

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
König-Ludwig-Haus  
Direktor: Professor Dr. med. J. Eulert

**Photodynamische Lasertherapie zur Behandlung der  
Rheumatoiden Arthritis im Tiermodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Sven Houserek  
aus München

München, April 2003

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. C. Hendrich  
Korreferent: Prof. Dr.-Ing. R. Thull  
Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2004

Der Promovend ist Arzt

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 Chronische Polyarthritits .....	1
1.1.1 Definition .....	1
1.1.2 Geschichte .....	1
1.1.3 Epidemiologie .....	2
1.1.4 Ätiologie und Pathogenese .....	3
1.1.5 Histologie .....	5
1.1.6 Klinik .....	7
1.1.7 Prognose .....	9
1.1.8 Therapie .....	10
1.1.8.1 Medikamentöse Therapie .....	10
1.1.8.2 Synoviorthese .....	11
1.1.8.3 Operative Therapie .....	12
1.1.9 Arthritismodelle .....	15
1.2 Laser in der Medizin .....	17
1.3 Photodynamische Therapie .....	19
1.3.1 Definition .....	19
1.3.2 Geschichte .....	19
1.3.3 Grundlagen der photodynamische Therapie .....	23
1.3.4 Photobleaching .....	26
1.3.5 Photosensibilisatoren .....	27
1.3.5.1 Benzoporphyrinderivat .....	31
1.3.6 Laserinduzierte Fluoreszenz (LIF) .....	35
1.4 Vorarbeiten .....	36
1.5 Fragestellung .....	37
2. Materialien und Methoden .....	38
2.1 Versuchstiere .....	38
2.2 Arthritismodell .....	38
2.2.1 Herstellung der Injektionslösung .....	38
2.2.2 Immunisierung und Boosterung .....	39

2.3	Photodynamische Therapie mit BPD-MA .....	39
2.4	Laserapparatur und Applikatoren .....	40
2.5	Operationstechnik .....	42
2.6	Fluoreszenzspektroskopie (LIF-System) .....	44
2.7	Gewinnung der Proben .....	47
2.8	Histologie.....	50
2.9	Fluoreszenzmikroskopie .....	50
2.9.1	Probengewinnung.....	50
2.9.2	Mikroskop .....	51
2.9.3	Spektrograph.....	52
2.9.4	CCD-Kamera.....	53
2.9.5	Bispektrale Aufnahmen .....	54
2.9.6	Messung von Emissionsspektren .....	55
3.	Ergebnisse.....	57
3.1	Arthritismodell.....	57
3.2	Intraoperative Fluoreszenzspektroskopie .....	59
3.3	Klinik.....	61
3.4	Makroskopie .....	62
3.5	Histologie.....	62
3.6	Fluoreszenzmikroskopie .....	68
3.6.1	Synovialis .....	69
3.6.2	Muskulatur.....	71
3.6.3	Gefäß .....	74
3.6.4	Haut.....	77
3.6.5	Sehne .....	79
3.6.6	Nerv.....	81
3.6.7	Meniskus .....	83
3.7	Fluoreszenzspektroskopische Messungen.....	85
4.	Diskussion .....	87
4.1	Tiermodell .....	88
4.2	Photodynamische Therapie .....	93
4.3	Vorarbeiten .....	94

4.4 Photosensibilisatoren .....	96
4.5 Dosis .....	98
4.6 Fluoreszenzmikroskopie .....	99
4.7 Laser .....	101
4.8 Applikatoren .....	102
4.9 Dosimetrie .....	103
4.10 Effekt.....	107
4.11 Fazit und Zukunftsperspektiven .....	112
5. Zusammenfassung.....	114
6. Literaturverzeichnis .....	117

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AIA	Antigeninduzierte Arthritis
ALA	5-Aminolävulinsäure
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
ARA	American Rheumatism Association
BPD-MA	Benzoporphyrin Derivat Monoacid Ring A
CCD	Charged Coupled Device
CD	Cluster of Differentiation
cP	chronische Polyarthrit
FA	Freund-Adjuvans
FWHM	Full Width at Halfe Maximum (Maß für die Qualität eines Detektionssystems)
G	Gauge (Maßeinheit von Kanülen)
HAAG	hitzeaggregiertes Immunglobulin G
HE	Hämatoxylin / Eosin
HLA	humanes Leukozytenantigen
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
J	Joule (Energieeinheit, 1 Joule = 1 Watt x Sekunde)
KG	Körpergewicht
LDL	Low Density Lipoproteins
LED	Light Emitting Diode
LIF	laserinduzierte Fluoreszenz
m-THPC	meta-Tetrahydroxyphenylchlorin
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
PDT	Photodynamische Therapie
PUVA	Psoralene plus UVA
tPDT	transdermale Photodynamische Therapie
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Volt (Spannungseinheit, 1 Volt = 1 Watt / 1 Ampere)
W	Watt (Leistungseinheit, 1 Watt = 1 Joule / Sekunde)

# 1. Einleitung

## 1.1 Chronische Polyarthritits

### 1.1.1 Definition

Die chronische Polyarthritits (rheumatoide Arthritits) ist eine chronische, unter Umständen remittierend oder schubweise verlaufende entzündliche, destruierende Gelenkerkrankung (Synovialitits) mit Schwellung, Schmerzen, Tendenz zur Bewegungseinschränkung bis zur Ankylosierung, auch Stabilitätsverlust, Deformierung und Deviationen mehrerer peripherer Gelenke mit entsprechenden Folgezuständen (z. B. Muskelatrophien), oft unter Beteiligung der Sehnenscheiden und der Halswirbelsäule und mit möglichen Manifestationen außerhalb des Bewegungsapparates <sup>[1]</sup>.

### 1.1.2 Geschichte

Der Rheumabegriff geht zurück auf die humoralbiologische Lehre von der Bedeutung der vier Kardinalsäfte in der griechischen Antike. Bereits im „*Corpus hippocraticum*“ ist der Begriff Rheuma zu finden. Ebenso wie das inhaltlich gleichwertig gebrauchte Wort „*Katarrhos*“ ist er mit Fluss, Herabfluss zu übersetzen, womit der ziehende, fließende Schmerz gemeint war <sup>[2]</sup>.

1603 unterschied der Schweizer Platter Schmerzen des „*Habitus corporis*“ und des „*Habitus externus*“, solche der Knochen, der Gelenke oder der Weichteile <sup>[3;4]</sup>.

Die früheste eindeutige wissenschaftliche Erwähnung der chronischen Polyarthritits findet sich in der Dissertation des französischen Medizinstudenten Landré-Beauvais aus dem Jahre 1800. In seiner Arbeit beschrieb er erstmals eine Erkrankung, die er „*Goutte asthenique primitive*“ nannte und die der chronischen Polyarthritits entspricht <sup>[5]</sup>.

Brodie beschrieb 1818 das typische langsame Voranschreiten der chronischen Polyarthritits sowie die Affektion von Bursen und Sehnenscheiden. Auch der Krankheitsbeginn mit Synovitis, die im weiteren Verlauf zur Knorpelzerstörung führt, war ihm bereits bekannt <sup>[6]</sup>.

Die heute im angloamerikanischen Sprachraum übliche Bezeichnung

„*rheumatoid arthritis*“ geht auf den englischen Arzt Garrod zurück. Er ersetzte 1858 den bis dahin üblichen Begriff „*rheumatoid gout*“<sup>[6;7]</sup>.

Weitere Meilensteine in der Geschichte der chronischen Polyarthritiden sind die Veröffentlichung der ersten Röntgenbilder cP-geschädigter Gelenke durch Bannatyne im Jahre 1896, die Abgrenzung der chronischen Polyarthritiden von der Arthrose durch Goldthwait 1904 und die Entdeckung des Rheumafaktors durch den Schweden E. Waaler (1940) und den Amerikaner H. Rose (1948)<sup>[6]</sup>.

### 1.1.3 Epidemiologie

Die Schwierigkeit epidemiologischer Studien zur chronischen Polyarthritiden liegt in ihrer uneinheitlichen Nomenklatur und Klassifikation sowie in der hohen Dunkelziffer subklinischer und latenter Verläufe begründet<sup>[8;9]</sup>. 1958 definierte Ropes einen inzwischen mehrfach überarbeiteten Katalog von sieben diagnostischen Kriterien (ARA-Kriterien, siehe Tabelle 1), an dem sich die Mehrheit klinischer Studien orientiert<sup>[10]</sup>.

1	Morgensteifigkeit von mindestens 1 Stunde Dauer
2	Weichteilschwellung / Arthritis in mind. 3 Gelenkregionen
3	Weichteilschwellung / Arthritis im Handgelenk, MCP- oder PIP-Gelenke der Hand
4	Symmetrische Arthritis
5	Rheumaknoten
6	Nachweis von Rheumafaktoren im Serum
7	Typische radiologische Veränderungen an den Hand- und Fingergelenken
	Mindestens 4 Kriterien müssen erfüllt sein. Die Kriterien 1-4 müssen für mindestens 6 Wochen vorliegen. Die Sensitivität beträgt 91-94%, die Spezifität 89%.

Tabelle 1: Kriterien des American College of Rheumatology zur Klassifikation der chronischen Polyarthritiden in der Revision von 1987<sup>[10]</sup>.

Demnach beträgt die Prävalenz der chronischen Polyarthritiden in Westeuropa ca. 1%, wobei Frauen etwa dreimal häufiger erkranken als Männer<sup>[11]</sup>. Individuen mit geringerer Bildung und niedrigerem sozioökonomischem Status besitzen ein höheres Risiko, an chronischer Polyarthritiden zu erkranken<sup>[12;13]</sup>. Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem 25. und 40. Lebensjahr sowie um



das 60. Lebensjahr <sup>[14]</sup>, die Inzidenz beträgt etwa 90/100.000 Personen/Jahr <sup>[15]</sup>. Die chronische Polyarthrititis ist damit die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung <sup>[16]</sup>. Neben dem Leidensdruck der Betroffenen stellt sie ein erhebliches soziales und ökonomisches Problem dar <sup>[17]</sup>. In den Vereinigten Staaten waren 1994 die durch die chronische Polyarthrititis verursachten Kosten denen des Infarkts und der koronaren Herzkrankheit vergleichbar <sup>[18]</sup>. In Deutschland führt die chronische Polyarthrititis nach einer groben Schätzung zu direkten und indirekten Krankheitskosten von ca. 20-40 Milliarden DM pro Jahr. Die Betroffenen scheidet im Durchschnitt 11,6 Jahre vor Erreichen der Altersgrenze aus dem Erwerbsleben aus <sup>[19]</sup>.

In Abhängigkeit vom funktionellen Status und dem Ausmaß des Gelenkbefalles zum Zeitpunkt der Diagnosestellung geht die chronische Polyarthrititis mit einer um bis zu zehn Jahren verkürzten Lebenserwartung einher <sup>[14]</sup>.

#### **1.1.4 Ätiologie und Pathogenese**

Die Ursache der chronischen Polyarthrititis ist noch unbekannt. Wahrscheinlich kommt es bei entsprechender genetischer Disposition durch exogene (mikrobielle) und/oder endogene Faktoren (Autoantigene) über eine Dysregulation des Immunsystems zur Bildung von Antikörpern mit der Folge von Immunkomplexablagerungen in der Synovialis.

##### *Genetische Prädisposition*

Familiäre Häufung und eine Assoziation mit HLA-DR4 sprechen für eine genetische Komponente. Während 60-80% aller cP-Patienten HLA-DR4-Träger sind, erkranken jedoch längst nicht alle 12% der Normalbevölkerung, bei denen das Merkmal ebenfalls vorkommt <sup>[9;20]</sup>.

##### *Veränderungen im Immunsystem*

An der Beteiligung zellulärer und humoraler Autoimmunmechanismen bei der Chronifizierung der chronischen Polyarthrititis besteht kein Zweifel. Ob sie allerdings auch für die Krankheitsentstehung verantwortlich sind, ist unklar <sup>[21;22]</sup>.

##### *Vorausgehende Infektionen*

Als mikrobielle Auslöser kommen Mykoplasmen, Epstein-Barr-Virus, Hitzeschockproteine, Retroviren und Streptokokkenantigene in Frage. Obwohl

eine Vielzahl von Beobachtungen seine Existenz nahe legen, konnte bisher kein Organismus als Auslöser der chronischen Polyarthritits gefunden werden [23;24].

Die rheumatische Gelenkzerstörung spielt sich in drei Phasen ab: Inflammation, Proliferation und Infiltration. In der entzündlichen Phase kommt es zum massiven Anstieg neutrophiler Granulozyten in der Synovialflüssigkeit und zur Einwanderung von mononukleären CD4-positiven T-Zellen, Plasmazellen und Makrophagen in das subsynoviale Gewebe. Persistiert diese entzündliche Synovitis, so verdickt sich die Synovialmembran, das invasiv wachsende, enzymatisch hochaktive und stark vaskularisierte Granulationsgewebe (Pannus) wächst in Richtung Gelenkhöhle vor und führt hier zu Knorpeldestruktion und Knochensubstanzverlusten. Abbildung 1 zeigt schematisch die Gelenkveränderungen bei der chronischen Polyarthritits.

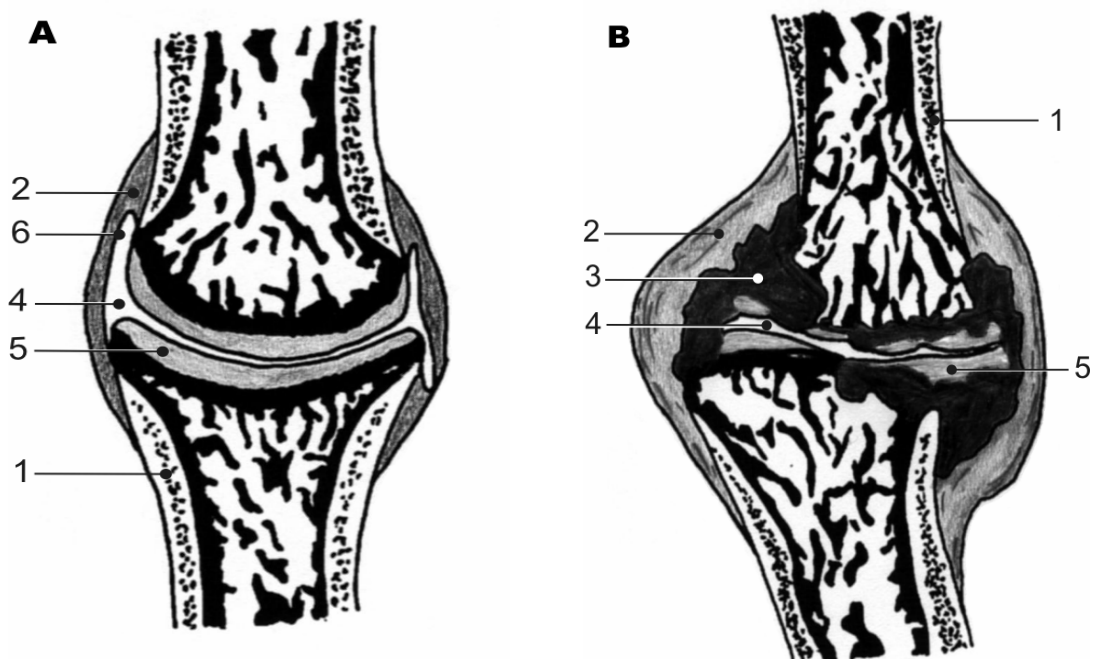


Abb. 1: Koronare Ansicht eines normalen (A) und rheumatisch veränderten Gelenks (B). Folgende Strukturen sind dargestellt: 1. Kortikaler Knochen, 2. Gelenkkapsel, 3. Pannus, 4. Gelenkspalt, 5. Knorpel, 6. Synovialmembran.

Der weitere Krankheitsverlauf führt über eine verminderte Gelenkbeweglichkeit bis hin zur fibrösen, seltener knöchernen Ankylose oder mitunter zu ausgeprägten Gelenkinstabilitäten.

Abbildung 2 fasst die pathogenetisch bedeutenden Faktoren der chronischen Polyarthrit zusammen <sup>[25]</sup>.

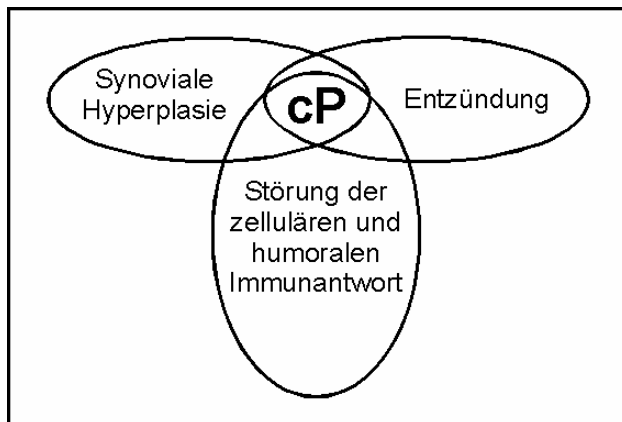


Abb. 2: Pathogenetisch bedeutsame Faktoren der chronischen Polyarthrit.

### 1.1.5 Histologie

Mit Ausnahme des Knorpels wird die gesamte Gelenkhöhle von der Synovialmembran ausgekleidet. Diese Synovialmembran setzt sich aus einer durchgehenden Lage Synoviozyten (ohne Basalmembran) sowie dem subsynovialen Gewebe zusammen. Es werden zwei Arten von Synovialzellen unterschieden: Lysosomenreiche Typ A-Synoviozyten mit der Fähigkeit zur Phagozytose (Makrophagen - ähnliche Synoviozyten), sowie Typ B-Synoviozyten (Fibroblasten - ähnliche Synoviozyten), bei denen große Mengen an endoplasmatischem Retikulum auf eine hohe Proteinsynthese schließen lässt <sup>[10]</sup>.

Im subsynovialen Gewebe finden sich Fibrozyten, Blutgefäße, Makrophagen, Lymphozyten und Histozyten, eingebettet in extrazelluläre Matrix und zusammengehalten durch ein Kollagenfasengerüst. Abbildung 3 vergleicht schematisch eine normale Synovialmembran mit einer infolge chronischer Polyarthrit veränderten Synovialmembran.

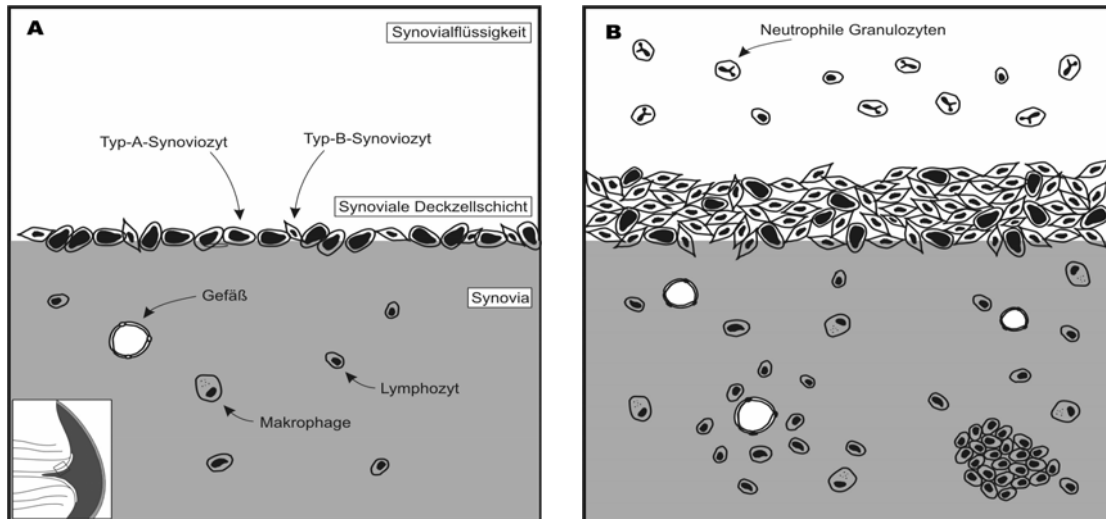


Abb. 3: Schematische Darstellung einer normalen Synovialmembran (A) sowie einer durch chronische Polyarthrititis veränderten Synovialmembran (B).

Die gesunde Synovialmembran ist charakterisiert durch eine ein bis drei Lagen dicke Deckzellschicht aus Typ A- und Typ B-Synoviozyten. Das darunter liegende Bindegewebsstroma umgibt Fibroblasten, dendritische Zellen, Mastzellen, vereinzelte Leukozyten, Blut- und Lymphgefäße. Die durch chronische Polyarthrititis veränderte Synovialmembran zeigt eine Zunahme der Synoviozyten auf vier bis sechs Zellen. Im Krankheitsverlauf kommt es zur Vasoproliferation mit Hyperämie sowie zur perivaskulären Infiltration des Stromas mit Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen mit einem Überwiegen CD4-positiver Helferzellen. Diese Zellen produzieren Zytokine (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$ ) und Autoantikörper (Rheumafaktor), welche ihrerseits eine Freisetzung von Entzündungsmediatoren und knorpelaggressiven Enzymen (Kollagenasen, Elastasen) bewirken können <sup>[10]</sup>. Die Synovialflüssigkeit verändert neben ihrem Volumen auch ihre Zusammensetzung, insbesondere finden sich vermehrt neutrophile Granulozyten. Die entzündliche Reaktion im Gelenk wird durch Prostaglandinsynthese weiter unterhalten. Besteht die Synovitis über einen längeren Zeitraum fort, bildet sich ein enzymatisch hochaktives, invasiv wachsendes und stark vaskularisiertes Granulationsgewebe (Pannus), welches den Knorpel überzieht, ihn zerstört und bei weiterem Fortschreiten zu Knochenerosionen führt <sup>[26]</sup>.

### 1.1.6 Klinik

Dem Erkrankungsbeginn gehen häufig Prodromalerscheinungen voraus, die Monate bis Jahre andauern können. Sie äußern sich zunächst in Form von überwiegend vegetativen Störungen wie Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust, Appetitmangel, subfebrilen Temperaturen, vermehrtem Schwitzen und kurzfristig auftretenden Gelenkschwellungen.

Der Übergang vom Prodromalstadium in das Frühstadium der chronischen Polyarthritis ist in der Regel fließend. Lediglich in 15% der Fälle findet sich ein akuter, in 5% ein subakuter Beginn.

Typischerweise manifestiert sich die Erkrankung zunächst an den kleinen Gelenken wie Metacarpophalangeal- oder Metatarsophalangealgelenken. Prinzipiell können jedoch alle Gelenke betroffen sein (siehe Abb. 4.1 und 4.2).

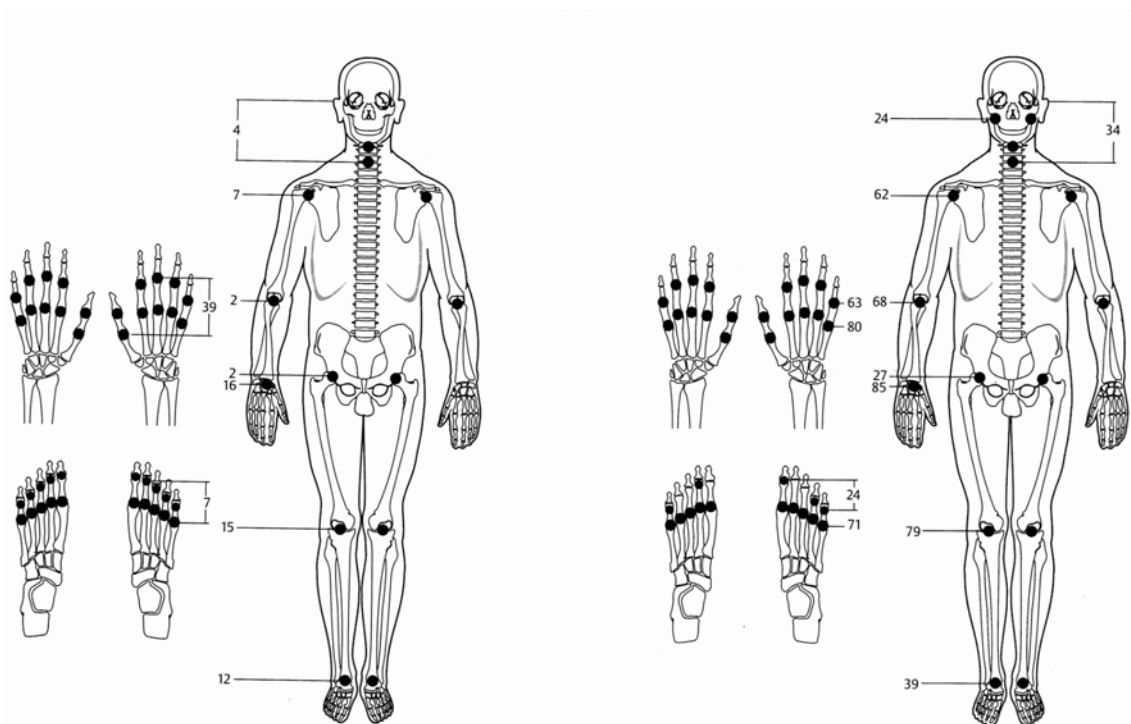


Abb. 4.1:  
Gelenkbeteiligung bei chronischer Polyarthritis. Prozentuale Erstlokalisation bei 780 Patienten der Züricher Universitätsrheumaklinik (nach Wagenhäuser) <sup>[27]</sup>.

Abb. 4.2:  
Gelenkbeteiligung bei etablierter chronischer Polyarthritis. Prozentuale Häufigkeit der betroffenen Gelenke bei 50 Patienten (nach Boyle u. Buchanan) <sup>[27]</sup>.

Charakteristisches Frühsymptom ist die Morgensteifigkeit der Finger, die bei 70% der Patienten beide Hände betrifft. Ein symmetrisches Befallsmuster findet sich meist auch im weiteren Krankheitsverlauf, ist jedoch nicht obligat. Unter Zuhilfenahme klinischer und röntgenologischer Daten entwickelten Steinbrocker et al. bereits 1949 eine Stadieneinteilung der chronischen Polyarthrit. Die Einteilung unterscheidet vier Stadien, wobei sich das Gesamtstadium für den Patienten nach dem am stärksten betroffenen Gelenk richtet <sup>[28]</sup>.

Das *erste Stadium* der chronischen Polyarthrit wird geprägt durch die zunehmende Steifigkeit der (Finger-) Gelenke. Sie ist morgens am stärksten ausgeprägt und hält länger als 30 Minuten, teilweise mehrere Stunden an. Die grobe Kraft ist vermindert. Bereits in dieser Phase kann es zum Befall der Zehengrundgelenke und der Kiefergelenke kommen.

Im *zweiten Stadium* kommt es zur Bindegewebsproliferation im Gelenk. Die Beweglichkeit wird zunehmend eingeschränkt, Muskelatrophien fallen besonders deutlich an den Musculi interossei im Bereich des Handrückens auf. In dieser Phase finden sich häufig Tenosynovitiden, Bursitiden und Rheumaknoten.

Das *dritte Stadium* imponiert durch zunehmende Knorpel- und Knochendestruktion sowie sich weiter verstärkende Muskelatrophien. Die Schädigung des Gelenk- und Bandapparates führt schließlich zu den in den Stadien drei und vier der chronischen Polyarthrit typischen Gelenkdeformitäten mit Subluxationen und Luxationen (Ulnardeviation, Knopflochdeformität, Schwanenhalsdeformierung, 90/90-Deformität des Daumens, Caput-ulnae-Syndrom, Atlantooccipitalsubluxationen) sowie zu Synostosen und Ankylosen (vgl. Abb. 5). Röntgenologisch ist diese Phase durch eine ausgeprägte Osteoporose gekennzeichnet. Nach Zerstörung von Knorpel und Knochen kann der Entzündungsprozess zum Stillstand kommen und in eine sekundäre Arthrose münden.

Im *vierten Stadium* finden sich fibröse oder knöcherne Ankylosen einzelner Gelenke. Für den Patienten bedeutet dies oft Invalidität.

Extraartikuläre Manifestationen entstehen meist auf dem Boden einer Vaskulitis. Am häufigsten finden sich Rheumaknoten (bei fast 20% der

Patienten), die bevorzugt in Gelenknähe, z.B. an der Streckseite der Ellenbogen, im Bindegewebe über Sehnen und Sehnenscheiden sowie in der Subkutis lokalisiert sind und in der Regel auf einen schweren Krankheitsverlauf hinweisen. Gehäuft lassen sich außerdem Anämie und Keratokonjunktivitis sicca (im Rahmen eines Sjögren-Syndroms) beobachten.

Seltenerer Begleiterkrankungen sind Skleritis, Episkleritis, Perikarditis, Myokarditis, Pleuritis, Lungenfibrose, Aortitis, sekundäre Amyloidose oder Felty-Syndrom (mit Splenomegalie und Neutropenie) <sup>[10]</sup>.



*Abb. 5: Fotografie und Röntgenbild einer Hand mit für die chronische Polyarthritits typischen Veränderungen.*

### **1.1.7 Prognose**

Der Verlauf der chronischen Polyarthritits ist nicht vorhersehbar, äußerst variabel und in der Regel durch ein Abwechseln von Remissionen mit akuten Schüben gekennzeichnet. Bei einer Krankheitsdauer von über einem Jahr kann mit einer Spontanremission nicht mehr gerechnet werden.

Die Mortalität ist infolge der Begleiterkrankungen sowie durch medikamentöse Folgeschäden und Operationen auf über das Doppelte erhöht, die Überlebensrate von Patienten mit schwerer Polyarthritits ist der von Patienten

mit 3-Gefäß-koronarer-Herzkrankheit oder Hodgkin-Syndrom im Stadium IV vergleichbar <sup>[29;30]</sup>.

### **1.1.8 Therapie**

Aufgrund der unbekanntenen Ätiologie ist eine kausale Therapie der chronischen Polyarthrititis bis heute nicht möglich. Die Behandlung soll das Fortschreiten der Krankheit verzögern, die Gelenkfunktionen erhalten, viszerale Schäden vermeiden und die Schmerzen der Patienten reduzieren <sup>[31]</sup>. Um diese Ziele zu erreichen ist ein frühzeitiger Behandlungsbeginn vor Auftreten irreparabler Schäden notwendig. Während die medikamentöse Therapie auf eine Schmerzlinderung und Entzündungshemmung abzielt, ermöglichen operative Verfahren die direkte Entfernung pathologischen Gewebes sowie die Rekonstruktion eingeschränkter Gelenkfunktionen. Neben pharmakologischer und operativer Therapie gehören stets auch allgemeine Maßnahmen, Physiotherapie und Rehabilitation zum komplexen Behandlungsplan.

