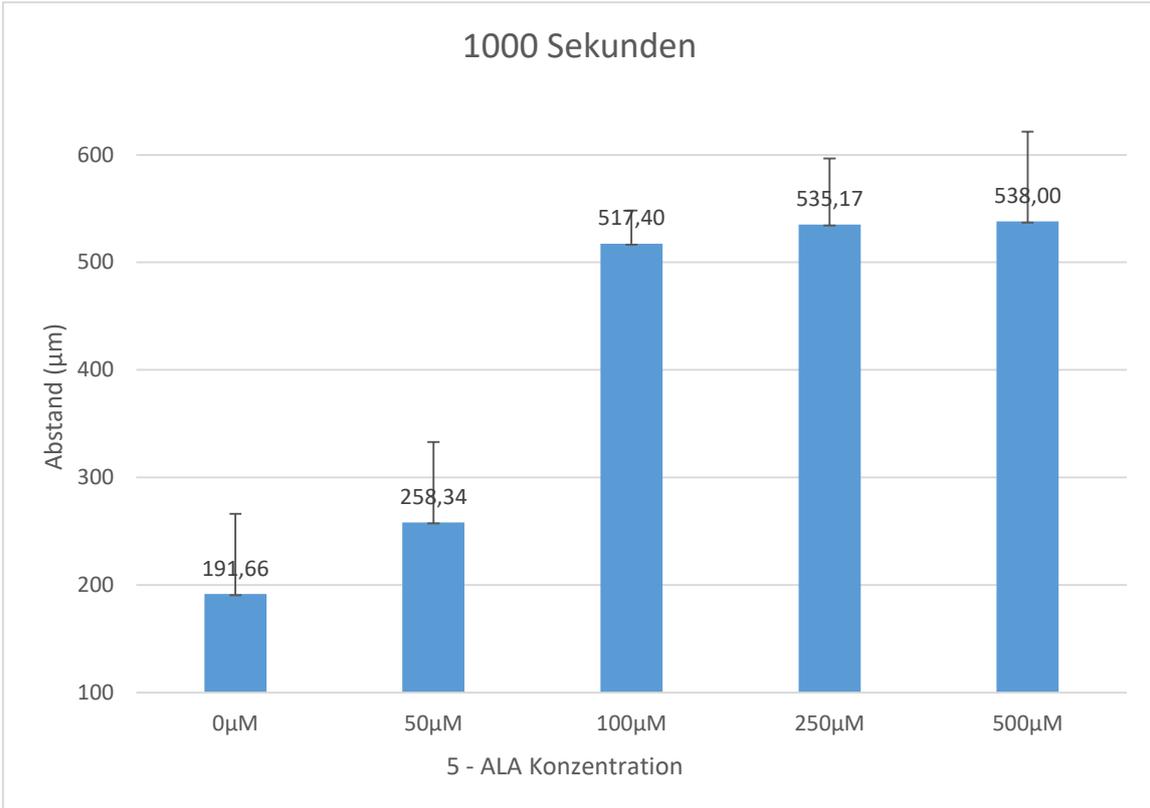


Abbildung 27: Distanz der Zellpopulationen der Fibroblasten-1 nach 1000 Sekunden Belichtung und 18 stündiger Migration

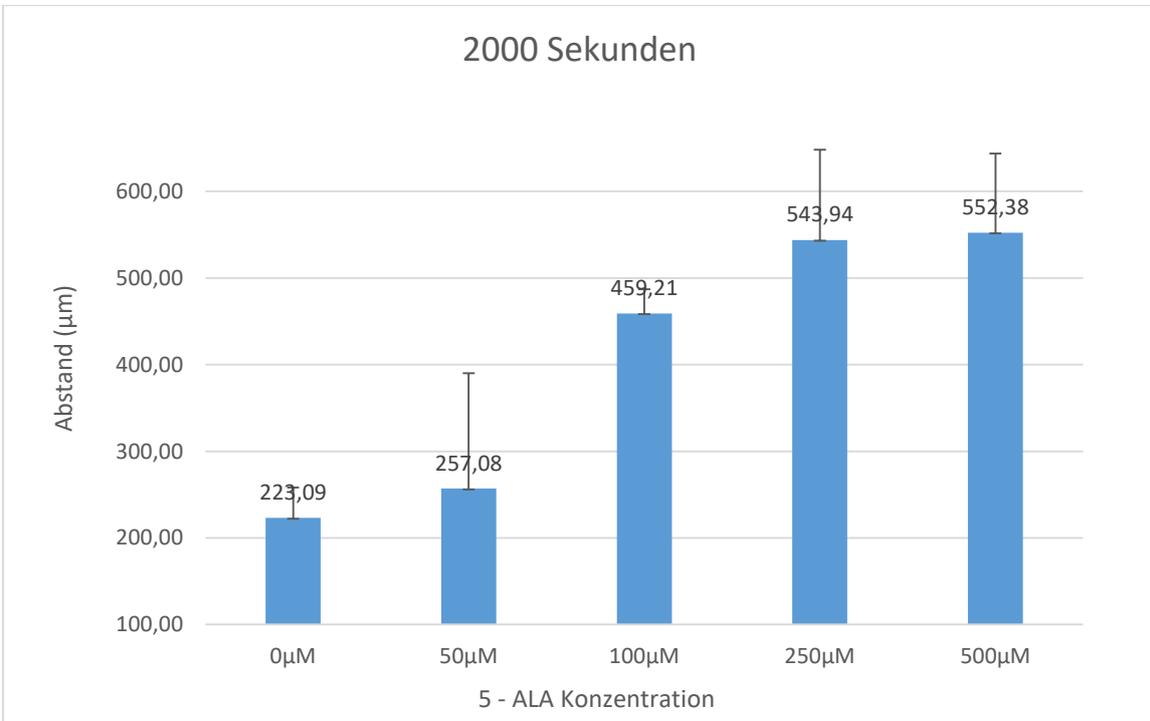


Abbildung 28: Distanz der Zellpopulationen der Fibroblasten-1 nach 2000 Sekunden Belichtung und 18 stündiger Migration

Parallel zur verringerten Migration der Zellen, zeigte sich die Veränderung der Morphologie. Die Zellzahl reduzierte sich und bei einigen Zellen zeigte sich gehäuft ein pyknotischer Zellkern. Diese morphologischen Veränderungen traten bereits bei Konzentrationen von 100µM und 300 Sekunden Belichtung auf. Bei höheren Belichtungsdauern und 5 – ALA Konzentrationen zeigte sich eine zunehmende Tendenz. In ABBILDUNG 29 sind Zellen der Fibroblasten-1 Reihe mit physiologischer Morphologie dargestellt, die bei 300 Sekunden Belichtung und 50µM 5 – ALA signifikant migrierten und nach PDT auch morphologisch dem Zustand vor Therapie entsprachen.

Im Gegensatz dazu ist in ABBILDUNG 30 die Fotografie nach 250µM 5 – ALA und 2000 Sekunden Belichtung dargestellt. Es sind deutlich die Verringerung der Zellzahl und Zelldichte sowie der verschmälerte Zytoplasmasaum der Zellen zu sehen. Darüber hinaus wirken die Zellkerne der Fibroblasten-1 verkleinert. Die Zellpopulationen entfernten sich voneinander, von ihrem Ausgangswert von 500µm zu Migrationsbeginn auf 543,94µm nach PDT.

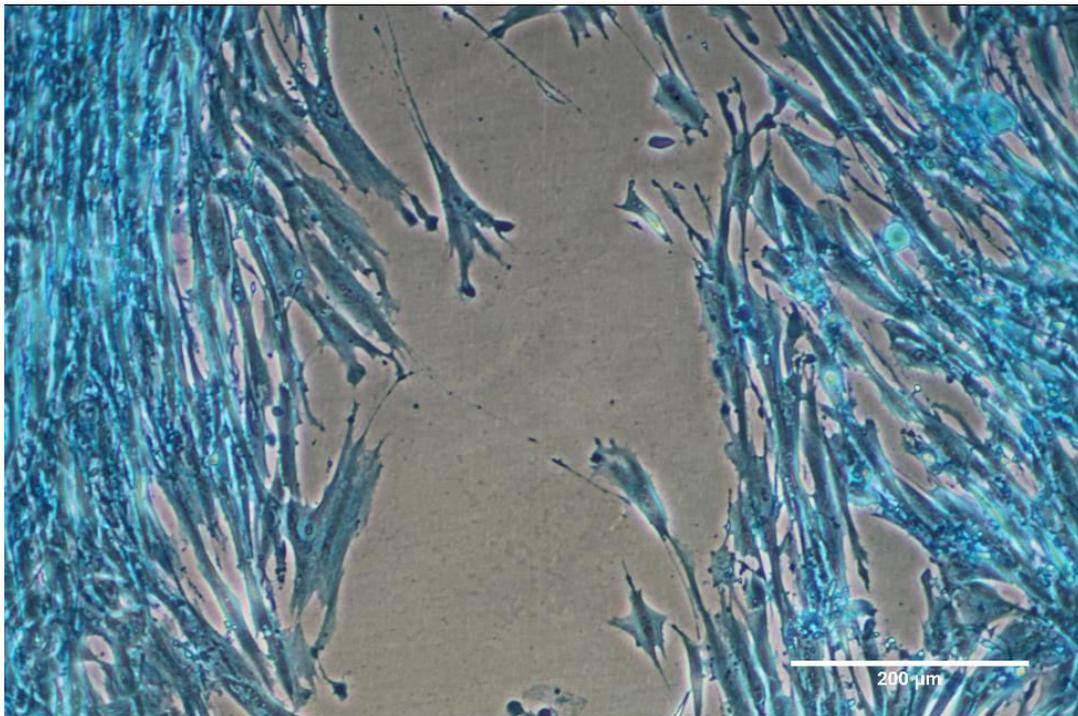
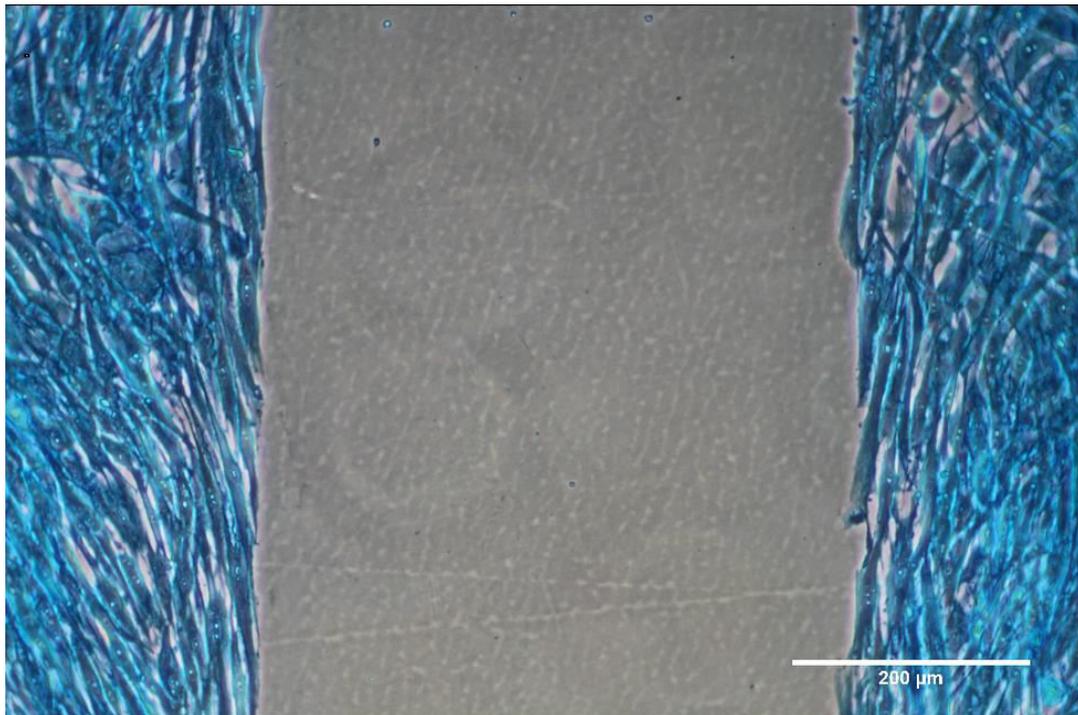


Abbildung 29: Dargestellt sind Migrationen der Fibroblasten-1 nach 18 stündiger Inkubation bei 37°C. Oberes Bild: d0 – Probe ohne Migration. Unteres Bild: Stattgefundene Migration bei 50µM 5 – ALA Konzentration und 300 Sekunden Belichtung im Vergleich dazu. Es ist deutlich sichtbar, das über 200µm ausmigriert wurde und die Zellen morphologisch den unbehandelten Zellen ähneln.

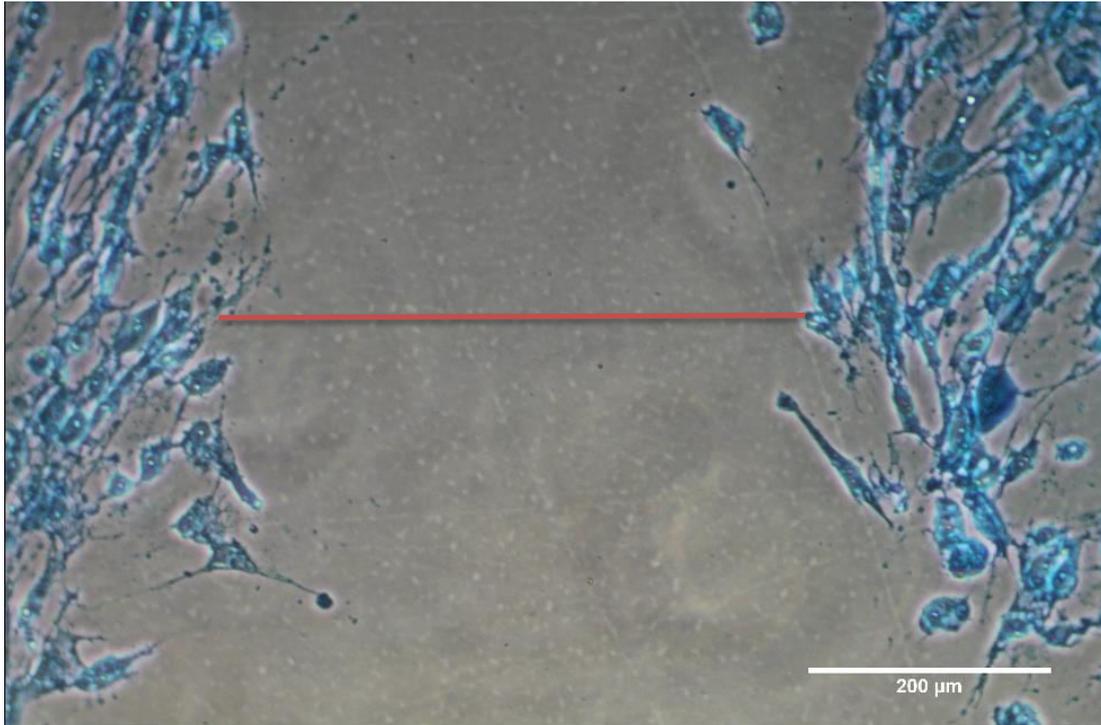


Abbildung 30: Fibroblasten-1 Migration mit einer 250 μ M 5 – ALA Konzentration und 2000 Sekunden belichtet. Es fand keine signifikante Migration statt. Im Vergleich zur d0 – Probe mit 500 μ m Distanz hat sich diese sogar auf 543,94 μ m (rote Linie) vergrößert. Die Zellen sind ebenfalls deutlich morphologisch verändert. Auffallend ist die verminderte Zellmenge bei vergrößertem Zellabstand zueinander. Darüber hinaus eine Veränderung der Kern – Plasma – Relation zugunsten des Kerns.

3.2 MTT – Assay

Die MTT – Assays wurden bei beiden Zellreihen nach den Migrations – Untersuchungen durchgeführt. Für jede Zellreihe wurde das Experiment in Tripletten durchgeführt und die resultierenden Werte gemittelt.

3.2.1 MTT – Assay der PVNS-1 Zellreihe

Die MTT – Assay Ergebnisse der PVNS-1 Zellen wurden gemittelt und die Daten graphisch dargestellt. Es ergab sich, dass die PVNS-1 Zellen bei allen untersuchten 5 – ALA Konzentrationen beziehungsweise jeder verwendeten Belichtungsdauer das MTT Reagenz kontinuierlich in Formazan umsetzten.