#### **1.1.8.1 Medikamentöse Therapie**

Die medikamentöse Behandlung der chronischen Polyarthrititis umfasst im wesentlichen symptomatisch wirkende Pharmaka (nichtsteroidale Antirheumatika und Glucocorticoide) und sogenannte Basistherapeutika (disease modifying antirheumatic drugs, DMARD) <sup>[32]</sup>.

Die *nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR)* sind die Mittel der ersten Wahl in der Therapie der chronischen Polyarthrititis. Ihr Wirkprinzip beruht auf der Entzündungshemmung, unter anderem durch Hemmung der Cyclooxygenase und damit der Prostaglandinsynthese. Die Dosierung der NSAR richtet sich nach der Schmerzintensität, wobei die Ansprechbarkeit individuelle Unterschiede aufweist und deshalb im Einzelfall ausgetestet werden muss.

*Glucocorticoide* sollen auf akute Schübe beschränkt bleiben und aufgrund ihrer möglichen Nebenwirkungen nur bei durch NSAR nicht beherrschbaren Symptomen eingesetzt werden. Sie können lokal oder systemisch angewendet werden, ihre Wirkung beruht auf einer Hemmung der zellulären und humoralen Entzündungsreaktion.



Die sogenannten *Basistherapeutika* stellen eine heterogene Gruppe von Medikamenten dar, deren Wirkung im Gegensatz zu den oben genannten Therapeutika erst nach Wochen oder Monaten einsetzt, weshalb sie auch als langsam wirkende Antirheumatika (LWAR) bezeichnet werden. Basistherapeutika sollen in der Lage sein, in den Pathomechanismus der Krankheit einzugreifen, den Krankheitsverlauf zu stoppen und röntgenologisch nachweisbare Remissionen einzuleiten. Der angloamerikanische Begriff „disease modifying antirheumatic drugs“ geht auf diese Eigenschaften zurück. Die meisten Medikamente dieser Gruppe wurden nicht für die chronische Polyarthrit, sondern für andere Krankheiten entwickelt und erwiesen sich eher zufällig als wirksam [33]. Ihre Wirkmechanismen bei der chronischen Polyarthrit sind daher in vielen Fällen auch noch nicht hinreichend bekannt. Folgende Basistherapeutika stehen derzeit zur Verfügung:

Chloroquinderivate (Resochin<sup>®</sup>, Hydroxychloroquin<sup>®</sup>), Sulfasalazin (Azulfidine RA<sup>®</sup>, Colo-Pleon<sup>®</sup>), Goldpräparate (Tauredon<sup>®</sup>), D-Penicillamin (Metalcaptase<sup>®</sup>, Trolovol<sup>®</sup>), Methotrexat, (Lantarel<sup>®</sup>), Azathioprin (Imurek<sup>®</sup>), Cyclophosphamid (Endoxan<sup>®</sup>), Cyclosporin A (Sandimmun<sup>®</sup>), Leflunomid (Arava<sup>®</sup>).

Die angeführten Medikamente unterscheiden sich zum Teil erheblich hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Nebenwirkungen. Die Wahl des Therapeutikums richtet sich somit in erster Linie nach der Krankheitsaktivität. Bei geringeren Beschwerden bieten sich Chloroquinderivate oder Sulfasalazin an, mäßig bis hochaktive Krankheitsfälle werden bevorzugt mit Goldsalzen, D-Penicillamin, Methotrexat oder Cyclophosphamid behandelt. Die Kombination verschiedener Basistherapeutika ist Gegenstand derzeitiger Forschungen [34-36]. Im Rahmen neuerer Studien werden darüber hinaus Antikörper getestet, welche die Funktion der T-Lymphozyten und ihrer Mediatoren (TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 etc.) blockieren [32;36;37].

#### **1.1.8.2 Synoviorthese**

Eine weitere konservative Therapiemöglichkeit, die lokal an den entzündlich veränderten Gelenkinnenhäuten angreift, ist die Synoviorthese. Prinzipiell unterscheidet man die chemische von der Radiosynoviorthese.

Die *chemische Synoviorthese* mit Natriummorhualat oder Osmiumsäure führt zu einer hochgradigen Zerstörung synovialer Strukturen. Durch mangelnde Selektivität werden jedoch auch gesunde Gewebe, insbesondere der Gelenkknorpel geschädigt. Die Behandlung ist für den Patienten äußerst schmerzhaft und erfordert daher den Einsatz von Lokalanästhetika.

Bei der *Radiosynoviorthese* werden kolloidale,  $\beta$ -strahlende Radionuklide wie Yttrium90, Erbium169 oder Rhenium186 intraartikulär injiziert und führen zur Nekrose der Synoviozyten sowie zu einer aktinischen Schädigung tieferer Regionen der Synovialmembran. Nach einiger Zeit bildet sich eine Neosynovialis aus, die eine verminderte Destruktionstendenz und eine ausgeprägte Fibrosierung aufweist.

Im Gegensatz zur chemischen Synoviorthese kann der Erfolg einer Radiosynoviorthese frühestens nach drei bis sechs Monaten beurteilt werden. Das Verfahren ist schonender als die Chemosynoviorthese, da es nicht zu einer akuten Entzündungsreaktion kommt. Weitere Vorteile der Methode sind ein kurzer bzw. kein stationärer Aufenthalt, niedrige Kosten sowie geringe Morbidität. Physikalische Nachbehandlungen sind nicht notwendig und eine mehrmalige Anwendung ist möglich. Als Nebenwirkung werden chromosomale Schädigungen in der Literatur kontrovers diskutiert. Weitgehende Übereinstimmung besteht im Ausschluß von jüngeren Patienten (< 35. Lebensjahr) und Frauen im gebärfähigen Alter <sup>[38]</sup>. Weitere unerwünschte Wirkungen der Radiosynoviorthese sind eine Strahlensynovitis sowie Gewebnekrosen im Stichkanal durch unsaubere Injektionstechnik. Die Erfolgsquote der Synoviorthese variiert in der Literatur zwischen 54 und 94%. Auffallend ist eine hohe Rezidivrate von bis zu 43% ein Jahr nach Behandlung <sup>[39-43]</sup>.

### **1.1.8.3 Operative Therapie**

Die operative Therapie der chronischen Polyarthritits umfasst präventive (z.B. Frühsynovektomie), palliative (z.B. Spätsynovektomie) und rekonstruktive (z.B. Arthroplastik, Osteotomie, Arthrodese, Totalendoprothese) Eingriffe <sup>[44]</sup>. Die Indikation zum operativen Eingriff ist dann gegeben, wenn die Erkrankung durch konservative Maßnahmen nicht mehr beherrschbar ist. Gschwendt

entwickelte ein Punktesystem zur Festlegung des Stellenwertes von Operationen entsprechend ihrer Erfolgsaussichten <sup>[45]</sup>. Andere Autoren unterscheiden Operationen absoluter und relativer Dringlichkeit, wobei als absolute Operationsindikationen eine drohende oder manifeste Sehnenruptur, drohende oder manifeste Nervenkompression sowie in erster Linie die vitalen Gefährdungen durch drohende oder manifeste Instabilitäten der Halswirbelsäule gelten <sup>[46;47]</sup>. Als relative Indikationen führt Gschwend persistierende Synovialitis, Bursitis und Tenosynovialitis, dauernde Schmerzen, Steifheit und Fehlstellung von Gelenken an <sup>[17]</sup>. Bei der Mehrzahl der durchgeführten Operationen handelt es sich um gelenkersetzende Maßnahmen, an zweiter Stelle stehen die Synovektomien mit Tenosynovektomien <sup>[48]</sup>.

Die *Synovektomie* ist das älteste operative Verfahren in der Lokalthherapie chronischer Arthritiden. Eine erste Erwähnung findet sie im Jahre 1877 in der Behandlung tuberkulöser Kniegelenke durch Volkmann <sup>[49]</sup>. Elf Jahre später führte Müller eine Synovektomie erstmals an Patienten mit chronischer Polyarthritiden durch und beobachtete eine „Heilung mit beweglichen Kniegelenken“. Aufgrund schlechter Ergebnisse konnte sich das Konzept in den folgenden Jahrzehnten jedoch zunächst nicht durchsetzen. In den 50iger Jahren erlangen die Synovektomien durch verbesserte operative Voraussetzungen und engere Indikationsstellung zunehmende Bedeutung <sup>[50]</sup>. Inzwischen gilt die Synovektomie als Methode der Wahl in der frühzeitigen Behandlung von Synovitiden, die auf medikamentöse Therapien nicht ansprechen. Größere Analysen belegen, dass in 70-80% der Fälle in den ersten Jahren mit einer wesentlichen Besserung der Hauptsymptome Schmerz und Schwellung gerechnet werden kann <sup>[27]</sup>.

Das Prinzip der Synovektomie besteht in einer mehr oder weniger radikalen Entfernung der Gelenkinnenhaut bzw. der Sehnencheiden. Innerhalb von 6-12 Wochen bildet sich ein Regenerat, welches zwar noch Zeichen einer Entzündung trägt, jedoch funktionell weitgehend normale Eigenschaften aufweist. Bei Fortbestehen der systemischen Erkrankung sowie in erhöhtem Maße auch bei mangelnder Radikalität muss allerdings mit der Ausbildung eines Rezidivs gerechnet werden <sup>[27]</sup>.

Neben der seit Ende der 60er Jahre etablierten offenen Synovektomie hat in den letzten 15 Jahren die arthroskopische Technik zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Frage, welche Methode die besseren Ergebnisse, vor allem in Bezug auf Radikalität liefert, wird seither kontrovers diskutiert. In Literaturübersichten vergleichen Roggenbuck und Paulus die Wertigkeit der arthroskopischen Synovektomie mit der offenen Methode sowie mit der Kombination aus Synovektomie und nachfolgender Synoviorthese <sup>[38;51]</sup>. Roggenbuck und Zacher weisen in ihrer 1997 erschienen Übersicht auf starke methodische Mängel bei der Mehrzahl der Studien hin, die verwertbare Aussagen kaum zulasse. Davon abgesehen findet sich insbesondere für kurz- und mittelfristige Untersuchungszeiträume eine leichte Überlegenheit der arthroskopischen Technik, wobei eine anschließende Synoviorthese die Radikalität der Operation eventuell weiter zu steigern vermag <sup>[39]</sup>. Die Vorteile der arthroskopischen Synovektomie sind ein kurzer stationärer Aufenthalt, geringe postoperative Morbidität, schnellere Mobilisierung, geringere Störung der Propriozeption, seltenere Bewegungseinschränkungen durch reduzierte postoperative Fibrosierung, Wiederholbarkeit sowie ein kosmetisch unproblematisches Ergebnis <sup>[52]</sup>. Die Nachteile der arthroskopischen Verfahren liegen in der Unmöglichkeit der gleichzeitigen Tenosynovektomie gelenknaher Sehnen und dem Verlust des Denervierungseffektes, der bei einer offenen Synovektomie erreicht wird, begründet <sup>[44;53;54]</sup>. Entscheidend für den Erfolg einer Synovektomie ist ihre frühzeitige Durchführung <sup>[39;42]</sup>. Ist es im Gelenk bereits zu irreversiblen Schäden gekommen, kann die Operation nur noch palliativen Charakter haben, der Prozentsatz guter Resultate sinkt nach Marmor von 75 auf 53% <sup>[55]</sup>.

Die wesentlichen Nachteile der Synovektomie sind mangelnde Radikalität und die Entwicklung von Rezidiven. Die positiven Wirkungen des Eingriffes sind oft nur von kurzer Dauer. Während die meisten Untersucher ein bis drei Jahre nach offener Synovektomie vom erneuten Auftreten klinischer und histologischer Synovitiszeichen berichten, beschreiben Paus und Pahle das Wiederauftreten pathologischer Veränderungen bereits nach sechs Monaten <sup>[56]</sup>.

### 1.1.9 Arthritismodelle

Im Rahmen der Entwicklung neuer Substanzen und Methoden zur Behandlung der chronischen Polyarthrititis spielt der Tierversuch eine wichtige Rolle. Um die Wirksamkeit einer Therapie nachweisen und verbessern zu können, bedarf es zunächst eines Modells, welches die pathologischen Eigenschaften der interessierenden Krankheit möglichst optimal imitiert. Derartige Modelle sollen einfach zu handhaben und gut reproduzierbar sein <sup>[57]</sup>. Für die chronische Polyarthrititis existiert eine Vielzahl von Tiermodellen, wobei sich das Kaninchenknie aufgrund seiner mit dem Fingergelenk des Menschen vergleichbaren Größenverhältnisse für viele Untersuchungen anbietet. Zu den am besten untersuchten Modellen zählen neben den spontanen Arthritismodellen bei Mäusen (MRL-lpr-Maus) <sup>[58]</sup> die Adjuvansarthritis <sup>[59]</sup>, die Streptokokkenzellwand-induzierte Arthritis <sup>[60]</sup>, die Kollageninduzierte Arthritis <sup>[61]</sup>, die IL-1-induzierte Arthritis <sup>[62]</sup> und die Antigeninduzierte Arthritis (AIA)<sup>[63]</sup>, wobei letztere von vielen Untersuchern aufgrund weitreichender Übereinstimmungen mit der chronischen Polyarthrititis favorisiert wird <sup>[57;59;64-66]</sup>. Tabelle 2 vergleicht die Charakteristika der bekanntesten Arthritistiermodelle.

Charakteristika	Chronische Polyarthrit	Adjuvans-arthrit	Antigen-ind. Arthritis	Kollagen-ind. Arthritis	MRL / Ipr Arthritis
Arthritogen	?	Mykobakt.	z.B. mBSA	Kollagen II	Mutation (Fas)
Spezies	Mensch	Ratte	Ratte, Maus, Kaninchen	Ratte, Maus, Affe	Maus
genet. Prädisposition	ja	ja	ja	ja	ja
symmetr. Polyarthrit	ja	ja	nein	ja	ja
extraart. Beteiligung	ja	ja	(nein)	nein	ja
Inzidenz	1%	100%	100%	60-100%	100%
Chronizität	ja	nein	ja	nein	ja
spontanes Auftreten	ja	nein	nein	nein	ja
entzündl. Schübe	ja	nein	induzierbar	nein	nein
periph. Gelenke betroffen	ja	ja	ja	ja	ja
Erosion / Pannusbildung	ja	ja	ja	ja	(ja)
T-Zell-Abhängigkeit	ja	ja	ja	ja	ja

*Tabelle 2: Charakteristika von Arthritismodellen im Vergleich zur chronischen Polyarthrit<sup>[67]</sup>.*

Im Jahr 1937 beobachtete J. Freund einen Titeranstieg bei tuberkulosekranken Guinea-Schweinen, denen er Schaferythrozyten injiziert hatte. Er entwickelte daraufhin eine Emulsion bestehend aus einer wässrigen Lösung des Antigens Ovalbumin, Paraffinöl sowie abgetöteten Tuberkulosebakterien und untersuchte die Wirkung am Tiermodell. Aus der Weiterentwicklung dieses Gemisches resultierte 1951 das "Komplette Freund-Adjuvans" (CFA), eine Wasser-in-Öl-Emulsion aus abgetötetem Mycobacterium tuberculosis und einer Antigenlösung. CFA stimuliert als potentes Adjuvans sowohl die humorale als auch die zellvermittelte Immunität und induziert die Antikörperbildung gegen Epitope denaturierter Proteine<sup>[68]</sup>. Die andauernde Freisetzung von Bakterienbestandteilen aus dem nicht metabolisierbarem Öl-Depot führt zu einer verstärkten Immunantwort auf injizierte Antigene.

Pearson zeigte 1956, dass sich mit Hilfe von Freund-Adjuvans bei Versuchstieren eine allergische Arthritis auslösen lässt<sup>[59;68]</sup>.

Das Modell der Antigen-induzierten Arthritis mit humanem IgG geht prinzipiell auf Beschreibungen von Klinge bzw. Dumonde et al. zurück. Hierbei werden die Tiere durch eine einmalige intrakutane Injektion von hitzeaggregiertem humanem IgG in Kombination mit Freund-Adjuvans (CFA) immunisiert. In

einem zweiten Schritt folgt eine intraartikuläre Boosterinjektion, bei der das Antigen direkt in das Kniegelenk der Tiere injiziert wird.

Im Gegensatz zu anderen cP-Modellen handelt es sich bei der AIA – wie bei der chronischen Polyarthritis auch – um einen in erster Linie durch T-Zellen vermittelten Prozess. Weitere Gemeinsamkeiten betreffen neben der charakteristischen Pannusbildung auch die Morphologie der Synovialmembran, den erhöhten IL-1-Spiegel in der Synovia sowie die Entwicklung einer chronischen Entzündungsreaktion mit Knorpelzerstörung und Knochenerosion. Da es sich bei der AIA um eine Monarthritis handelt, bietet sie die Möglichkeit, den Erfolg der Arthritisinduktion im Vergleich zur unbehandelten Gegenseite zu quantifizieren <sup>[69]</sup>.

## **1.2 Laser in der Medizin**

Die Theorie des Lasers geht auf die Formulierung der stimulierten Emission durch Einstein zu Anfang des 20. Jahrhunderts zurück. 1954 gelang Townes die Entwicklung des Maser (Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation) <sup>[70]</sup>. Die Übertragung des Maser-Prinzips in den optischen Wellenlängenbereich führte 1960 zur Entwicklung des ersten Lasers durch Maiman <sup>[71]</sup>. Bereits wenige Monate nach seiner Entdeckung führten Campbell und Köster erste Versuche zur Verwendung des Lasers in der Ophthalmologie durch. Inzwischen werden Laser in nahezu allen medizinischen Bereichen routinemäßig oder im Versuchsstadium eingesetzt. Abhängig von der Art des verwendeten Werkstoffes unterscheidet man Kristall- oder Festkörperlaser, Gaslaser, Farbstofflaser sowie Halbleiter- (= Dioden-) Laser <sup>[72]</sup>.

Während normales Licht durch spontane Emission entsteht, beruht Laserstrahlung auf stimulierter Emission. Daraus ergeben sich die für Laserstrahlung charakteristischen Eigenschaften Kohärenz, Monochromasie, geringe Divergenz und Bereitstellung kurzer Laserpulse.

Die bevorzugt in der Medizin eingesetzten Lasertypen sind der Neodym-YAG-Laser, der Argonionen-Laser und der CO<sub>2</sub>-Laser. Je nach Wellenlänge und verwendeter Energie kommt es zu unterschiedlichen Wirkungen des Laserlichts auf biologisches Gewebe. Man unterscheidet thermische, photochemische und sogenannte nichtlineare Effekte.

Die thermischen Effekte ermöglichen das Koagulieren, Schneiden, Vaporisieren und Karbonisieren von Geweben und lassen sich daher in den chirurgischen Disziplinen vielfältig einsetzen. Typische Anwendungen sind Blutstillung, Fixation der Netzhaut, Abtragung von Melanomen und Warzen sowie von Karzinomen im HNO-, Magen-Darm- und Bronchialbereich, Rekanalisation von Gefäßen und viele andere mehr <sup>[70;73]</sup>.

Während die nichtlinearen Effekte in der Medizin keine Rolle spielen, bilden die photochemischen Effekte die Grundlage für die photodynamische Therapie.

Die Anforderungen an einen Laser für die photodynamische Therapie unterscheiden sich deutlich von denen der meisten chirurgischen Laser. Während bei der photodynamischen Therapie eine geringe Energie über einen langen Zeitraum (zwischen 30 und 120 Minuten) auf eine relativ große Fläche wirkt, überträgt der chirurgische Laser eine wesentlich höhere Energie innerhalb von Sekunden auf ein meist sehr kleines Gewebeareal. Die Bestrahlungsdosis, definiert als das Produkt aus Bestrahlungszeit [s] und Bestrahlungsstärke [ $\text{W}/\text{cm}^2$ ] liegt bei der photodynamischen Therapie zur Vermeidung hyperthermischer Effekte in der Regel unterhalb von  $800 \text{ J}/\text{cm}^2$  <sup>[74]</sup>.

Von den für die photodynamische Therapie zur Verfügung stehenden Lasersystemen zeichnen sich Diodenlaser durch eine Reihe von Vorteilen aus. Diodenlaser basieren auf Halbleiterkristallen wie Galliumarsenid (GaAs) oder Indiumphosphid (InP). Abbildung 6 zeigt den Aufbau einer einfachen Laserdiode, die im wesentlichen aus zwei Schichten besteht, in denen ein geringfügiger Überschuss (n-Schicht) bzw. Mangel an Elektronen (p-Schicht) herrscht. Die überschüssigen Elektronen der n-Schicht befinden sich in einem energetisch höherliegenden Band, dem sogenannten Leitungsband. Der Überschuss bzw. Mangel an Valenzelektronen erlaubt einen Ladungstransport durch Elektronen im Leitungsband der n-Schicht bzw. das Wandern der „Löcher“ im Valenzband der p-Schicht. Legt man eine Spannung in Flussrichtung an, wandern Elektronen aus dem n-dotierten Material (Leitungsband) in das p-dotierte (Valenzband), die Elektronen und Löcher rekombinieren. Dabei wird Energie in Form von Laserstrahlung emittiert, wobei der energetische Abstand zwischen Leitungs- und Valenzband die Wellenlänge des abgestrahlten Lichts bestimmt <sup>[75]</sup>.



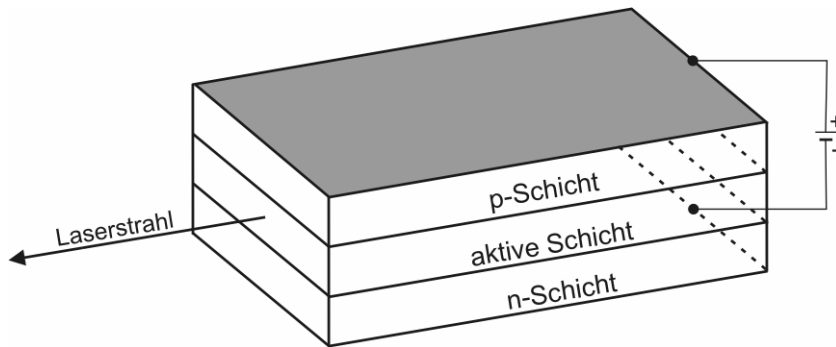


Abb. 6: Schematischer Aufbau einer Laserdiode.

Im Vergleich zu herkömmlichen Lasern sind Diodenlaser sehr kostengünstig, haben eine längere Lebenserwartung (ca. 10.000 Stunden) und sind einfacher zu handhaben. Während Gaslaser in etwa die Größe eines Kühlschranks aufweisen, sind Diodenlaser meist kleiner als ein Schuhkarton. Darüber hinaus zeichnen sich Diodenlaser durch einen vergleichsweise hohen Gesamtwirkungsgrad aus (15–20 %). Um einen ein Watt starken Laserstrahl zu erzeugen benötigen sie eine Energie von fünf Watt, während konventionelle Laser für dieselbe Leistung 5000 Watt erfordern <sup>[76;77]</sup>.

Weitere für die photodynamische Therapie prinzipiell geeignete Lichtquellen wie LED's (Light-emitting diodes) und nichtkohärente Lichtquellen befinden sich zur Zeit im Entwicklungsstadium.

## 1.3 Photodynamische Therapie

### 1.3.1 Definition

Die photodynamische Therapie (PDT) ist eine Form der Photochemotherapie, bei der die Interaktion eines Photosensibilisators mit sichtbarem Licht unter Vorhandensein von Sauerstoff durch die Produktion zytotoxischer Substanzen, insbesondere des Singulett-Sauerstoffes, zur Zell- und Gewebeschädigung mit nachfolgendem Zelltod führt.

### 1.3.2 Geschichte

Bereits vor über 2000 Jahren behandelte man in Ägypten und Indien Hautkrankheiten mit psoralenhaltigen Pflanzenextrakten und Sonnenlicht <sup>[78;79]</sup>. Es vergingen viele hundert Jahre bevor Kalkbrunner 1834 das synthetische 5-

Methoxypsoralen aus Bergamot-Öl isolierte und damit die Voraussetzung für die PUVA-Therapie (Psoralene plus UVA) zur Behandlung der Psoriasis, Vitiligo und später auch in der Immuntherapie schuf.

Die ersten wissenschaftlichen Untersuchungen phototoxischer Prozesse gehen auf den Münchner Medizinstudenten Oscar Raab zurück. Im Rahmen seiner Dissertation untersuchte er die toxische Wirkung von Akridin auf Pantoffeltierchen (*Paramecium caudatum*). Durch Zufall erkannte er den Einfluss unterschiedlicher Lichtverhältnisse auf die Untersuchungsergebnisse. In weiteren Versuchen fanden er und sein Lehrer von Tappeiner, dass auch die Stoffe Chinin, Eosin und Phenylakridin in entsprechenden Verdünnungen im Dunkeln keine, bei Tageslicht jedoch äußerst schädliche oder letale Wirkung auf Pantoffeltierchen hatten. Im Jahr 1900 postulierte Raab in der Münchner Medizinischen Wochenschrift den therapeutischen Nutzen fluoreszierender Substanzen in der Dermatologie <sup>[79;80]</sup>. Von Tappeiner und der Hautarzt Jesionek behandelten in den Folgejahren Hautkarzinome, luetische und tuberkulöse Hautmanifestationen sowie Kondylome des weiblichen Genitale durch Bepinseln der Haut mit Eosinlösung und anschließender Lichtexposition <sup>[81]</sup>.

In einem 1907 erschienenen Buch prägten von Tappeiner und Jodlbauer den Begriff photodynamische Therapie und beschrieben damit ein von Sauerstoff, Photosensibilisator und Licht abhängiges biologisches System <sup>[82]</sup>.

Die Suche nach neuen, wirkungsvolleren Photosensibilisatoren führte Hausmann 1908 zum Haematoporphyrin, einem eisenfreien Hämoglobinabkömmling <sup>[83]</sup>. Anhand einer intravenösen Selbstinjektion von 200 mg Haematoporphyrin zeigte Meyer-Betz 1912 eindrucksvoll, dass die Substanz selbst nicht toxisch ist, jedoch in Kombination mit Sonnenbestrahlung zu einer hochgradigen Hautsensibilisierung führt, welche in seinem Fall zwei Monate lang anhielt und mit Schwellung und Hyperpigmentierung verbunden war (siehe Abb. 7) <sup>[84]</sup>. Zalar wiederholte den Versuch 61 Jahre später an zwei Patienten und beobachtete dabei dieselben Reaktionen <sup>[85]</sup>.

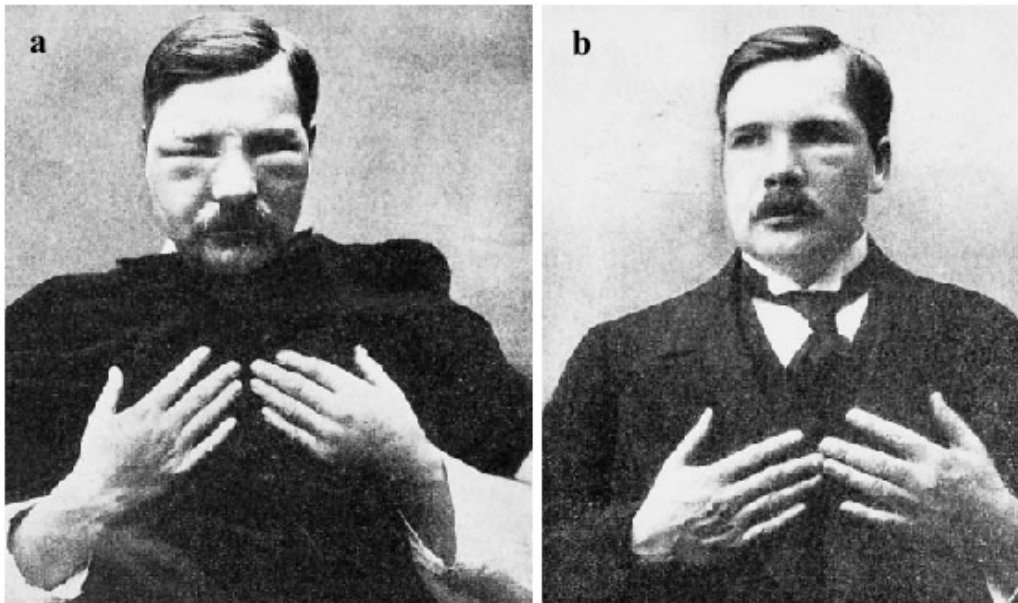


Abb. 7: Friedrich Meyer-Betz am 18. Oktober 1912, 4 Tage nach intravenöser Injektion von 0,2 g Haematoporphyrin und anschließender Sonnenexposition (a) sowie nach Abklingen des Ödems am 19. Oktober (b).

Die nächste wegweisende Entdeckung gelang zwölf Jahre später dem Franzosen Policard. Bei Rattensarkomen beobachtete er eine rötliche Fluoreszenz, wenn er sie mit einer Wood-Lampe (UV-Licht) anstrahlte. Als Ursache dieser Fluoreszenz konnte Policard endogene Porphyrine nachweisen [86].

Erste tumorlokalisatorische Eigenschaften von Porphyrinen untersuchten Auler und Banzer im Jahre 1942. Intramuskulär injiziertes Haematoporphyrin zeigte bei Ratten eine hohe Affinität zu Tumor- und Metastasengewebe und führte unter Bestrahlung zu Nekrosen [87]. Figge et al. bestätigten diese Beobachtungen durch Fluoreszenzmessungen und erkannten das mögliche Potential von Haematoporphyrin für die Tumordiagnostik und -therapie [88].