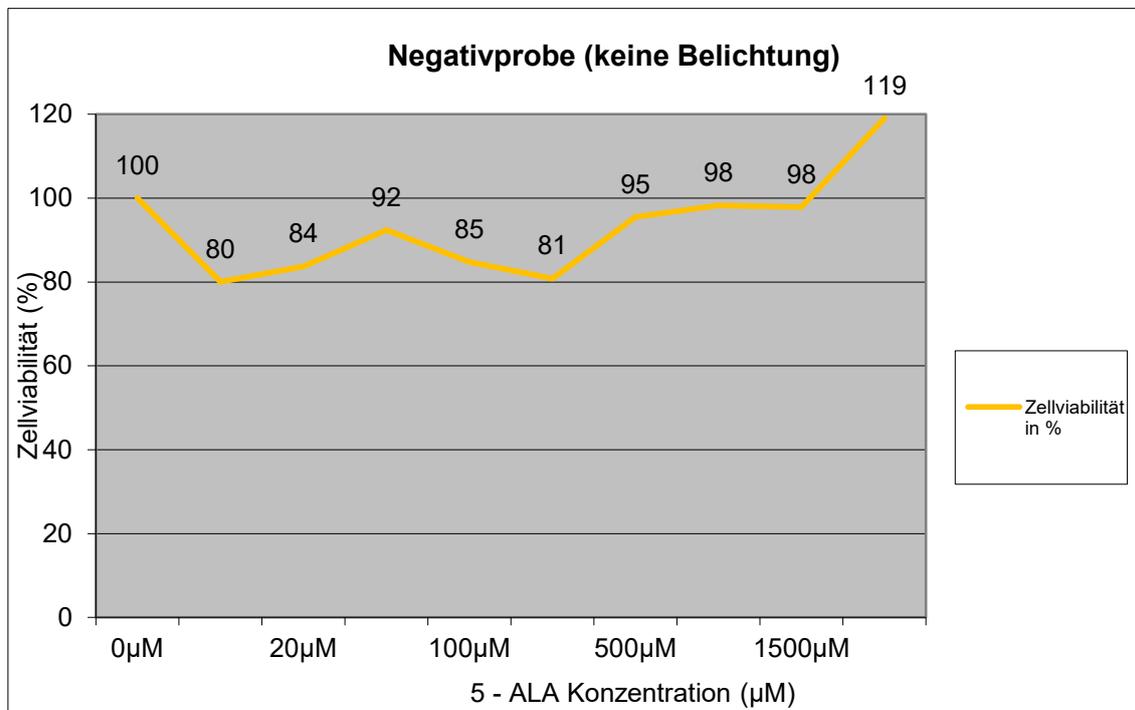


Abbildung 31: Prozentuale Zellviabilität der PVNS-1 Zellen unbelichtet im MTT – Assay

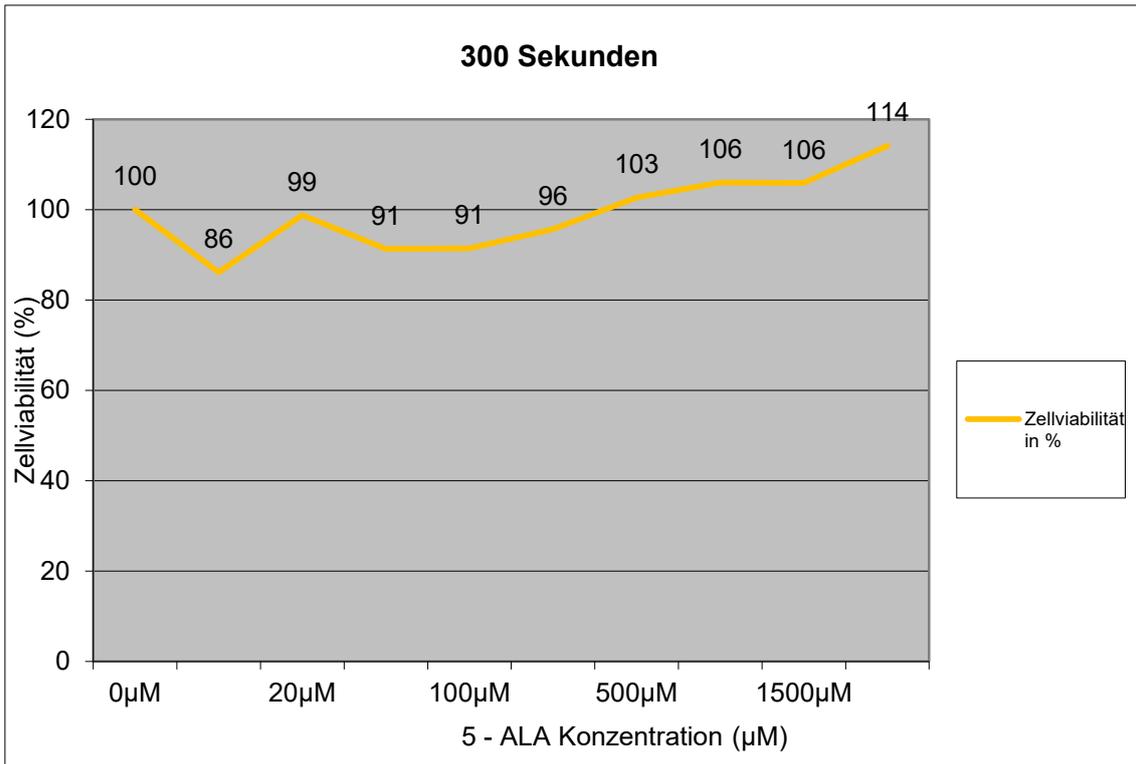


Abbildung 32: Prozentuale Zellviabilität der PVNS-1 Zellen nach 300 Sekunden Belichtung im MTT – Assay

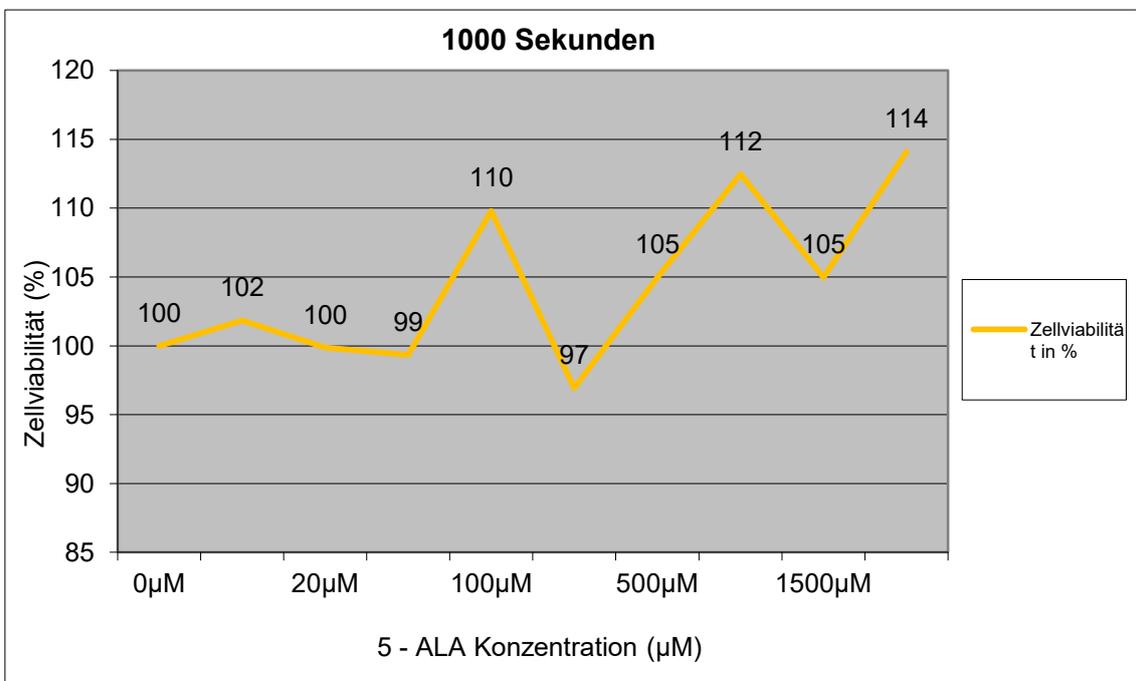


Abbildung 33: Prozentuale Zellviabilität der PVNS-1 Zellen nach 1000 Sekunden Belichtung im MTT – Assay. Der Einbruch bei 250µM bzw. 1500µM gilt unter dem Vorbehalt zu betrachten, dass auch hier die Viabilität im niedrigsten Fall noch bei 97 % liegt.

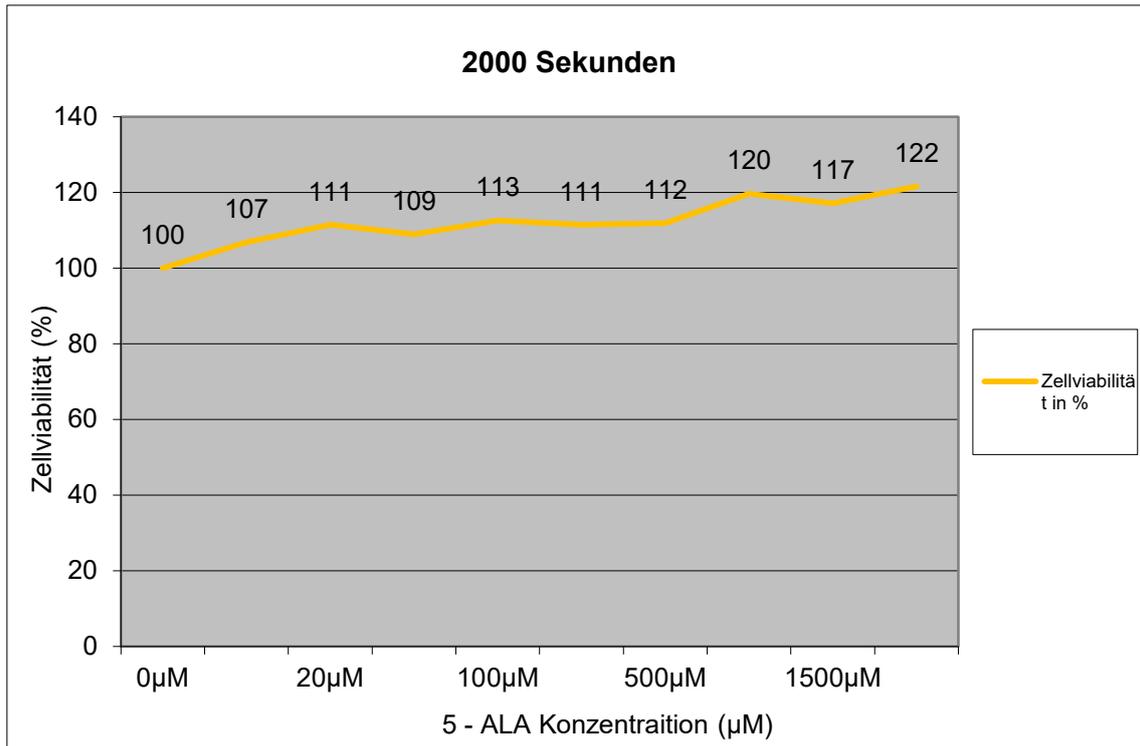


Abbildung 34: Prozentuale Zellviabilität der PVNS-1 Zellen nach 2000 Sekunden Belichtung im MTT – Assay

Auf ABBILDUNG 31 ist ersichtlich, dass die PVNS-1 Zellen bei 10µM 5 –ALA ohne Belichtung mit 80% im Vergleich zur Referenzprobe ihre minimalen Absorptionswerte und somit errechneten Viabilitätswerte erreichen. Über alle 5 – ALA Konzentrationen halten die PVNS-1 Zellen ihre enzymatische MTT – Reagenz Umsetzung mit leichten Schwankungen jedoch oberhalb von 80%.

- 300 Sekunden: In ABBILDUNG 32 sind die Absorptionsmaxima in % im Verhältnis zur Referenzgruppe (unbelichtet mit 0µM 5 – ALA) aufgetragen. Hier ist zu erkennen, dass die PVNS über steigende 5 – ALA Konzentrationen die Tendenz haben, mehr MTT Reagenz in Formazan umzusetzen. Die errechnete Viabilität steigt mit zunehmender 5 – ALA Konzentration.
- 1000 Sekunden: bei 1000 sekundiger Belichtung (ABBILDUNG 33) fällt auf, dass bei 250µM 5 – ALA bzw. 1500µM ein vermeintlicher Einbruch der Viabilität zu sehen ist. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass auch diese Werte im niedrigsten Fall noch bei 97% der Referenzabsorption liegen. Es muss berücksichtigt werden, dass es sich im Gra-

phen bei 250µM nur um eine einzelne Messung handelt (250µM 5 – ALA wurden nur im ersten Versuchsansatz verwendet, anschließend nur noch die Konzentrationen aus TABELLE 7). Abgesehen davon stellt sich auch hier, wie bereits bei 300 Sekunden Belichtung eine steigende Absorptionstendenz und somit errechnete Zellviabilität der PVNS-1 mit zunehmenden 5 – ALA Konzentrationen dar.

- 2000 Sekunden: Auch bei 2000 Sekunden Belichtung (ABBILDUNG 34) zeigt sich gleichermaßen wie bei den übrigen Belichtungsdauern ein Trend, der mit steigenden 5 – ALA Konzentrationen zunehmende prozentuale Absorptionswerte der PVNS-1 Zellen erreicht. Die errechneten Viabilitätswerte liegen hier konstant über 100% des Ausgangswertes (ohne Belichtung und 5 – ALA Zusatz).

Im Methodikteil (siehe 2.2.4.) wurde bereits beschrieben, dass bei der PVNS-1 Zellreihe zwei zusätzliche Experimentalansätze durchgeführt wurden. Die Ergebnisse dieser beiden Versuchsansätze sind jeweils in obige Graphen eingepflegt und zeigten vergleichbare Ergebnisse wie die echten Versuchsansätze. Daher wurden die Ergebnisse anschließend gemeinsam interpretiert.

3.2.2 MTT – Assay der Fibroblasten-1 Zellreihe

Für die optimale Auswertung des MTT Assays der Fibroblasten-1 Zellreihe sind in den folgenden Graphen insbesondere die 5 – ALA Konzentrationswerte entsprechend TABELLE 6 von Interesse (5 – ALA Konzentrationen bei Fibroblasten-1: 0µM, 50µM, 100µM, 250µM, 500µM). Daher müssen in den unten stehenden Graphen die Kurvenverläufe bei Konzentrationen unterhalb von 50µM bzw. oberhalb von 500µM 5 – ALA unter dem Vorbehalt betrachtet werden, dass diese Ergebnisse nur aus einer Messung (anfängliche Ermittlung der verwendeten Konzentrationen) resultieren.

In den MTT – Assays der Fibroblasten-1 Zellen kann ein Trend dargestellt werden, wie er bereits in den Migrations – Untersuchungen auftrat. Die Messwerte zeigen, dass oberhalb eines 5 – ALA Konzentrationswertes von 100µM und bereits 300 Sekunden Belichtung, gemessene Absorptionswerte signifikant absin-

ken und bei 500 μ M über alle Belichtungsdauern hinweg den Nadir erreichen (Vgl. ABBILDUNGEN 35 – 38). Bei Werten >500 μ M 5 – ALA steigt die errechnete Viabilität der PVNS-1 bei allen Belichtungsdauern erneut signifikant an.

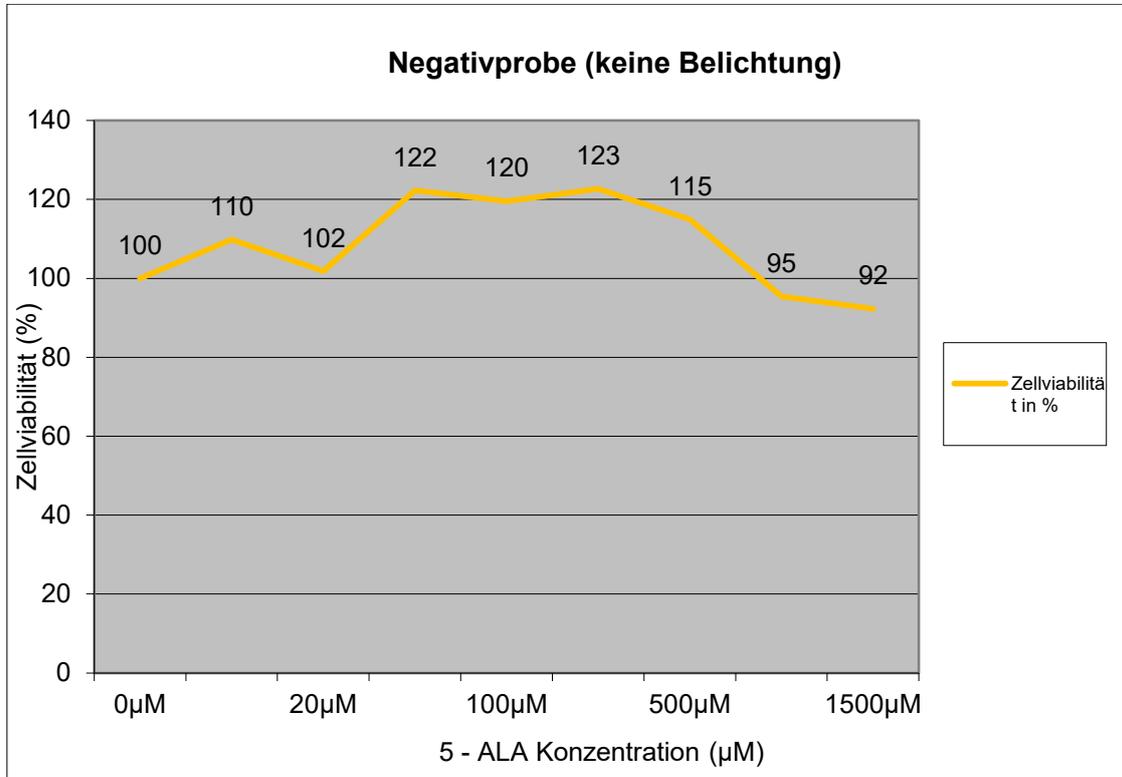


Abbildung 35: Prozentuale Zellviabilität der Fibroblasten-1 Zellen unbelichtet im MTT – Assay

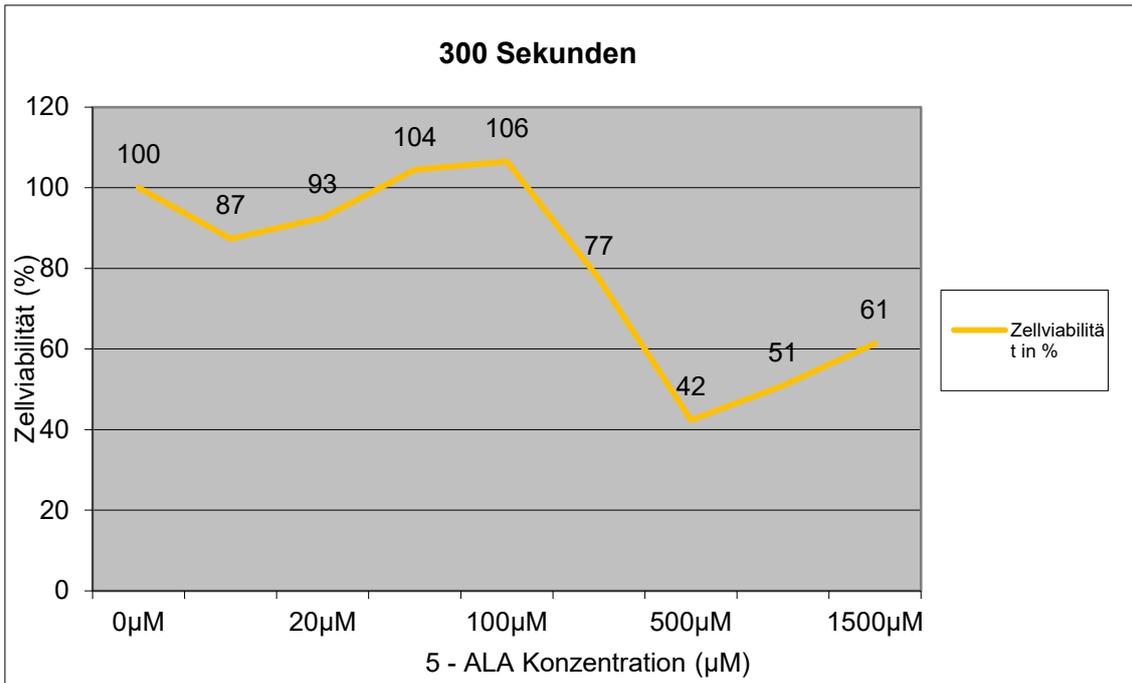


Abbildung 36: Prozentuale Zellviabilität der Fibroblasten-1 Zellen nach 300 Sekunden Belichtung im MTT – Assay

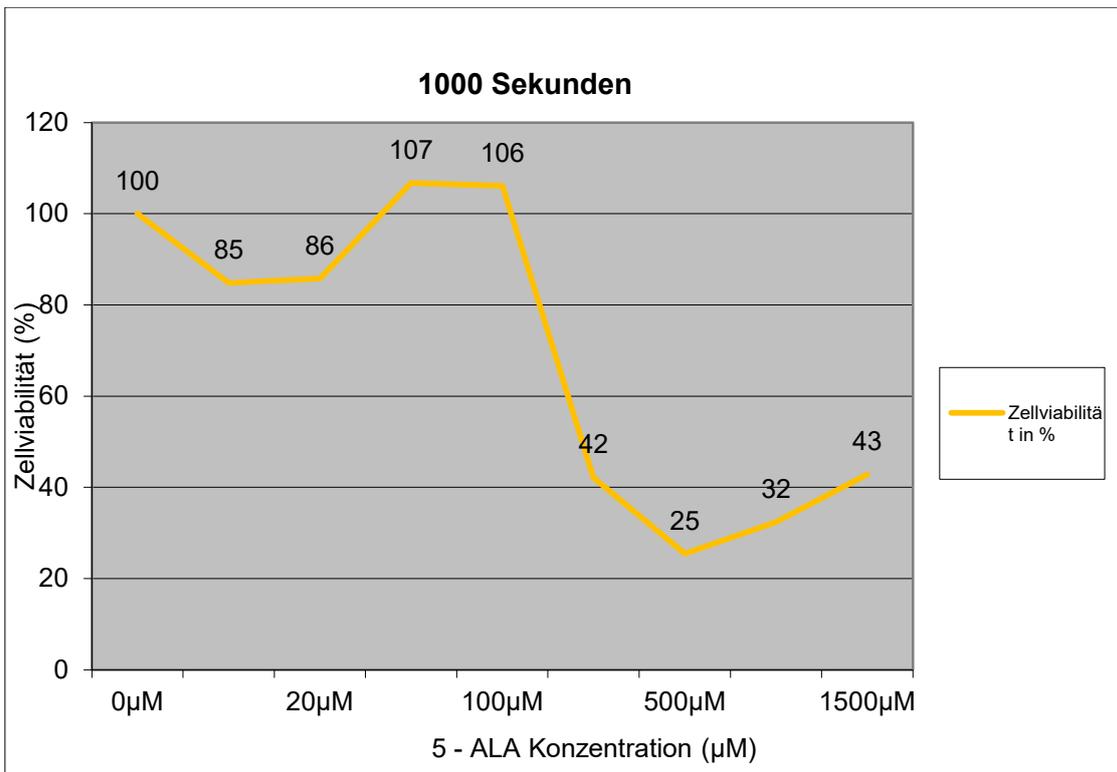


Abbildung 37: Prozentuale Zellviabilität der Fibroblasten-1 Zellen nach 1000 Sekunden Belichtung im MTT – Assay

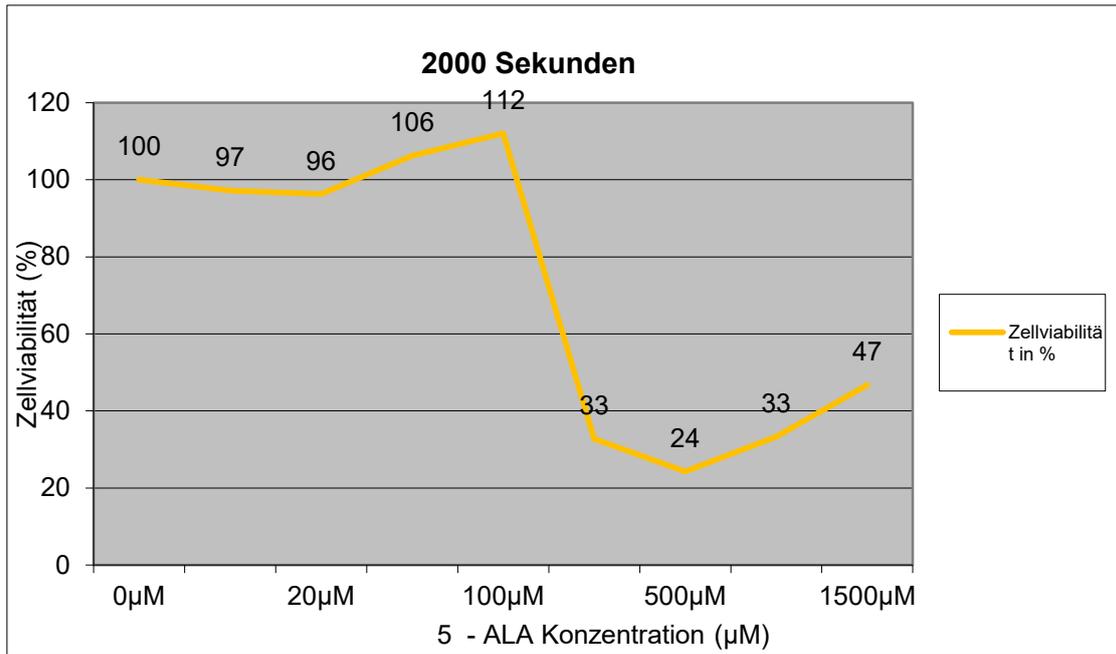


Abbildung 38: Prozentuale Zellviabilität der Fibroblasten-1 Zellen nach 2000 Sekunden Belichtung im MTT – Assay

ABBILDUNG 35 stellt die Situation ohne Belichtung dar. Die Fibroblasten-1 Zellen zeigen hierbei ein recht stabiles Niveau von prozentualen Absorptionswerten in Bezug auf die Referenz. Minimale Absorptionswerte liegen bei 92% der Ausgangsabsorption → errechnete Viabilität von 92%.

- 300 Sekunden Belichtung (Vgl. ABBILDUNG 36): Bis zu einer 5 – ALA Konzentration von 100µM sind die ermittelten Werte auf einem stabilen Niveau im Bereich der Referenz. Ab einer 5 – ALA Konzentration von 250µM ist bereits ein deutlicher Abfall des Viabilitätswertes (77%) festzustellen. Bei 500µM 5 – ALA (Absorption von 42% verglichen zur Referenz) erreicht die Viabilität den Nadir. Bei Konzentrationen >500µM steigt der Wert erneut, erreicht jedoch nicht die Ausgangswerte (maximal 61%).
- 1000 Sekunden (ABBILDUNG 37): Entsprechend den Ergebnissen bei 300 Sekunden Belichtung sind auch hier die Zellreihen bis zu einer 5 – ALA Konzentration von 100µM in ihrer Absorption kaum verändert. Im Bereich von 10µM bzw. 20µM 5 – ALA fallen die Viabilitätswerte auf minimal 85% ab, erreichen bei 50µM jedoch erneut Werte von 107%. Auch hier ist ein deutlicher Abfall der Vitalität bei 250µM auf 42% zu erkennen, der wie

zuvor bei 500µM seinen Nadir mit 25% erreicht. Anschließend steigen bei 1000 bzw. 1500µM 5 – ALA die Absorptionswerte erneut an.

- 2000 Sekunden (ABBILDUNG 38): Auch bei der maximalen Belichtungsdauer der Versuchsansätze stellt sich der Trend der beiden vorherigen Belichtungsdauern dar. Nach stabilen Absorptionswerten bis zu einer 5 – ALA Konzentration von 100µM sinkt die Viabilität bei 250µM auf 33% und erreicht bei 500µM ihren Tiefpunkt von 24% verglichen zur Referenz. Bei Konzentrationen >500µM steigt die Viabilität der Zellen erneut an, erreicht einen maximalen Wert von 47%.

3.3 Viability Assay

Im Folgenden sind die Messwerte der prozentualen Vitalität der Knorpelzellen bei steigenden 5 – ALA Konzentrationen aus 3 Versuchsansätzen gemittelt graphisch dargestellt. Dabei dienen die Knorpelzellen ohne 5 – ALA Zusatz als Referenz und repräsentieren 100% vitale Knorpelzellen zu Versuchsbeginn. Alle weiteren ermittelten Vitalitäten sind zu diesem Referenzwert in Verhältnis gesetzt

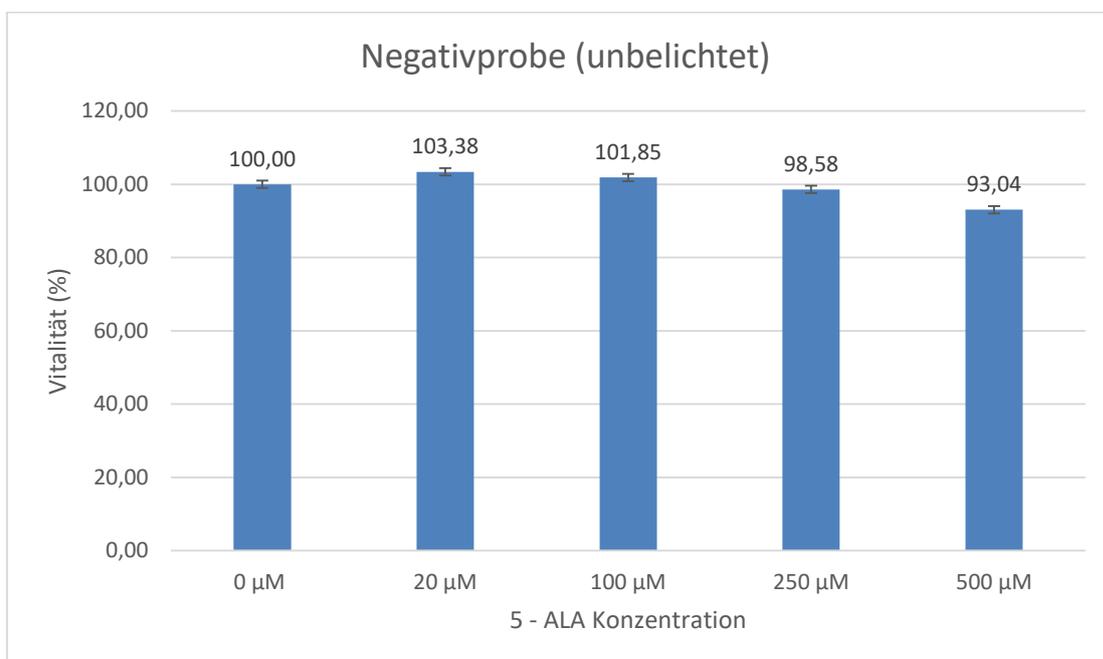


Abbildung 39: prozentuale Vitalität der Knorpelzellen nach 5 – ALA Gabe und ohne Belichtung

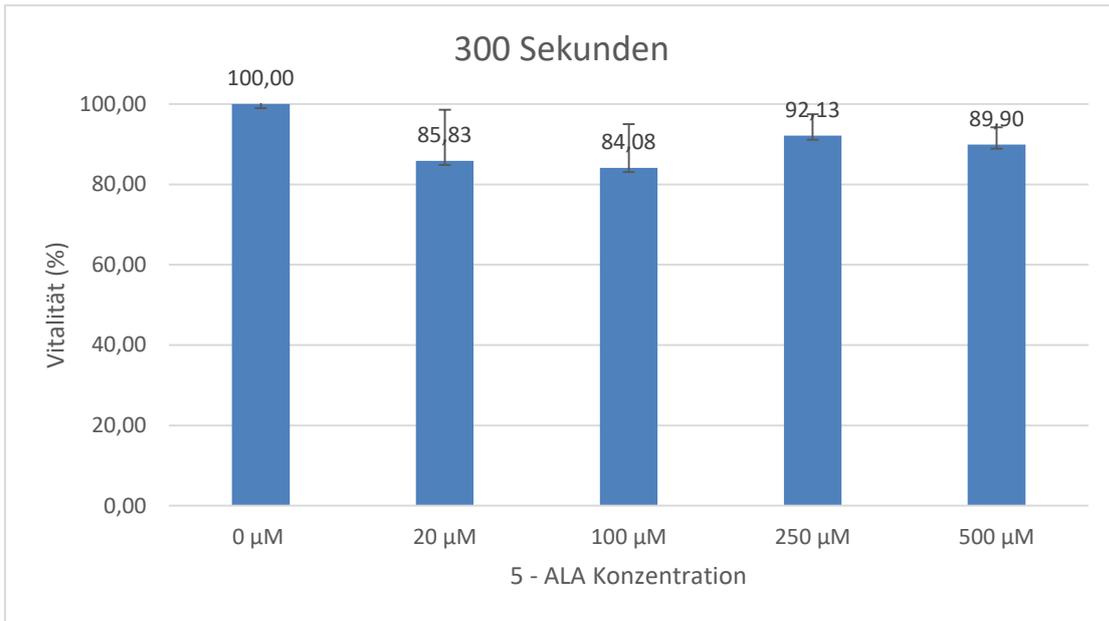


Abbildung 40: prozentuale Vitalität der Knorpelzellen nach 5 – ALA Gabe und 300 Sekunden Belichtung

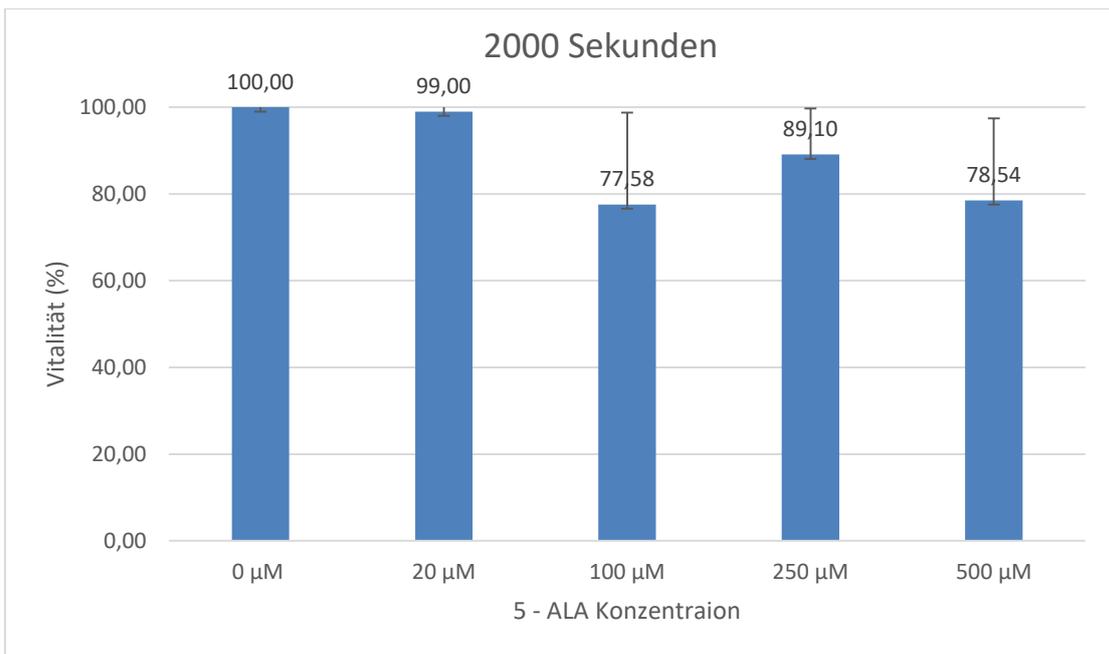


Abbildung 41: prozentuale Vitalität der Knorpelzellen nach 5 – ALA Gabe und 2000 Sekunden Belichtung

In der graphischen Darstellung der prozentualen Vitalität ist ein leicht negativer Trend der Vitalität unter der PDT zu detektieren. Mit steigenden 5 – ALA Konzentrationen und Belichtungsdauern reduziert sich die Vitalität der Knorpelzellen jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,947$). Diese Reduktion der Vitalität ist erst bei 2000 Sekunden Belichtungsdauer und 100µM 5 – ALA deutlich zu be-

obachten. Eine nicht signifikante oder nur minimale Vitalitätsreduktion ist auch in den nichtbelichteten Negativproben zu detektieren (SIEHE ABBILDUNG 39).

Bei 300 bzw. 2000 Sekunden Belichtungsdauer (SIEHE ABBILDUNGEN 40 & 41) ist diese Reduktion bereits deutlicher ausgeprägt. In beiden Fällen scheint die Vitalität bei 100µM 5 – ALA den Nadir zu erreichen (77,58% Vitalität bei 100µM 5 – ALA und 2000 Sekunden Belichtung) und bei 250µM wieder zu steigen.

In der graphischen Darstellung wurden je die gemittelten Werte aus den Versuchstripletts verwendet. Oftmals unterliegt dieser Mittelwert aber großen Standardabweichungen. In einem Versuchsansatz mit bereits stark arthrotischen Knorpel vor Versuchsbeginn liegt die Standardabweichung bei 100µM 5 – ALA und 2000 Sekunden Belichtung bei 21,18%.

3.4 Kernfragmentierung der Fibroblasten-1 Zellreihe

In ABBILDUNG 43 sind bei 250µM bzw. 500µM 5 – ALA Konzentration und 2000 Sekunden Belichtung deutlich zytoplasmatische Einschlüsse als grüne Anteile innerhalb der blau angefärbten Nuklei sichtbar. Diese sind mit den Zytoplasma Einschlüssen in den Fibroblasten-1 Zellen bei der Positivprobe mit Staurosporin vergleichbar (siehe ABBILDUNG 42). Dies ist Hinweis für eine stattgefundene Kernfragmentierung. Kernfragmentierung zählt zu den sicheren Apoptosezeichen und legt die Karyorrhesis der Fibroblasten-1 Zellreihe nach 5 – ALA PDT nah. Somit bestehen starke Hinweise, dass die PDT bei Fibroblasten-1 ab einer Konzentration von 250µM 5 – ALA zytotoxisch wirkt und Apoptose induziert. Von daher wird von nun an in dieser Dissertation ein cut – off Wert für das Einsetzen der Apoptose bei 250µM 5 – ALA festgelegt.