Probleme verursachte Haematoporphyrin als diagnostisches Hilfsmittel beim Menschen jedoch durch die notwendigen hohen Dosen und die damit verbundene ausgeprägte Phototoxizität. Aus diesem Grund analysierte Schwartz das Haematoporphyrin und fand ein Gemisch aus vielen Porphyrinen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Er vermutete, dass die selektive Fluoreszenz von malignem Gewebe nach Sensibilisatorgabe möglicherweise mehr durch Verunreinigungen im Rohprodukt als durch Haematoporphyrin

selbst verursacht wird <sup>[89]</sup>. Diese Annahme veranlasste Lipson 1961 käufliches Haematoporphyrin mit einer Mischung aus Essig- und Schwefelsäure zu behandeln, anschließend zu neutralisieren und das so entstandene Pulver ausgiebig zu waschen. Er nannte die neue Substanz Haematoporphyrinderivat (HpD). In Untersuchungen an der Mayo-Klinik konnten Lipson und Gregorie deutlich verbesserte Eigenschaften und ein besseres Anreicherungsverhalten nachweisen <sup>[90]</sup>. Haematoporphyrinderivat wird seither mit Erfolg zur Lokalisation von Tumoren der Bronchien, des Ösophagus und des Zervix eingesetzt. Im Jahre 1966 behandelten Lipson et al. erstmals eine Patientin mit einem rezidivierenden Mammakarzinom. Obwohl die Läsionen nach einigen Wochen wieder auftraten, zeigte sich doch eine deutliche Tumortoxizität <sup>[91]</sup>. Erste systematische Studien am Menschen führten Dougherty et al. 1978 an einem Kollektiv von 25 Patienten mit kutanen oder subkutanen malignen Läsionen durch <sup>[92]</sup>. Seither haben eine Vielzahl klinischer Untersuchungen die Wirksamkeit der photodynamischen Therapie mit Haematoporphyrinderivat und weiterentwickelten Präparaten wie dem Photofrin II oder dem Photosan 3 belegt. Photofrin II erhielt 1993 von den kanadischen Gesundheitsbehörden die Zulassung zur Behandlung oberflächlicher Blasen Tumore. In den Jahren 1995 und 1996 folgten Zulassungen in Japan, den USA, Belgien, Frankreich, den Niederlanden, Deutschland, Dänemark und Griechenland.

Chemische Inhomogenität, langandauernde Photosensibilisierung von Haut und Augen, ungünstige physikalisch-chemische Eigenschaften sowie ungenügende Tumorselektivität limitieren jedoch den Einsatz von Photofrin II und erforderten die Entwicklung neuer Photosensitizer. Etwa ein Dutzend Photosensibilisatoren der 2. Generation wird derzeit in klinischen Phase-III-Studien untersucht, eine weit größere Anzahl in Zell- und Tierversuchen. Während sich der Einsatz der photodynamischen Therapie zunächst auf die Behandlung von Tumoren beschränkte, gewinnt das Verfahren in den letzten Jahren zunehmend in der Therapie nicht-onkologischer Erkrankungen an Bedeutung. Zur Zeit durchläuft die photodynamische Therapie vorklinische und klinische Studien zur Behandlung von Krankheiten wie Barrett-Ösophagus, Ösophaguskarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom, Mesotheliom, Kolorektalkarzinom, Mammakarzinom, Blasenkarzinom, Prostatakarzinom, Gehirneoplasien,

viralen und bakteriellen Infektionen, verschiedenen Hautkrankheiten (Melanom, Psoriasis, aktinische Keratose, Kaposi-Sarkom), altersbedingter Makuladegeneration, Endometriose, Arteriosklerose und einigen weiteren mehr [93-99]. Im Fachgebiet Orthopädie finden sich neben Arbeiten zum Einsatz der photodynamischen Therapie bei der chronischen Polyarthrits einige *in vitro* Experimente zur Therapie von Neoplasien des Bewegungsapparates [100;101], *in vitro* Studien zur Untersuchung chondroprotektiver Effekte einer photodynamischen Therapie sowie Versuche zum photochemischen Verschweißen von Meniskus- und Knorpeldefekten [102].

### 1.3.3 Grundlagen der photodynamische Therapie

Stark vereinfacht lässt sich die photodynamische Therapie in zwei Schritte unterteilen (vgl. Abb. 8): Nach Injektion (1) reichert sich der Photosensibilisator selektiv im Zielgewebe an (2) und verhält sich dort zunächst inert. Durch die anschließende Lichtbestrahlung (3) kommt es zur Entstehung phototoxischer Substanzen wie Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) und freier Radikale, welche schließlich zur Nekrose des Zielgewebes führen (4) [74].

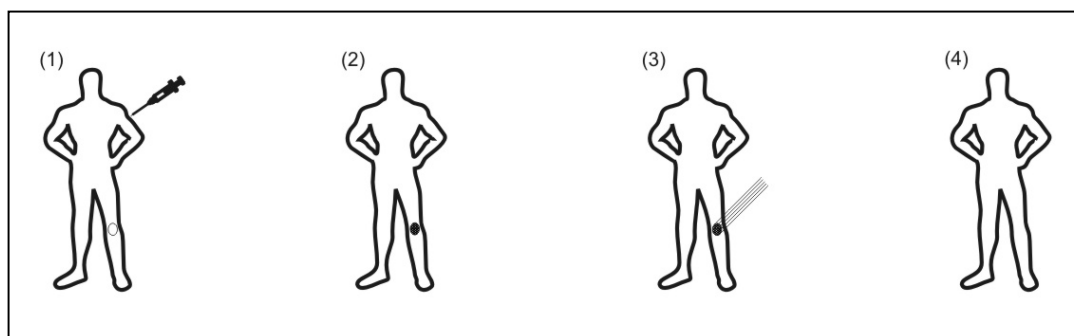


Abb. 8: Schematische Darstellung des Prinzips der photodynamischen Therapie.

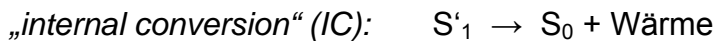
Voraussetzung für das Zustandekommen photodynamischer Wechselwirkungen ist die gleichzeitige Anwesenheit von Photosensibilisator, Sauerstoff und Licht geeigneter Wellenlänge [103].

Durch Absorption von Licht geht der Photosensibilisator aus seinem Singulett-

Grundzustand ( $S_0$ ) direkt oder nach strahlungslosem Übergang via  $S_2$  in den angeregten Singulett-Zustand  $S'_1$  über:



Zur Rückkehr von  $S_1$  in den Grundzustand sind verschiedene Reaktionswege möglich:



Insbesondere wenn der  $S'_1$ -Zustand kurzlebig ist, kann sich der Sensibilisator stabilisieren, indem er unter dem sogenannten „intersystem crossing“ (ISC) in einen metastabilen Triplett-Zustand ( $T_1$ ) übergeht<sup>[104-106]</sup>:



Die verschiedenen monomolekularen Deaktivierungsprozesse lassen sich schematisch in einem sogenannten Jablonski-Diagramm darstellen (Abb. 9).

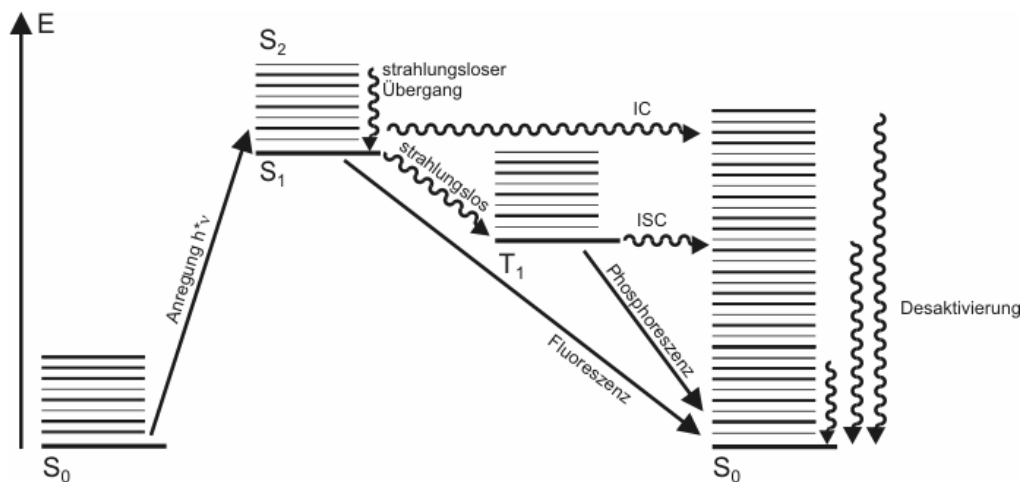


Abb. 9: Energiediagramm eines Photosensibilisators (Jablonski-Diagramm).  
IC = internal conversion, ISC = intersystem crossing.

Durch eine relativ lange Halbwertszeit ( $> 10^{-4}$  s) kann der Triplett-Zustand ( $T_1$ ) chemische Reaktionen in seiner Mikroumgebung auslösen. Hierbei werden abhängig vom jeweiligen Reaktionspartner zwei Mechanismen der zellulären Schädigung unterschieden (vgl. Abb. 10):

*Typ-I-Reaktion:* Die direkte Reaktion des Sensibilisators mit einem Substrat führt durch Wasserstoffabspaltung oder Elektronentransfer zur Bildung freier Radikale. Dieser Prozess läuft bevorzugt ab, wenn eine hohe Substratkonzentration vorliegt <sup>[107]</sup>.



*Typ-II-Reaktion:* Die Energie des Triplett-Zustandes wird auf Sauerstoff übertragen, es entsteht reaktionsfreudiger Singulett-Sauerstoff (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Dieser Mechanismus läuft bevorzugt ab, wenn eine ausreichend hohe Sauerstoffkonzentration vorliegt <sup>[108;109]</sup>.

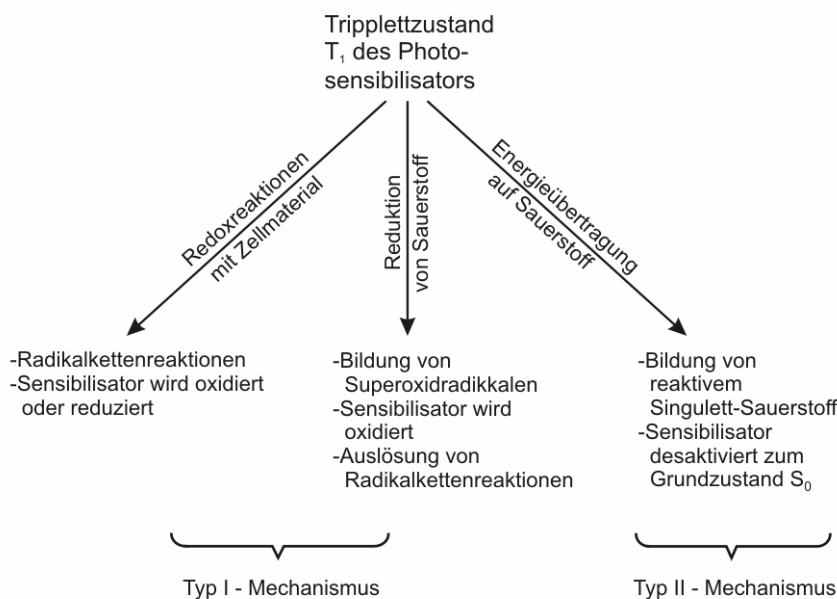


Abb. 10: Zellzerstörende Prozesse bei der PDT (nach Rück <sup>[110]</sup>).

Welcher der beiden Mechanismen überwiegt, hängt vom Photosensibilisator, den Substraten sowie der Sauerstoffkonzentration ab <sup>[107]</sup>. Für die photodynamische Therapie spielt wahrscheinlich hochreaktiver Singulett-Sauerstoff und damit die Typ-II-Reaktion die größere Rolle <sup>[111-115]</sup>. Durch seine kurze Lebensdauer ist die Reichweite des Singulett-Sauerstoffs in wässrigem Milieu

auf weniger als 0,1 µm begrenzt <sup>[116]</sup>. Folglich bleibt die Zellschädigung auf den Ort der <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Entstehung und damit auf die Mikroumgebung der Sensibilisatorlokalisierung beschränkt <sup>[116]</sup>.

Als zelluläre Angriffspunkte der photodynamischen Therapie gelten biologische Membranen und Mitochondrien, ferner Lysosomen, Nukleoside und verschiedene Enzymsysteme <sup>[117]</sup>. Die Lokalisation des jeweiligen Sensibilisators auf oder in der Zelle hängt in erster Linie von seiner Lipophilie ab und spielt für den Wirkmechanismus eine entscheidende Rolle <sup>[105;118-120]</sup>. So reichern sich lipophile Farbstoffe im Allgemeinen in den Membranen von Zellen und ihren Organellen an. Die Photooxidation von Lipiden und Proteinen der Zellmembranen triggert membranöse Phospholipasen die den raschen Abbau geschädigter Phospholipide bedingen. Durch Depolarisation der Zellmembran kommt es zum Kollaps des Ionengleichgewichts und schließlich zum Zelltod <sup>[121;122]</sup>.

Neben der direkten Zellschädigung führen bei der photodynamischen Therapie auch einige sekundäre Effekte zum Zelltod. Beschrieben sind hypoxische Schädigung durch Vasokonstriktion, Thrombozytenaggregation und Aktivierung der Gerinnungskaskade <sup>[123-125]</sup>, die Induktion von Apoptose <sup>[126;127]</sup> sowie die Initiation immunologischer und inflammatorischer Reaktionen <sup>[128;129]</sup>.

#### **1.3.4 Photobleaching**

Nicht nur Zellbestandteile, sondern auch die Farbstoffe selbst werden Opfer der aggressiven Reaktionsprodukte. Sie werden in Abhängigkeit von Intensität und Dauer der Bestrahlung zerstört, bleichen aus und verlieren ihre photodynamische Wirksamkeit <sup>[130;131]</sup>. Dieser als „photobleaching“ bezeichnete Prozess ist jedoch nicht generell als Nachteil zu betrachten, sondern stellt ein wichtiges Hilfsmittel für die Dosimetrie dar, insbesondere als Schutz vor Überdosierung. Hierzu muss der verwendete Photosensibilisator einerseits niedrig genug dosiert werden, um in normalem Gewebe auszubleichen bevor es zu zytotoxischen Reaktionen kommt, andererseits muss die Dosis hoch genug sein, um eine letale Schädigung des Zielgewebes zu induzieren <sup>[132-136]</sup>. Voraussetzung für die Ausnutzung dieses Effektes ist eine entsprechend hohe Sensibilisatoranreicherung im Zielgewebe gegenüber den normalen Strukturen.



Dieses Verhältnis drückt sich im sogenannten Akkumulationsindex aus und liegt für die meisten Photosensibilisatoren zwischen 2:1 und 5:1.

### 1.3.5 Photosensibilisatoren

Als Photosensibilisatoren bezeichnet man Substanzen, die in der Lage sind, absorbierte Lichtenergie wieder in Form von Licht (= Fluoreszenz) oder durch Energie- und Elektronentransfer auf andere Moleküle zu übertragen <sup>[118]</sup>. Während durch Blaulicht (absolutes Absorptionsmaximum) angeregte Moleküle rot fluoreszieren und bei der photodynamischen Diagnostik (PDD) zur Anwendung kommen, werden durch Rotlicht (langwelligstes Absorptionsmaximum) angeregte Photosensibilisatoren in der photodynamischen Therapie eingesetzt. Hierbei schädigt der Photosensibilisator entweder direkt das umliegende Gewebe (Typ-I-Reaktion), oder die aufgenommene Energie wird auf andere Moleküle in der Zelle – meist auf Sauerstoff – übertragen und führt so über verschiedene Mechanismen zur Zerstörung des Gewebes (Typ-II-Reaktion).

Von den meisten derzeit zur Verfügung stehenden Photosensibilisatoren existieren bisher ausschließlich empirisch gewonnene Daten, die oft zwischen den Arbeitsgruppen stark variieren und zum Teil durch unterschiedliche Protokolle bedingt sind. Voraussetzung für den therapeutischen Einsatz sind jedoch eindeutige Kenntnisse über Pharmakokinetik, den Einfluss der Applikationsart, das Wirkungs- sowie das Nebenwirkungsspektrum. So muss für den verwendeten Photosensitizer bekannt sein in welchen Organen nach welcher Zeit welche Konzentrationen vorliegen, wie stark die Kontrastanreicherung im Zielgewebe und im umliegenden Gewebe ist, wie und in welchem Zeitraum die Substanz wieder ausgeschieden wird und wie lange mit Nebenwirkungen (z.B. an der Haut) zu rechnen ist <sup>[137]</sup>.

Haematoporphyrinderivat (HpD) und Photofrin II (P II) waren die ersten in der photodynamischen Therapie eingesetzten Sensibilisatoren <sup>[138]</sup>. Diese Photosensibilisatoren der ersten Generation erweisen sich jedoch für den klinischen Einsatz in verschiedenster Hinsicht als nicht zufriedenstellend:

- HPD und P II stellen Substanzgemische dar, deren Zusammensetzung noch nicht hinreichend bekannt ist. Eine eindeutige Struktur - Wirkungsbeziehung lässt sich damit nicht herstellen <sup>[119;139]</sup>.
- Die langwelligste Absorption der beiden Substanzen liegt bei 630 nm <sup>[140]</sup>. Bei dieser Wellenlänge erfolgt weder eine optimale Anregung, noch eine befriedigende Eindringtiefe (maximal 2-3 mm) des therapeutischen Lichts in das Gewebe <sup>[141;142]</sup>.
- Eine zwei bis vier Wochen andauernde Photosensibilisierung von Haut und Augen erfordert aufwendige Schutzmaßnahmen zur Vermeidung phototoxischer Reaktionen <sup>[143-146]</sup>.

Die beschriebenen Substanzen können somit keineswegs als optimal angesehen werden. Vor diesem Hintergrund und aufgrund des Einsatzes der photodynamischen Therapie für eine ständig wachsende Anzahl von Krankheitsbildern konzentriert sich die Forschung seit einigen Jahren auf die Entwicklung neuer oder die Verbesserung bekannter Photosensibilisatoren. Zu den sogenannten „Photosensibilisatoren der zweiten Generation“ zählen unter anderen Phthalocyanine, Naphthalocyanine, Purpurine, Verdine, Chlorine, 5-Aminolävulinsäure, Pheophorbide und Benzoporphyrinderivate <sup>[132;137]</sup>. Die Vorteile dieser neuen Substanzen liegen vor allem in einer geringeren Hautsensibilisierung sowie günstigeren Absorptionswellenlängen begründet. Die Eindringtiefe von Licht ins Gewebe, bei der die Strahlungsintensität auf 37% des Ausgangswertes vermindert ist, bezeichnet man als optische Penetrationstiefe. Sie ist abhängig von der Wellenlänge und vom Gewebetyp. Da das bei der photodynamischen Therapie durchstrahlte Gewebe in der Regel vorgegeben ist, setzt die Behandlung tiefer gelegener Strukturen die Verwendung einer entsprechend hohen Wellenlänge in Kombination mit einem in diesem Bereich absorbierenden Sensibilisator voraus (siehe Tabelle 3).

Wellenlänge [nm]	Optische Penetrationstiefe [mm]
400	< 1
514	0,5-2
630	1-6
700-800	5-10

*Tabelle 3: Optische Penetrationstiefe des Lichts im Gewebe.*

Die Eindringtiefe von Licht in Haut und subkutanes Gewebe nimmt für Wellenlängen zwischen 600 nm und 1200 nm kontinuierlich zu (optisches Fenster) <sup>[147]</sup>. Dabei wird Licht der Wellenlängen unter 600 nm größtenteils durch Hämoglobin, Licht der Wellenlängen über 1200 nm durch Wasser absorbiert und dabei in Wärmeenergie transformiert <sup>[115]</sup>.

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der derzeit klinisch am häufigsten verwendeten Photosensibilisatoren <sup>[144;148-150]</sup>.

Kurzname	Substanz	Handelsname	Hersteller	Absorptions-Wellenlänge
HPD	Haematoporphyrinderivat	Photofrin	QLT PhotoTherapeutics Inc., Vancouver, CA	630 nm
BPD-MA	Benzoporphyrinderivat Monoacid Ring A	Verteporfin	Sanofi-Synthelabo, FRA	690 nm
mTHPC	Meso- tetrahydroxyphenylchlorin	Foscan	Scotia Pharmaceutical, Stirlingshire, UK	652 nm
ALA	5-Aminolävulinsäure	Levulan	DUSA Pharmaceuticals, Inc., Wilmington, USA	630 nm
Lu-TeX	Lutetium texaphyrin	LUTRIN	Pharmacyclics, Sunnyvale, USA	732 nm

*Tabelle 4: Übersicht einiger häufig verwendeter Photosensibilisatoren.*

Ein idealer Photosensibilisator zeichnet sich neben seinen spezifischen durch eine Reihe von grundlegenden Eigenschaften aus <sup>[106;132]</sup>. Hierzu zählen:

- leichte Verfügbarkeit und chemische Stabilität
- geringe Dunkeltoxizität
- pharmakokinetische Unbedenklichkeit
- langweilige Absorption (> 650 nm) mit hohem molarem Extinktionskoeffizienten
- definierte chemische Zusammensetzung, möglichst Reinstoff
- Selektivität (mindestens 1:10)
- hohe Quantenausbeute für Singulett-Sauerstoff (für therapeutische Anwendungen) bzw.
- hohe Fluoreszenzquantenausbeute (für diagnostischen Einsatz)
- einfache Handhabung (unter anderem gute Löslichkeit in isotonischen Medien)

Im Hinblick auf die Behandlung der chronischen Polyarthrits sind an einen Sensibilisator weitere Anforderungen zu stellen:

- selektive Anreicherung in der Synovialis
- keine Wechselwirkung mit Antirheumatika

### 1.3.5.1 Benzoporphyrinderivat

Mit Verteporfin, einem Benzoporphyrinderivat-Monoacid (BPD-MA) steht ein Photosensibilisator zur Verfügung, der die obengenannten Voraussetzungen weitgehend erfüllt. BPD-MA ist ein Abkömmling des auch physiologischerweise im Hämoglobinabbau entstehenden Porphyrins und löst als endogene Substanz keine Unverträglichkeitsreaktionen aus. In therapeutischer Dosis und ohne Lichteinwirkung ist Verteporfin nicht toxisch.

Das BPD-MA-Molekül setzt sich zu gleichen Teilen aus zwei Strukturisomeren zusammen, die sich durch die Anordnung einer Carboxylgruppe an Position drei bzw. vier des Porphyrinringes unterscheiden (siehe Abb. 11). In den Eigenschaften der beiden Isomere besteht kein Unterschied <sup>[117;151-153]</sup>.

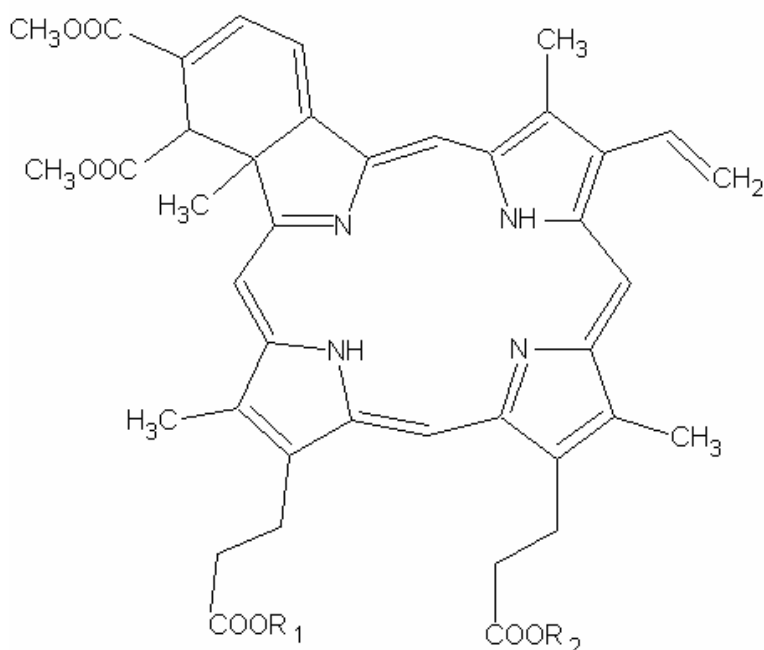
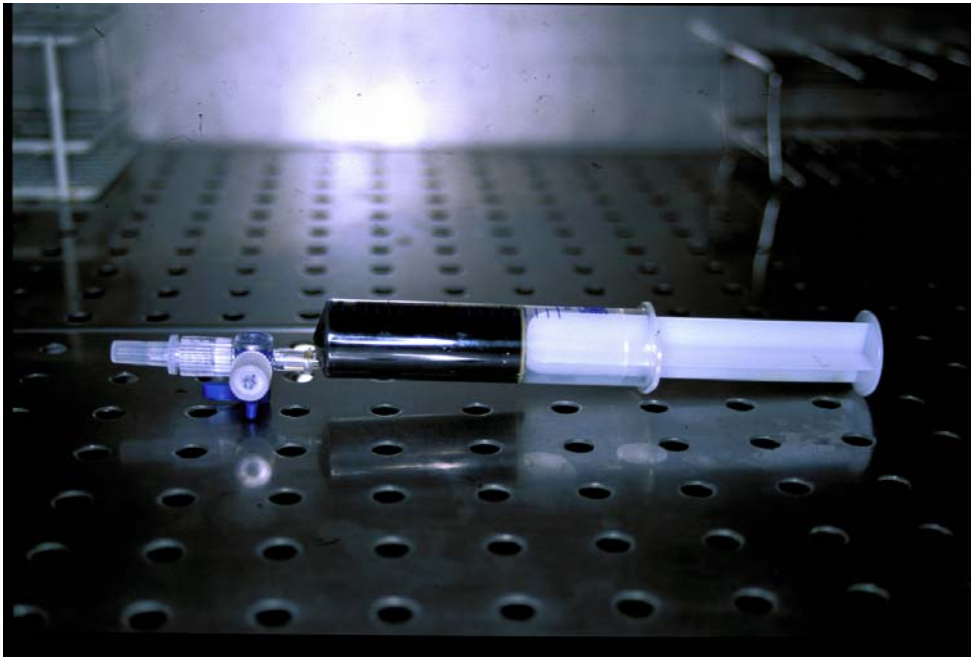


Abb. 11: Chemische Struktur von Benzoporphyrinderivat-Monoacid (BPD-MA). Für ein Isomer gilt  $R_1 = CH_3$  und  $R_2 = H$ , für das andere  $R_1 = H$  und  $R_2 = CH_3$ .

In der Handelsform liegt BPD-MA Verteporfin als gefriergetrocknetes Pulver vor, wobei die Einbettung der an sich hydrophoben Substanz in Liposomen mit einer mittleren Partikelgröße von unter 200 nm eine gute Wasserlöslichkeit ergibt und sich außerdem positiv auf das Anreicherungsverhalten auswirkt <sup>[150;154]</sup>. Nach Solution des Pulvers in Wasser für Injektionszwecke entsteht die in Abbildung 12 dargestellte dunkelgrüne Injektionslösung.



*Abb. 12: Injektionsbereites BPD-MA nach Lösung des gefriergetrockneten Pulvers in 16 ml aqua ad iniectabilia.*

Die Vorteile des BPD-MA liegen in einer kurzen Hautsensibilisierung (maximal zwei bis drei Tage nach i.v.-Applikation), einer zufriedenstellenden Gewebepenetration des verwendeten Anregungslichtes durch ein Absorptionsmaximum bei 690 nm (siehe Abb. 13) und der chemisch eindeutig definierten Struktur <sup>[155;156]</sup>.

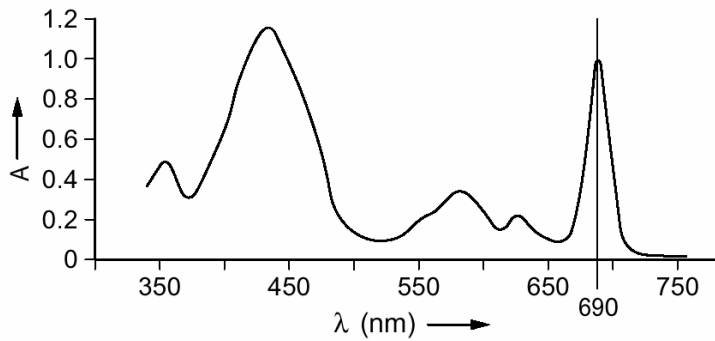


Abb. 13: Absorptionsspektrum von BPD-MA.

BPD-MA akkumuliert sehr rasch (innerhalb von 15 min) und selektiv in anormalen oder hyperproliferativen Zellen. Die Mechanismen dieser selektiven Anreicherung sind noch nicht hinreichend bekannt, wahrscheinlich spielt die hohe Affinität des BPD-MA zu Plasma-Lipoproteinen (insbesondere LDL) eine entscheidende Rolle <sup>[117;157;158]</sup>. Der Porphyrintransport im Blutkreislauf erfolgt ebenfalls durch Lipoproteine, LDL-Oberflächenrezeptoren sind ferner am Porphyrintransport in die Zelle beteiligt <sup>[159;160]</sup>.

Gewebe mit großer Dichte und gesteigertem Umsatz von LDL-Rezeptoren weisen häufig einen hohen Grad an Neovaskularisationen auf. Die photodynamische Therapie führt in diesen Bereichen durch Mikrothrombosierung zur Unterbrechung der Blutzufuhr und damit zur ischämischen Nekrose der hyperproliferativen Strukturen <sup>[161]</sup>.

Nach intravenöser Injektion sind 90% des Verteporfins mit dem Plasma, die übrigen 10% mit Blutzellen assoziiert. Im menschlichen Plasma binden wiederum 90% der Substanz an die Lipoproteinfraktion und etwa 6% an Albumin <sup>[162]</sup>. Die Plasmahalbwertszeit wird vom Hersteller mit etwa vier bis sieben Stunden angegeben, die Elimination erfolgt überwiegend hepatisch mit der Galle <sup>[153;162;163]</sup>. Während Verteporfin größtenteils unverändert ausgeschieden wird, führt die Hydrolyse der Estergruppe durch Leberesterasen bei 5-10% der Substanz zur Entstehung von Benzoporphyrinderivat-Diacid (BPD-MA-DA) <sup>[164]</sup>.

Als absolute Kontraindikationen für den Einsatz von BPD-MA gelten eine bestehende Porphyrie sowie Überempfindlichkeit gegenüber Verteporfin oder

einen der Hilfsstoffe, relative Kontraindikationen sind mittelschwere bis schwere Leberfunktionsstörungen <sup>[162]</sup>.

Verschiedene neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass die photodynamische Therapie mit BPD-MA gemäß einer Typ-II-Reaktion, also unter Bildung von Singulett-Sauerstoff, abläuft <sup>[146;165]</sup>.

BPD-MA befindet sich seit 1992 in der klinischen Erprobung. In der Dermatologie wird es nach erfolgreichen klinische-Phase-I- und -II-Studien derzeit in einer Phase-III-Studie zur Behandlung spinözellulärer Karzinome und Basaliome erprobt. Klinische Untersuchungen zur Behandlung der Psoriasis vulgaris lieferten ebenfalls positive Ergebnisse. In der Hämatologie untersucht man die Wirksamkeit der photodynamischen Therapie mit BPD-MA im Rahmen eines „Purging“ (= Reinigung) des Knochenmarks bei autologen Knochenmarkstransplantationen <sup>[144]</sup>. Als weitere Indikationen diskutiert oder experimentell untersucht werden derzeit unter anderem AIDS, diabetische Retinopathie, Multiple Sklerose, Arteriosklerose, Glaukom, sekundärer Katarakt, Myopie, chronische Leukämie, Histoplasmose, Multiples Myelom, Myeloablation, koronare Restenosierung und zervikale Dysplasie <sup>[152]</sup>. Basierend auf zwei 24-monatige Phase-III-Wirksamkeitsprüfungen ist Verteporfin seit August 2000 unter dem Handelsnamen Visudyne® von der Europäischen Union zur Behandlung der feuchten Form der senilen Makuladegeneration (AMD) zugelassen <sup>[166]</sup>. Gleichzeitig wurde vom Hersteller (Ciba-Vision) ein Antrag auf Indikationserweiterung für die pathologische Myopie und weitere Augenerkrankungen gestellt.

In den klinischen Studien zur Therapie der AMD mit Verteporfin wurden neben unerwünschten Wirkungen am behandelten Auge auch einige systemische Nebenwirkungen beobachtet, die möglicherweise auf die Visudynebehandlung zurückzuführen sind. Hierzu zählen als häufige Nebenwirkungen (1-10%) infusionsbedingte Schmerzen, Übelkeit, Photosensibilitätsreaktionen, Asthenie, Pruritus und Hypercholesterinämie. An der Injektionsstelle können Schmerz, Ödeme, Entzündung und Extravasation auftreten. Als gelegentliche Nebenwirkungen (0,1-1%) werden Hypertonie, Hypästhesie und Fieber beschrieben <sup>[162;167]</sup>.



### **1.3.6 Laserinduzierte Fluoreszenz (LIF)**

Trotz intensiver Erforschung bereitet die Dosimetrie bei der photodynamischen Therapie noch große Probleme. In der klinischen Praxis beschränkt man sich meist auf die Festlegung der gewichtsadaptierten Sensibilisatormenge sowie einer empirisch ermittelten Lichtdosis. Der Tatsache, dass sich die Sensibilisatorkonzentration am Zielort während der Bestrahlung ständig ändert sowie der Existenz ausgeprägter inter- und intraindividuelle Unterschiede wird damit keine Rechnung getragen.

Die Bestimmung von Arzneimittelkonzentrationen in Geweben durch extrahierende Verfahren ist mit großem klinischen Aufwand verbunden, da sie die Entnahme von Biopsien erfordert und somit labor- und zeitintensiv, traumatisch und oft aufgrund des Behandlungsregimes gar nicht möglich ist. Mit der laserinduzierten Fluoreszenz steht ein System zur Verfügung, welches eine nichtinvasive Echtzeitmessung der Signale von fluoreszierenden Molekülen in biologischen Geweben gestattet. Die Methode erlaubt sowohl die Bestimmung der Fluoreszenz von Fluorophoren in nativem Gewebe (Autofluoreszenz), als auch die Fluoreszenzmessung nach Applikation exogener Marker (Photosensibilisatoren).

Neben dem Sensibilisatorgehalt und seiner Degradation kann auch die etwaige Entstehung von Photoprodukten im Behandlungsverlauf verfolgt werden. Das Prinzip der LIF beruht auf der Anregung eines Moleküls oder Atoms durch ein Laserphoton und der anschließenden Emission aus dem angeregten Zustand (= Fluoreszenz). Die Signalintensität ist hierbei abhängig von der molekularen Konzentration, der molekularen Mikroumgebung und den physikalischen Rahmenbedingungen wie Druck, Temperatur und pH-Wert. Wesentliche Vorteile der LIF gegenüber gewebeextrahierenden Methoden sind die Möglichkeit zur „Online-Messung“, beliebige Wiederholbarkeit bei maximaler Schonung des Gewebes sowie Einsetzbarkeit in schwer zugänglichen Regionen durch Verwendung von Faseroptiken <sup>[168;169]</sup>. Schwierigkeiten bei der Beurteilung von LIF-Messungen ergeben sich aus den mikroskopischen Schwankungen der Photosensibilisatorkonzentration zwischen Kapillaren und Parenchym sowie den Konzentrationsänderungen durch Metabolisierung und Ausscheidung. Ferner darf nicht außer Acht gelassen werden, dass durch

Bindung des Photosensibilisators an Moleküle das Fluoreszenzverhalten dieser Moleküle beeinflusst wird und dass sich die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Bindung an Plasma gegenüber der Aufnahme in Zellen ändert <sup>[168]</sup>.

#### **1.4 Vorarbeiten**

Zur photochemotherapeutischen Behandlung der chronischen Polyarthritiden wurden in den vergangenen Jahren zwei Therapieansätze verfolgt, die PUVA und die photodynamische Therapie. Beiden Therapieprinzipien gemein ist die Kombination von Licht mit photosensiblen Chemotherapeutika. Der herausragende Vorteil der photodynamischen Therapie gegenüber der PUVA liegt in der Verwendung von Licht größerer Wellenlängen und der damit verbundenen tieferen Gewebepenetration.

Die bisher zum Thema veröffentlichten Untersuchungen befassen sich in erster Linie mit Fragen zur Auswahl eines geeigneten Photosensibilisators und dessen dosisabhängiger Wirkung <sup>[99;170;171]</sup>. Die vorliegende Arbeit stützt sich insbesondere auf die Erfahrungen und Ergebnisse zweier vorangegangener Studien.

Die ersten Experimente untersuchten die Wirksamkeit der photodynamischen Therapie in einem humanen Synovialzellmodell. Hierfür wurde ein Zellsystem aus Synovialfibroblasten von an chronischer Polyarthritiden erkrankten Patienten entwickelt. An diesem Modell wurde die photodynamische Wirksamkeit der beiden Sensibilisatoren Photosan3 und Photofrin vergleichend getestet. Beide Substanzen zeigten bei Laserbestrahlung eine zytotoxische Wirkung auf Synovialfibroblasten, während eine alleinige Laserbestrahlung oder die alleinige Photosensibilisatorapplikation keinen Effekt auf die Zellen hatten. Für Photofrin konnte eine signifikant höhere zytotoxische Potenz, vor allem bei höheren Dosen, nachgewiesen werden <sup>[172]</sup>.

Die zweite Studie hatte die Etablierung eines Arthritis-Tiermodells, die Bestimmung der PpIX-Anreicherung im gesunden und arthritischen Gelenk nach lokaler bzw. systemischer ALA-PpIX-Applikation sowie Untersuchungen zur Wirksamkeit der photodynamischen Therapie mit ALA und Photosan3 bei Synovialitis zum Ziel <sup>[173]</sup>. In Anlehnung an die Beschreibung Reichels wurde am Kaninchenknie eine Immunarthritiden erzeugt <sup>[174]</sup>. Das Modell konnte die in der

Literatur beschriebenen Charakteristika reproduzieren und erwies sich für die nachfolgenden Versuche als geeignet. Die photodynamische Therapie mit Photosan3 führte zur selektiven hämorrhagischen Nekrose der Synovialis bei Schonung bradytropher Gelenkanteile, wobei als limitierender Faktor für den klinischen Einsatz eine ausgeprägte Hautsensibilisierung von bis zu dreiwöchiger Dauer beschrieben wurde. Die Versuche zur photodynamischen Therapie mit ALA zeigten zwar eine selektive Anreicherung von PpIX in der Synovialis, die Laserbestrahlung mit  $50 \text{ J/cm}^2$  führte jedoch trotz vollständigem Ausbleichen des Farbstoffes am Bestrahlungsende nicht zur erwarteten Schädigung der synovialen Deckzellschicht, so dass sich die Substanz für diese Indikation als ungeeignet herausstellte.

### **1.5 Fragestellung**

Seine photobiologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften machen BPD-MA zu einem vielversprechenden Photosensibilisator für den Einsatz bei einer Vielzahl verschiedenster Erkrankungen. Vor ersten klinischen Versuchen bei Patienten mit chronischer Polyarthritits muss ausgeschlossen werden, dass die Behandlung zu Schäden an wichtigen Gelenkstrukturen wie Knorpel und Bändern führt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher

- die Untersuchung der photodynamischen Wirkung von BPD-MA im Tiermodell der chronischen Polyarthritits
- die Beobachtung der Effekte unterschiedlicher Licht- und Sensibilisatordosen auf die Synovialmembran und die umliegenden Gewebe bei der photodynamischen Therapie zur Behandlung der chronischen Polyarthritits sowie
- die Entwicklung eines Konzeptes zur intraartikulären Dosimetrie.

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Die Versuche wurden an 38 New Zealand White Kaninchen der Firma Charles River (Sulzfeld) durchgeführt. Die Genehmigung wurde im November 1995 von der Bezirksregierung Hannover unter der Nummer 621-3531.01-11/95 erteilt. Zum Zeitpunkt der Versuche waren die Tiere etwa ein halbes Jahr alt und hatten ein Körpergewicht von 2,5-3,5kg. Die Unterbringung und Versorgung der Kaninchen erfolgte nach Genehmigung durch die Regierung von Unterfranken im Tierhaus der Universitätsklinik Würzburg. Als Futter erhielten die Tiere Wasser, Heu, Stroh und Kaninchen-Trockenfutter ad libitum. Die Operationen wurden von unserer Arbeitsgruppe im Medizinischen Laserzentrum Lübeck durchgeführt, wo die Arbeitsgruppe um Herrn Dr. Hüttmann die apparativen Voraussetzungen und ihr technisches Know-how zur Verfügung stellte. Die perioperative Betreuung der Kaninchen vor Ort erfolgte durch das Tierlabor der Medizinischen Universität Lübeck. Auch hier wurden die Tiere mit Wasser, Heu, Stroh und Kaninchen-Trockenfutter ad libitum versorgt. Mit dem Transport der Kaninchen nach und von Lübeck wurde ein Tiertransportunternehmen beauftragt.

### **2.2 Arthritismodell**

#### **2.2.1 Herstellung der Injektionslösung**

Humanes IgG (Beriglobin® 16%, Behring, Marburg) wurde mit Aqua ad iniectabilia (Baxter, Unterschleißheim) zu einer zweiprozentigen Lösung verdünnt. Diese Lösung wurde anschließend für 25 Minuten bei 60°C erhitzt um eine Komplexbildung zu erreichen. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde das so entstandene hitzeaggregierte IgG (HAAG) in ein steriles Gefäß abgefüllt. Für die intrakutane Sensibilisierung wurden gleiche Mengen zweiprozentiges HAAG und CFA (Freund's Adjuvant-Complete, Sigma Immunochemicals, St. Louis, USA) in sterile Spritzen aufgezogen, über einen Dreiwegehahn sorgfältig miteinander vermischt und anschließend steril abgefüllt.

### **2.2.2 Immunisierung und Boosterung**

Für die Immunisierungsinjektion wurden die Tiere zwischen den Schulterblättern geschoren und diese Stelle mit Hautdesinfektionsmittel (Neo-Kodan, Schülke & Mayr, Norderstedt) gereinigt. Zur Injektion wurde die Haut in einer Falte abgehoben, um eine intramuskuläre Applikation zu vermeiden. Die Injektionsmenge von 0,6 ml wurde mit einer 27 G Kanüle auf sechs bis acht Stellen verteilt, um die Entstehung von Hautnekrosen zu vermeiden. Die Injektionsstellen wurden im weiteren Versuchsverlauf täglich inspiziert. Der Erfolg der Immunisierung wurde nach drei Wochen durch subkutane Injektion von 0,1 ml zweiprozentigem HAAG kontrolliert.

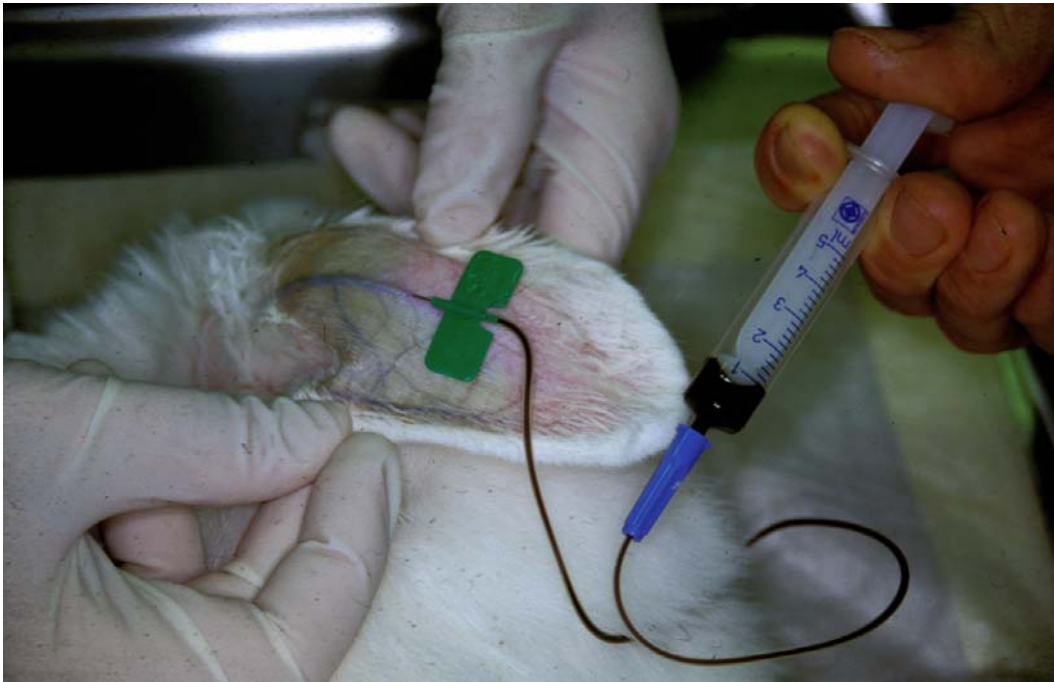
Für die Boosterinjektionen wurden 0,5 ml zweiprozentiges HAAG in sterile Spritzen aufgezogen. Um Schmerzen zu vermeiden und eine sichere intraartikuläre Injektion zu gewährleisten, erfolgte die Applikation in Anästhesie. Hierzu bekamen die Kaninchen 0,4 ml/kg KG Ketanest<sup>®</sup> 50 (Parke-Davis, Berlin) mit 0,2 ml/kg KG Rompun<sup>®</sup> 2% (Bayer, Leverkusen) intramuskulär in die linke Glutäalmuskulatur verabreicht, um eine Beeinträchtigung des rechten Hinterlaufes zu vermeiden. Danach wurde der rechte Hinterlauf geschoren und mit Hautdesinfektionsmittel desinfiziert.

Die intraartikuläre Injektion erfolgte mit einer 25 G / 0,5 - Kanüle, die von medial proximal der Patella nach retropatellar in die Gelenkhöhle eingestochen wurde. Die korrekte intraartikuläre Injektionsplatzierung konnte durch eine leichte Injizierbarkeit sowie das Anschwellen der Gelenkrezessi kontrolliert werden.

### **2.3 Photodynamische Therapie mit BPD-MA**

BPD-MA (Verteporfin, QLT Phototherapeutics Inc., Vancouver, Kanada) wird als gefriergetrocknetes Pulver lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt. Zur Herstellung einer injektionsfähigen Lösung wurde die Substanz zwölf Stunden vor Applikation in einem lichtundurchlässigen Gefäß bei Zimmertemperatur gelagert. Durch Zugabe von 16 ml aqua ad iniectabilia und vorsichtigem Schütteln entsteht eine isotone BPD-MA-Lösung mit einer Konzentration von 1,47 mg/ml.

28 Tiere erhielten eine intravenöse BPD-MA-Injektion. Hierzu wurden die Kaninchen zunächst durch intramuskuläre Gabe von 0,4 ml/kg KG Ketanest® 50 mit 0,2 ml/kg KG Rompun® 2% anästhesiert. Es folgte die Punktion einer Ohrvene mit Hilfe einer 21 G Butterfly-Kanüle. Über diese wurden nun 2 mg/kg KG der isotonen BPD-MA-Lösung langsam als Bolus verabreicht (siehe Abb. 14).



*Abb. 14: BPD-MA-Injektion in eine Ohrvene eines Kaninchens 3 Stunden vor Operationsbeginn.*

Die Injektion erfolgte drei Stunden vor Operationsbeginn. Während dieser Zeit befanden sich die Tiere in einem abgedunkelten Raum.

Als Kontrollgruppe dienten 14 Tiere, die im Anschluss an die Arthritisinduktion entweder keiner Sensibilisatorinjektion oder keiner Bestrahlung unterzogen wurden (siehe Tabelle 5).

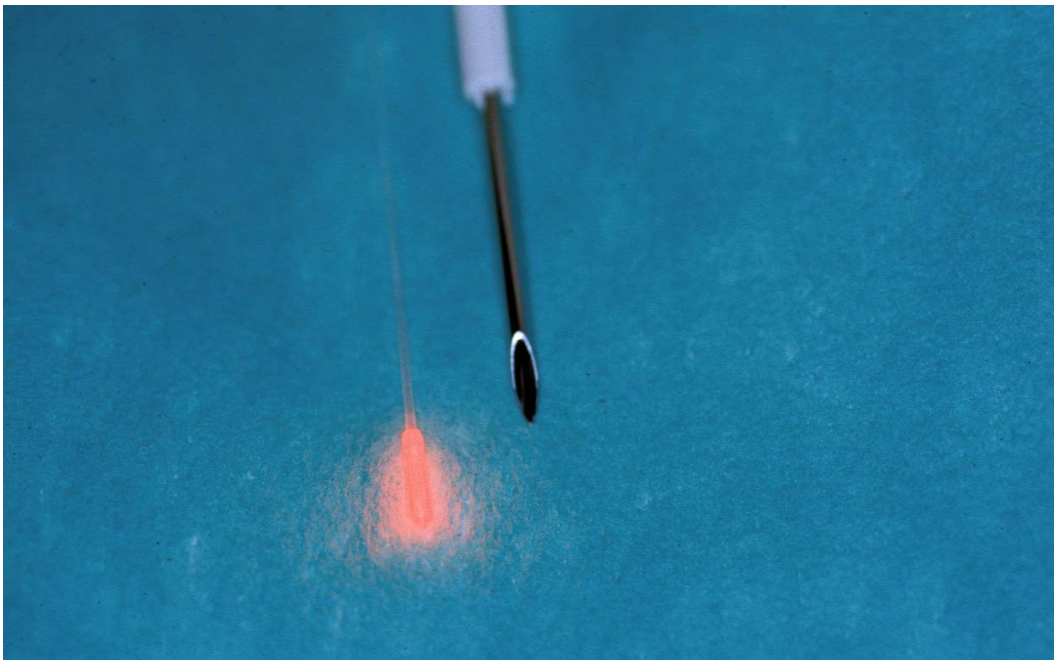
## **2.4 Laserapparatur und Applikatoren**

Als Lichtquelle diente eine Laserdiode mit dem Diodentyp AOC 690-350-HHL-200 (Laser 2000, Weißling). Die Diode emittiert Licht mit einer Leistung von bis

zu 300 mW bei einer Wellenlänge von 690 nm und einer Halbwertsbreite von 2 nm FWHM. Die Betriebsspannung beträgt 3 V.

Die Messung der optischen Gesamtleistung bzw. des emittierten Strahlungsflusses erfolgte mit einer integrierenden (Ulbricht-) Kugel (Labsphere North Sutton, NH, USA), die gegen ein bolometrisches Powermeter (Mentor MA10, Science, Boulder, CO, USA) kalibriert wurde.

Zur intraartikulären Bestrahlung wurde das Applikatormodell "Cylinder Diffusor" (QLT, Vancouver, Kanada) mit dem Ziel einer gleichmäßigen radiären Abstrahlung modifiziert. Die Länge der Faserspitze betrug 5 mm bei einem Durchmesser von 1,6 mm (siehe Abb. 15).



*Abb. 15: Applikator zur intraartikulären Bestrahlung neben einer der hierzu verwendeten 18 G - Kanülen.*

Für die Bestrahlung am eröffneten Kniegelenk wurden mehrere eigene Applikatoren entwickelt, von denen schließlich ein Modell mit der Fläche 0,33 cm x 0,30 cm und einer Leistung pro Fläche von 247 mW/cm<sup>2</sup> zur Anwendung kam (siehe Abb. 16).



*Abb. 16: Applikator zur Bestrahlung am eröffneten Kniegelenk.*

Nach Justierung des Laseraufbaus wurde jeweils die Synovialis des oberen lateralen Rezessus bestrahlt. Bei fünf Tieren erfolgte die intraartikuläre Bestrahlung mit zwei Laserapplikatoren. Hierbei wurden zusätzlich das Corpus adiposum infrapatellare und die Menisci bestrahlt.

Die Versuche wurden mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen durchgeführt (siehe Tabelle 5), die Gesamtbestrahlungsdauer betrug bei allen Versuchen 30 Minuten.

## **2.5 Operationstechnik**

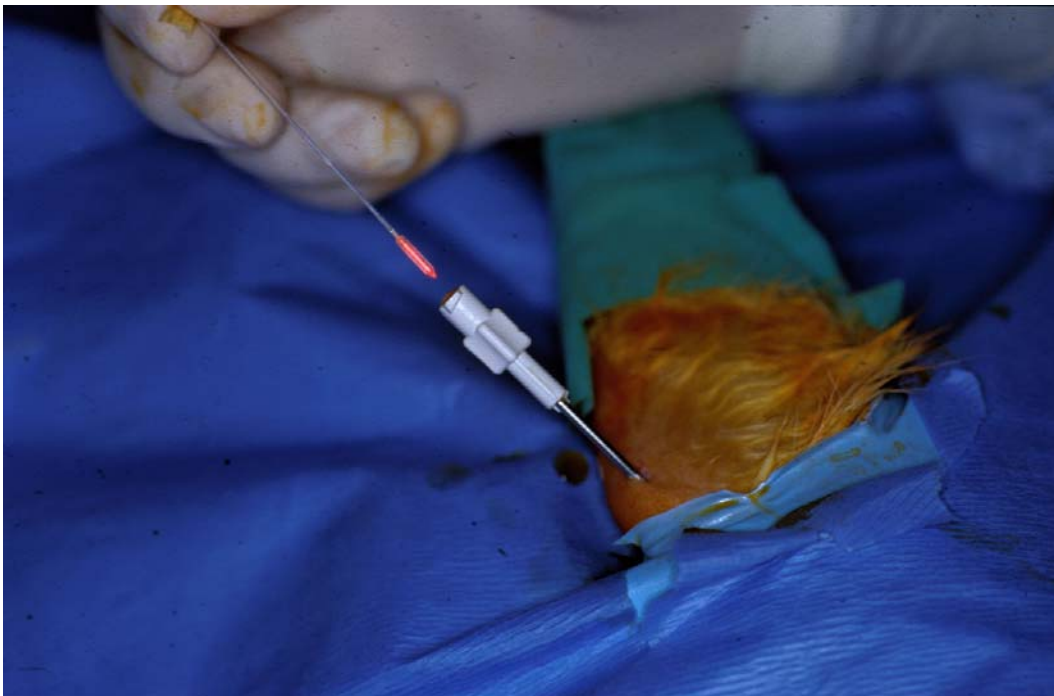
Zur Narkoseeinleitung wurde den Tieren 0,5 mg Valium® (Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) intramuskulär verabreicht. Nach etwa zehn Minuten erfolgte die Anästhesie durch intramuskuläre Injektion von 0,4 ml/kg KG Ketanest® 50 mit 0,2 ml/kg KG Rompun® 2%. Bei Bedarf wurde die Narkose intraoperativ durch eine weitere intramuskuläre Injektion mit jeweils halber Dosierung verlängert. Zur Infektionsprophylaxe erhielten alle Tiere präoperativ 0,4 ml Tardocillin® 1200 (Bayer, Leverkusen) als intramuskuläre Injektion.

Nach Einsetzen der Narkose wurde das rechte Kniegelenk der Tiere geschoren, das Operationsgebiet anschließend mit Braunovidonlösung (B.



Braun, Melsungen) desinfiziert und mit sterilen Tüchern abgedeckt. Die Operation wurde unter sterilen Bedingungen und unter Sicht mit einer Lupenbrille durchgeführt.

Zunächst wurde durch Punktion des oberen medialen Rezessus mit einer 18 G Kanüle ein Zugang zur Gelenkhöhle hergestellt. Bei den fünf mit zwei Applikatoren bestrahlten Tieren, wurde ein zweiter Zugang durch Punktion des unteren medialen Rezessus geschaffen. Durch das Kanülenlumen konnte die Lichtfaser nun sicher in die Gelenkhöhle eingeführt werden (siehe Abb. 17).



*Abb. 17: Einführen des Applikators über die Kanüle ins Gelenk.*

Bei zehn Tieren erfolgte die Bestrahlung am eröffneten Kniegelenk. Hierzu wurde medial parapatellar ein Hautschnitt gesetzt. Nach Freipräparieren der Gelenkkapsel wurde diese ebenfalls medial parapatellar eröffnet, so dass die einzelnen Gelenkstrukturen dargestellt und der Applikator an entsprechender Stelle platziert werden konnten (siehe Abb. 18).



Abb. 18: Applikator zur Bestrahlung am eröffneten Gelenk beim Einbringen in die Gelenkkapsel des Kaninchens.

Vor und nach Bestrahlung wurden die Gelenke mit Ringerlösung (B. Braun, Melsungen) gespült. Am Ende der Operationen erfolgte die Versorgung der Wunden durch Kapselnaht, Hautnaht und sterilen Verband. Tabelle 5 zeigt die Verteilung der 38 Versuchstiere auf die verschiedenen Behandlungsregime.

	BPD-MA				kein BPD-MA
	keine Bestrahlung	180 J	470 J	2 x 470 J	470 J
Punktion	4	11	3	4	6
Mini-Arthrotomie	-	4	1	1	4

Tabelle 5: Verteilung der Versuchstiere.

## 2.6 Fluoreszenzspektroskopie (LIF-System)

Zum indirekten Nachweis der BPD-MA-Konzentration im Gewebe der Gelenke sowie der gelenknahen Haut wurden vor, während und nach der Bestrahlung semiquantitative Messungen der Sensibilisatorfluoreszenz (Laserinduzierte

Fluoreszenz, LIF) durchgeführt. Zur Vereinfachung der Fluoreszenzbestimmungen im Bereich kleiner Gelenke wurde eine 90°-Fluoreszenzmessfaser entwickelt, die Messungen senkrecht zum Faserverlauf erlaubt. Als Fasertyp wurden Multimodefasern mit einem Kerndurchmesser von 300 µm verwendet. Abbildung 19 zeigt das Funktionsprinzip der beschriebenen Faser.

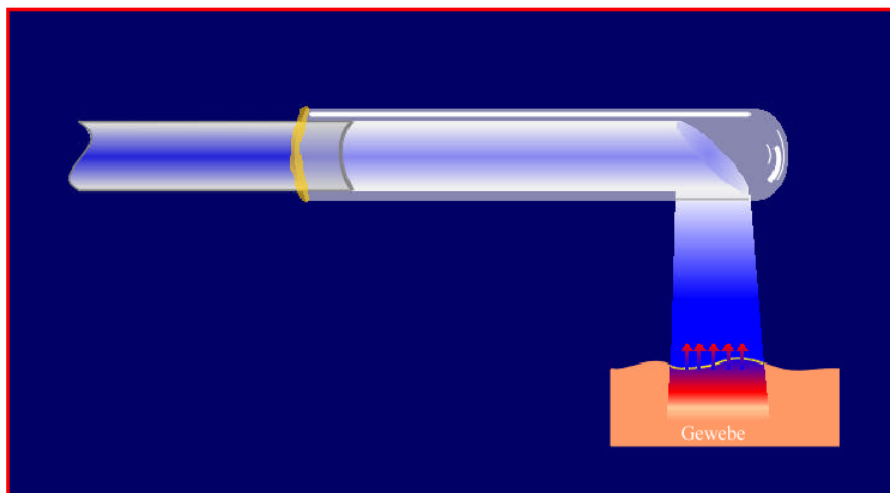


Abb. 19: Funktionsprinzip der 90°-Fluoreszenzmessfaser.

Als Anregungslichtquelle wurde ein Stickstoff-Farbstofflaser eingesetzt, dessen Strahlung über eine 400 µm Quarzfaser (CeramOptec, Bonn) und einen Strahlteiler in die Messfaser gekoppelt wurde. Das Fluoreszenzlicht der Probe lief in die Messfaser zurück, wurde von dem Strahlteiler transmittiert und auf den Spalt eines Monochromators abgebildet. Am Ausgang des Monochromators wurde das Fluoreszenzspektrum mittels eines „Optical Multichannel Analysers“ (OMA), der aus einem Kanalplattenverstärker (MCP) und einer Diodenzeile besteht, aufgezeichnet, digitalisiert und in einem Computer gespeichert. Der Laser wurde mit einem Frequenzgenerator mit 20 Hz gepulst. An den Frequenzgenerator war zusätzlich ein Pulsgenerator (SI PG 10) angeschlossen, der den Kanalplattenverstärker ansteuerte. Während der Anregung, die nur einige Nanosekunden dauerte, wurde für ca. 20 ns eine Hochspannung an die Photokathoden des Kanalplattenverstärkers angelegt. Durch diesen getakteten Betrieb konnte das Umgebungslicht weitest-

gehend unterdrückt und das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert werden. Abbildung 20 zeigt schematisch den Aufbau des Fluoreszenzspektrographen.