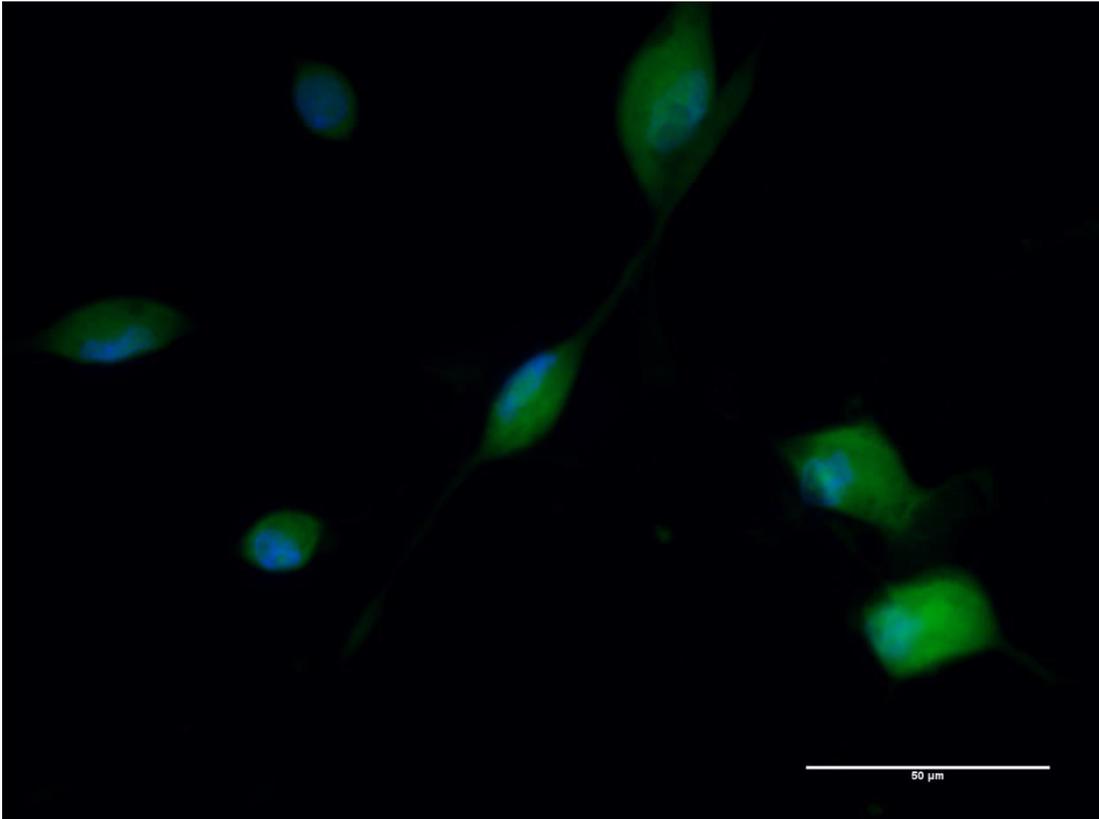


Abbildung 42: Bild der Kernfragmentierung von Fibroblasten-1 Zellen bei Positivprobe mit 500μl Staurosporin (Verdünnung 1:1000 (v/v))

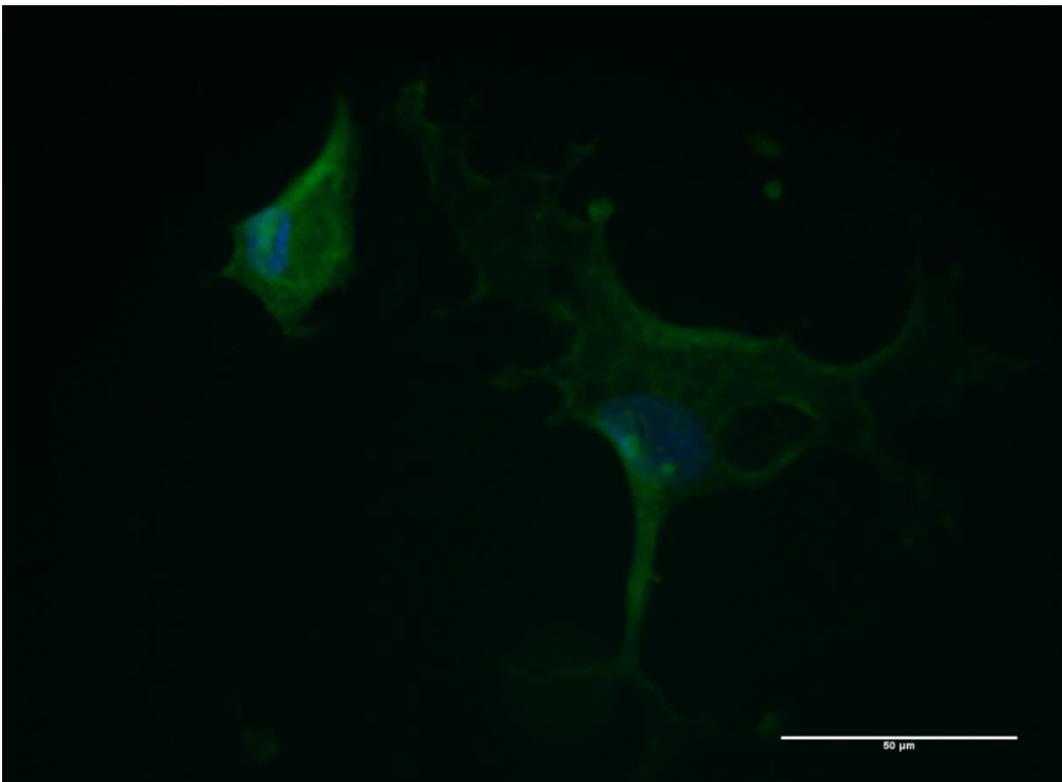
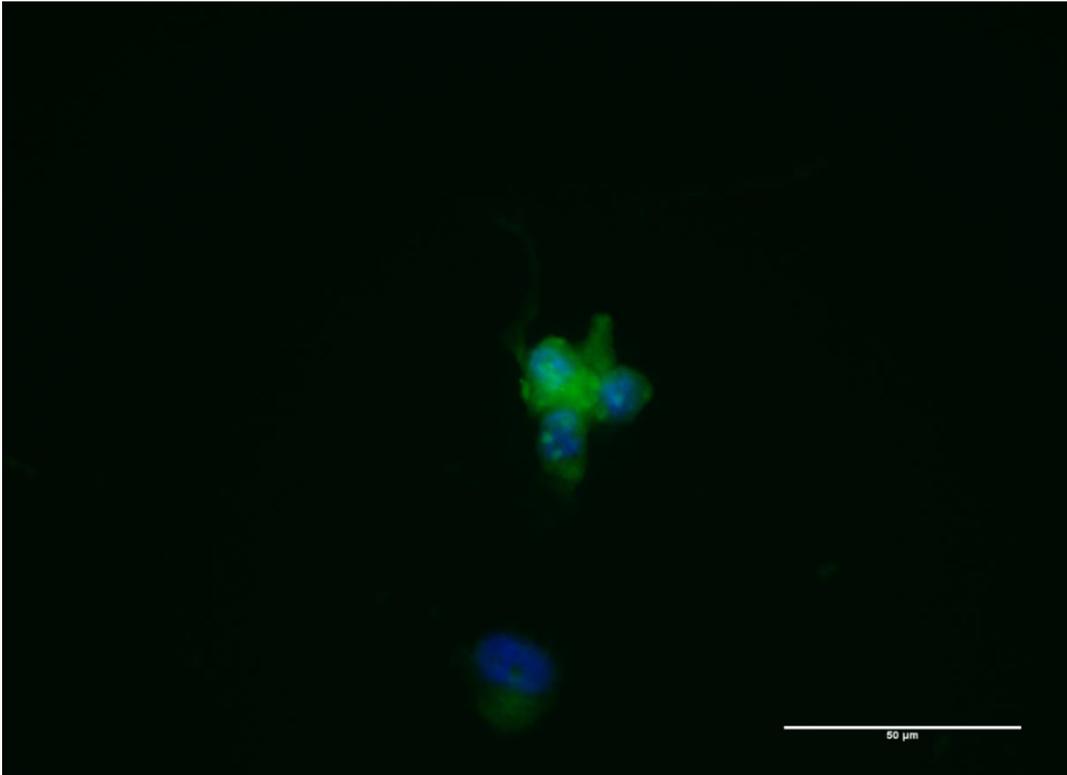


Abbildung 43: Oberes Bild: Kernfragmentierung der Fibroblasten-1 Zellreihe bei 250 μ M 5 – ALA und 2000 Sekunden Belichtung mit deutlichen Zytoplasmaeinschlüssen im Kern Unteres Bild: Kernfragmentierung bei 500 μ M 5 – ALA und 2000 Sekunden Belichtung. Es sind deutliche Zytoplasmaeinschlüsse innerhalb der Nuklei sichtbar. In beiden Fällen bestehen somit starke Hinweise für eingetretene Apoptose.

4 Diskussion

Degenerative Gelenkerkrankungen sind vor allem im zunehmenden Alter eine sehr häufige Entität. Nach Daten des RKI sind ab dem sechsten Lebensjahrzehnt gut die Hälfte der Frauen und ein Drittel der Männer von Arthrose betroffen.¹⁵ Die Gelenkschleimhautentzündung (Synovitis) ist ein wichtiger Faktor im Rahmen der Arthrose. Einerseits resultiert aus einer chronischen Synovitis eine Arthritis. Im Rahmen der globalen Gelenkentzündung kommt es aufgrund Hochregulation von proinflammatorischen Cytokinen zu Degeneration des Gelenkknorpels und so letztendlich zur Arthrose.^{12, 21} Ebenso ist umgekehrt die Begleitsynovitis mit konsekutivem Gelenkerguss und Entzündungssymptomen häufig im Rahmen der chronisch inflammatorischen Phase einer Arthrose zu beobachten.¹⁵

Somit stellt die Synovitis einerseits sowohl Ursache als auch Begleiterscheinung der Arthrose dar. Das Kniegelenk ist aufgrund seiner hohen mechanischen Beanspruchung und der Zusammensetzung aus zwei Teilgelenken ein häufig betroffenes Gelenk von degenerativen Gelenkerkrankungen. Auch die uncharakteristische Synovitis bzw. der tenosynoviale Riesenzelltumor befallen häufig das Kniegelenk.

Die uncharakteristische Synovitis zeichnet sich vor allem durch die Aktivierung der ortsständigen Zellen der Synovia (spezialisierte Fibroblasten) aus.¹⁰ Die Wirksamkeit der PDT auf die uncharakteristische Synovitis wird im Rahmen dieser Dissertation an der Zellreihe Fibroblasten-1 untersucht. Um eine aggressive Erkrankung der Gelenkschleimhaut zu untersuchen wurde zusätzlich eine PVNS-1 Zelllinie genutzt. Hierbei handelt es sich um eine aggressive, jedoch seltene Tumorerkrankung, die sich an der Synovia manifestiert und in etwa zwei von drei Fällen das Kniegelenk betrifft.^{9, 34, 31, 32} Die Diagnose eines TGCT wird nach Eintritt der Beschwerden in den meisten Fällen erst nach Monaten oder Jahren gestellt.²⁸ Die Bildgebung der Wahl zur Diagnose ist das MRT, in dem eine diffuse Synoviaverdickung mit Eisenablagerungen, fakultativ Knochenerosion sichtbar ist.^{31, 24} Histologisch stellen sich bräunlich pigmentierte Makropha-

gen mit Hämosiderineinschlüssen neben mehrkernigen Riesenzellen und Histiocyten dar.⁵⁷

Aktuell ist die (sub-)totale Synovektomie sowohl bei TGCT als auch uncharakteristischer Synovitis die Therapie der Wahl.^{31, 23}

Die photodynamische Therapie ist heute ein etabliertes Therapiekonzept in der Behandlung der aktinischen Keratose und des Basalzellkarzinoms.^{36, 37} Darüber hinaus ist sie auch bei einer Vielzahl onkologischer Erkrankungen, wie beispielsweise dem Glioblastom, dem Blasenkarzinom, gastrointestinalen Tumoren oder dem kindlichen Rhabdomyosarkom wirksam. Die PDT wird bei diesen Krankheitsbildern – mit Ausnahme des kindlichen Rhabdomyosarkoms – routinemäßig angewandt.^{38, 39, 40}

Die PDT erzielt ihre Wirkung nicht über Beeinflussung der DNA, sondern über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies.^{41, 47} Aufgrund der guten Wirksamkeit und Verwendung von nichtionisierender Strahlung kann eine PDT mehrfach wiederholt werden, ohne kumulative Langzeitnebenwirkungen hervorzurufen. Die Therapie besteht aus zwei Phasen. Im ersten Schritt wird ein nichttoxisches Medikament topisch oder systemisch verabreicht, welches die Zielzellen aufnehmen und diese lichtsensibel macht, der sogenannte Photosensitizer (in unserem Versuchsansatz 5 – ALA).^{36, 47} Diesem ersten Schritt folgt die Bestrahlung der Zellen mit sichtbarem Licht. Der Photosensitizer wird hierbei durch das Licht von seinem Grundzustand in einen aktivierten Zustand überführt und überträgt diese Energie auf molekularen Sauerstoff. Dadurch werden reaktive Sauerstoffspezies gebildet (ROS)^{40, 41}, welche wiederum durch Oxidation der Proteine und Lipide die Membranen der Zelle zerstören und mitochondriale Enzyme inhibieren.³⁸ In dieser Dissertation wird eine weiße LED Lichtquelle verwendet. Das polychromatische, weiße Licht enthält alle Wellenlängen sichtbaren Lichts und somit auch die entsprechenden Wellenlängen des Absorptionsmaximums von 5 – ALA (etwa 405nm) inkl. kleinerer weiterer Absorptionspeaks.⁴⁵ Laut einer Studie von Marra et al. (2018), in der die Wirksamkeit von blauem und weißem Licht bei der PDT der aktinischen Keratose verglichen wurde, stellten sich beide Lichtquellen als wirksam heraus, wobei das weiße Licht sogar geringfügig

effektiver war.⁴³ Dieser Effekt könnte durch den Zusammenhang erklärt werden, dass blaues Licht aufgrund der kurzen Wellenlänge weniger tief in bestrahltes Gewebe eindringt. Weißes Licht hingegen besitzt zusätzlich Photonen längerer Wellenlängen. Diese können im Gewebe gestreut werden und so tiefer und weiter das Zielgewebe penetrieren.^{43, 44}

4.1 Zielsetzung dieser Dissertation

Nach aktueller Studienlage ist die (sub)totale Synovektomie Therapie der Wahl bei Synovitiden. Diese kann sowohl offenchirurgisch als auch arthroskopisch durchgeführt werden und wird teilweise, vor allem bei der diffusen Form der TGCT (PVNS) zur Rezidivprophylaxe, um eine peri- oder postoperative Radiotherapie erweitert.^{33, 24}

Die adjuvante Radiotherapie ist bis heute stark debattiert. Vidal et al (2014) berichtet von der adjuvanten Radiotherapie entweder intraartikulär oder extraartikulär im Falle von subtotaler Synovektomie oder bei Rezidiven.³³ Mollon et al. (2015) stellt ebenfalls eine Studie vor, bei der sich bei einem Patientenkollektiv von 630 Patienten, vor allem bei diffuser PVNS die Rezidivraten verringerten, wenn post- oder gar perioperativ bestrahlt wurde.²⁴ Insgesamt profitieren hier auch die Patienten mit postoperativen Krankheitsresiduen von Bestrahlung.²⁴ Befürchtungen über höhergradige postoperative Steifheit des Gelenks aufgrund der Bestrahlung bestätigten sich nicht.²⁴ Ähnliche Ergebnisse lieferte die klinisch retrospektive Studie von Heyd et al (2010), die adjuvante Radiotherapie für subtotale Resektion oder lokale Rezidive als Behandlungsoption postuliert.⁵⁸ Laut Shi et al (2013) ist die adjuvante Radiotherapie gerade bei jungen Patienten mit Vorsicht zu verwenden, da auch maligne Transformation der PVNS nach Radiotherapie beobachtet wurde.³¹

Nachdem die PDT bei verschiedensten Krankheitsentitäten als wirkungsvoll getestet wurde, lautet die zu überprüfende Hypothese dieser Dissertation, auch die Synovitiden der PDT zu unterziehen und die Suffizienz dieser Therapieform bei Synovitiden zu untersuchen und zu beobachten. Die Lichtquelle die in unse-

ren Experimenten verwendet wurde entspricht einer handelsüblichen Arthroskopielampe. Ein praktischer Gedankenansatz könnte sein, dass vier Stunden vor geplanter Arthroskopie zur Synovektomie der Photosensitizer 5 – ALA topisch in Form einer intraartikulären Injektion verabreicht werden kann. Nach 4 stündiger Einwirkzeit kann die Arthroskopie vorgenommen werden. Die Dauer dieses arthroskopischen Eingriffes (mindestens 30 Minuten) stellt in etwa unsere maximale Belichtungsdauer (2000 Sekunden) aus den Versuchsansätzen dar. So könnte die photodynamische Therapie parallel zur Synovektomie vorgenommen werden und bei nachgewiesener Wirksamkeit das Ausmaß der notwendigen Synovektomie möglicherweise reduzieren. Hierbei soll die verdächtige Gewebestelle inklusive der näheren Umgebung für mindestens 300 Sekunden (5 Minuten) direkt bestrahlt werden, um den Effekt zu erzielen. Belichtetes Gewebe (verdächtiges Synovitis – Areal) soll hierbei nach vorheriger 5 – ALA Aufnahme apoptotisch werden. Grundvoraussetzung für diese Art der Therapie ist, das vitales Gewebe des Gelenks wie der Gelenkknorpel unbeeinträchtigt bleibt.

4.2 Migrations – Assay

4.2.1 Migration der pigmentierten villonoduären Synovitis Zellreihe

Über alle Konzentrationen des Photosensitizers und alle Belichtungsdauern fand eine signifikante Migration der PVNS-1 – Zellen unter PDT statt. Bei zunehmend höheren Konzentrationen und Belichtungsdauern, fiel diese Migration geringfügiger aus, jedoch migrierten die Zellverbände in allen Fällen deutlich über 200µm aufeinander zu. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine Migration von mehr als 200µm als signifikant erachtet.