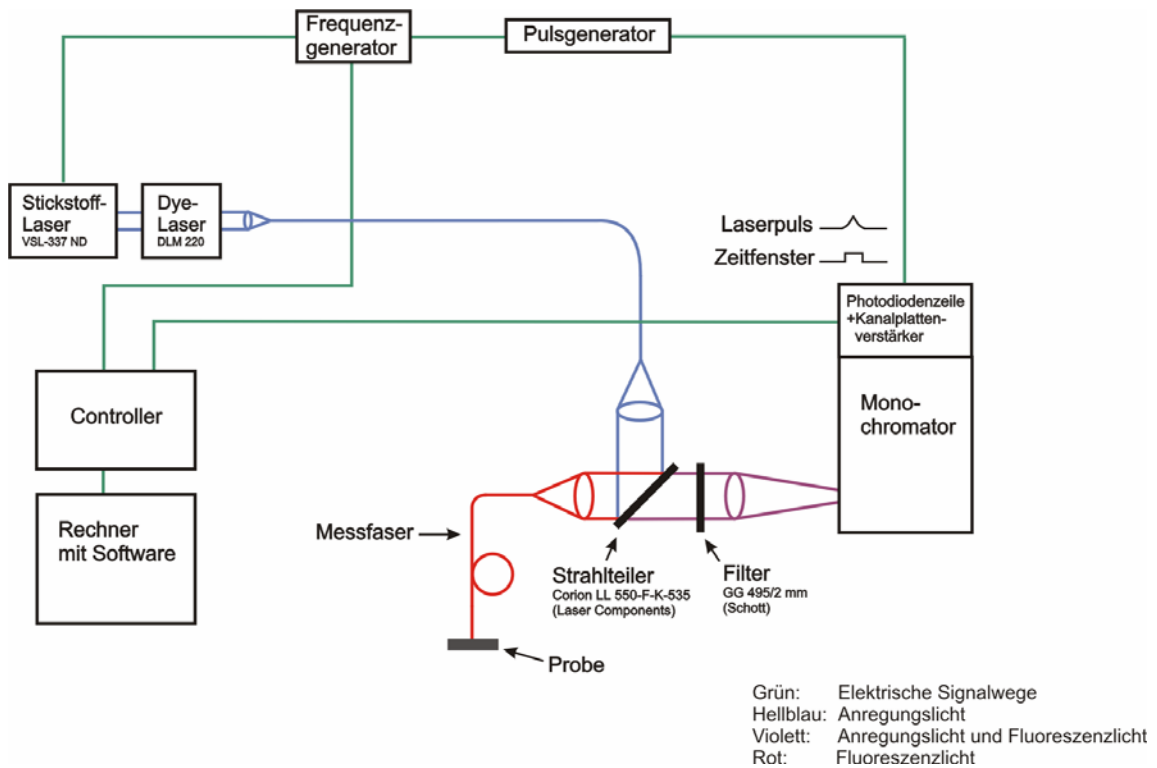


Abb. 20: Prinzipieller Aufbau des LIF-Systems.

Das distale Ende der Fluoreszenzfaser wurde neben dem zylindrischen Lichtapplikator im oberen lateralen Rezessus positioniert (siehe Abb. 21). Um die Spektren zu messen, wurde die Bestrahlung alle zwei bzw. fünf Minuten unterbrochen. Bei einigen Tieren wurden neben Haut und Synovialmembran zusätzlich Fluoreszenzspektren von Knorpel und Hoffa-Körper aufgezeichnet.



*Abb. 21: Intraartikuläre Fluoreszenzmessung.*

## **2.7 Gewinnung der Proben**

Nach Kontrolle der Wundheilung in den ersten Tagen wurden die Tiere nach Würzburg verbracht, wo am siebten postoperativen Tag die Verbände entfernt und die Tiere klinisch untersucht wurden. Im weiteren Verlauf erfolgte eine tägliche Wundkontrolle, bevor die Tiere am 14. postoperativen Tag durch intrakardiale Injektion von 5 ml T 61 (Hoechst, München) nach vorangegangener Anästhesie (siehe oben) geopfert wurden. Anschließend wurden die Kniegelenke für die histologische Untersuchung in toto entnommen und nach Entfernung des Fells in Formalinlösung fixiert. Abbildung 22 zeigt den Versuchsablauf der Studie von der Sensibilisierung bis zur Opfertung der Tiere.

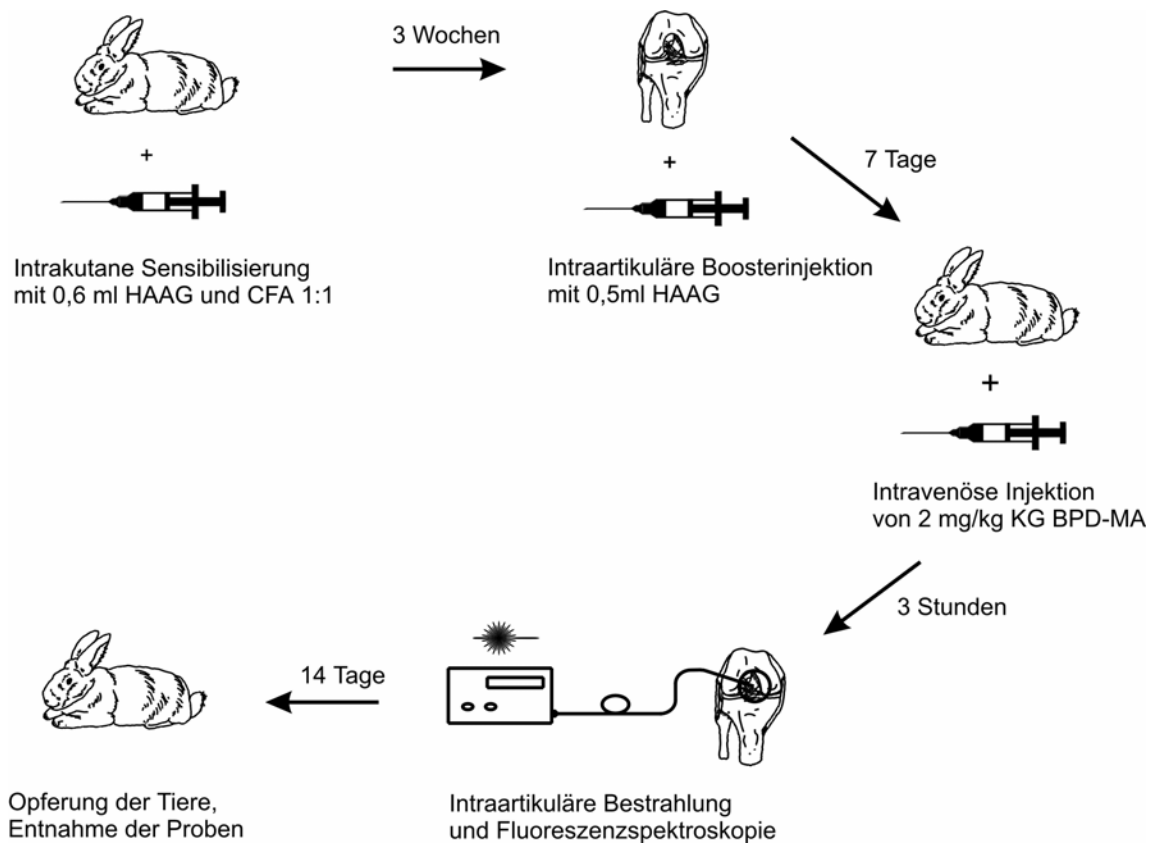


Abb. 22: Behandlungsalgorithmus des in der vorliegenden Studie beschriebenen Tierversuchs.

Nach erfolgter Fixierung wurden aus den Kniegelenken Gewebeproben zur histologischen Aufarbeitung gewonnen. Hierzu wurde das Gelenk durch einen medialen parapatellaren Zugang eröffnet, die Patellarsehne distal durchtrennt und die Patella nach lateral verlagert. Abbildung 23 zeigt ein derart präpariertes Kniegelenk.



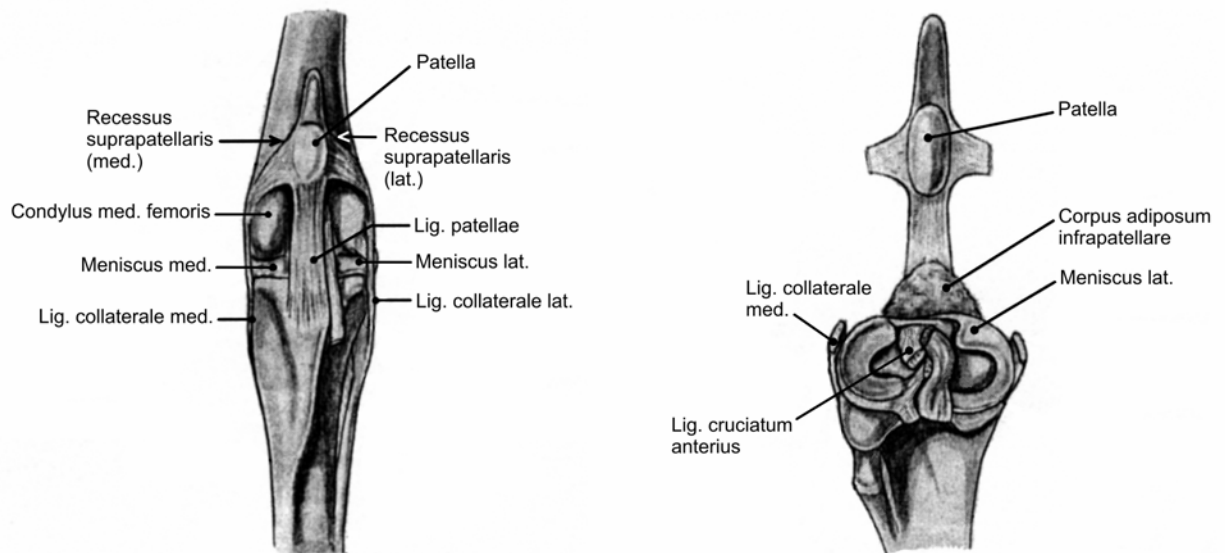
*Abb. 23: Eröffnetes Kaninchenkniegelenk vor Entnahme der Gewebeproben.*

Von folgenden Geweben wurden Proben entnommen:

- oberer lateraler Rezessus
- oberer medialer Rezessus
- Patellarsehne
- Vorderhorn des Innenmeniskus
- Vorderhorn des Außenmeniskus
- Knorpel (Patella und medialer Femurkondylus)
- Innenband
- vorderes Kreuzband
- Corpus adiposum infrapatellare



Abbildung 24 zeigt schematisch die Lokalisation der entnommenen Gelenkstrukturen.



*Abb. 24: Übersicht über die Lokalisation der entnommenen Gewebeprobe am schematisch dargestellten Kaninchenknie.*

## 2.8 Histologie

Zur histologischen Aufarbeitung wurden die fixierten Proben mit Hilfe eines Einbettautomaten in Paraffin gebettet, anschließend geschnitten und mit Hämatoxylin/Eosin (HE) bzw. Azan gefärbt. Knochen- und Knorpelproben wurden vor dem Schneiden decalcifiziert.

Die Histologien wurden blind von zwei Untersuchern beurteilt, wobei insbesondere nach synovialen Nekrosen, Entzündungsreaktionen sowie Schäden an Knorpel und Knochen gesucht wurde.

## 2.9 Fluoreszenzmikroskopie

### 2.9.1 Probengewinnung

Zur Bestimmung der BPD-MA-Anreicherung in den verschiedenen Gelenkanteilen wurde ein Tier der Kontrollgruppe (Tier 28 in Tabelle 6) drei Stunden nach intravenöser BPD-MA-Gabe wie oben beschrieben geopfert und



exartikuliert. Es wurden je 20 Gewebeproben von Synovialmembran, Muskel, Gefäß und Nerv entnommen.

Die Gewebe wurden mit Einbettmedium (Jung-Reichert, Cambridge Instruments GmbH, Nußloch) auf Korkplättchen fixiert und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Mit Hilfe eines Kryostaten (FrigoCut 2800, Jung-Reichert, Cambridge Instruments GmbH, Nußloch) wurden 10 µm und 20 µm dicke Schnitte angefertigt und bis zur Aufnahme eingefroren. Alle angeführten Arbeitsschritte wurden in dunkler Umgebung durchgeführt, um ein Ausbleichen des BPD-MA zu minimieren.

Nach Entnahme der Gewebeproben für die Fluoreszenzmikroskopie wurde das Kniegelenk in Formalinlösung fixiert um anschließend Gewebeproben der übrigen Gelenkstrukturen für die histologische Untersuchung zu entnehmen.

### **2.9.2 Mikroskop**

Das verwendete Mikroskop (Aristoplan, Ernst Leitz GmbH, Wetzlar) erlaubt neben der Fluoreszenzmikroskopie auch Hellfeld-, Dunkelfeld- und Phasenkontrastmikroskopie.

Abbildung 25 illustriert schematisch den Aufbau des verwendeten Fluoreszenzmikroskops. Das Anregungslicht passiert verschiedene Filter und den Teilerspiegel, bevor es auf die Probe fällt. Das Fluoreszenzlicht passiert Kurz- und Langpassfilter, bevor es das Okular bzw. den Photoausgang trifft. An den Photoausgang ist eine Slow-Scan CCD-Kamera angeschlossen.

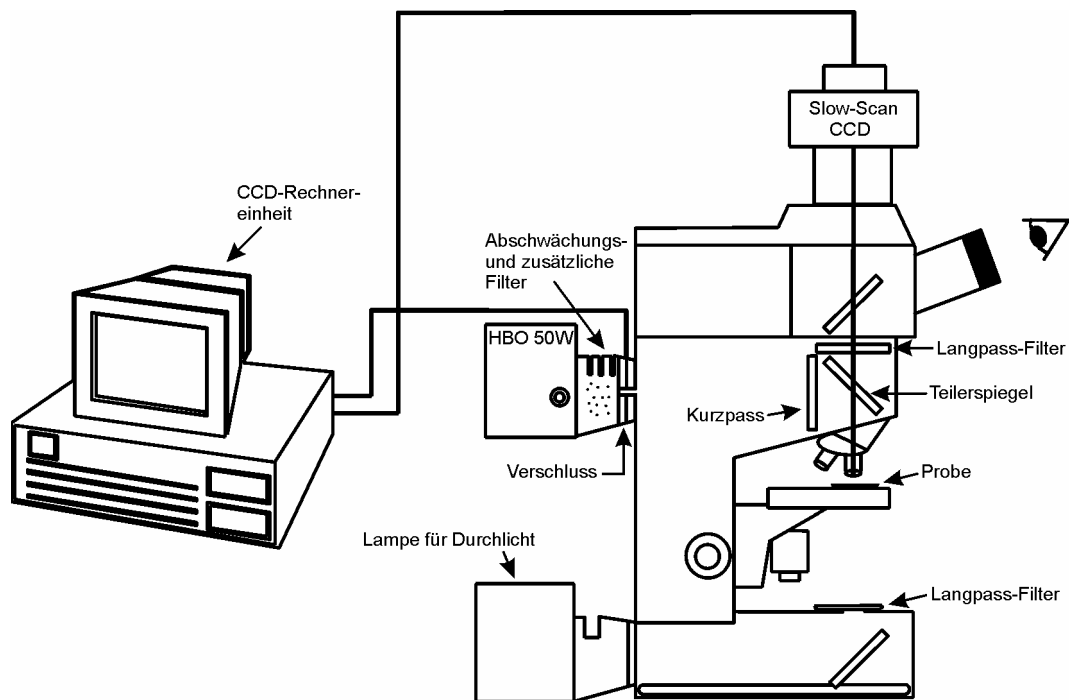


Abb. 25: Schematische Darstellung des verwendeten Fluoreszenzmikroskops (Aristoplan) mit angeschlossener Anregungslampe, CCD-Kamera und Bildverarbeitungseinheit.

### 2.9.3 Spektrograph

Zur spektralen Zerlegung des Fluoreszenzlichtes wurde ein Spektrograph (Jobin-Yvon CP140, Instruments S. A., Grasbrunn) mit einem Spektralbereich von 300 bis 1100nm benutzt.

Der Spektrograph setzt sich aus einem Tubus zur Aufnahme von Eingangsblenden, einem justierbaren Drehspiegel, einem konkaven Fokussierspiegel mit holographisch aufgebrachtem Gitter sowie einer Austrittsöffnung zusammen (vgl. Abb. 26).

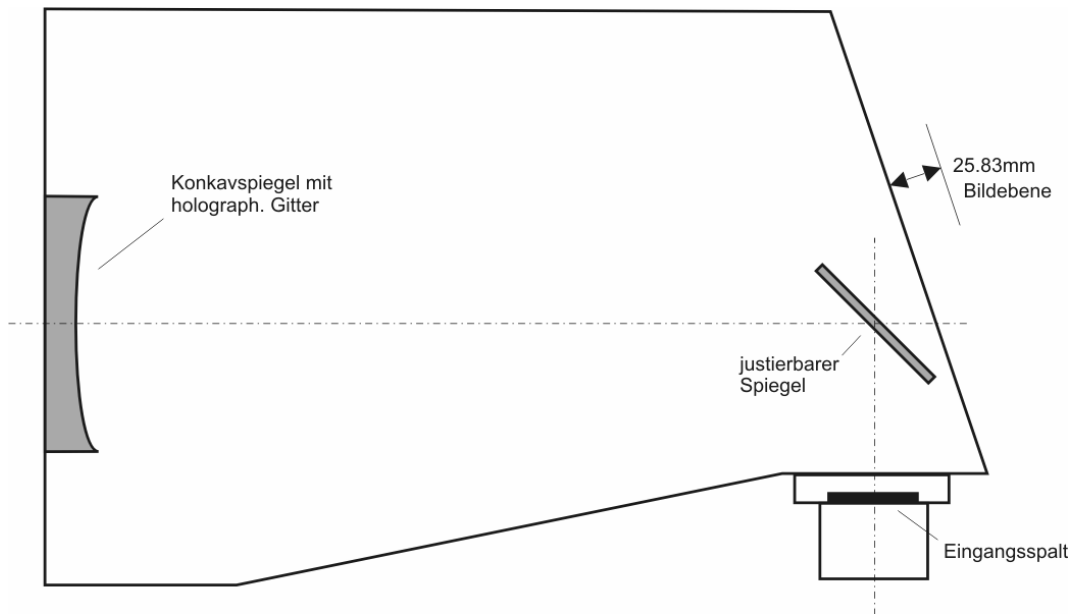


Abb. 26: Spektrograph CP-140 von Jobin-Yvon (Schemazeichnung).

Das durch den Eingangsspalt einfallende Licht wird mit Hilfe des justierbaren Spiegels zentral auf den Gitterspiegel abgebildet. Hier wird es in seine spektralen Bestandteile zerlegt und in eine Ebene in 25,83mm Entfernung von der Austrittsöffnung abgebildet. Am Ausgang des Spektrographen entsteht ein Bild, das in horizontaler Richtung die spektrale Zerlegung eines Lichtpunktes zeigt, der in einer bestimmten Höhe auf den Spalt fällt. Die Position auf dem Spalt findet sich im Bild in vertikaler Richtung wieder, so dass sich die entstehende Abbildung aus einer räumlichen und einer Wellenlängenachse zusammensetzt. Die einzelnen Spektren liegen in vertikaler Richtung „übereinandergeschichtet“, die Intensität eines Punktes auf der horizontalen Achse repräsentiert den Anteil einer bestimmten Wellenlänge.

#### 2.9.4 CCD-Kamera

Die verwendete Kamera (TE/CCD-512TK mit Controller ST138, Spectroscopy Instruments, Gilching) erreicht eine theoretische Empfindlichkeit von einem Elektron pro zwei absorbierten Lichtquanten. Das Funktionsprinzip einer CCD- (charge-coupled-device) Kamera beruht auf der Umwandlung eines Helligkeitsmusters in ein Ladungsmuster, Speicherung der Ladungsverteilung auf einer lichtempfindlichen Fläche und dem nachfolgenden Auslesen durch ein

Verschieben dieser Ladungsverteilung zu einem Ausleseverstärker (siehe Abb. 27).

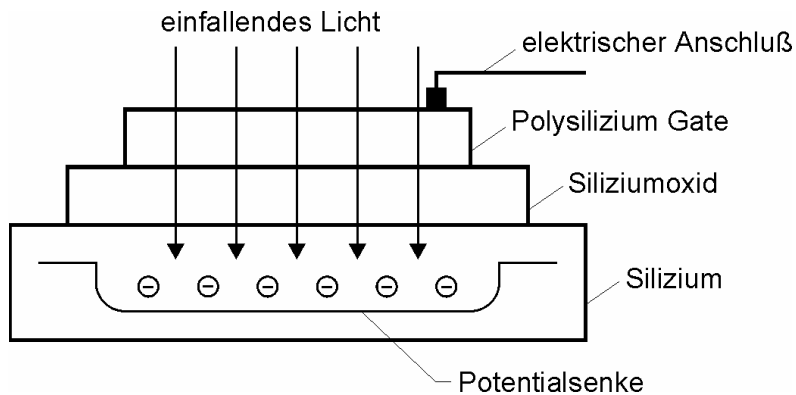


Abb. 27: Aufnahmeprinzip CCD-Kamera.

### 2.9.5 Bispektrale Aufnahmen

Die Eigenfluoreszenz der untersuchten Gewebe überlagert die charakteristische Fluoreszenzbande des BPD-MA bei 690nm und führt im Bild der Sensibilisatorverteilung zu einer deutlichen Kontrastminderung. Durch Detektion der Fluoreszenz in zwei Wellenlängenbereichen ist es möglich, diese Eigenfluoreszenz weitgehend zu subtrahieren. Hierzu wurde für jedes Präparat ein Bild mit einem Rotfilter (650nm) und eines mit einem Grünfilter ( $405\text{nm} < \lambda < 435\text{nm}$ ) aufgenommen. Das Grünbild musste nun mit einem Korrekturfaktor derart gewichtet werden, dass die Gewebefluoreszenz in beiden Wellenlängen annähernd gleich war, um schließlich vom Rotbild subtrahiert zu werden (vgl. Abb. 28).

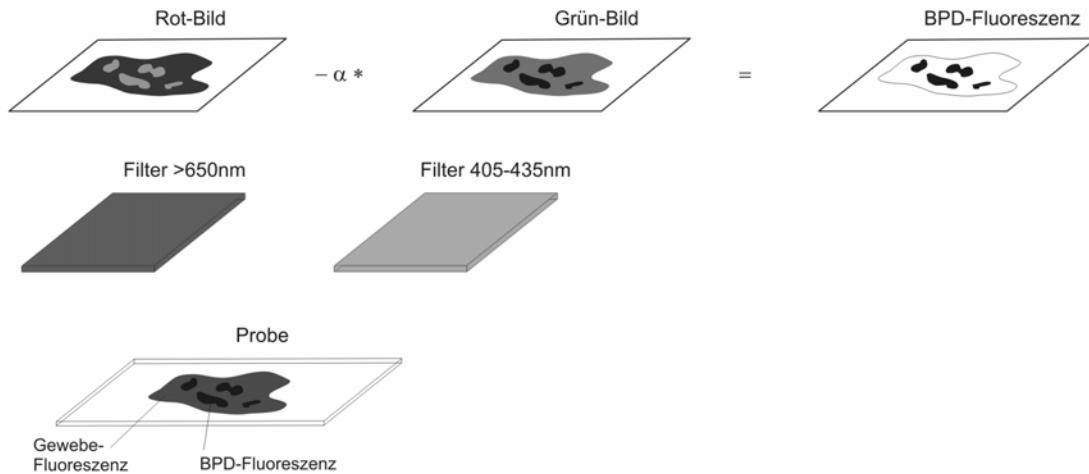


Abb. 28: Korrektur des Fluoreszenzbildes durch Subtraktion der Autofluoreszenz am Beispiel des Benzoporphyrin-Derivats.

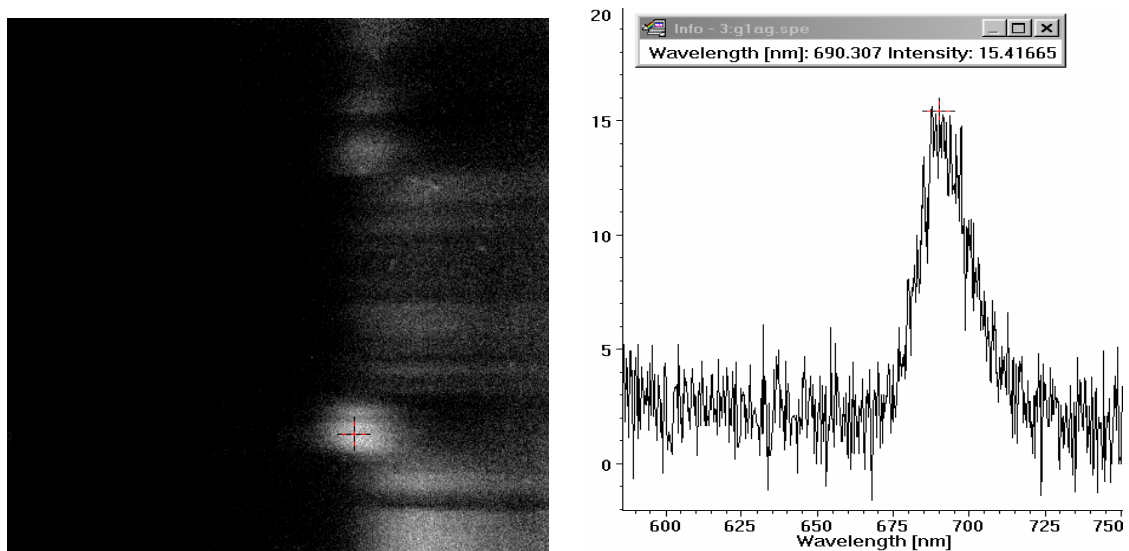
Neben den beiden Fluoreszenzaufnahmen wurde eine Durchlichtaufnahme angefertigt. Die Schnitte wurden im Anschluss an die Fluoreszenzaufnahmen mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und mit einem Diafilm (100 ASA) fotografiert. Erst mit Hilfe der HE-Schnitte ist eine genaue Zuordnung der Fluoreszenz zu einzelnen Strukturen möglich.

### 2.9.6 Messung von Emissionsspektren

Um quantitative Aussagen über die BPD-MA-Fluoreszenz zu erhalten, wurden von allen Gewebeproben orts aufgelöste Spektren in einem streifenförmigen Bereich gemessen. Für die spektrale Zerlegung des auf den Eingangsspalt abgebildeten Fluoreszenzlichtes wurde der Spektrograph zwischen den Photoausgang des Mikroskops und die CCD-Kamera montiert. Die Lage des Spaltes relativ zum aufgenommenen Bild wurde durch Testmessungen mit einer scharfen Bildkante bestimmt. Die Wellenlängenachse wurde mit Hilfe des bekannten Spektrums einer Quecksilber-Niederdrucklampe (Pen-Ray 6035, L.O.T.-Oriel, Darmstadt) kalibriert, die Korrektur der spektralen Empfindlichkeit von Spektrograph und CCD-Kamera erfolgte durch eine stabilisierte Halogen-Wolfram-Lampe (Modell 63358, L.O.T.-Oriel, Darmstadt), deren absolutes Spektrum bekannt ist.

Der Spektrographenspalt wurde nach Möglichkeit so gelegt, dass er den Bereich der größten Rotfluoreszenz erfasste. Nach Aufnahme eines

Spektralbildes (Abb. 29 links) lässt sich dieses in eine Spektrenschar umformatieren, aus der man durch Angabe der Höhe bzw. Position auf dem Spalt beliebige Spektren auswählen kann (Abb. 28 rechts).



*Abb. 29: Spektralbild (links) und Fluoreszenzspektrum (rechts) eines Gefäßschnittes. Deutlich erkennbar ist die Fluoreszenz des BPD-MA Verteporfin bei 690 nm.*

Zur Steuerung, Aufnahme und Auswertung der Bilder und Spektren wurde das Programm WinView/WinSpec in der Version 1.3 B (Spectroscopy Instruments, Gilching) verwendet.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Arthritismodell**

Drei Wochen nach der intrakutanen Immunisierung mit CFA zeigten neun Tiere eine Schwellung im Bereich der Injektionsstellen zwischen den Schulterblättern. Auf die Testung mit subkutaner IgG-Injektion reagierten alle Tiere mit einer ausgeprägten Hautreaktion. Das Ausmaß der Reaktion war unterschiedlich und reichte von einfacher Schwellung bei drei Tieren bis hin zu einem 10 mm durchmessendem subkutanen Granulom bei einem Tier.

Bereits einen Tag nach intraartikulärer Antigeninjektion zeigten sich erste klinische Symptome in Form von Schwellung, Überwärmung und Druckschmerzhaftigkeit der behandelten Gelenke. Eine Rötung der Kniegelenke wurde nicht beobachtet. Bei zwölf Tieren konnte eine Schonhaltung der behandelten Extremität registriert werden, die ebenso wie die Schwellung bis zum Operationstag persistierte. Die unbehandelte Gegenseite präsentierte sich klinisch bei allen Tieren unauffällig ohne Rötung, Schwellung oder Erguss. Sowohl bei der intraoperativen Punktion am Operationstag als auch bei der Eröffnung zur Probengewinnung wies die Mehrzahl der arthritischen Gelenke einen wasserklaren Erguss auf.