Wenn man die Ergebnisse der PVNS-1 Migration miteinander vergleicht, ist rein anhand der **Migrationstrecke** die Aussage zu treffen, dass diese durch die PDT bei allen 5 – ALA Konzentrationen und Belichtungsdauern – bei gewähltem cut – off von 200µm Migrationsdistanz – nicht signifikant reduziert wird.

Schaut man sich die nackten Zahlen in den ABBILDUNGEN 19 – 22 an, so scheint sich jedoch eine Tendenz der sinkenden Migration bei steigenden 5 – ALA Konzentrationen und Belichtungen darzustellen. Wäre der cut – off anders gewählt worden (z.B. signifikant ist eine Migration ab 400 μ m Migrationsstrecke) würden sich signifikante Unterschiede der PDT – Probe im Vergleich zur Negativprobe darstellen; die Migration wäre signifikant reduziert. Da in der Methodik dieser Arbeit jedoch 200 μ m als cut – off festgelegt wurde, sind die Trends in den obigen ABBILDUNGEN 19 – 22 nicht bedeutungsvoll.

Auffallend sind jedoch ab einem Konzentrationswert von 1,5mM 5 – ALA und 1000 Sekunden Belichtungsdauer bzw. 500 μ M bei 2000 Sekunden Belichtung, deutliche Morphologieveränderungen der Zellen in Form von Zytoplasmaverdünnungen, Verminderung der Zellzahl und Zelldichte. Aufgrund dieser semiquantitativen Qualifizierung der Morphologie ist zu diskutieren, dass einige Zellen der PVNS apoptotisch geworden oder zumindest in Seneszenz übergegangen sind.

Jedoch kann diese Fragestellung mit den Ergebnissen dieser Methode nicht hinreichend beantwortet werden, weshalb ein späteres MTT – Essay objektiver Aufschluss über die Vitalität der Zellen geben soll. Mithilfe des Migrations – Assays kann die Aussage getroffen werden, dass die Mehrzahl der PVNS – Zellen bei allen 5 – ALA Konzentrationen und Belichtungsdauern aktive Zellmigration betreibt und diese Zellen zur amöboiden Bewegung fähig sind. Aktive Zellmigration ist ein Hinweis und Kriterium für Vitalität von Zellen. Dadurch bestehen deutliche Hinweise, dass nach 5 – ALA – PDT selbst bei maximaler Konzentration und Belichtungsdauer noch vitale, migrationsfähige PVNS Zellen vorhanden sind. Inwiefern höhere 5 – ALA Konzentrationen und Belichtungsdauern die Anzahl der vitalen Zellen reduziert, kann mit dieser semiquantitativen Morphologiebeschreibung nicht eindeutig determiniert werden und wird daher im Anschluss in der Diskussion des MTT Essays erläutert.

4.2.2 Migration der Fibroblasten- Zellreihe

Das Migrationsassay der Fibroblasten-1 Zellen zeigte sehr eindeutige 5 – ALA Konzentrationswerte oberhalb welcher keine Migration mehr stattfand. Ab einer 5 – ALA Konzentration von 100 μ M und bereits 300 Sekunden Belichtungsdauer und 18 stündiger Inkubationszeit fand bei den Fibroblasten-1 keine signifikante Migration statt. Bei Konzentrationen oberhalb von 250 μ M 5 – ALA konnte ein Zurückweichen der Zellverbände gemessen werden (maximaler Abstand von 559 μ m bei 500 μ M 5 – ALA und 300 Sekunden Belichtungsdauer; SIEHE ABBILDUNG 26). Zusätzlich konnten auch hier bereits beschriebene Morphologieveränderungen der Zellen detektiert werden, die für Apoptose hinweisend sein können (Karyopyknose, Zellzahlverminderung, Zytoplasmareduktion). Gleiche Morphologieveränderungen nach ALA – PDT werden auch von Zhou et al. (2016) bei humanen dermalen Fibroblasten beschrieben.⁵⁹ Auch hier gilt es erneut zu bemerken, dass die Morphologie allein kein Beweis für Apoptose liefert, jedoch hinweisend darauf sein kann. Ähnlich wie bei den Migrationen der PVNS-1 Zellreihe, kann auch hier keine objektive Aussage bezüglich der Vitalität getroffen werden. Es ist anhand der Morphologie nicht zweifelsfrei zu bestimmen, ob eine Zelle hierbei in Apoptose übergegangen ist, oder ob sie nach PDT nur vorübergehend in Seneszenz verfallen ist.

Bei 1000 bzw. 2000 sekundiger Belichtung stellte sich ebenfalls der Trend dar, dass keine signifikante Migration der Fibroblasten-1 bei 100 μ M 5 – ALA mehr stattfand. Bei steigenden 5 – ALA Konzentrationen oberhalb von 250 μ M vergrößerte die Initialdistanz der Zellverbände. Daraus kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die PDT ab einer 5 – ALA Konzentration von 100 μ M die Fibroblasten in ihrer aktiven Migration hemmt und ab einer 5 – ALA Konzentration von 250 μ M sogar einige Zellen zerstört werden, weshalb sich die Migrationslücke größer darstellt als bei der d0 – Probe (500 μ m). Diese Effekte treten bereits bei 300 Sekunden Endoskoplichtbeleuchtung (300W) in vollem Umfang auf und setzen sich bei höheren Belichtungsdauern fort. Die Ergebnisse gehen einher mit der Studie von Zhang et al. (2018). Hierbei wurde ein Migrationsassay nach 6 stündiger 5 – ALA Einwirkzeit mit 100mM 5 – ALA und anschließender Belich-

tung mit einem Laser (635nm) und $40\text{mW}/\text{cm}^2$ durchgeführt.⁶⁰ Es konnte gezeigt werden, dass die Migration der Fibroblasten signifikant verringert war, wohingegen bei Negativproben (nur Belichtung, oder nur 5 – ALA - Applikation) normale Migration stattfand.⁶⁰ In den Versuchsansätzen anderer Studien konnte ebenfalls eine signifikant verminderte Migration von Fibroblasten nach PDT detektiert werden, auch bei der Verwendung anderer Photosensitizer beispielsweise Methylenblau oder Photofrin.^{61, 62} Jedoch werden in unserem Versuchsansatz bei Konzentrationen unterhalb von $100\mu\text{M}$ 5 – ALA auch bei 2000 Sekunden Belichtung (maximale Belichtungszeit) die Fibroblasten-1 offenbar nicht beeinträchtigt und eine signifikante Zellmigration findet statt.

4.3 MTT – Assay

Der MTT – Assay der PVNS-1 Zellen zeigte, dass die prozentuale Vitalität der Zellen bei jeder 5 – ALA Konzentration und jeder Belichtungsdauer bei über 90% verblieb. In der Negativprobe bei der keine Belichtung der mit 5 – ALA beimpften Zellen stattgefunden hat, sank die Viabilität am stärksten, und zwar auf einen Minimalwert von 80% bei $250\mu\text{M}$ 5 – ALA. Hierbei handelt es sich am ehesten um Messungenauigkeiten. Grund dafür ist, das wie bereits beschrieben der erste Versuchsansatz noch mit einer größeren Anzahl an Konzentrationen angesetzt wurde, nämlich, 0, 10, 20, 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 und $3000\mu\text{M}$ 5 – ALA. Sowohl der zweite als auch dritte Versuchsansatz wurden nur noch mit den ermittelten Konzentrationen laut TABELLE 7 durchgeführt (0, 500, 1000, 1500, $3000\mu\text{M}$ 5 – ALA). Dementsprechend müssen die Werte in den Graphen zwischen $10\mu\text{M}$ und $250\mu\text{M}$ mit Vorsicht betrachtet werden, da diese nur die Messwerte aus einem Experiment widerspiegeln. Aufgrund einer hohen Zellpassage (p18), die im ersten Experiment verwendet wurde, bei der die PVNS ihre maximale Teilungsrate und Vitalität möglicherweise schon überschritten haben, ließen sich geringere Vitalitäten von 80% in der Negativprobe möglicherweise erklären. Dagegen spricht, dass im gleichen Versuchsansatz (p18) belichtete Zellen nicht diese geringen Vitalitäten zeigten. 5 – ALA als Photosensitizer allein ist als Vorstufe des Häms ohne anschließende Belichtung

harmlos für Gewebe und erklärt somit die geringere Viabilität der Zellen in der Negativprobe nicht.^{36, 40, 44} Aus den Graphen geht somit hervor, dass die PVNS – Zellen bei jeder 5 – ALA Konzentration und jeder Belichtungsdauer vital blieben (>90%).

Die PVNS-1 Zellen mit morphologischen Änderungen in den Migrationsassays ab einem Wert von 250µM 5 – ALA und 300 Sekunden Belichtung zeigen bei entsprechenden 5 – ALA Konzentrationen und Belichtungsdauern im MTT Assay keine reduzierten Vitalitäten. Der MTT Assay beruht auf dem Prinzip der kolorimetrischen Messung anhand der Verstoffwechslung eines Metaboliten, das heißt nur eine vitale und metabolisch aktive Zelle kann das verabreichte Testreagenz verstoffwechseln und einen Farbumschlag induzieren. Somit kann vermutet werden, dass die ALA – PDT bei der in dieser Dissertation verwendeten Zellreihe PVNS-1 und unter genannten Konzentrationen und Belichtungsdauern nicht als Therapieansatz in Frage kommt. Die PVNS-1 Zellen bleiben über alle Konzentrationen und Belichtungsdauern dieser Versuchsansätze hinweg vital und aktiv.

Bei dem Migrationsassay der Fibroblasten-1 bestehen deutliche Hinweise das Apoptose beziehungsweise Seneszenz der Zellreihe einsetzt. Bei 100µM 5 – ALA und allen Belichtungsdauern findet keine signifikante Zellmigration mehr statt. Ab 250µM 5 – ALA schrumpfen die Zellpopulationen und ihre initiale Distanz zueinander vergrößert sich. Dieser morphologische Apoptoseverdacht der Fibroblasten-1 wird durch die Ergebnisse des MTT – Assays der Fibroblasten-1 bestätigt. In ABBILDUNGEN 35 – 38 ist eine deutliche Abnahme der errechneten Viabilität ab 250µM 5 – ALA zu detektieren. Trotz fehlender Migration setzen die Fibroblasten-1 bei 100µM 5 – ALA im MTT – Assay bei jeder Belichtungsdauer das Farbreagenz noch vollständig um und stellen sich somit vital dar (minimale Vitalität hier bei 106% nach 1000 Sekunden Belichtung, SIEHE ABBILDUNG 37).

Ab 250µM 5 – ALA fällt die Zellvitalität stark ab und erreicht bei 500µM ihren Nadir zwischen 24 und 42% (Vgl. ABBILDUNGEN 36 – 38). Eine Konzentration von 250µM 5 – ALA und bereits eine 300 sekundige Belichtungsdauer kann offenbar die Apoptose bei Fibroblasten einleiten. Diese Ergebnisse stimmen

überein mit der Arbeit von Zhou et al. (2016). Dort wird nachgewiesen, dass PDT mit rotem Laserlicht (635nm) die Apoptose in Fibroblasten einleitet und die Zellproliferation sinkt.⁵⁹ In unserem Versuchsaufbau repräsentiert die Zellkultur der Fibroblasten die unspezifische Synovitis. Diese zeichnet sich vor allem durch Vermehrung von residenten Zellen, in erster Linie den Synovia – Fibroblasten, aus. Somit könnte die PDT eine wirksame zusätzliche Therapiesäule oder Alternativtherapie zur operativen Sanierung durch (sub-)totale Synovektomie der uncharakteristischen Synovitis darstellen.

Sowohl beim MTT – Assay der PVNS-1 als auch der Fibroblasten-1 Zellreihe konnte gezeigt werden, dass bei 5 – ALA Konzentrationen oberhalb von 500µM bei allen Belichtungsdauern die Viabilität der Zellen erneut anstieg. Die Vitalität erreichte jedoch nie Werte vergleichbar der Zellviabilität bei niedrigeren 5 - ALA Konzentrationen. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits in Studien beschrieben. Harmatys et al. (2017) machten sich die fluoreszierenden Eigenschaften von PpIX zunutze. Hierbei wurden Ovarialzellen eines Hamsters mit verschiedenen Konzentrationen 5 – ALA inkubiert. Anschließend wurde die Aufnahme des 5 – ALA und die intrazelluläre Metabolisierung und Konversion zu PpIX mithilfe eines „Cell extraction assays“ evaluiert, welches die rote Fluoreszenz von PpIX bei 604nm innerhalb der Zellen misst. In einem Graphen wird die Fluoreszenzstärke in Abhängigkeit von der verwendeten 5 – ALA Konzentration dargestellt. Dieser Graph zeigt eine sigmoidale Abhängigkeit, wobei die Menge an PpIX intrazellulär und somit die Stärke der Fluoreszenz einen Peak bei etwa 800µM 5 – ALA erreicht. Bei höheren Konzentrationen fällt die Intensität der Fluoreszenz und somit die intrazelluläre PpIX Konzentration wieder ab.⁶³ Auch in unserer Arbeit ist deutlich erkennbar, dass die Effektivität der PDT bei 5 – ALA Konzentrationen von 500µM maximal ist, und sich bereits ab 1000µM verringert. Ebenso wiesen Egli et al. (2007) mithilfe der Flusszytometrie bei 500µM 5 – ALA Applikation die höchste intrazelluläre PpIX Dosis in Fibroblasten nach.⁶⁴ Dieser Umstand, dass 5 – ALA oberhalb von 500µM Applikationsdosis offensichtlich nur in reduzierter Menge in den Zielzellen vorliegt, kann möglicherweise die verringerte Wirksamkeit der PDT oberhalb 500µM 5 - ALA sowohl bei den Fibroblasten-1, als auch den PVNS-1 Zellen erklären.

Der Grund der verminderten intrazellulären PpIX Konzentration ist unklar und möglicherweise damit zu erklären, dass bei 5 – ALA Konzentrationen $>500\mu\text{M}$ ein Stoffwechselweg aktiviert wird, der bei niedrigeren Konzentrationen noch inaktiv ist. Dieser könnte den Efflux von 5 – ALA aus der Zelle fördern, sodass 5 – ALA schneller metabolisiert bzw. eliminiert ist und die 4 stündige Einwirkzeit vor Belichtung zu lange gewählt wurde.

Aus diesem Grund wurde ein weiterer Ansatz des Experimentes durchgeführt, in dem bereits 2 Stunden nach 5 – ALA Gabe belichtet wurde (SIEHE 2.2.4.). Auch diese Ergebnisse waren kongruent mit den Ergebnissen bei 4 Stunden 5 – ALA Einwirkzeit.

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die steigende Vitalität der Zellen bei 5 – ALA Konzentrationen $>500\mu\text{M}$, könnte sein, dass ein enzymatischer Stoffwechselweg innerhalb der Zelle aktiviert wird, welcher 5 – ALA metabolisiert und inaktiviert und die Zellen somit resistenter für die PDT macht. Um diese Möglichkeit auszuschließen wurde unter der Annahme, dass ein Enzym in einem gewissen Zeitraum nur eine gewisse Menge 5 – ALA umsetzen kann (Sättigung des Enzyms), eine zweimalige 5 – ALA Gabe der entsprechenden Konzentrationen durchgeführt (SIEHE 2.2.4.). Einerseits wurde vor der 24 stündigen Inkubation zur Adhäsion der Zellen bereits die entsprechende 5 – ALA Konzentration hinzugefügt und nach diesen 24 Stunden eine zusätzliche 5 – ALA Gabe. Anschließend wurden die Proben nach weiterer Inkubation für 4 Stunden wie gewöhnlich belichtet. Auch hierbei stimmten die Ergebnisse mit den anderen Versuchsansätzen überein.

Nemes et. al. (2016) untersuchte die 5 – ALA Aufnahme und Verweildauer in verschiedenen Arten von Hypophysenadenomen und kam ebenfalls zu der Überzeugung, dass es bei verschiedenen Zellreihen der Adenome zu sehr unterschiedlichen 5 – ALA Konzentrationen intrazellulär und anschließender Zytotoxizität der PDT kommt. Einige Adenomzellreihen zeigten ein deutlich schlechteres Ansprechen auf PDT. Auch hier wurde ein noch unbekannter Effluxmechanismus oder Metabolisierungsvorgang der Zellen diskutiert. Es wurden zwei verschiedene Inkubationszeiten von 5 – ALA gewählt (6 Stunden und 24 Stunden).

den) und 5 – ALA Konzentrationen von 200µM bis 2mM. Wie in unserem Experiment auch, konnte nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei beiden Versuchsansätzen in einem anschließenden Viability – Assay kein signifikanter Unterschied der PDT – Zytotoxizität festgestellt werden.⁶⁵ Aus diesen Ergebnissen kann weder ein enzymatischer Stoffwechselfvorgang, der das 5 – ALA intrazellulär schneller metabolisiert, noch ein aktiver Efflux des 5 – ALA aus der Zielzelle sicher nachgewiesen werden.

Cengel et al. (2008) diskutiert ebenfalls die potentielle Effektivität der 5 – ALA – PDT aufgrund unterschiedlicher Aufnahmezeiten, Metabolisierung und Efflux von 5 – ALA bei verschiedenen Zelltypen anhand Viability – Assays und Fluoreszenzspektroskopie (zum Nachweis intrazellulären 5 – ALAs bzw. PpIX). Es wurde nachgewiesen, dass 5 – ALA hauptsächlich über den ABCG2 – Transporter aus der Zelle eliminiert wird und dieser Transporter EGF (epidermal growth factor) – vermittelt in die Zellmembran eingebaut wird. Durch ‚Epidermal growth factor receptor‘ – Inhibition mithilfe von Cetuximab konnten intrazelluläre Konzentrationen von PpIX signifikant erhöht werden.⁶⁶ Auch Peng et al (2020) konnten bei EGFR überexprimierenden Tumorzellen verstärkten PDT Einfluss nachweisen, wenn die PDT mit Cetuximab kombiniert wurde.⁶⁷ Durch intrazelluläre Erhöhung des PpIX als aktiver Metabolit des 5 – ALA kann eine PDT möglicherweise effizienter ablaufen. In dieser Dissertation wurde die intrazelluläre PpIX Konzentration in den Zielzellen nicht bestimmt.