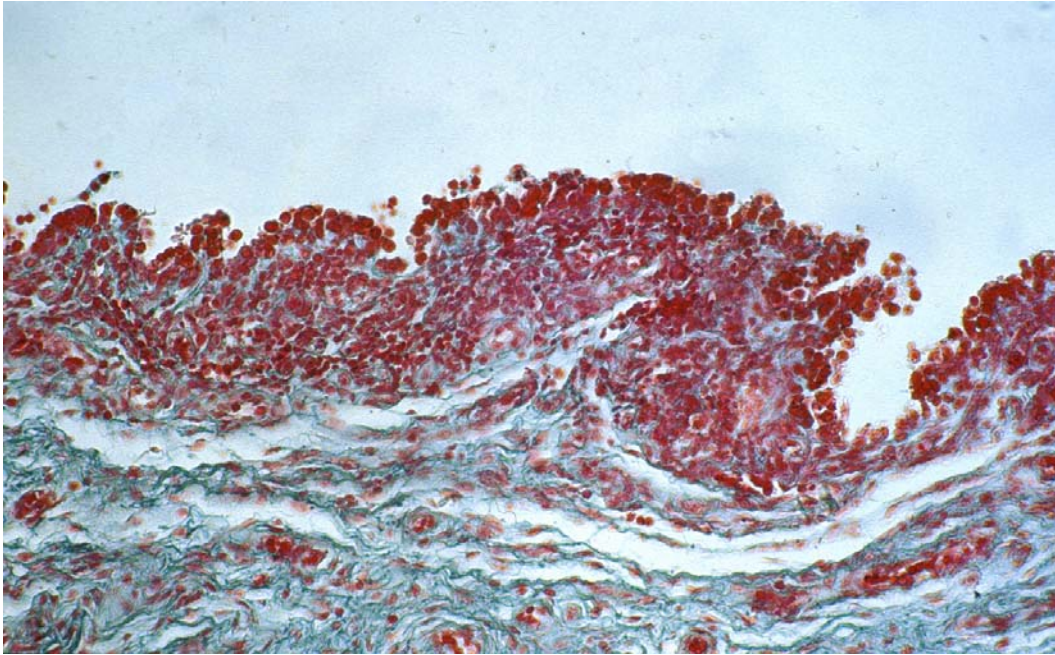
Das Ausmaß der Arthritisreaktion konnte anhand der histologischen Auswertung von Gelenksanteilen bestimmt werden, die im weiteren Verlauf nicht photodynamisch behandelt wurden. Darüber hinaus dienten die 14 Tiere, die entweder nicht bestrahlt wurden oder keinen Photosensibilisator appliziert bekamen, insofern als Kontrolle, als hier eine Beeinflussung der Arthritisreaktion nicht zu erwarten war und auch nicht beobachtet wurde. Bei Eröffnung der unbehandelten Gelenke war die Synovialis aufgrund ihres geringen Ausmaßes makroskopisch kaum erkennbar. Auch Menisken und Gelenkknorpel erschienen makroskopisch unverändert. Histologisch zeigte sich die gesunde Synovialis mit einem wenige Schichten umfassenden Deckzellular überzogen, der vereinzelte Zellinfiltrate enthielt. Das darunter liegende Bindegewebe war unauffällig und nicht vermehrt vaskularisiert.

Im Vergleich zum humanen Gelenkknorpel enthält der Gelenkknorpel von Kaninchen mehr Zellen, die allerdings ebenfalls in Lakunen angeordnet sind. Die Knorpeloberfläche der arthritisinguzierten, aber nicht photodynamisch behandelten Gelenke war intakt, die Knorpelzellen waren unauffällig.

Die makroskopische Inspektion der eröffneten Gelenke der Kontrollgruppe (Tiere 1-3 und 28-38 in Tabelle 6) zeigte eine deutlich hypertrophe und gelblich verfärbte Synovialis im Bereich des medialen und lateralen oberen Rezessus. Menisken, Knorpeloberfläche und Bandapparat stellten sich makroskopisch in Farbe, Struktur und Konsistenz unverändert dar. Ferner ergab sich kein Hinweis auf eine Entzündung oder Einblutung an den betroffenen Gelenken.

Die histologische Untersuchung zeigte eine ausgeprägte Proliferation der Synoviozyten, wobei der synoviale Deckzellayer 15-30 Zellagen aufwies. Des Weiteren war eine massive zelluläre Infiltration zu beobachten, die vorwiegend aus Lymphozyten und Plasmazellen bestand. Das Bindegewebe war in der Mehrzahl der Fälle ödematös verdickt, es fanden sich regelmäßig und zum Teil stark ausgeprägte Gefäßproliferationen. An den bradytrophen Geweben Meniskus, Knorpel und Band konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Abbildung 30 zeigt eine Mikrophotographie mit den typischen Veränderungen der Synovialmembran bei AIA.





*Abb. 30: Mikrophotographie der Synovialis bei IgG-induzierter Arthritis (Azan, Vergr. 100:1). Neben der Verbreiterung des Deckzellayers zeigt sich eine Hypervaskularisation und ein dichtes lymphoplasmatisches Infiltrat.*

### **3.2 Intraoperative Fluoreszenzspektroskopie**

Die präoperativen fluoreszenzspektroskopischen Messungen zeigten einen für BPD-MA charakteristischen Fluoreszenzpeak bei 690 nm. Die Autofluoreszenz des Gewebes in diesem Wellenlängenbereich konnte vernachlässigt werden, sie war vor allem im Bereich zwischen 530 und 600 nm zu beobachten. Im Verlauf der Bestrahlung verminderten sich die Fluoreszenzsignale mit steigender Gesamtdosis kontinuierlich, so dass am Ende der Bestrahlungszeit bei 490 J praktisch keine Fluoreszenz mehr nachweisbar war (vgl. Abb. 31).

Die Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 180 J führte ebenfalls zu einer sukzessiven Reduktion der Fluoreszenz, allerdings in geringerem Ausmaß mit niedrigem Fluoreszenzgipfel am Bestrahlungsende. Während sowie nach der Bestrahlung wurde keine zusätzliche Fluoreszenz im Bereich zwischen 530 und 600 nm detektiert.

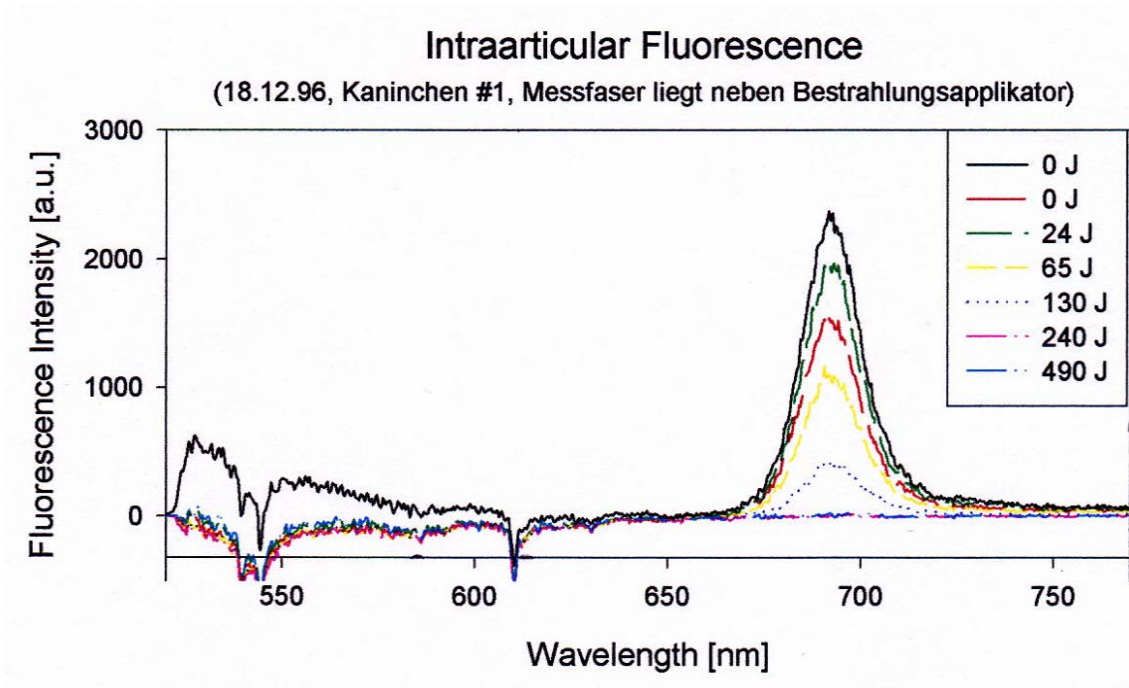


Abb. 31: Intraartikuläre Fluoreszenzspektren von bestrahltem Synovialgewebe, aufgenommen vor, während und nach der photodynamischen Behandlung.

Durch Ausrichtung der Messfaser auf verschiedene Gelenkstrukturen wurden Spektren von Synovialmembran, Fettgewebe und Knorpel abgeleitet. Während die Fluoreszenz an allen Geweben mit steigender Lichtdosis abnahm, waren deutliche Unterschiede der Intensitätsmaxima am Bestrahlungsbeginn zwischen Synovialis und Knorpel- bzw. Fettgewebe bei 690 nm zu beobachten (siehe Abb. 32).

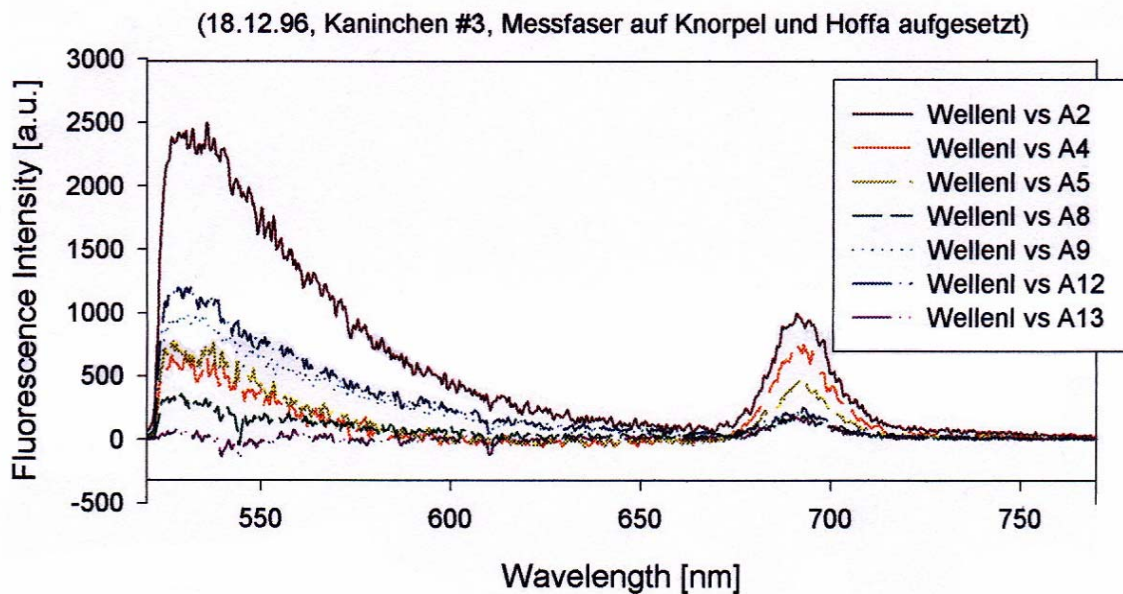


Abb. 32: Intraartikuläre Fluoreszenzspektren von bestrahltem Knorpel und Fettgewebe, aufgenommen vor, während und nach der photodynamischen Behandlung.

### 3.3 Klinik

Nach Entfernung des Verbandes am siebten postoperativen Tag zeigte sich bei 15 der 34 operierten Tiere keine oder nur minimale Schwellung des behandelten Kniegelenkes. Bei den übrigen 19 Tieren wurde eine mäßige Gelenkschwellung beobachtet, wobei das Ausmaß der Schwellung weder mit dem Operationsverfahren noch mit der Bestrahlungsdosis oder der Hautreaktion korrelierte. Bei den drei nicht bestrahlten Tieren (1,2 und 3 in Tabelle 6) fand sich eine vergleichbare, mäßig ausgeprägte Schwellung. Die Gelenke aller Tiere waren zu diesem Zeitpunkt weder gerötet noch druckschmerzhaft. In der klinischen Untersuchung wurden keine Bewegungseinschränkungen oder Instabilitäten beobachtet. Sämtliche Tiere belasteten die operierten Hinterläufe voll und wiesen einen normalen Allgemeinzustand auf. Im Gegensatz zu den photodynamisch behandelten Tieren persistierten in der nicht operierten Kontrollgruppe die ausgeprägte Schwellung und die Druckschmerzhaftigkeit des Kniegelenkes über den gesamten Versuchszeitraum ohne wesentliche Befundänderung.

### 3.4 Makroskopie

Bei der Präparation der behandelten Kniegelenke war die austretende Synovialflüssigkeit bräunlich verfärbt. Die makroskopische Untersuchung der Gelenke zeigte in einigen Fällen eine bräunlich-rötliche Verfärbung der Synovialis. An den übrigen Strukturen wie Knorpel, Menisken oder Bandstrukturen waren keine morphologischen Veränderungen zu erkennen (siehe Abb. 33).



*Abb. 33: Photographie eines Kaninchenkniegelenkes nach PDT mit BPD-MA. Während die Synovialis rötlich-braun verfärbt ist, erscheinen Knorpel, Menisken und Ligamente makroskopisch unverändert.*

### 3.5 Histologie

Die intravenöse BPD-MA-Applikation ohne nachfolgende Bestrahlung führte im Beobachtungszeitraum zu keiner makroskopisch oder mikroskopisch

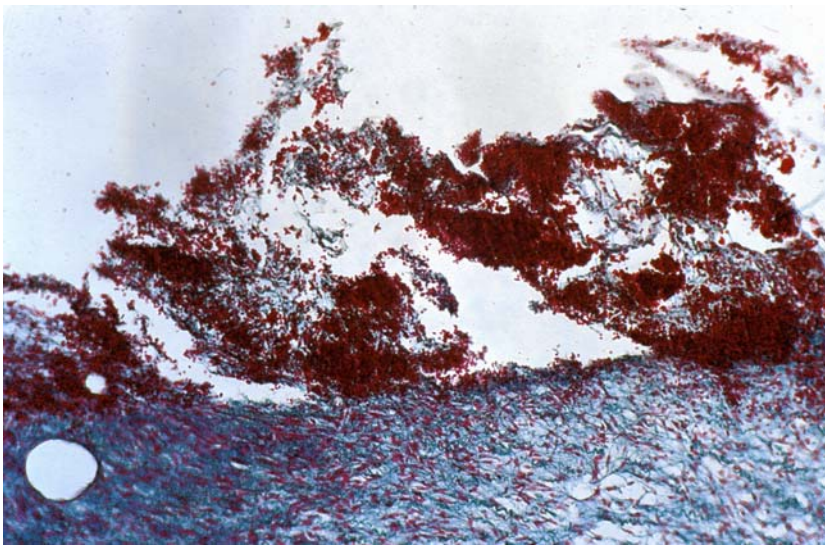
erkennbaren Veränderung der Gelenkstrukturen im Vergleich zur Gruppe der ohne vorherige BPD-MA-Injektion bestrahlten Tiere. Auch die alleinige Bestrahlung in Abwesenheit von Sensibilisatorsubstanz hatte keinen Einfluss auf die Gelenkmorphologie.

Im Gegensatz dazu zeigten sich bei der photodynamischen Therapie mit einer Gesamtdosis von 470 J bzw. 2x470 J bei sechs von neun behandelten Tieren deutliche Effekte. Diese Effekte waren ausschließlich in bestrahlten Regionen anzutreffen und äußerten sich als teilweise oder vollständige Ablösung der Synovialis vom darunter liegenden Gewebe mit ausgeprägter synovialer Nekrose, die bis an das benachbarte Gelenkkapsel- und Muskelgewebe reichte. Die derart veränderten Areale waren durch Verlust der Zellstruktur, pyknotische Zellkernveränderungen sowie amorphe eosinophile Zelltrümmer charakterisiert. In einem Fall zeigte sich eine bis in die Muskulatur reichende und diese miteinbeziehende Nekrose. Bei den drei übrigen Tieren wurden ebenfalls Nekrosen und Ablösung des synovialen Deckzellayers beobachtet, das Ausmaß dieser Veränderungen war jedoch deutlich geringer als in den zuvor genannten Fällen.

Die photodynamische Therapie mit der niedrigeren Gesamtdosis von 180 J führte bei 9 von 15 Tieren ebenfalls zu einer Nekrose der Synovialis. Im Gegensatz zur Behandlung mit der höheren Dosis (470 J) war der hierbei beobachtete synoviale Zellschaden jedoch qualitativ wie auch quantitativ weit geringer ausgeprägt. Bei den restlichen sechs Tieren aus dieser Gruppe führte die photodynamische Therapie im Vergleich mit den Kontrolltieren nicht zu signifikanten Veränderungen. Ebenfalls kein signifikanter Unterschied ergab sich für den Vergleich der Bestrahlung am eröffneten Kniegelenk mit der intraartikulären Lichtapplikation.



Bei keinem der oben genannten Behandlungsregime fanden sich makroskopische oder histopathologische Veränderungen an den bradytrophen Gelenkstrukturen wie Knorpel, Meniskus, Sehne oder Band. Gelenkbereiche, welche nicht bestrahlt wurden, wie z.B. der kontralaterale Rezessus, stellten sich ebenfalls unverändert dar. Die folgenden Abbildungen zeigen Mikrophotographien der verschiedenen Gelenkstrukturen nach photodynamischer Therapie mit BPD-MA.



*Abb. 34: Mikrophotographie einer Synovialmembran aus dem oberen Rezessus (Azan, Vergr. 100:1) nach photodynamischer Therapie mit BPD-MA und einer Lichtdosis von 470J. Bei sechs von neun Tieren wurde eine selektive Nekrose der Synovialis beobachtet, die bis an die darunter liegende Muskulatur reichte.*

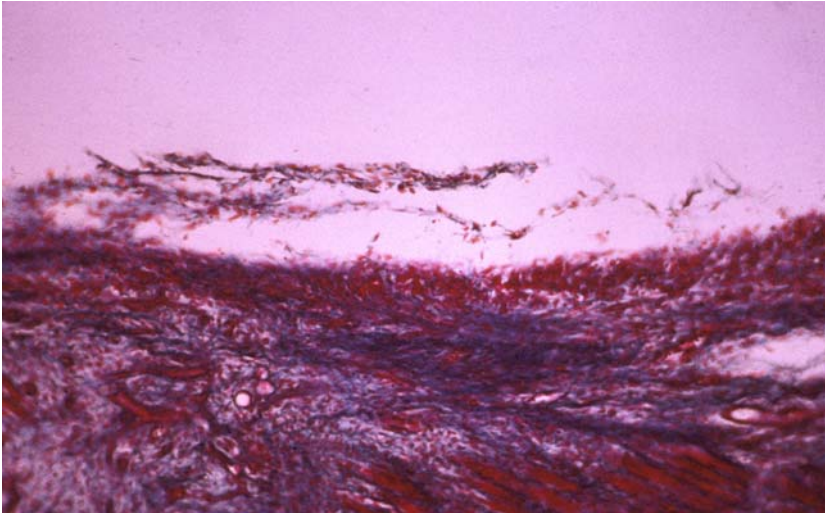


Abb. 35: Mikrophotographie einer Synovialmembran aus dem oberen Rezessus (Azan, Vergr. 200:1) nach photodynamischer Therapie mit BPD-MA und einer Lichtdosis von 180J. Im Vergleich mit Abb. 34 fällt eine geringere Ausprägung der Qualität als auch des Ausmaßes der Nekrose auf. Vergleichbare Befunde wurden bei 9 von 15 Tieren erhoben.

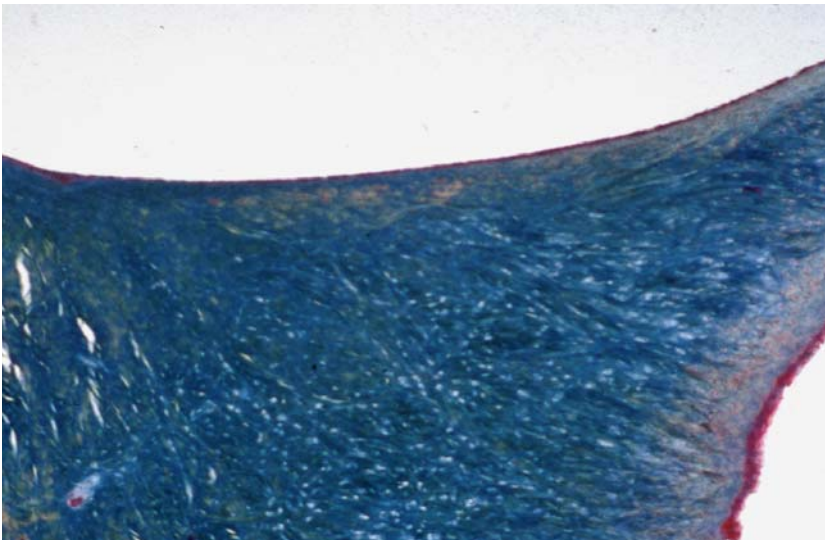
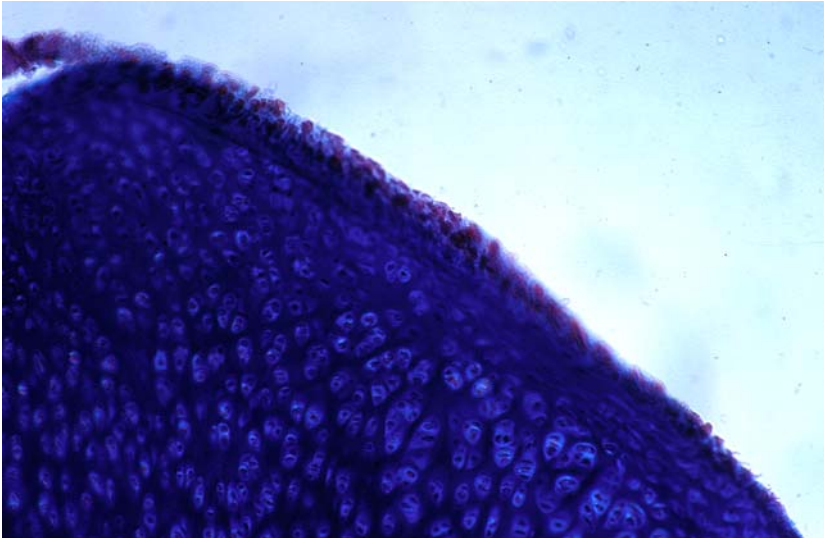
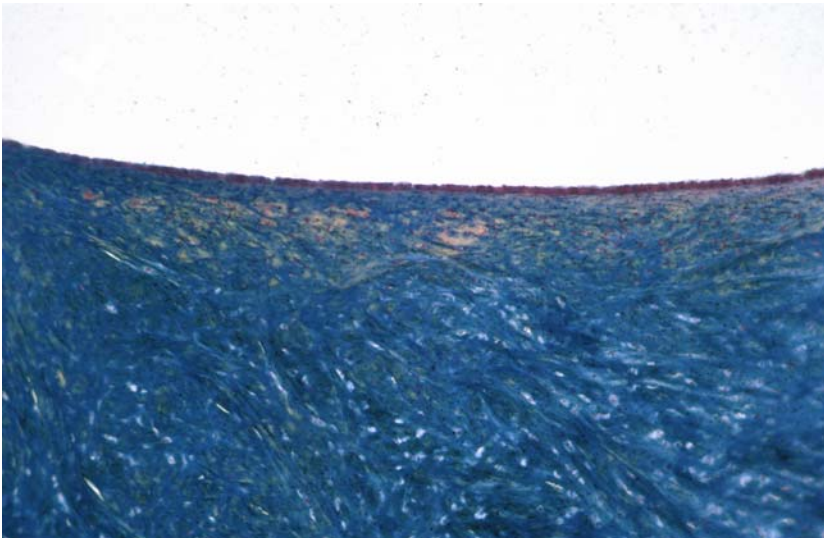


Abb. 36: Mikrophotographie eines Meniskuspräparates (Azan, Vergr. 100:1) nach photodynamischer Therapie mit BPD-MA und einer Lichtdosis von 2x470J. Abgesehen von einer leichten Desquamation des synovialen Überzugs im Bereich der Meniskusbasis zeigen sich keine histologischen Veränderungen.



*Abb. 37: Mikrophotographie von Patellaknorpel (Azan, Vergr. 200:1) nach photodynamischer Therapie mit BPD-MA und einer Lichtdosis von 470J. Im Vergleich zu den unbehandelten Gelenken der Kontrolltiere fanden sich keinerlei Veränderungen.*



*Abb. 38: Mikrophotographie eines Quadrizepssehnenpräparates (Azan, Vergr. 100:1) nach photodynamischer Therapie mit BPD-MA und einer Lichtdosis von 470J. Auch hier zeigt sich ein unauffälliger histologischer Befund.*



Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der histologischen Effekte nach photodynamischer Therapie in Abhängigkeit von Bestrahlungsart, Lichtdosis, Sensibilisatorapplikation und Hautreaktion nach subkutaner HAAG-Injektion.

BPD-MA-Applikation										
Tier	Haut-reaktion	Dosis	OP	ob. med. Rezess.	Muskel	Sehne	Meniskus	Knorpel	Band	Fett
1	+	0 J	P	0	0	0	0	0	0	0
2	++	0 J	P	0	0	0	0	0	0	0
3	++	0 J	P	0	0	0	0	0	0	0
4	++	180 J	P	0	0	0	0	0	0	0
5	+++	180 J	P	0	0	0	0	0	0	0
6	++	180 J	P	+	0	0	0	0	0	0
7	++	180 J	P	+	0	0	0	0	0	0
8	++	180 J	P	0	0	0	0	0	0	0
9	++	180 J	P	+	0	0	0	0	0	0
10	++	180 J	P	+	0	0	0	0	0	0
11	++	180 J	P	+	0	0	0	0	0	0
12	++	180 J	P	+	0	0	0	0	0	0
13	++	180 J	P	0	0	0	0	0	0	0
14	+++	180 J	P	+	0	0	0	0	0	0
15	++	180 J	MA	0	0	0	0	0	0	0
16	+++	180 J	MA	+	0	0	0	0	0	0
17	++	180 J	MA	+	0	0	0	0	0	0
18	++	180 J	MA	0	0	0	0	0	0	0
19	+	470 J	P	++	0	0	0	0	0	0
20	++	470 J	P	++	+	0	0	0	0	0
21	++	470 J	P	+	0	0	0	0	0	0
22	++	470 J	MA	+	0	0	0	0	0	0
23	+++	2x470 J	P	++	++	0	0	0	0	0
24	+	2x470 J	P	+	0	0	0	0	0	0
25	++	2x470 J	P	++	0	0	0	0	0	0
26	++	2x470 J	P	++	0	0	0	0	0	0
27	++	2x470 J	MA	++	+	0	0	0	0	0

BPD-MA-Applikation, Fluoreszenzmikroskopie										
Tier	Haut-reaktion	Dosis	OP	ob. med. Rezess.	Muskel	Sehne	Meniskus	Knorpel	Band	Fett
28	+++	0 J	P	0	0	0	0	0	0	0

Keine BPD-MA-Applikation										
Tier	Haut-reaktion	Dosis	OP	ob. med. Rezess.	Muskel	Sehne	Meniskus	Knorpel	Band	Fett
29	++	470 J	P	0	0	0	0	0	0	0
30	++	470 J	P	0	0	0	0	0	0	0
31	++	470 J	P	0	0	0	0	0	0	0
32	+++	470 J	P	0	0	0	0	0	0	0
33	+++	470 J	P	0	0	0	0	0	0	0
34	++	470 J	P	0	0	0	0	0	0	0
35	++	470 J	MA	0	0	0	0	0	0	0
36	+++	470 J	MA	0	0	0	0	0	0	0
37	++	470 J	MA	0	0	0	0	0	0	0
38	++	470 J	MA	0	0	0	0	0	0	0

*Tabelle 6: Zusammenstellung der Ergebnisse. Die Hautreaktion wurden von „0“ (keine Reaktion) über „+“ (leichte Schwellung) und „++“ (starke Schwellung) bis „+++“ (subkutanes Granulom) bewertet. Die histologischen Veränderungen der einzelnen Gewebe wurden von „0“ (keine erkennbare Reaktion) über „+“ (erkennbare Veränderung, oberflächliche Nekrose) bis „++“ (tiefe /vollständige Nekrose) beurteilt. Abkürzungen: P = Punktion, MA = Mini-Arthrotomie, ob. med. Rezess. = oberer medialer Rezessus.*

### 3.6 Fluoreszenzmikroskopie

Zur quantitativen Bestimmung und Lokalisation der BPD-MA-Fluoreszenz wurden Emissionsspektren verschiedener Gewebe nach Sensibilisatorapplikation aufgezeichnet. Es wurden Fluoreszenzbilder in zwei Spektralbereichen, ein Durchlichtbild, ein Spektralbild sowie ein Bild nach HE-Färbung aufgenommen. Das Subtraktionsbild entsteht durch Verrechnung der bispektralen Aufnahmen.

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der BPD-MA-Anreicherung in den untersuchten Geweben dargestellt und repräsentativ mit Bildmaterial dokumentiert.

### 3.6.1 Synovialis

In den Abbildungen 39.1-39.5 sind 20 µm dicke Schnitte der Synovialmembran dargestellt. Es handelt sich um ein Durchlichtbild (Abb. 39.1), eine Diaphotografie desselben Schnittes nach HE-Färbung (Abb. 39.2), Rot- und Grünaufnahme (Abb. 39.3 und 39.4) sowie das aus den beiden letztgenannten Bildern errechnete Subtraktionsbild (Abb. 39.5). Die spektrale Zerlegung des auf den im Subtraktionsbild markierten Spalt fallenden Lichtes ergibt das Spektralbild (Abb. 39.6). Ein einzelnes Spektrum lässt sich mit Hilfe der Software durch Cursorpositionierung auf einer beliebigen Spalthöhe darstellen (Abb. 39.7).

Die Abbildungen zeigen einen Ausschnitt der Synovialmembran mit darunter liegendem Muskel- und Bindegewebe. Das Subtraktionsbild lässt eine deutlich erhöhte Fluoreszenz im Bereich der Synovialmembran wie auch der subsynovialen Muskulatur erkennen. Die Synovialmembran stellt sich in der betrachteten Region sehr schmal dar, so dass eine Abgrenzung von der Muskulatur schwierig ist. In der Mitte des Spaltes kommt Fluoreszenz von BPD-MA-angereichertem Synovialgewebe zur Darstellung, weiter oben und weiter unten ist die von BPD-MA-haltigem Muskelgewebe ausgehende Fluoreszenz erkennbar. Entsprechend weist das Spektralbild bei 690 nm in Projektion auf die Synovialis sowie die subsynoviale Muskulatur helle Areale auf, die sich im einzelnen Spektrum als Fluoreszenzpeak äußern. In der Fotografie des HE-gefärbten Schnittes lassen sich Synovialmembran und Muskulatur gut differenzieren: Im Gegensatz zur Synovialmembran erscheinen die Muskelfasern dunkler und geometrisch strukturiert.

Bereiche sehr großer Fluoreszenzintensität im Subtraktionsbild sind durch übereinandergeschichtete Muskelfasern bedingt, da sich hierbei die von den Zellen ausgehende Fluoreszenz addiert. In den HE-gefärbten Schnitten sind diese Regionen als dunkel erscheinende Areale gut zu erkennen.