Botez et al (2013) stellt dar, dass die Existenz von Trisomie 7 ist mit der PVNS assoziiert ist.⁶⁸ Das Protoonkogen c-erb codiert für EGFR und ist auf Chromosom 7 lokalisiert.^{68 69} Somit gibt es Anhalt für erhöhte EGFR Expression bei einzelnen PVNS Fällen und eine mögliche Wirksamkeit von Cetuximab.

Somit kann möglicherweise die PDT in einigen PVNS Fällen durch den Zusatz von Cetuximab suffizienter ablaufen. Die weitere genetische Analyse von PVNS auf eine EGFR Überexpression stellt einen interessanten Gedankenansatz für die Zukunft dar.

4.4 Viability Assay

Im Viability Assay der Knorpelzellen konnte unter 5 – ALA PDT bei steigenden 5 – ALA Konzentrationen und Belichtungsdauern eine leichte, jedoch statistisch nicht signifikante ($p=0,947$) Reduktion der Vitalität der Knorpelzellen gemessen werden. Auch bei der unbelichteten Negativprobe ist eine leichte, nicht signifikante Reduktion der Vitalität mit steigenden 5 – ALA Konzentrationen sichtbar (SIEHE ABBILDUNG 39). Eine mögliche Zytotoxizität der Negativprobe ist sehr unwahrscheinlich, da 5 – ALA als Photosensitizer ohne Belichtung die Knorpelzellen in ihrer Vitalität nicht beeinflusst. ^{36, 40, 44}

Die Vitalität der Knorpelzellen erreichte bei 2000 Sekunden Belichtungsdauer und $100\mu\text{M}$ 5 – ALA ihren Nadir und stieg bei $250\mu\text{M}$ 5 – ALA erneut an.

Grund dafür könnten auch hier die unter PUNKT 4.3. genannten Umstände sein, bei denen die 5 – ALA PDT in verschiedenen Zellreihen bei verschiedenen Konzentrationen ihre maximale Wirkung hat. ^{63, 64} Wird der Peak maximaler intrazellulärer PpIX Menge überschritten, kann dies eine mögliche Erklärung sein, dass in diesem Fall die 5 – ALA PDT hier reduziert wirksam ist und sich die Zellen bei höheren 5 – ALA Konzentrationen wieder vitaler darstellen. ^{65, 66}

In der graphischen Darstellung wurden je die gemittelten Werte aus den Versuchstripletts verwendet. Oftmals unterliegt dieser Mittelwert aber großen Standardabweichungen von bis zu 21,18% im Bereich des Vitalitätsminiums ($100\mu\text{M}$ 5 – ALA bei 2000 Sekunden Belichtung). Grund hierfür ist, dass mit unterschiedlich stark arthrotischen Patientenproben gearbeitet wurde.

Die verschiedenen Schweregrade der Arthrose sind auf unten stehenden ABBILDUNGEN 44 & 45 anhand der Anordnung der Chondrozyten zu erkennen.

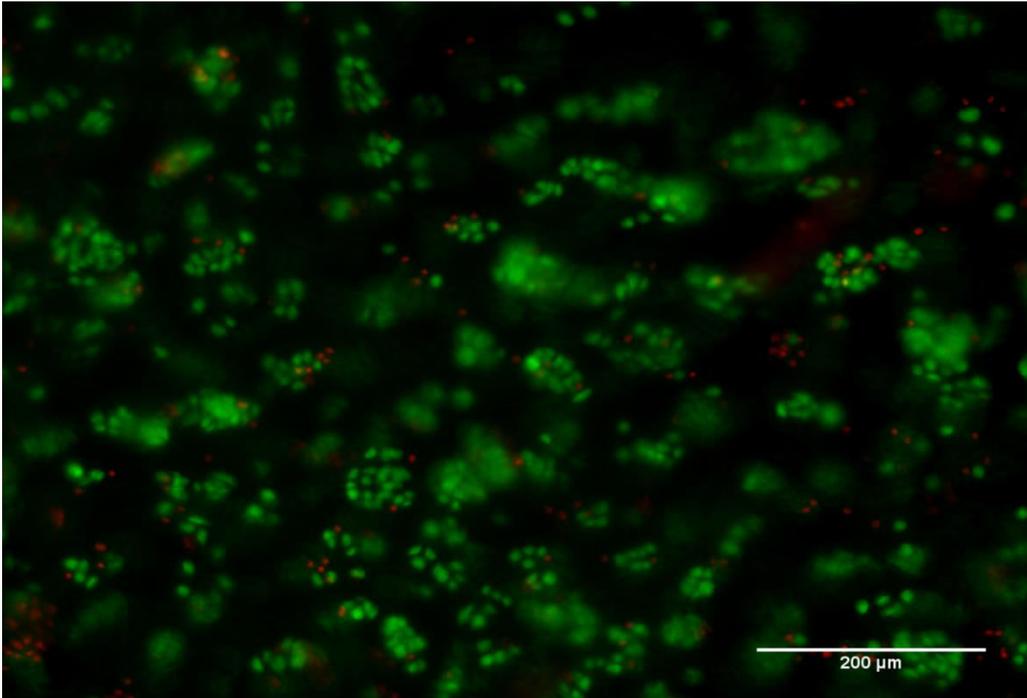


Abbildung 44: 100 μ M 5 - ALA bei 300 Sekunden Belichtung; Patientenknorpelprobe mit stark fortgeschrittener Arthrose, die Zellen haben sich bereits zu Clustern zusammengefunden. Viele dieser Cluster sind avital (rot angefärbt). Die prozentuale Vitalität liegt hier bei 71,3 % verglichen zur Referenz.

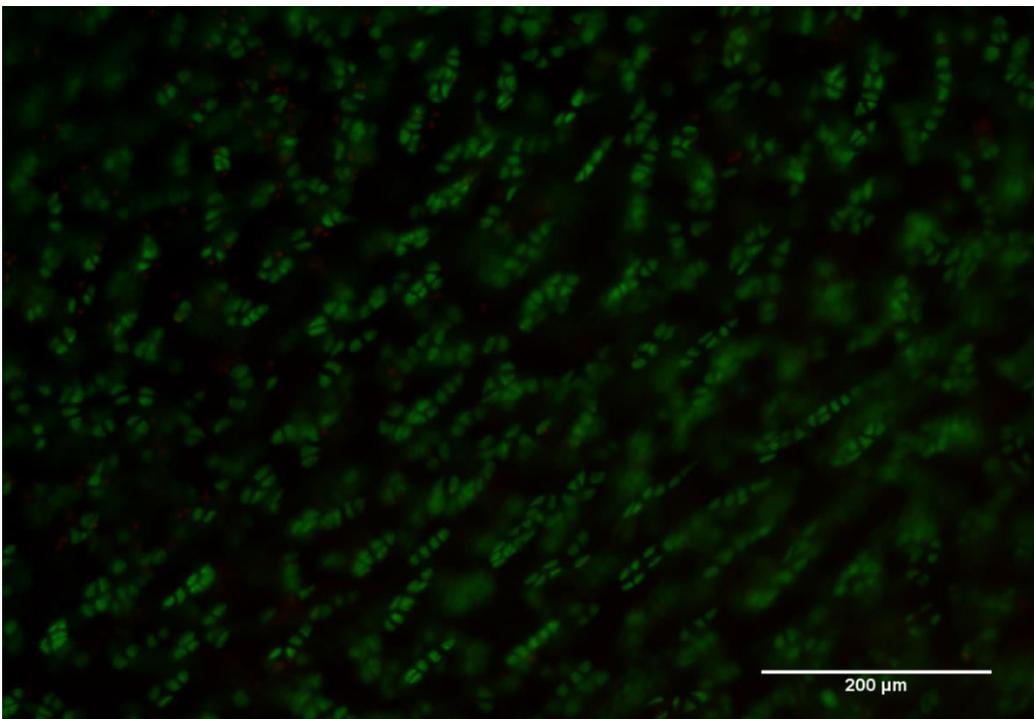


Abbildung 45: 500 μ M 5 – ALA Konzentration bei 2000 Sekunden Belichtung; im Vergleich zum vorherigen Bild eine Knorpelprobe, die deutlich weniger arthrotisch verändert ist (hauptsächlich double strings Anordnung). Die Vitalität liegt trotz höchster 5 – ALA Konzentration und maximaler Belichtungsdauer bei 94,1% verglichen zur unbelichteten Referenz.

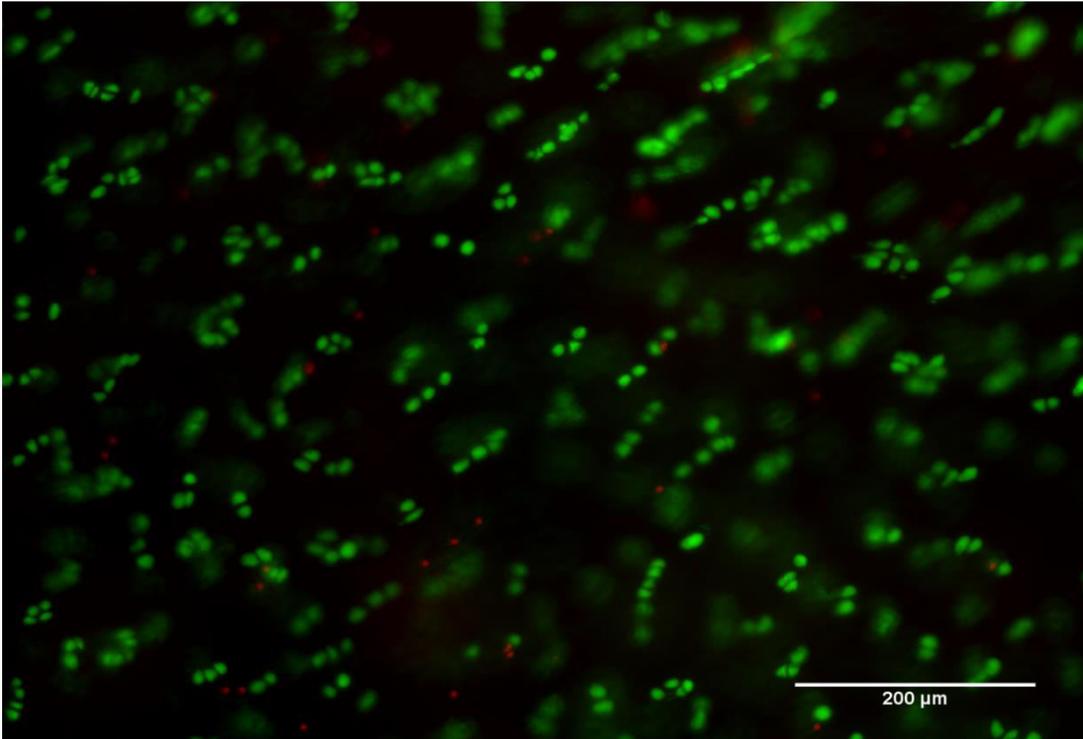


Abbildung 46: 100µM 5 – ALA und 300 Sekunden Belichtung: Noch sehr physiologischer und intakter Knorpel (hauptsächlich single strings), die Vitalität liegt in diesem Versuchsansatz bei 94,3% verglichen zur Referenz.

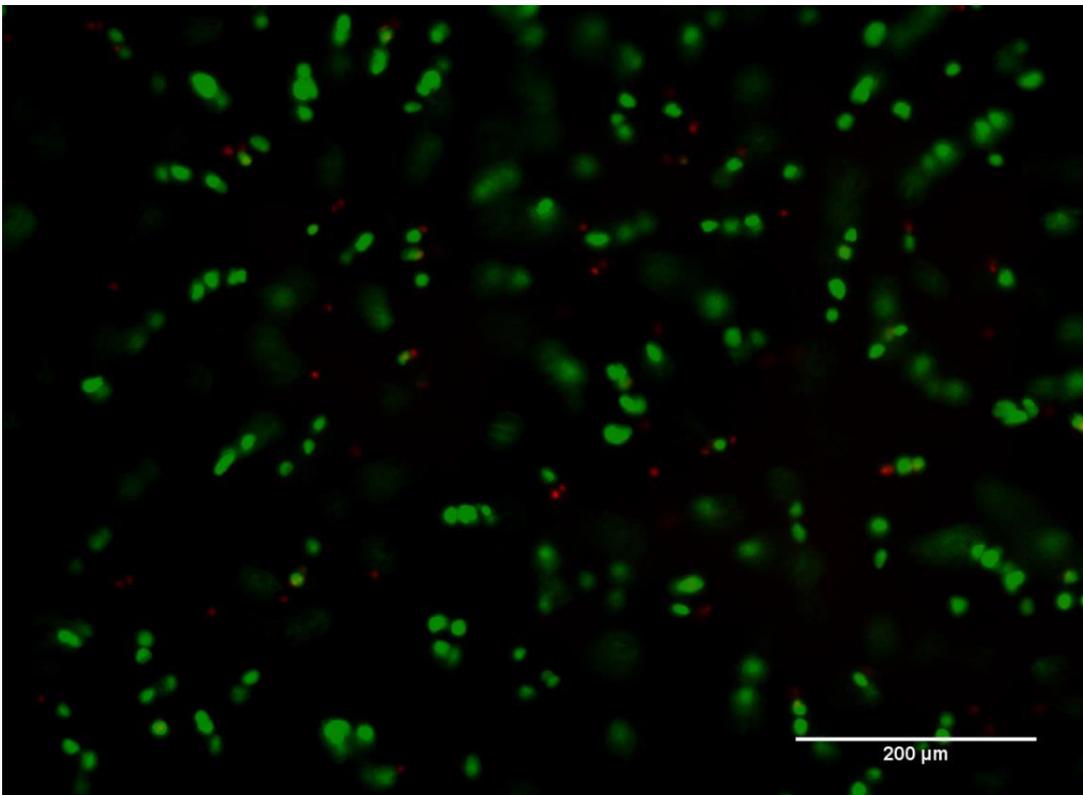


Abbildung 47: 100µM 5 – ALA und 2000 Sekunden Belichtung: Der Knorpel ist noch sehr physiologisch und gesund (single strings Anordnung). Die Vitalität der Knorpelprobe liegt bei 89,2% verglichen zur Referenz.

Wie in ABBILDUNG 45 – 47 ersichtlich, wurden einerseits Superfizialschnitte verwendet bei denen die Chondrozyten noch hauptsächlich in single und double strings vorlagen, sprich noch sehr physiologischer und intakter Knorpel.¹⁷ Hier stellen sich die Proben nach 5 – ALA PDT noch in hohem Maße als vital dar. Im Gegensatz dazu ist auf ABBILDUNG 44 sichtbar, dass sich in einem anderen Versuchsansatz die Chondrozyten schon deutlich zu big clusters zusammengefunden haben, also der Knorpel bereits hochgradig degeneriert ist und stark arthrotisch.¹⁷ Hwang et al. (2015) beschreibt die Abnahme der Proteoglykane der perizellulären Matrix als Zeichen der deutlichen Knorpeldegeneration.⁷⁰ Es ist daher durchaus plausibel, dass die Zellen sich daraufhin zu den Zellverbänden zusammenfinden und beginnen in Apoptose überzugehen. Apoptose ist eigentlich ein schneller Prozess und eine hohe Apoptoserate des Knorpels würde innerhalb kürzester Zeit zu maximaler Degeneration führen. Dies lässt sich jedoch schlecht mit dem langjährigen, chronischen Verlauf der Arthrose vereinbaren.^{70, 71} Daher wird in der Literatur zunehmend der Begriff „Chondroptose“ genannt. Dieser beschreibt den Zelltod der Chondrozyten ohne den klassischen Weg der Apoptose.⁷¹ Chondrozytentod, sei es Chondroptose, Apoptose oder auch Nekrose, resultiert in einer mangelhaften Erhaltung der physiologischen Knorpelstruktur.⁷⁰ Chondrozyten, die sich in big clustern angeordnet haben, beginnen demnach bereits mit der Chondroptose.⁷⁰ Der Verdacht der Chondroptose geht mit den Ergebnissen aus unserem Versuchsansatz einher und stützt die Hypothese, dass Knorpelproben, die big clusters darstellten bereits vor 5 – ALA – PDT stark arthrotisch und in höherem Maße avtial waren.

Durch die hohen Standardabweichungen im Bereich des Nadirs (21% STABW) lassen sich möglicherweise die Vitalitätseinbrüche bei 100µM 5 – ALA erklären (SIEHE ABBILDUNGEN 40 & 41). Nicht in allen Versuchsansätzen fiel die Knorpelviabilität nach 5 – ALA PDT auf entsprechend niedrige Werte. So waren in einem Versuchsansatz bei 100µM 5 – ALA und 2000 Sekunden Belichtung über 89,2% der Zellen vital (SIEHE ABBILDUNG 47). Das legt den Verdacht nahe, dass nicht die PDT, sondern der vorgeschädigte arthrotische Knorpel diese Vitalitätseinbrüche erklärt. Ebenso waren auch bei 100µM und 300 Sekunden in ei-

nem Versuchsansatz 94,3% der ausgezählten Knorpelzellen vital (SIEHE ABBILDUNG 46).

Der Trend, dass bei steigender 5 – ALA Konzentration und Belichtungsdauer die Vitalität kontinuierlich abnimmt, lässt sich möglicherweise mit der Tatsache erklären, dass arthrotischer Knorpel durch beginnende Degeneration weniger widerstandsfähig gegen äußere Einflüsse wie die PDT ist. So können steigende 5 – ALA Konzentrationen und Belichtungsdauern den vorgeschädigten Knorpel möglicherweise zusätzlich schädigen. In einem der Versuchsansätze stand noch sehr gesunder Knorpel zur Verfügung. Hier lag selbst bei 500µM 5 – ALA und 2000 Sekunden Belichtung (jeweils Maximalwerte) die Vitalität der Zellen bei 94,1% verglichen zur unbelichteten Referenz (SIEHE ABBILDUNG 45).

Somit scheint die PDT bei gesundem Gelenkknorpel auch in diesen hohen Konzentrationen und Belichtungsdauern sehr wahrscheinlich nicht vitalitätsgefährdend für Knorpelzellen. Es liegt der Verdacht nahe, dass vorgeschädigter, arthrotischer Knorpel mit steigender 5 – ALA Konzentration und Belichtungsdauer zunehmend in seiner Vitalität reduziert wird. Da dieses Verfahren in dieser Dissertation erstmalig angewendet wurde, gibt die aktuelle Studienlage wenig Referenz und Vergleichsergebnisse her. Hier bedarf es weiterer Forschung.