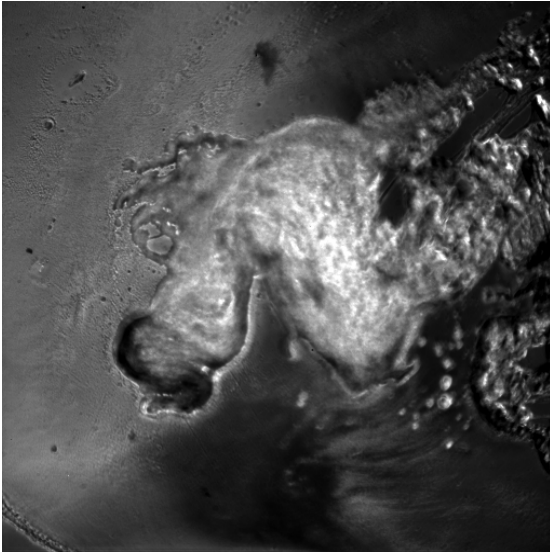


Abb. 39.1: Synovialmembran, Durchlichtbild.

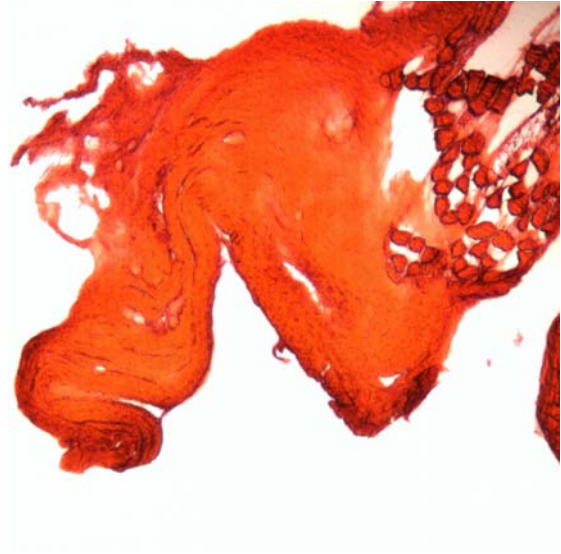


Abb. 39.2: Synovialmembran, HE (Dia).

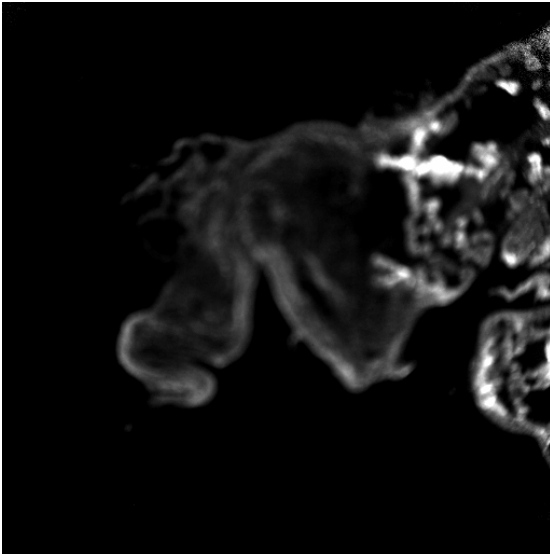


Abb. 39.3: Synovialmembran, Rot-Bild.

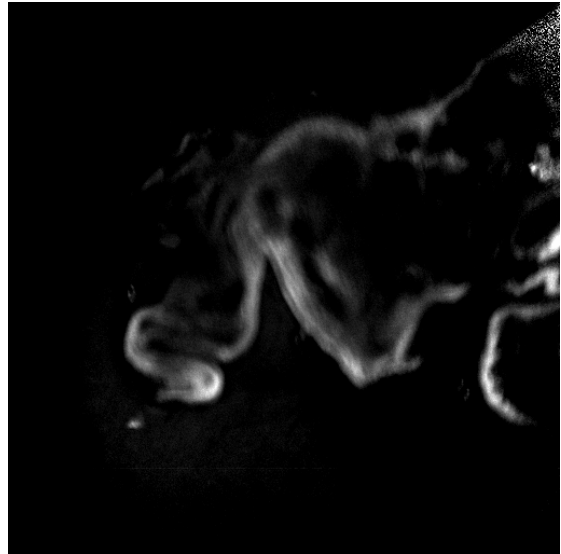


Abb. 39.4: Synovialmembran, Grün-Bild.

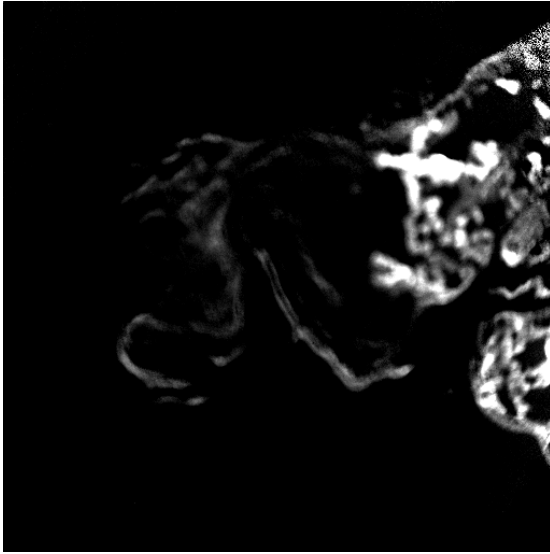


Abb. 39.5: Synovialmembran, Differenzbild.

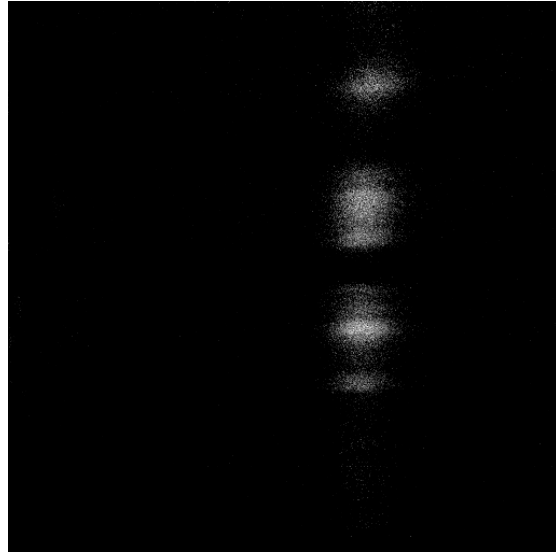


Abb. 39.6: Synovialmembran, Spektralbild.

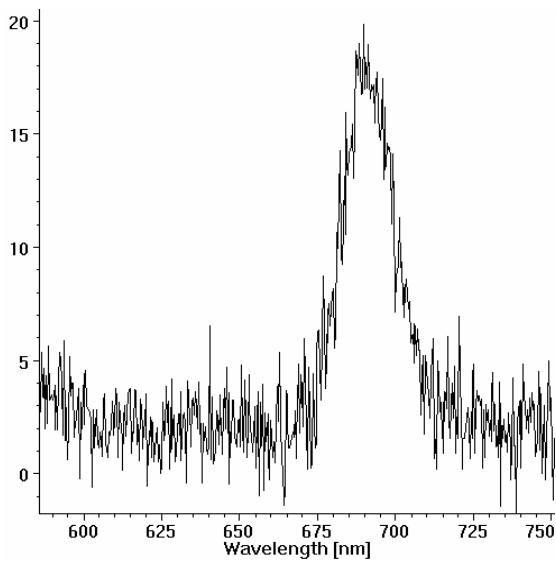


Abb.39.7: Synovialmembran, Spektrum.

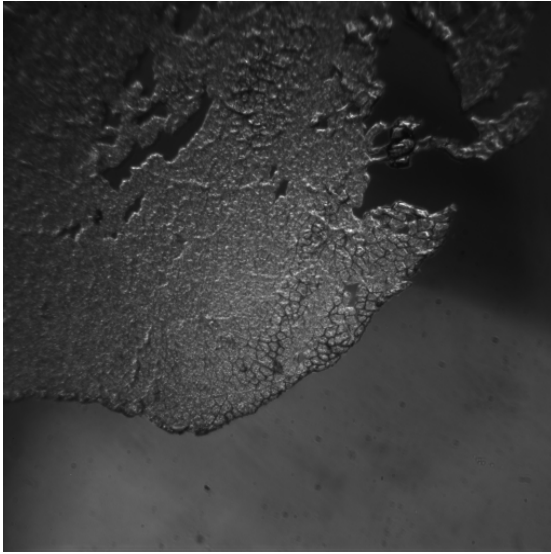
### 3.6.2 Muskulatur

In den Abbildungen 40.1 bis 40.5 sind 20  $\mu\text{m}$  starke Schnitte eines Muskelpräparates dargestellt. Die Abfolge der verschiedenen Aufnahmen entspricht der des oben beschriebenen Synovialpräparates. Die (semiquantitative) Messung der Fluoreszenz des Muskelgewebes ergab im Durchschnitt die größten Signale.

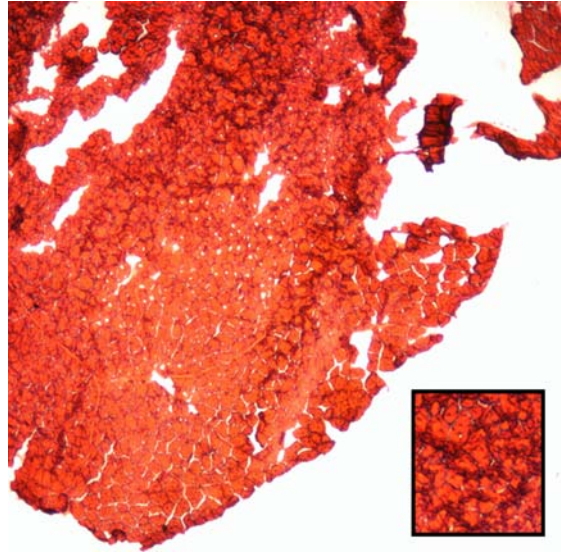
Auffallend ist die strukturierte Verteilung der Fluoreszenz im Epi- und Perimysium der Muskelfasern. Im Spektralbild äußert sich dieses Anreicherungsverhalten in periodisch wechselnden Fluoreszenzintensitäten in vertikaler Richtung im Bereich der BPD-MA-Fluoreszenz (690 nm). In den HE-gefärbten Schnitten ist eine Verlagerung des Zytosols an die Zellwand erkennbar (siehe Insert Abb. 40.2). Diese Artefakte sind Folge der Schockgefrierung der Muskelproben und bedingen das oben genannte Verteilungsmuster, da sich mit dem Zytosol auch der darin lokalisierte Sensibilisator an die Zellwände anlagert.

Der helle Fleck in der oberen Hälfte des Spektralbildes ist ebenfalls als Artefakt anzusehen und resultiert aus übereinandergeschichteten Muskelfasern. An diesen Stellen addiert sich die Fluoreszenz der einzelnen Zellen und führt zu falsch hohen Signalen. Eine ähnliche Ursache hat auch die erhöhte Fluoreszenz im Randbereich des Präparates, wo es durch Umschlagen oder Aufrollung des Schnittes ebenfalls zu einer Vervielfachung der Signale kommt. Mit Hilfe der Durchlicht- und HE-gefärbten Bilder lassen sich solche Stellen leicht identifizieren und bei der Auswertung entsprechend berücksichtigen.

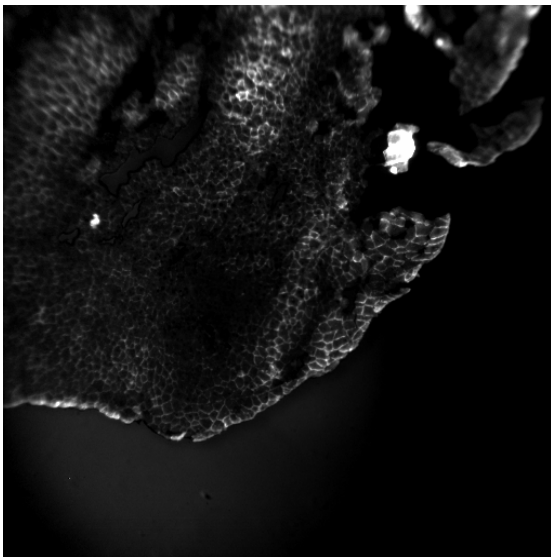
Abwechselnde Zonen intensiverer und schwächerer Fluoreszenz im Subtraktionsbild lassen sich auf Bereiche verdichteter und auseinandergezogener Zellverbände zurückführen. Auch dies lässt sich bei Betrachtung des HE-Schnittes leicht nachvollziehen.



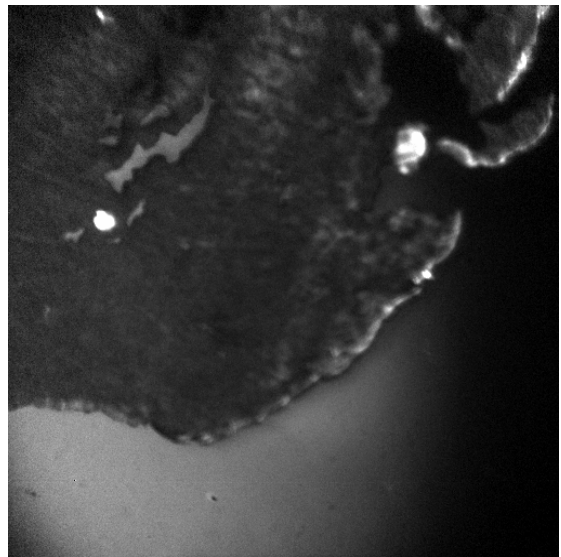
*Abb. 40.1: Muskel, Duchlichtbild.*



*Abb. 40.2: Muskel, HE (Dia).*



*Abb. 40.3: Muskel, Rot-Bild.*



*Abb. 40.4: Muskel, Grün-Bild.*



Abb. 40.5: Muskel, Differenzbild.



Abb. 40.6: Muskel, Spektralbild.

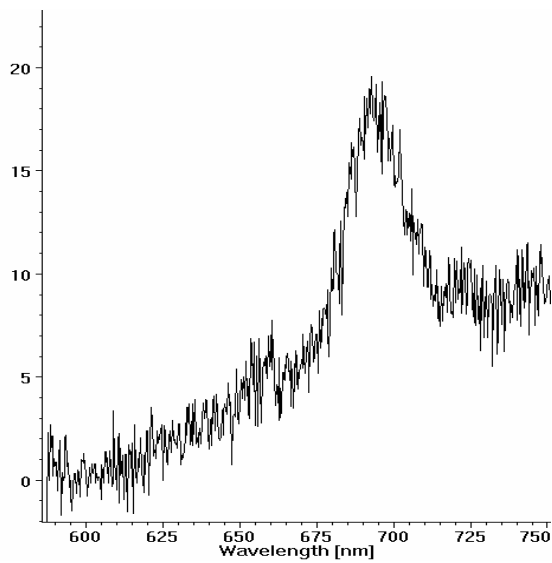


Abb. 40.7: Muskel, Spektrum.

### 3.6.3 Gefäß

Die Abbildungen 41.1 bis 41.5 zeigen eine quer angeschnittene Arterie. Die Schnittstärke beträgt ebenfalls  $20\ \mu\text{m}$ , die Reihenfolge der Abbildungen entspricht Kap. 3.4.1.



Verglichen mit dem umgebenden Muskel- und Bindegewebe zeigen die Gefäßwände keine vermehrte Fluoreszenz, eine ausgeprägte BPD-MA-Anreicherung hat somit nicht stattgefunden.

Das Grünbild weist im Bereich kürzerer Wellenlängen eine vermehrte Fluoreszenz im Bereich der Intima und Adventitia auf. Diese Fluoreszenz entspricht der Autofluoreszenz des Gewebes im sichtbaren Wellenlängenbereich und hat seine Ursache im sogenannten „cross-linking“ von Aminosäuren der Kollagen- bzw. Elastinfasern. Unter „cross-linking“ versteht man die Kreuzvernetzung von Molekularketten zu einem dreidimensionalen Netzwerk.

Das Spektralbild weist auf eine geringfügig erhöhte BPD-MA-Konzentration im Bereich der Intima hin. Der entsprechende Leuchtfleck (Fadenkreuz in Abb. 39.6) liegt bei 690 nm auf der Wellenlängen- (x-) Achse. Im Subtraktionsbild sind die korrelierenden hellen Punkte entlang des Endothels zu erkennen.

Das im Spektralbild breite, nach rechts verschobene Fluoreszenzband liegt oberhalb der Wellenlänge von 700 nm und rührt somit nicht von einer BPD-MA-Anreicherung her. Es ist vor allem an Stellen zu beobachten, an denen sich kein Gewebe befindet, insbesondere intravasal. Dem gesamten Signal überlagert ist ein Hintergrund, der von kürzeren Wellenlängen zu längeren hin zunimmt. Dieser Hintergrund lässt das ohnehin nur schwach BPD-MA-angereicherte Gewebe kaum hell hervortreten. Mit Hilfe der spektralen Analyse und dem hier zu beobachtendem Fluoreszenzpeak bei 690 nm lässt sich eine BPD-MA-Fluoreszenz jedoch sicher nachweisen.

Anhand der Fotografie des HE-gefärbten Schnittes kann der Wandaufbau des Gefäßes gut nachvollzogen werden. Die auch in diesen Aufnahmen, insbesondere im Grün-Bild, erkennbaren Bereiche sehr starker Fluoreszenz sind wiederum als Artefakte zu werten, verursacht am ehesten durch Schmutz auf dem Objektträger.

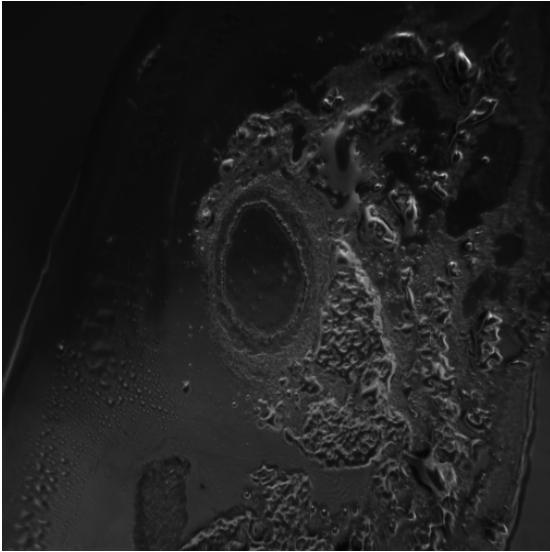


Abb. 41.1: Gefäß. Durchsichtbild.

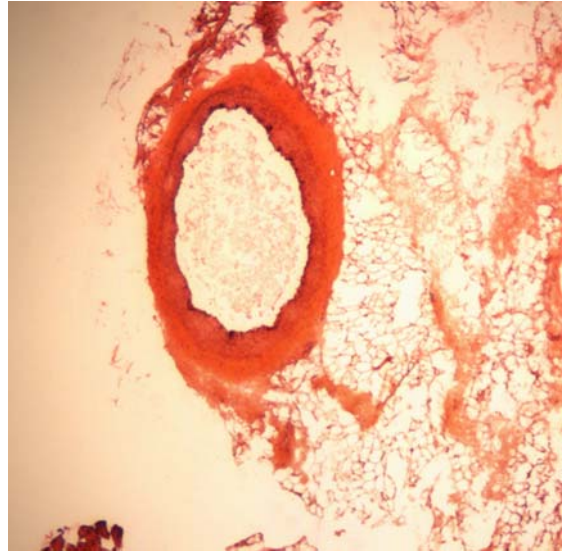


Abb. 41.2: Gefäß, HE (Dia).

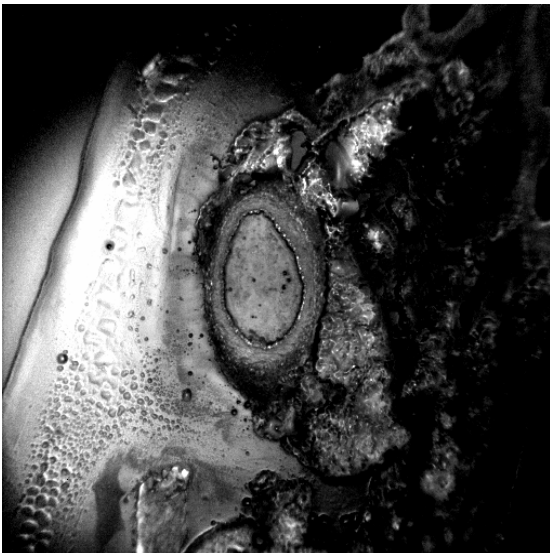


Abb. 41.3: Gefäß, Rot-Bild.

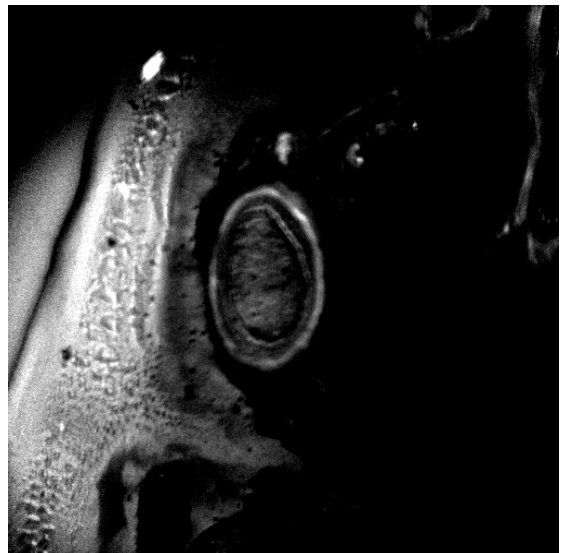


Abb. 41.4: Gefäß, Grün-Bild.

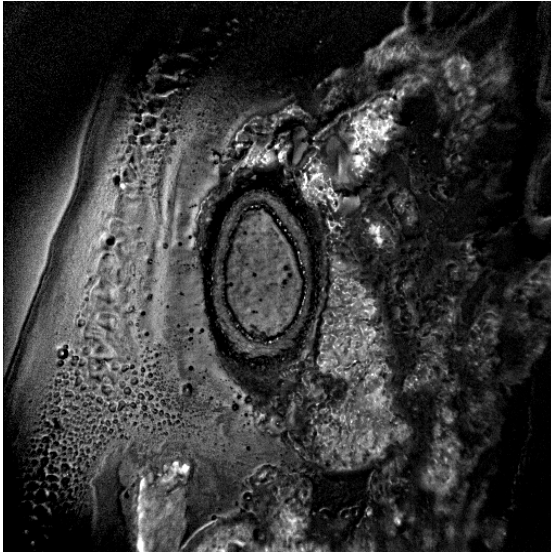


Abb. 41.5: Gefäß, Differenzbild.

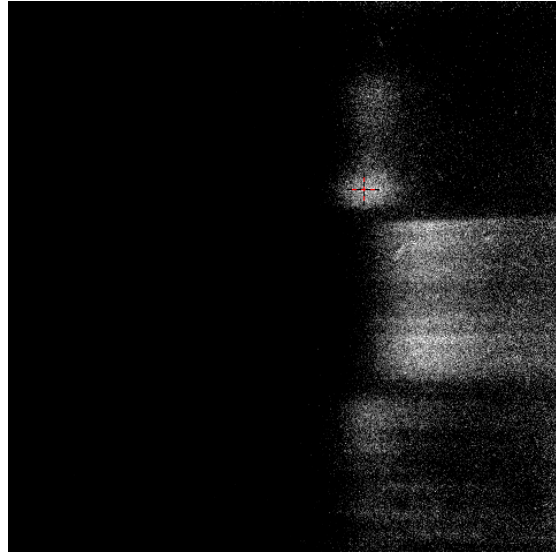


Abb. 41.6: Gefäß, Spektralbild.

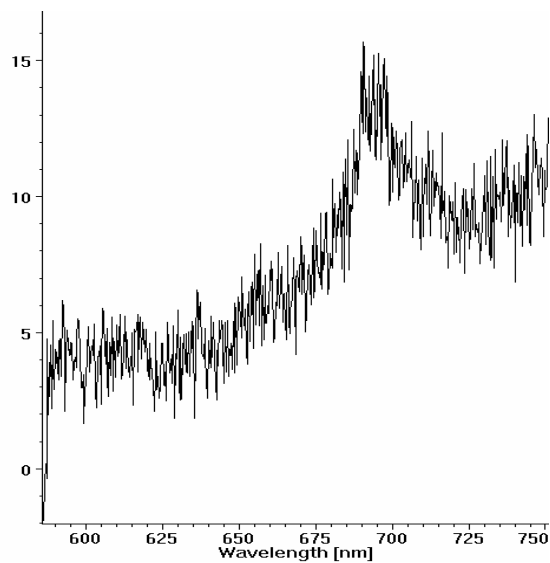


Abb. 41.7: Gefäß, Spektrum.

### 3.6.4 Haut

Auf den Abbildungen 42.1 bis 42.5 ist ein Hautpräparat mit Epidermis, Dermis, Subkutangewebe, Drüsen und Haarfollikeln zu sehen. Die Fluoreszenzmikroskopien zeigen eine vermehrte BPD-MA-Anreicherung im Bereich der Haarbälge und insbesondere im Bereich der Drüsen. Im

Subkutangewebe wie auch in der Epidermis wurde hingegen keine Fluoreszenz beobachtet.

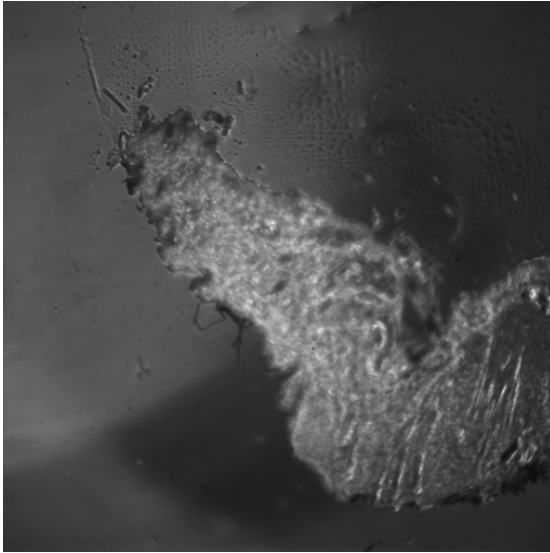


Abb. 42.1: Haut, Durchsichtbild.



Abb. 42.2: Haut, HE (Dia).

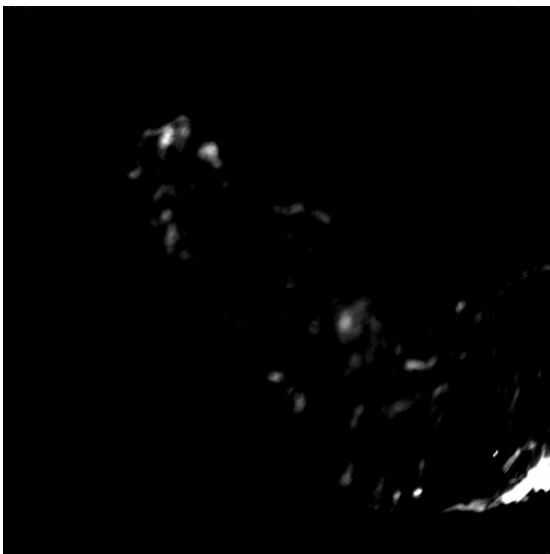


Abb. 42.3: Haut, Rot-Bild.

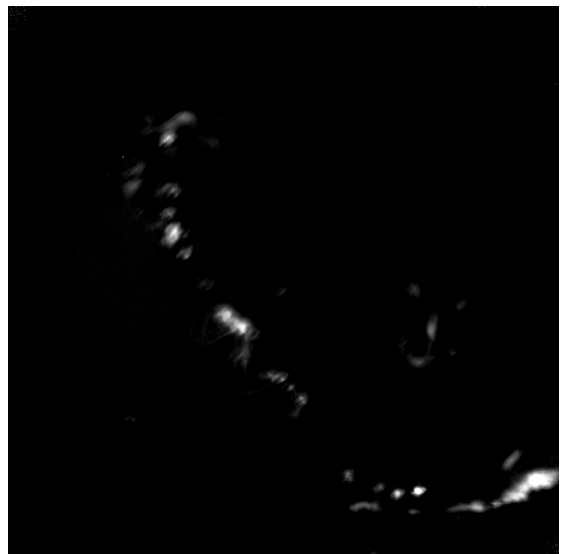


Abb. 42.4: Haut, Grün-Bild.



Abb. 42.5: Haut, Differenzbild.

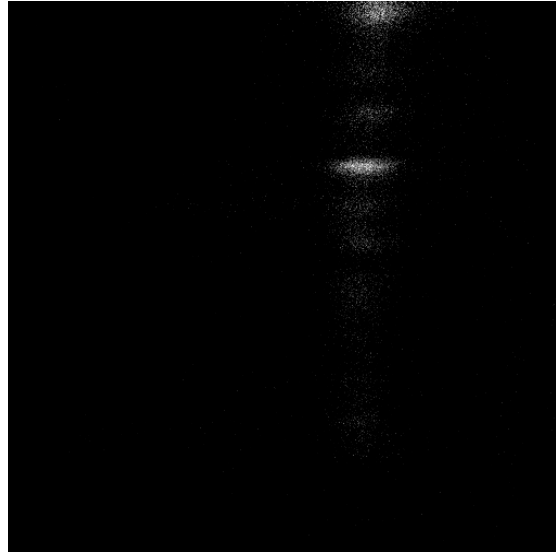


Abb. 42.6: Haut, Spektralbild.

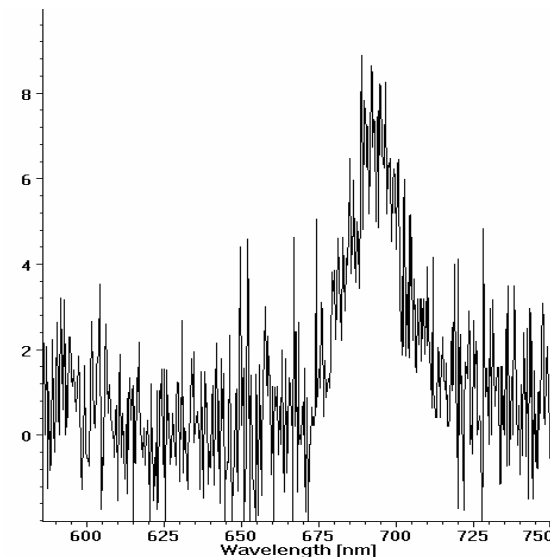


Abb. 42.7: Haut, Spektrum.