4.5 Kernfragmentierung

Mit Hilfe der vorherigen Assays konnte die Aussage getroffen werden, dass die Fibroblasten-1 ab einer Konzentration von 250µM 5 – ALA und bereits 300 Sekunden Belichtung sowohl keine Migration mehr betreiben, als auch kein MTT – Reagenz mehr umsetzen. Dies legt nahe, dass die Zellen, durch die PDT beeinträchtigt wurden. Es kann jedoch nicht eindeutig bestimmt werden, ob die Zellen apoptotisch wurden oder aber in Seneszenz verfallen sind, einen Status einnehmen in dem die Zellteilung zum Erliegen kommt, die aktive Bewegung unterbunden ist. Jedoch können die Metabolisierungsvorgänge der Zellen bei Seneszenz noch intakt sein, sprich das MTT – Reagenz würde in diesem Fall noch umgesetzt.³⁷ Laut Gewirtz et al. (2016) ist zunehmend betrachtet worden, dass

gerade Zellen, die in therapieinduzierte Seneszenz verfallen sind, durchaus das Potenzial besitzen, wieder in ihren normalen Zellzyklus und Metabolismus einzutreten.^{37, 72} Die Fragmentierung des Kerns als zusätzliche Methode dieser Dissertation ist ein valides Apoptosezeichen und stellt einen deutlichen Hinweis dar, dass die Fibroblasten durch die 5 – ALA PDT in Apoptose übergehen.

Auf ABBILDUNG 43 sind deutlich zytoplasmatische Einschlüsse innerhalb der Nuklei sichtbar, als grüne Artefakte in blau gefärbten Zellkernen. Dies ist deutlicher Nachweis einer stattgefundenen Kernfragmentierung und geht einher mit den TUNEL – Assay Ergebnissen bei Fibroblasten nach Hypericin – PDT von Armeanu et al (2014).³⁹ Kernfragmentierung zählt zu den sicheren Apoptosezeichen und weist das Zugrundegehen der Fibroblasten bei PDT ab 250µM 5 – ALA Konzentration nach. Es kann daher schlussgefolgert werden, dass die PDT bei Fibroblasten ab einem cut- off von 250µM 5 – ALA zytotoxisch wirkt und Apoptose induziert.

4.6 Ausblick

Wie sich in den Experimenten gezeigt hat, scheint die 5 – ALA PDT wirksam gegenüber der unspezifischen Synovitis. Ab 250µM 5 – ALA und bereits 300 Sekunden Belichtung ergaben sich starke Hinweise für Apoptose der Fibroblasten-1 Zellen. Vitaler Knorpel, als physiologischer Gelenkknorpel scheint von der PDT nicht beeinflusst zu werden. Inwiefern beginnend arthrotisch veränderter Knorpel von der Therapie beeinträchtigt wird, oder ob dieser bereits vor der Therapie entsprechend geringere Vitalitäten aufwies (SIEHE PUNKT 4.4.), bleibt zu klären. Die sehr spezifische Form einer Synovitis in Form der TGCT stellte sich bei den von uns gewählten Parametern und cut – off Werten über alle Konzentrationen des Photosensitizers und allen Belichtungsdauern durchweg vital dar. Dementsprechend scheint die ALA – PDT für die Therapie der hier verwendeten PVNS-1 Zellreihe – bei den von uns gewählten Parametern von Dosis, Lichtquelle (300W) und Belichtungsdauer – nicht geeignet. Prinzipiell scheint die Idee der PDT – Therapie bei PVNS jedoch erfolgsversprechend.

Ein interessanter Ansatz für die Zukunft könnte sein, einen anderen Photosensitizer zu verwenden. 5 – ALA aus der Gruppe der Porphyrine ist einer der heute meistgenutzten Photosensitizer, doch auch einige andere Photosensitizer sind auf dem Markt und werden derzeit erforscht.⁷³ Je höher die Wellenlänge der verwendeten Lichtquelle, desto tiefer können die Photonen in bestrahltes Gewebe eindringen.^{43, 44} Besonders tief dringen entsprechend Wellenlängen roten Lichts in Gewebe ein (600 – 800nm). 5 – ALA mit seinem Absorptionsmaximum zwischen 400 & 450nm, absorbiert dagegen bei blauem Licht mit geringerer Eindringtiefe optimal.⁷⁴ Photosensitizer aus der Gruppe der Chlorine (z.B. Foscan) bzw Phthalocyanine haben ihr Absorptionsmaximum zwischen 650 & 700nm (Phthalocyanine bei 750nm) und somit in einem Bereich von tiefer eindringendem, roten Licht.^{74, 75} Mit der Verwendung von polychromatischen, weißen Licht innerhalb dieser Arbeit sollen von 5 – ALA eben jene kleineren Absorptionsmaxima im höheren Wellenlängenbereich, die sogenannten Q – Banden (SIEHE PUNKT 1.3.1) auch aktiviert werden um die Eindringtiefe zu verbessern. Genauso könnte diese polychromatische Lichtquelle bei Photosensitizern verwendet werden, die ihr Absorptionsmaximum im hohen Wellenlängenbereich haben. Hypericin aus der Gruppe Perylenequinone ist mit seinem Absorptionsmaximum von 600nm bei sehr hohen Wellenlängen am aktivsten. In der Studie von Armeanu et al. (2014) konnte gezeigt werden, dass Hypericin mit anschließender PDT bereits bei 50µM und 20 minütiger Belichtung (weißes Licht) Fibroblastenvitalitäten deutlich unter 10% fallen ließ.³⁹

Ein Gedankenansatz für die Zukunft könnte also sein, die PDT mit weißem Licht und Hypericin anstelle des 5 – ALA als Photosensitizer einzusetzen und die Wirksamkeit der Methode auf TGCT zu evaluieren. Darüber hinaus zeigte sich, dass Hypericin im Vergleich zu 5 – ALA weniger zum Effekt des „photobleaching“ (lichtinduzierte Ausbleichung und somit Funktionslosigkeit des Photosensitizers) neigt.^{39, 74}

Neben dem Wechsel des Photosensitizers ist eine andere interessante Überlegung, ob man dem Photosensitizer Nanopartikel oder andere Moleküle anheftet, um ihn spezifischer und wirksamer zu machen.^{73, 76, 77, 78} Khaing et al.

(2011) schlägt die Verwendung von biokompatiblen Gold Nanopartikeln (GNP) vor.⁷⁶ Diese werden bereits für spezifischen Medikamententransport innerhalb des Körpers genutzt und können nach elektrostatischer Anheftung entweder an die COO^- oder NH_3^+ - Gruppe des 5 – ALA binden (je nach pH der Lösung). 5 – ALA wird hierbei von den Goldpartikeln umkapselt, behält dabei jedoch seine ursprüngliche Struktur.⁷⁹ Somit können die GNPs als geeigneter Träger für den zielgerichteten Transport von 5 – ALA zu Tumorzellen dienen.⁷⁶ In Khaings Studie konnte eine hohe Akkumulation von 5 – ALA – GNPs in Fibrosarkomzellen gesehen werden, darüber hinaus reichert sie sich in Prostatazellen und Glioblastomen an.^{76, 79} Interessant wäre zu sehen, ob sich diese hohe Akkumulation auch in PVNS Zellen darstellt, um die Therapie so effizienter zu gestalten. Darüber hinaus kommt es laut Goncalves et al. (2015) durch die GNPs zu stärkerer Verstoffwechslung von 5 – ALA zu PpIX, was zur Akkumulation von PpIX in der Zielzelle führt und somit zu höheren und stabileren PpIX Dosen im Zielgewebe.⁷⁷

Gerade bei der diffusen Form der PVNS wird neben der Synovektomie heutzutage die perioperative, intraartikuläre oder auch postoperative externe Radiotherapie mit Strahlendosen von 30Gy bis 50Gy aufgrund hoher Rezidivraten diskutiert.^{31, 24, 80} Laut Mollon et al. (2015) hat die Synovektomie mit anschließender Radiotherapie geringere Rezidivraten als die Synovektomie allein (12,0% Rezidivrate bei Synovektomie inklusive perioperativer Radiotherapie im Vergleich zu 36,9% bei alleiniger Synovektomie).²⁴ Ebenso haben Duan et al. (2018) in ihrer Studie gezeigt, dass postoperative Radiotherapie mit niedrigen oder moderaten Dosen (30Gy – 50Gy) eine verbesserte Rezidivrate aufweist, ohne dabei innerhalb von 29 Monaten follow – up die Gelenkleistung zu verschlechtern oder eine verspätete Strahlenreaktion hervorzurufen.⁸¹ Bernthal et al (2020) weisen bei dieser Behandlungsmethode ebenfalls eher auf kurzfristige Nebenwirkungen wie mögliche Wundheilungsstörung hin.⁸⁰ Inwiefern eine Operation und Radiotherapie mit einer PDT verknüpft werden kann, um möglicherweise sowohl uncharakteristische Synovitis als auch PVNS therapeutisch abzudecken und dabei die Sicherheit der ausreichenden Radikalität der Maßnahme zu gewährleisten, kann ein interessanter Gedankeneinsatz für die Zukunft sein.

In der Literatur wird aktuell intensiv daran geforscht, womit die PDT weiterhin kombiniert werden kann um ihre Wirksamkeit im Zielgewebe zu verstärken.⁸² Luksiene et al (2003) beschreibt die Kombination der PDT mit Hyperthermie zur Steigerung der PDT – Effizienz insbesondere in hypoxischen malignen Gewebsarealen.⁸³ Schlecht perfundierte Areale stellen mitunter nicht ausreichend Sauerstoff für die PDT zur Verfügung (Prinzip der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies). Hyperthermie kann die Wirkung der PDT in hypoxischen Gewebsanteilen verstärken, da diese Gewebsanteile mit erniedrigtem pH – Wert und insuffizienter Nährstoff- und Blutversorgung besonders sensitiv auf Hyperthermie reagieren.⁸³

Zduniak et al. (2020) konnte eine verstärkte Wirksamkeit der 5 – ALA PDT bei Kombination mit Thalidomid in Brustkrebs Zellreihen von Mäusen nachweisen.⁸² Thalidomid vermittelt seine Wirkung über vascular epithelial growth factor Inhibition (VEGF).⁸² VEGF ist in PVNS Zellen bisher nicht sicher nachgewiesen, jedoch beschreibt Nissen et al (2013) den Einsatz von Bevacizumab (VEGF – Antikörper) bei refraktären PVNS Verläufen als wirkungsvolle Alternative.⁸⁴

Darüber hinaus stellt Botez et al (2013) dar, dass die Existenz von Trisomie 7 mit der PVNS assoziiert ist.⁶⁸ Das Protoonkogen c-erb codiert für EGFR und ist auf Chromosom 7 lokalisiert.^{68, 69} Somit gibt es Anhalt für erhöhte EGFR Expression bei einzelnen PVNS Fällen und eine mögliche Wirksamkeit von Cetuximab. Die PDT kann in einigen PVNS Fällen durch den Zusatz von Cetuximab möglicherweise suffizienter ablaufen.

Die in dieser Dissertation verwendete Zellreihe PVNS-1 ist auf eine EGFR bzw. VEGF Expression nicht getestet worden. Möglicherweise kann die nicht signifikante Wirksamkeit der PDT dadurch erklärt werden, dass die hier verwendete PVNS-1 Zellreihe eine EGFR/ VEGF Mutation aufweist.

Die weitere genetische Analyse von PVNS – Zellen auf VEGF Expression bzw. EGFR Überexpression stellt interessante Gedankenansätze für die Zukunft dar. Die Augmentation der PDT mit entsprechenden Wirkstoffen bietet somit Grundlage für weitere intensive Forschung.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung: Die photodynamische Therapie (PDT) ist eine klinisch anerkannte, minimalinvasive und vielversprechende Technik, die bei der Behandlung verschiedener Pathologien eingesetzt wird. Die Entzündung der Gelenkschleimhaut (Synovitis) ist sowohl als Bestandteil der Arthrose als auch als eigenes Krankheitsbild in Form des tenosynovialen Riesenzelltumors (TGCT) oder im Rahmen der Arthritis eine häufige Entität im Bereich der orthopädischen Chirurgie. Gedankenansatz dieser Dissertation ist, ob die PDT als lokal zielgerichtete Therapie zur Behandlung von Gelenkentzündungen wie Synovitis verwendet werden kann. Eine PDT auf der Basis von 5 - Aminolevulinsäure (5 - ALA) könnte jedoch die Lebensfähigkeit physiologischer Zellen im Gelenk, wie z.B. Gelenkknorpel, beeinträchtigen. Ziel dieser Studie war die Untersuchung der PDT an Gelenkzellkulturen, ob die 5 – ALA – PDT eine suffiziente Therapiemethode der Synovitis sein kann und dabei aber physiologischen und intakten Gelenkknorpel verschont.

Material & Methodik: Zur Erhebung der Daten wurde mit zwei Zellkulturen des Orthopädischen Zellforschungslabors Tübingen gearbeitet: PVNS-1 – Zellen und Fibroblasten-1 – Zellen (als Korrelat der unspezifischen Synovitis). Darüber hinaus wurde mit vitalen Knorpelproben der Winghofer Klinik Rottenburg der Einfluss der 5 – ALA – PDT auf vitale Knorpelzellen untersucht. Dabei wurden entsprechende Zellproben mit verschiedenen 5 – ALA Konzentrationen (Fibroblasten-1 und Chondrozyten: 50µM, 100µM, 250µM, 500µM // PVNS-1: 500µM, 1mM, 1,5mM, 3mM) inkubiert. Anschließend wurden entsprechende Zellreihen aus 16,5 cm Entfernung einer handelsüblichen Arthroskopielampe (300W) als Lichtquelle je verschiedenen Belichtungsdauern (300 Sekunden, 1000 Sekunden, 2000 Sekunden) ausgesetzt. Mithilfe von Migrationsassays, MTT – Assays, dem Kernfragmentierungsassay, sowie Viability – Assays des Knorpels wurde die Wirksamkeit der PDT an oben genannten Zell- und Gewebsstrukturen getestet.

Ergebnisse: Bei der unspezifischen Synovitis in Form der Fibroblasten-1 stellte sich über alle Versuchsansätze eine minimale Vitalität der Zellen bei 500µM 5 – ALA und einer Belichtung von 300 Sekunden dar. Längere Belichtungsdauern und höhere 5 – ALA Konzentrationen verringerten die Fibroblastenvitalitäten hierbei nicht, mit zunehmenden 5 – ALA Konzentrationen stiegen die Vitalitätswerte paradoxerweise erneut an. Die Vitalität der PVNS-1 Zellreihe veränderte sich bei dem von uns verwendeten Versuchsaufbau und den festgelegten cut – off Werten nicht signifikant, minimal lag sie hier bei 91%. Auch bei dieser Zellreihe stieg ähnlich wie bei den Fibroblasten-1 die Zellvitalität mit zunehmender 5 – ALA Konzentration erneut.

Mit steigender 5 – ALA Konzentration und maximalen Belichtungsdauer reduzierte sich die Vitalität der Chondrozyten, jedoch nicht signifikant ($p=0,947$). Die niedrigste Chondrozytenvitalität lag bei einer 100µM 5 – ALA Konzentration und einer Belichtungsdauer von 2000 Sekunden.

Konklusion: Schlussfolgernd kann aus dieser Dissertation der Verdacht nahegelegt werden, dass Fibroblasten, repräsentativ für die uncharakteristische Form der Synovitis, von der 5 – ALA – PDT ab 250 µM 5 - ALA möglicherweise zerstört werden (minimale Vitalität bei 500µM 5 – ALA) und diese Therapieform bei diesem Krankheitsbild somit eine mögliche Therapieentität neben der operativen Sanierung in Form von Synovektomie bieten kann.

Die Sonderform der Synovitis in Form der TGCT, die innerhalb dieser Dissertation genauer betrachtet wird, zeigt bei den von uns gewählten Versuchsparametern keine signifikanten Unterschiede der Vitalität zwischen Negativprobe und Kontrollgruppe. Wenn man die reinen Zahlenwerte der Migration betrachtet (ABBILDUNGEN 19 – 22) sind durchaus Tendenzen geringerer Migration unter 5 – ALA – PDT zu detektieren. Diese fallen jedoch bei den von uns gewählten cut – off Werten (200µm Migrationsdistanz) nicht signifikant aus. Des Weiteren wurde in dieser Dissertation nur eine Zellreihe der PVNS verwendet. Auf eine mögliche Mutation (z.B. EGF1), die die Wirksamkeit der PDT beeinflussen kann, wurde zuvor nicht getestet.

Interessant zu klären bleibt für die Zukunft, ob der Wechsel des Photosensitizers oder eine genetische PVNS – Analyse und anschließend gezielte Augmentation der PDT mit Chemotherapeutika eine effiziente Möglichkeit sein kann, die zytotoxische Wirkung der 5 – ALA – PDT auf die PVNS-1 Zellreihe auszuweiten.

Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass physiologischer, vitaler Gelenkknorpel vom zytotoxischen Effekt der 5 – ALA PDT soweit wir dies anhand der genutzten Methoden beurteilen können, weitestgehend intakt bleibt. Stark arthrotischer Knorpel zeigt dahingegen eine Tendenz der verminderten Vitalität bei steigender 5 – ALA Konzentration und Belichtungsdauer.

6 Literaturverzeichnis

1. Schmidt W, Aust G, Mense S, et al. Duale Reihe Anatomie. *Duale R Anat.* 2017. doi:10.1055/b-005-143674
2. Julkunen P. *Relationships between Structure, Composition and Function of Articular Cartilage. Studies Based on Fibril Reinforced Poroviscoelastic Modeling.* Vol PhD.; 2008.
3. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: Structure, injuries and review of management. *Br Med Bull.* 2008;87(1):77-95. doi:10.1093/bmb/ldn025
4. Mundt L, Shanahan K. Chapter 11: Synovial Fluid. *Graff's Textb Urin Body Fluids.* 2011:253-262.
5. Ombregt L. Applied anatomy of the knee. *A Syst Orthop Med.* 2013:e262-e269. doi:10.1016/b978-0-7020-3145-8.00087-9
6. Anatomie Duale Reihe. 4. aktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2017. doi:10.1055/b-005-143674. Kniegelenk (Articulatio genus) Seite :363-379..
7. Structure & Function of the Knee Osteology of the Knee Distal femur. © teachmeanatomy.info/lower limb an knee.
8. Orth P, Kohn D, Madry H. Degenerative Kniegelenkerkrankungen – Gonarthrose. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date.* 2016;11(02):81-98. doi:10.1055/s-0041-108361
9. Massimo B, Antonella M, Paolo F, Francesco U, Daniele T, Michele MB. special forms of synovitis 2016.
10. Morawietz L, Fernahl G, Krenn V. Differenzialdiagnostik der Synovialitis Differential diagnosis of synovitis. *Pathologe.* 2008;29(S2):218-222. doi:10.1007/s00292-008-1036-9

11. Park J-E, Kim H-S, Seong J-H, et al. Knee Synovitis Mimicking a Septic Arthritis. *J Rheum Dis*. 2015;22(1):39. doi:10.4078/jrd.2015.22.1.39
12. Therapie AVP. Therapie aktuell Rheumatoide Arthritis (RA): Frühe Diagnose und Therapie sind entscheidend. 2016:137-143.
13. Deutsche Rheuma-Liga Bundesverband e.V. Z Der. Rheumatoide Arthritis Merkblatt Rheuma. S. 9-10. 9. Auflage 2017.
14. Schweizerische Gesellschaft für Rheumatologie; Autoren: Dr. med. Adrian Forster, Kantonsspital Winterthur. Rheumaliga Schweiz. 6. Auflage 2014.
15. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Robert Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt; Heft 54 Juni 2013 Seiten: 8 - 15.
16. Lockwood BW. Osteoarthritis (Degenerative Joint Disease). 2019;(September 2017).
17. Danalache M, Kleinert R, Schneider J, et al. Changes in stiffness and biochemical composition of the pericellular matrix as a function of spatial chondrocyte organisation in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr Cartil*. 2019;27(5):823-832. doi:10.1016/J.JOCA.2019.01.008
18. Pereira D, Ramos E, Branco JC. Osteoarthritis. 2014;(October). doi:10.20344/amp.5477
19. Sinusas K. Osteoarthritis: Diagnosis and Treatment. 2012.
20. AWMF S2k Leitlinie Gonarthrose Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC), Prof. Dr. J. Stöve Stand:01/2018.
21. Verspoor FGM, Han DF, Gademan MGJ, et al. Severity classification of Tenosynovial Giant Cell Tumours on MR imaging. 2018;27(July):544-550. doi:10.1016/j.suronc.2018.07.002
22. Mastboom M, Schreuder B. The effect of surgery in tenosynovial giant cell

- tumours as measured by patient-reported outcomes on quality of life and joint function. 2019;(March). doi:10.1302/0301-620X.101B3.BJJ-2018-0804.R1
23. Cassier PA, Gelderblom H, Stacchiotti S, Thomas D, Maki RG. Efficacy of Imatinib Mesylate for the Treatment of Locally Advanced and / or Metastatic Tenosynovial Giant Cell Tumor / Pigmented Villonodular Synovitis. 2012:1649-1655. doi:10.1002/cncr.26409
 24. Mollon B, Lee A, Busse JW, et al. The effect of surgical synovectomy and radiotherapy on the rate of recurrence of pigmented villonodular synovitis of the knee: An individual patient meta-analysis. *Bone Jt J.* 2015;97-B(4):550-557. doi:10.1302/0301-620X.97B4.34907
 25. Temponi EF, Barros AAG, Paganini VO, Barbosa VAK, Badet R, Carvalho Júnior LH de. Diffuse pigmented villonodular synovitis in knee joint: diagnosis and treatment. *Rev Bras Ortop (English Ed.* 2017;52(4):450-457. doi:10.1016/j.rboe.2017.06.008
 26. Mastboom MJL, Verspoor FGM, Verschoor AJ, et al. Higher incidence rates than previously known in tenosynovial giant cell tumors: A nationwide study in The Netherlands. *Acta Orthop.* 2017;88(6):688-694. doi:10.1080/17453674.2017.1361126
 27. Mastboom MJ, Planje R, Sande MA Van De. The Patient Perspective on the Impact of Tenosynovial Giant Cell Tumors on Daily Living: Crowdsourcing Study on Physical Function and Quality of Life. 2018;(February). doi:10.2196/ijmr.9325
 28. FERNANDES TL, VIDEIRA LD, SASAKI SU, et al. Bilateral Localized Pigmented Villonodular Synovitis of the Knee: Case Report and Review. *Acta Ortopédica Bras.* 2018;26(3):183-186. doi:10.1590/1413-785220182603179623
 29. Van Der Heijden L, Gibbons CLMH, Dijkstra PDS, et al. The management of diffuse-type giant cell tumour (pigmented villonodular synovitis) and

- giant cell tumour of tendon sheath (nodular tenosynovitis). *J Bone Jt Surg - Ser B*. 2012;94 B(7):882-888. doi:10.1302/0301-620X.94B7.28927
30. Mastboom MJL, Verspoor FGM. Tenosynovial Giant Cell Tumors in Children : A Similar Entity Compared With Tenosynovial Giant Cell Tumors in Children: A Similar Entity Compared With Adults. 2018;(February). doi:10.1007/s11999.00000000000000102
 31. Ma X, Shi G, Xia C. Pigmented villonodular synovitis : a retrospective study of seventy five cases (eighty one joints). 2013:1165-1170. doi:10.1007/s00264-013-1858-9
 32. Imhoff A, Schreiber A. Die Synovitis villonodosa pigmentosa des Fußes - Diagnose, Therapie und Langzeitverläufe. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*. 2008;126(02):130-137. doi:10.1055/s-2008-1044882
 33. Tyler WK, Vidal AF, Williams RJ, Healey JH. pigmented villonodular synovitis (PVNS) Pigmented Villonodular Synovitis. *Diagnostic Imaging Foot Ankle*. 2014. doi:10.1055/b-0034-102497
 34. Imakiire N. Malignant Pigmented Villonodular Synovitis in the Knee - Report of a Case with Rapid Clinical Progression. *Open Orthop J*. 2011;3(1):13-16. doi:10.2174/1874325001105010013
 35. Heijden L, Piner SR, Adrianus M, Sande J. Pigmented villonodular synovitis : a crowdsourcing study of two hundred and seventy two patients. *Int Orthop*. 2016;(May). doi:10.1007/s00264-016-3208-1
 36. Cláudia M, Issa A. Photodynamic therapy : a review of the literature and image documentation. 2010;85(4):501-511.
 37. Grigalavicius M, Juraleviciute M, Kwitniewski M, Juzeniene A. The influence of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid on senescent skin cancer cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017;17:29-34. doi:10.1016/j.pdpdt.2016.10.008
 38. Waidelich R, Beyer W, Knüchel R, et al. Whole bladder photodynamic

- therapy with 5-aminolevulinic acid using a white light source. *Urology*. 2003;61(2):332-337. doi:10.1016/S0090-4295(02)02164-7
39. Armeanu S, Heitmann H, Wessels J, et al. In vitro photodynamic therapy of childhood rhabdomyosarcoma. *Int J Oncol*. 2014;615-620. doi:10.3892/ijo.30.3.615
 40. Rkein AM, Ozog DM. Photodynamic Therapy. 2014;32:8635.
 41. Zhu TC, Finlay JC. The role of photodynamic therapy „ PDT ... physics. 2008;(May):3127-3136. doi:10.1118/1.2937440
 42. Kennedy J. PHOTODYNAMIC THERAPY WITH ENDOGENOUS PROTOPORPHYRIN IX: BASIC PRINCIPLES AND PRESENT CLINICAL EXPERIENCE *. 1990;6:143-148.
 43. Marra K, LaRoche EP, Chapman MS, et al. Comparison of Blue and White Lamp Light with Sunlight for Daylight-Mediated, 5-ALA Photodynamic Therapy, in vivo. *Photochem Photobiol*. 2018;94(5):1049-1057. doi:10.1111/php.12923
 44. Wang L, Ph D, Tagg R, Ph D, Barqawi AB, Chen YK. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors—potential and technical challenges. *Technol. Cancer Res. Treat*. 2008;7:309–320. doi.
 45. Zwinkels JC, Canada C. Encyclopedia of Color Science and Technology. *Encycl Color Sci Technol*. 2020;(January 2015). doi:10.1007/978-3-642-27851-8
 46. Bruno Montcel, Laurent Mahieu-Williams, Xavier Armoiry, David Meyronet, Jacques Guyotat, Two-peaked 5-ALA-induced PpIX fluorescence emission spectrum distinguishes glioblastomas from low grade gliomas and infiltrative component of glioblastomas. 2013.
 47. Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. 2013:24-29.

48. *Photodynamische Therapie (PDT) Einfluss von Inspiratorischer Hypoxie Und Hyperoxie Auf Die Behandlungseffektivität Und Das Metabolische Mikromilieu.*; 2004.
49. C. Heinrich et al. (Hrsg.), Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, DOI 10.1007/978-3-642-17972-3_32, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014 S.379 - 380.
50. Springer-Verlag GmbH Deutschland 2018 W. Müller-Esterl, Biochemie, Biosynthese von Aminosäuren und Häm doi.org/10.1007/978-3-662-54851-6_48. S668 - 669.
51. Colditz MJ, Leyen K Van, Jeffree RL. Aminolevulinic acid (ALA)–protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection . Part 2: Theoretical , biochemical and practical aspects. *J Clin Neurosci.* 2012;19(12):1611-1616. doi:10.1016/j.jocn.2012.03.013
52. Stepanenko AA, Dmitrenko V V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene.* 2015;574(2):193-203. doi:10.1016/j.gene.2015.08.009
53. Cañete M, Horobin RW, Stockert JC, Villanueva Á, Blázquez-Castro A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 2012;114(8):785-796. doi:10.1016/j.acthis.2012.01.006
54. CHACON E, ACOSTA D, LEMASTERS J. *Primary Cultures of Cardiac Myocytes as In Vitro Models for Pharmacological and Toxicological Assessments.* ACADEMIC PRESS; 2007. doi:10.1016/b978-012163390-5/50010-7
55. Tecan Ultra Evolution LIVE / DEAD ® Viability / Cytotoxicity Assay Kit. Technical note: Seite1-6.
56. Imagestream T, Ideas T, Cells A. Quantitation of Apoptosis by Nuclear Fragmentation Quantitation of Apoptosis by Nuclear Fragmentation. *Time.*

- 2006.
57. R Al Attar AS. Pigmented Villonodular Synovitis (PVNS) in Human and Animals: A Mini Review Article and Conclusive View. *Int Clin Pathol J.* 2017;5(2). doi:10.15406/icpjl.2017.05.00129
 58. Heyd R, Micke O, Berger B, Eich HT, Ackermann H, Seegenschmiedt MH. Radiation therapy for treatment of pigmented villonodular synovitis: Results of a national patterns of care study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;78(1):199-204. doi:10.1016/j.ijrobp.2009.07.1747
 59. Zhou B, Zhang L, Permatasari F, Liu J, Xu Y, Luo D. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy ALA-PDT elicits oxidative damage and apoptosis in UVB-induced premature senescence of human skin fibroblasts. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016;14:47-56. doi:10.1016/j.pdpdt.2016.02.005
 60. Zhang C, Wang J, Chou A, Gong T, Devine EE, Jiang JJ. Photodynamic Therapy Induces Antifibrotic Alterations in Primary Human Vocal Fold Fibroblasts. doi:10.1002/lary.27219
 61. Heckenkamp J, Aleksic M, Gawenda M, Brunkwall S. Modulation of Human Adventitial Fibroblast Function by Photodynamic Therapy of Collagen Matrix Modulation of Human Adventitial Fibroblast Function by Photodynamic Therapy of Collagen Matrix. 2004;(December). doi:10.1016/j.ejvs.2004.08.013
 62. Jiang F, Chopp M, Katakowski M, et al. Photodynamic Therapy with Photofrin Reduces Invasiveness of Malignant Human Glioma Cells. 2002:280-288.
 63. Harmatys KM, Musso AJ, Clear KJ, Smith BD, Dame N. Small molecule additive enhances cell uptake of 5- aminolevulinic acid and conversion to protoporphyrin IX 2017;15(11):1408-1416. doi:10.1039/c6pp00151c
 64. Egli RJ, Schober M, Hempfing A, Ganz R, Hofstetter W, Leunig M.

- Sensitivity of osteoblasts , fibroblasts , bone marrow cells , and dendritic cells to 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy. 2007;89:70-77. doi:10.1016/j.jphotobiol.2007.09.005
65. Nemes A, Fortmann T, Poeschke S, Greve B. 5-ALA Fluorescence in Native Pituitary Adenoma Cell Lines : Resection Control and Basis for Photodynamic Therapy (PDT) 2016:1-12. doi:10.1371/journal.pone.0161364
 66. K.A. Cengel, A.Rizzo, M. Mickler SH. Inhibiting ABCG-2-dependent Cellular Efflux of Protoporphyrin IX Enhances the Cytotoxicity of Aminolevulinic Acid-mediated Photodynamic Therapy in Head and Neck Cancer Cells. 2008.
 67. Peng W, de Bruijn HS, ten Hagen TLM, et al. Targeted Photodynamic Therapy of Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma with Anti-epidermal Growth Factor Receptor Antibody Cetuximab and Photosensitizer IR700DX in the Mouse Skin-fold Window Chamber Model. *Photochem Photobiol.* 2020;96(3):708-717. doi:10.1111/php.13267
 68. Botez P, Sirbu PD, Grierosu C, Mihailescu D, Savin L, Scarlat MM. Adult multifocal pigmented villonodular synovitis - Clinical review. *Int Orthop.* 2013;37(4):729-733. doi:10.1007/s00264-013-1789-5
 69. Ray RA, Morton CC, Lipinski KK, Corson JM, Fletcher JA. Cytogenetic Evidence of Clonality in a Case of Pigmented Villonodular Synovitis. 1991.
 70. Hwang HS, Kim HA. Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. 2015;(August):26035-26054. doi:10.3390/ijms161125943
 71. Roach HI, Aigner T, Kouri JB. Chondroptosis : A variant of apoptotic cell death in chondrocytes ? 2004:265-277.
 72. Chakradeo S, Elmore LW, Gewirtz DA. Is Senescence Reversible ?

2016:460-466.

73. Lan M, Zhao S, Liu W, Lee CS, Zhang W, Wang P. Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Adv Healthc Mater.* 2019;8(13):1-37. doi:10.1002/adhm.201900132
74. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy New photosensitizers for photodynamic therapy. 2016;(November 2017). doi:10.1042/BJ20150942
75. Manisova B, Binder S, Malina L, Jiravova J, Langova K, Kolarova H. Phthalocyanine-mediated photodynamic treatment of tumoural and non-tumoural cell lines. *Anticancer Res.* 2015;35(7):3943-3952.
76. Oo K., Yang. X; 5-aminolevulinic acid-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer. 10.2217/17435889.3.6.777 © 2008 Future Medicine Ltd research article S. 777 - 786.
77. Gonçalves KDO, Nascimento M, Sicchieri LB, et al. Aminolevulinic acid with gold nanoparticles: a novel theranostic agent for atherosclerosis. 2015:1974-1980. doi:10.1039/c4an02166e
78. AlSalhi MS, Aziz MH, Atif M, et al. Synthesis of NiO nanoparticles and their evaluation for photodynamic therapy against HeLa cancer cells. *J King Saud Univ - Sci.* 2020;32(2):1395-1402. doi:10.1016/j.jksus.2019.11.033
79. Tewari KM, Eggleston IM. therapy and photodiagnosis. 2018:1553-1572. doi:10.1039/c8pp00362a
80. Bernthal NM, Ishmael CR, Burke ZDC. Management of Pigmented Villonodular Synovitis (PVNS): an Orthopedic Surgeon's Perspective. *Curr Oncol Rep.* 2020;22(6):1-6. doi:10.1007/s11912-020-00926-7
81. Duan Y, Qian J, Chen K, Zhang Z. Necessity of adjuvant postoperative radiotherapy for diffuse pigmented villonodular synovitis of the knee. 2018;3(November 2017).

82. Zduniak K, Gdesz-Birula K, Woźniak M, Duś-Szachniewicz K, Ziółkowski P. The Assessment of the Combined Treatment of 5-ALA Mediated Photodynamic Therapy and Thalidomide on 4T1 Breast Carcinoma and 2H11 Endothelial Cell Line. *Molecules*. 2020;25(21):1-10. doi:10.3390/molecules25215184
83. Luksiene Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina (Kaunas)*. 2003;39(12):1137-1150.
84. M J Nissen, A Boucher, L Brulhart, J Menetrey CG. Efficacy of intra-articular bevacizumab for relapsing diffuse-type giant cell tumour. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(5):945-947. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204137

7 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde im Zellbiologischen Forschungslabor der Klinik für Orthopädie in Tübingen – Derendingen unter der Betreuung von PD Dr. Dr. med. Frank Traub durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Dr. med. Frank Traub.

Sämtliche Zellkultur, Experimente und Versuche dieser Arbeit wurden nach Bekanntmachung mit den Geräten und Einarbeitung durch Marina Danalache und Rosa Riester von mir, Felix Diel, eigenständig durchgeführt. Die Photographien und statistische Auswertung der ermittelten Werte erfolgten ebenso ausschließlich durch mich.

Ich versichere, das Manuskript vollständig selbst verfasst und alle verwendeten Quellen in entsprechendem Verzeichnis aufgeführt zu haben.

8 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater PD Dr. Dr. Frank Traub, der mich in das Thema dieser Dissertation eingeführt hat und mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem interessanten Themenkomplex zu forschen. Danken möchte ich auch für die hilfreichen Gedankenansätze beziehungsweise kritisches Hinterfragen während meiner Datenerhebung und die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens.

Darüber hinaus danke ich Rosa Riester für die Bekanntmachung mit der Zellkultur und Labormethoden im orthopädischen Zelllabor. In besonderem Maße danken möchte ich Marina Danalache für mentale Unterstützung und sehr nützliche Gedankenansätze sowohl während der Datenerhebung als auch bei der Verfassung dieser Dissertation.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Michael und Christine Diel, meinem Bruder Philipp Diel sowie meinen Großeltern Heribert und Wilma Kempf, die mich während der Dissertation und darüber hinaus auf meinem Weg durch das Studium stets liebevoll mit Rückhalt und vollstem Vertrauen unterstützt und begleitet haben.

Danken möchte ich darüber hinaus meinem engen Tübinger und Mettlacher Freundeskreis sowie Familie Volker Becker für gelungene Ablenkung in meiner Freizeit und die Möglichkeit in den Laborpausen völlig abzuschalten.