### 3.6.5 Sehne

Im Sehnengewebe war keine Sensibilisatoranreicherung nachweisbar. Die im Differenzbild (Abb. 43.5) am Präparatrand erkennbare Fluoreszenz erklärt sich beim Vergleich mit der HE-Aufnahme aus an diesen Stellen vorhandenem Synovialgewebe.

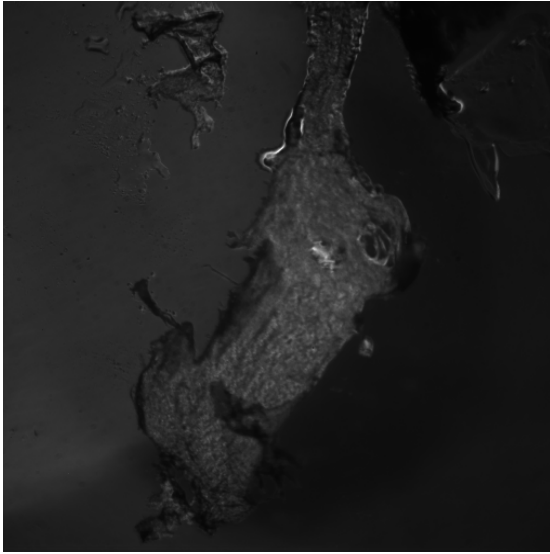


Abb. 43.1: Sehne, Durchsichtbild.



Abb. 43.2: Sehne, HE (Dia).

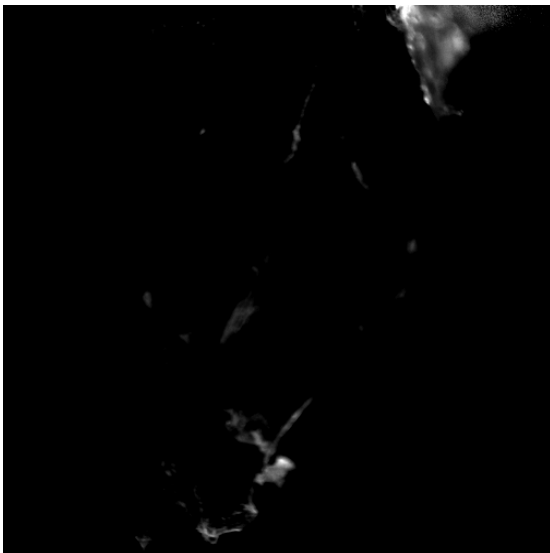


Abb. 43.3: Sehne, Rot-Bild.

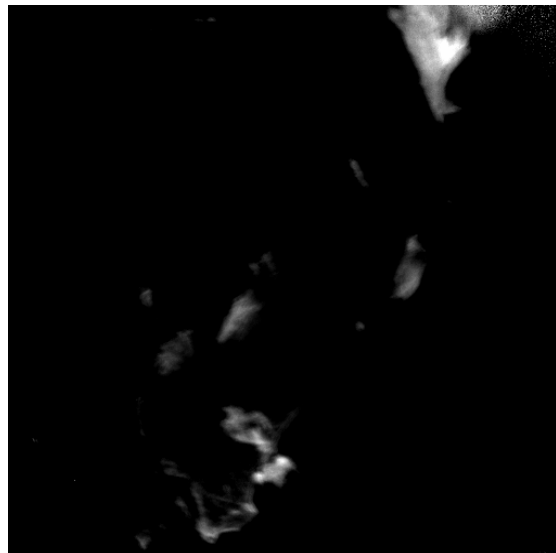


Abb. 43.4: Sehne, Grün-Bild.

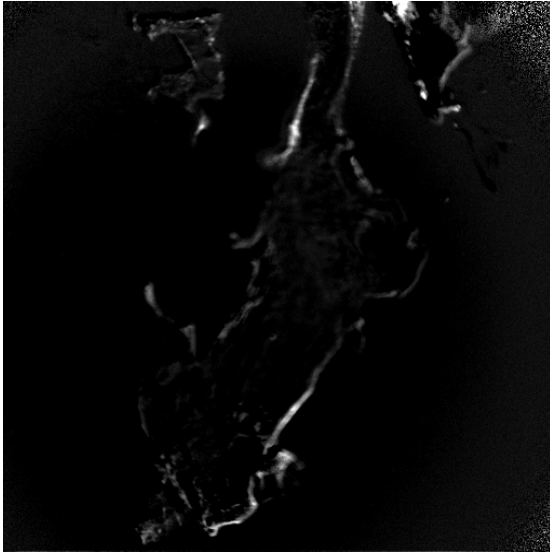


Abb. 43.5: Sehne, Differenzbild.

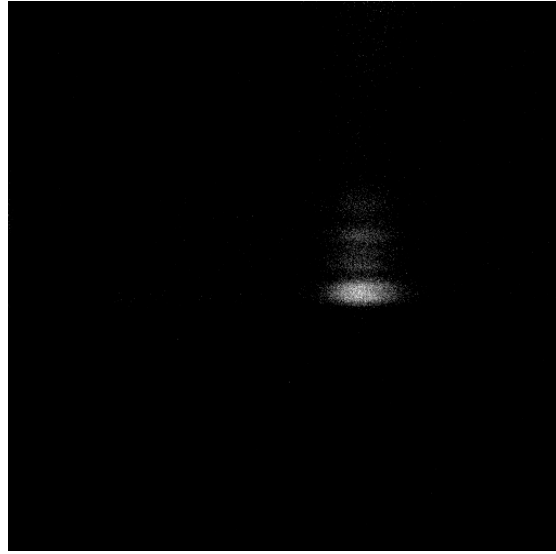


Abb. 43.6: Sehne, Spektralbild.

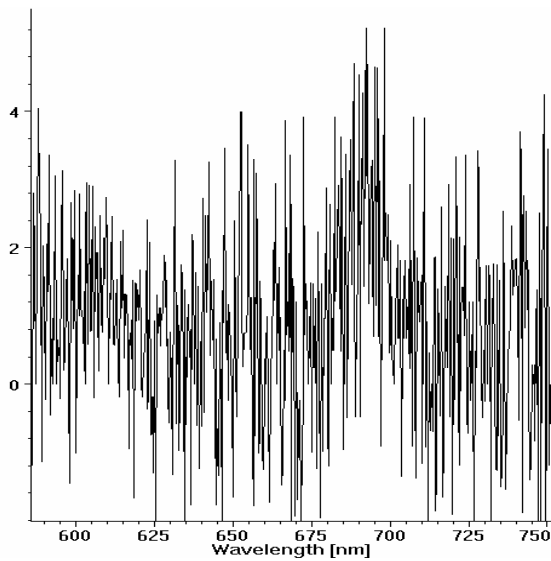


Abb. 43.7: Sehne, Spektrum.

### 3.6.6 Nerv

Die Abbildungen 44.1 bis 44.5 zeigen einen längsgeschnittenen peripheren Nerven mit anhängendem Fett- und Bindegewebe. Während das Nervengewebe keine Anreicherung aufweist, zeigt sich eine mäßige Fluoreszenz des Perineuriums und des Fettgewebes. Das Spektralbild zeigt auf der linken - dem Nervengewebe entsprechenden - Seite kein Signal, die



schmale Bande in der Bildmitte entspricht dem Perineurium, das breite Band rechts dem Fett- bzw. Bindegewebe.

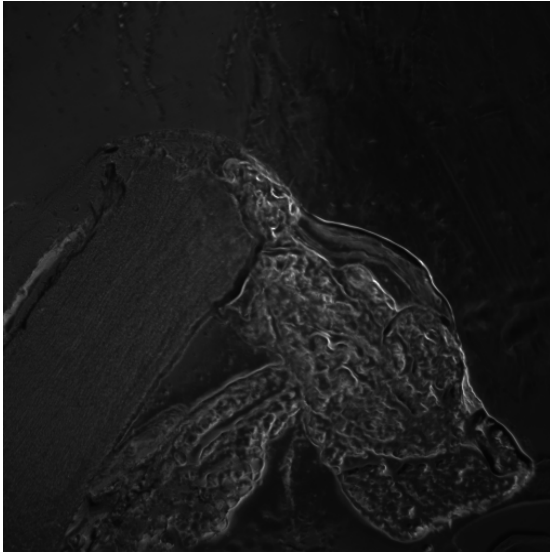


Abb. 44.1: Nerv, Durchsichtbild.

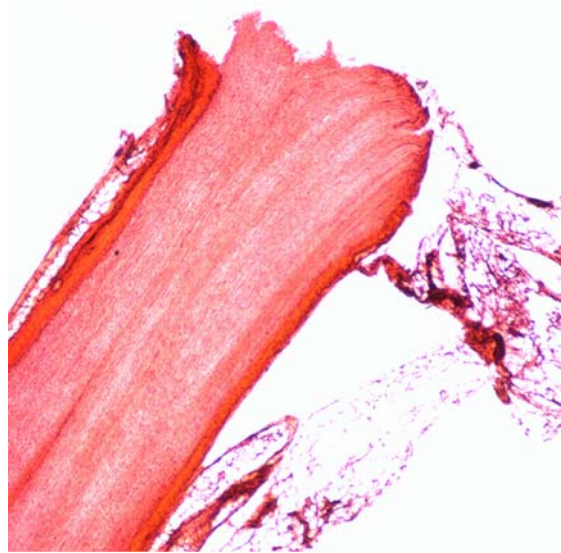


Abb. 44.2: Nerv, HE (Dia).

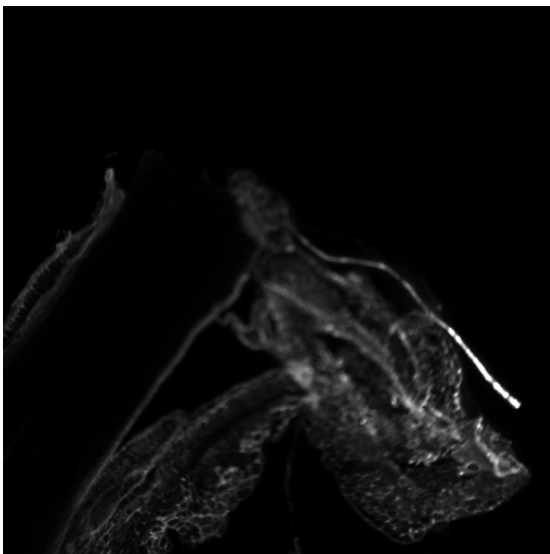


Abb. 44.3: Nerv, Rot-Bild.

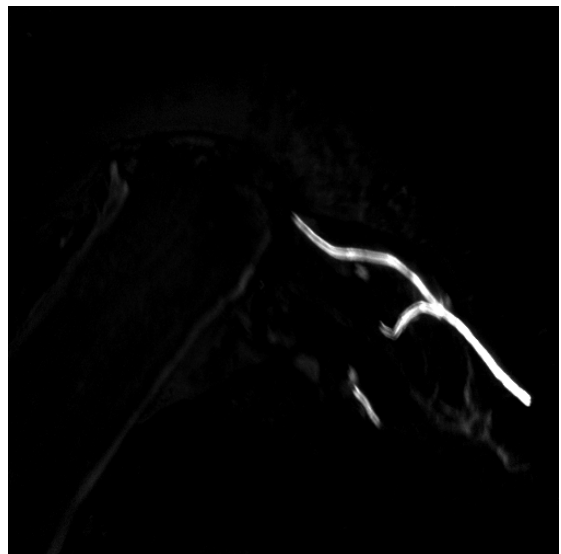


Abb. 44.4: Nerv, Grün-Bild.



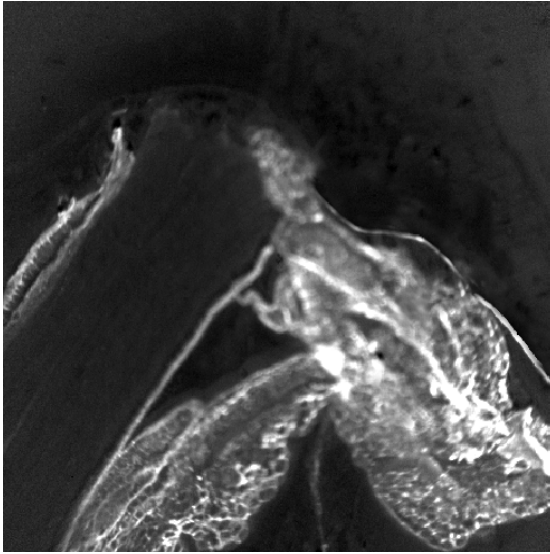


Abb. 44.5: Nerv, Differenzbild.

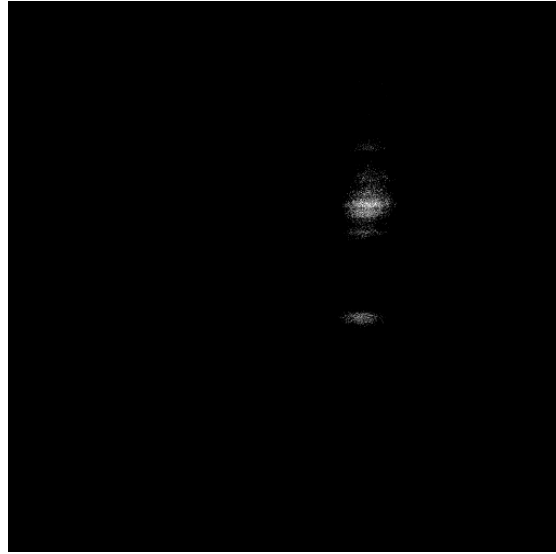


Abb. 44.6: Nerv, Spektralbild.

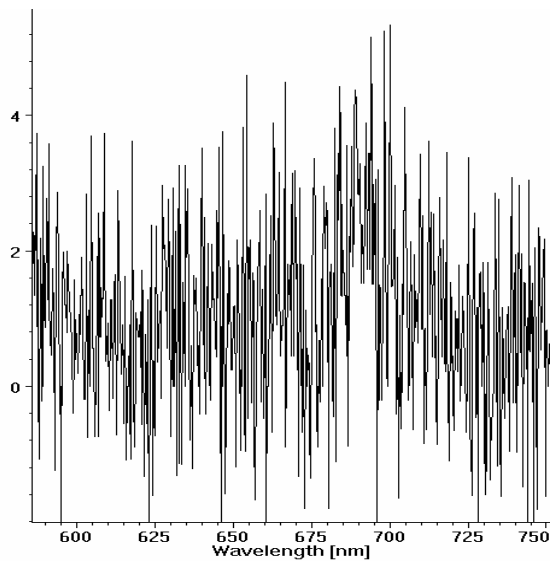


Abb. 44.7: Nerv, Spektrum.

### 3.6.7 Meniskus

Auch im Gewebe des Meniskus kam es nicht zur Anreicherung von BPD-MA, wie das Differentialbild (Abb. 45.5) belegt. Die hellen Bereiche entsprechen wiederum den angrenzenden Strukturen und lassen sich im HE-gefärbten Bild als Synovial- und Bindegewebe identifizieren.

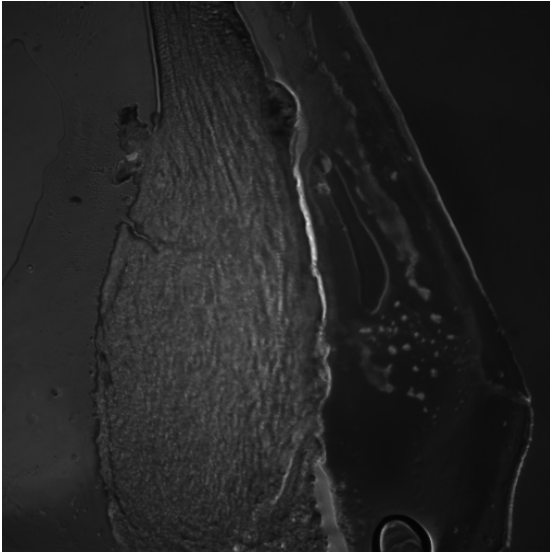


Abb. 45.1: Meniskus, Durchsichtbild.



Abb. 45.2: Meniskus, HE (Dia).



Abb. 45.3: Meniskus, Rot-Bild.

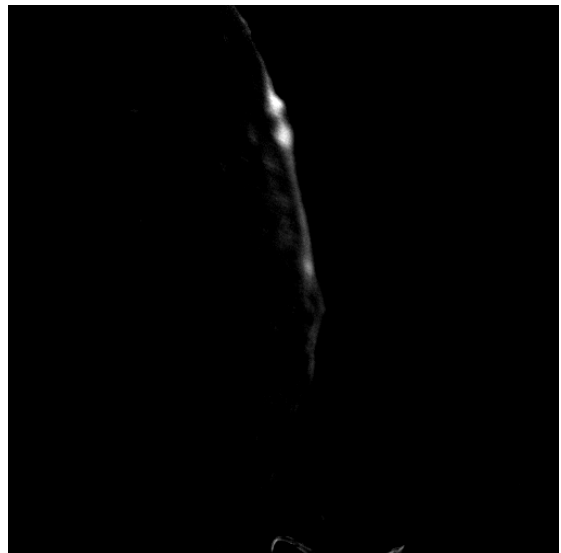


Abb. 45.4: Meniskus, Grün-Bild.



Abb.45.5: Meniskus, Differenzbild.

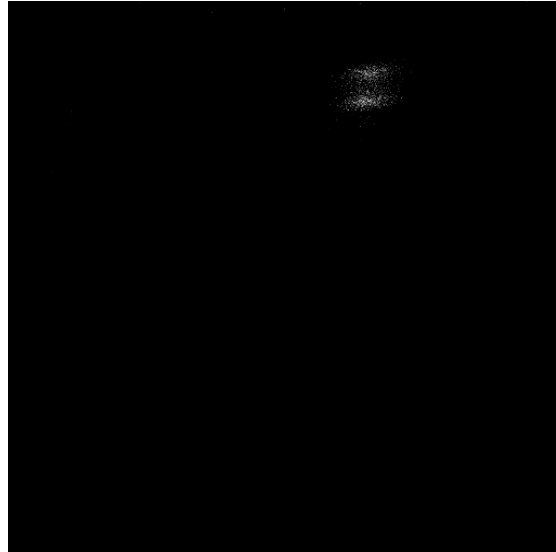


Abb. 45.6: Meniskus, Spektralbild.

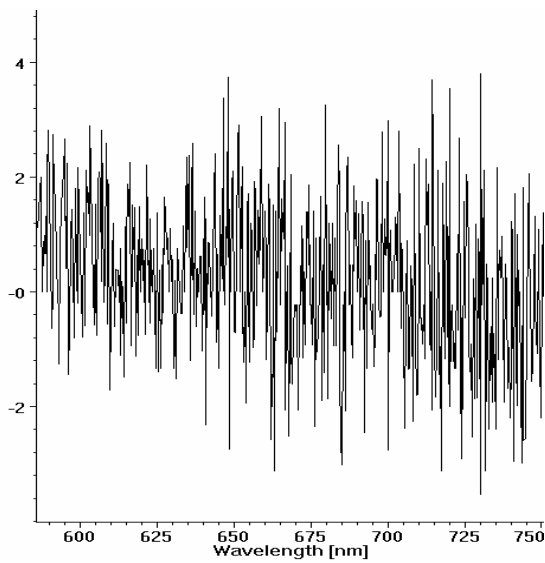


Abb. 45.7: Meniskus, Spektrum.

### 3.7 Fluoreszenzspektroskopische Messungen

Zur Beurteilung der Selektivität der BPD-MA-Anreicherung einzelner Gelenkstrukturen wurden die Signalintensitäten bei der Emissionswellenlänge von BPD-MA (690 nm) erfasst und über alle Werte des betreffenden Gewebes gemittelt.

Bei den untersuchten Präparaten ist ein unterschiedlich ausgeprägter Hintergrund vorhanden, der von kürzeren zu längeren Wellenlängen zunimmt und somit die Ergebnisse verfälscht. Um dadurch entstehende Fehler zu minimieren, wurde jeweils der Mittelwert der Signalintensitäten unter- bzw. oberhalb der BPD-MA-Fluoreszenz ermittelt und anschließend vom BPD-MA-Signal subtrahiert. Die Messungen wurden nur an denjenigen Geweben durchgeführt, die bei der oben genannten Fluoreszenzmikroskopie eine Sensibilisatoranreicherung zeigten (Synovialis, Muskulatur, Gefäß, Haut). Die Signalintensitäten sind in Counts angegeben. Folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Messungen:

<b>Synovialis</b>		<b>Muskulatur</b>		<b>Gefäß</b>		<b>Haut</b>	
<b>Schnitt Nr.</b>	<b>Signal bei 690nm</b>	<b>Schnitt Nr.</b>	<b>Signal bei 690nm</b>	<b>Schnitt Nr.</b>	<b>Signal bei 690nm</b>	<b>Schnitt Nr.</b>	<b>Signal bei 690nm</b>
1	15.2	1	17.2	1	12.2	1	10.2
2	16.3	2	17.5	2	14.9	2	11.3
3	16.9	3	16.7	3	13.2	3	9.5
4	15.2	4	16.8	4	12.7	4	11.1
5	17.4	5	17.9	5	14.2	5	9.8
6	15.9	6	19.1	6	16.3	6	11.6
7	15.3	7	17.1	7	14.6	7	9.4
8	13.0	8	16.3	8	15.2	8	13.6
9	17.7	9	15.0	9	16.7	9	11.3
10	17.9	10	17.4	10	17.1	10	12.7
11	16.4	11	15.7	11	13.0	11	12.0
12	18.2	12	16.8	12	12.8	12	12.9
13	16.8	13	17.3	13	14.5	13	10.4
14	17.6	14	18.9	14	15.9	14	11.4
15	17.5	15	17.6	15	16.4	15	12.2
<b>Mittelwert</b>	<b>16.5</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>17.1</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>16.6</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>11.3</b>
<b>Standard-abweichung</b>	<b>1.4</b>	<b>Standard-abweichung</b>	<b>1.0</b>	<b>Standard-abweichung</b>	<b>1.6</b>	<b>Standard-abweichung</b>	<b>1.3</b>

Tabelle 6: Ergebnisse der fluoreszenzspektroskopischen Messungen der Gewebe Synovialis, Muskulatur, Gefäß und Haut.

## 4. Diskussion

Die chronische Polyarthrititis ist eine schwere Erkrankung des rheumatischen Formenkreises, die mit anhaltenden Schmerzen einhergeht und zu Bewegungseinschränkungen, Gelenkdestruktionen, Verlust an Lebensqualität, Arbeitsunfähigkeit sowie verkürzter Lebenserwartung führt. Die durch sie verursachten Kosten bedeuten eine erhebliche Belastung für das Gesundheitssystem.

In der Behandlung der chronischen Polyarthrititis steht die medikamentöse Therapie an erster Stelle. Bei vielen Patienten führen die eingesetzten Medikamente jedoch nicht zu einer ausreichenden Beschwerdebesserung und nicht selten müssen sie aufgrund ihrer Nebenwirkungen abgesetzt werden. In diesen Fällen kommen rheumachirurgische Maßnahmen wie Synovektomie, Arthroplastik, Arthrodese oder Gelenkersatz in Betracht.

Die Synovektomie ist ein etabliertes Verfahren in der orthopädischen Rheumatologie <sup>[51]</sup>. Sie kann zwar die Krankheitsursache nicht beseitigen, jedoch das Substrat, die Synovialis als Ausgangsort der entzündlichen Veränderungen, aus dem Gelenk entfernen. Die bisher zur Verfügung stehenden Methoden weisen jedoch eine Reihe von Nachteilen auf, die ihren Einsatz limitieren und darüber hinaus eine Anwendung an den besonders häufig betroffenen kleinen Gelenken der Finger und Zehen nicht erlauben <sup>[38]</sup>.

Die prinzipielle Durchführbarkeit einer photodynamischen Synovektomie mit den Photosensibilisatoren Photosan 3 und Verteporfin konnte in vorhergehenden Untersuchungen am Tiermodell bereits gezeigt werden <sup>[173;175]</sup>. Vor dem Beginn klinischer Studien muss sichergestellt sein, dass die Behandlung nicht zur Schädigung wichtiger Gelenkstrukturen wie Knorpel oder Bändern führt. Aus diesem Grund untersuchten wir an einem Arthritistiermodell den Effekt unterschiedlicher Lichtdosen und Bestrahlungsmodalitäten auf die Synovialmembran und die benachbarten Gewebe.

Eine für die klinische Anwendung der photodynamischen Therapie schwierig zu realisierende aber dringend zu fordernde Voraussetzung ist die Verfügbarkeit einer suffizienten Dosimetrie. Nur so kann ein reproduzierbarer Behandlungserfolg garantiert und eine Überdosierung vermieden werden. Zu

diesem Zweck entwickelten wir ein System zur intraoperativen Fluoreszenzmessung, mit dessen Hilfe eine indirekte Aussage über die Anreicherung und das Ausbleichen des Photosensibilisators und damit der zu applizierenden Lichtdosis getroffen werden kann.

#### **4.1 Tiermodell**

Für den Einsatz und die Weiterentwicklung von Tiermodellen für die chronische Polyarthrititis gibt es vor allem zwei Beweggründe. Zum einen dienen sie der Aufklärung der bisher nur teilweise bekannten Ätiologie und Pathogenese der Krankheit, andererseits sind sie unverzichtbar für die Entwicklung und Testung neuer Therapeutika.

Ein ideales Tiermodell sollte für diese Zwecke eine möglichst große Ähnlichkeit zur chronischen Polyarthrititis aufweisen, einfach zu handhaben und gut reproduzierbar sein <sup>[57]</sup>. Den Voraussetzungen entsprechend lassen sich drei Gruppen von Arthritismodellen unterscheiden. Natürlich vorkommende und experimentell reproduzierbare Arthritiden, immunologische Arthritismodelle sowie banale Arthritismodelle <sup>[176]</sup>.

Die beiden am besten untersuchten Arthritismodelle sind die Adjuvansarthritis der Ratte <sup>[177]</sup> und die Antigeninduzierte Arthritis (AIA) des Kaninchens <sup>[59;66]</sup>. Die Adjuvansarthritis besticht auf den ersten Blick durch ihre einfache Durchführbarkeit, weist jedoch in Verlauf, Morphologie und Immunologie nur sehr begrenzte Übereinstimmungen mit der chronischen Polyarthrititis auf <sup>[57;178]</sup>.

Demgegenüber wird die durch intraartikuläre Antigenapplikation bei immunisierten Kaninchen hervorgerufene AIA von der Mehrzahl der Autoren als Modell für die chronische Polyarthrititis favorisiert <sup>[179-185]</sup>. Deutliche Übereinstimmungen zeigen sich hierbei im histologischen Bild der chronischen Synovialitis mit villöser Hyperplasie, Makrophagen-, Lymphozyten- und Plasmazellinfiltration, in der Ausbildung lymphatischer Sekundärfollikel und in der Pannusbildung mit erosiven Veränderungen an Knorpel und Knochen <sup>[186;187]</sup>. Neben diesen morphologischen existieren eine Reihe funktioneller Gemeinsamkeiten wie Antikörper- und Lymphokinproduktion oder die Ablagerung von Immunkomplexen und Komplement im Gelenkknorpel. Wie die chronische Polyarthrititis auch ist die AIA – im Gegensatz zu anderen

tierexperimentellen Arthritismodellen – ein im wesentlichen durch T-Zellen vermittelter Prozess <sup>[65]</sup>.

Die auffälligsten Unterschiede der AIA zur chronischen Polyarthritis des Menschen sind die Beschränkung der Arthritis auf das induzierte Gelenk, das Fehlen eines schubweisen Verlaufs sowie das Fehlen extraartikulärer Manifestationen wie Rheumafaktoren und Rheumaknoten <sup>[57]</sup>.

Außer an Kaninchen lässt sich eine derartige Arthritis auch an Mäusen, Meerschweinchen und Ratten induzieren. In der vorliegenden Studie sollten arthritische Gelenke nach Sensibilisatorapplikation intraartikulär bestrahlt werden. Das Modell der AIA am Kaninchenknie bietet hierfür entscheidende Vorteile:

- Die Kniegelenke von Kaninchen entsprechen in ihren Ausmaßen etwa den menschlichen Fingergelenken. Während die Fingergelenke Hauptmanifestationsort der chronischen Polyarthritis sind, ist ihre operative Versorgung mit herkömmlichen Methoden bisher unbefriedigend. Da im Rahmen der Studie Bestrahlungsapplikatoren für die intraartikuläre Anwendung entwickelt wurden, waren zudem realistische Größenverhältnisse erwünscht.
- Das morphologische Bild der Synovialitis entspricht bei diesem Modell weitgehend dem der chronischen Polyarthritis <sup>[57]</sup>. Die entzündlich veränderte Gelenkinnenhaut ist Ausgangspunkt der Gelenkzerstörung und ihre selektive Zerstörung war Gegenstand der vorliegenden Arbeit.
- Die Synovialmembran gesunder Kaninchen ähnelt in ihrer Ultrastruktur weitgehend derjenigen des Menschen <sup>[188]</sup>. Eine Beurteilung des Therapieerfolges lässt sich somit leichter auf die Verhältnisse beim Menschen übertragen.
- Durch den Vergleich mit der unbehandelten Gegenseite bei der unilateralen AIA besteht gegenüber anderen Modellen eine bessere Quantifizierungsmöglichkeit der arthritischen Gelenkveränderungen <sup>[69]</sup>.
- Im Gegensatz zu Mäusen und Ratten kann bei Kaninchen eine größere Menge an Untersuchungsmaterial gewonnen werden.

Das von Reichel modifizierte und in unseren Versuchen eingesetzte Modell der AIA verwendet als Proteinantigen hitzeaggregiertes humanes IgG <sup>[174]</sup>. Da sich dieses Modell bereits in der vorangegangenen Studie bewährt hatte, wurde es auch hier verwendet <sup>[173]</sup>. Die Durchführung der Immunisierung entsprach dem von Harlow und Lane publizierten „Standard immunization protocol for rabbits“ <sup>[189]</sup>.

Nach Broderson führt die Verteilung der Immunisierungsdosis auf mehrere subkutane Injektionsstellen zu einer verminderten Entstehung möglicherweise schmerzhafter Entzündungsreaktionen. Darüber hinaus bedingen multiple Injektionen eine ausgeprägtere Antigenpräsentation sowie die Beteiligung einer größeren Anzahl an Lymphknoten mit dem Ergebnis einer vermehrten Antikörperproduktion <sup>[190-192]</sup>.

Bei der Inspektion der Injektionsstellen zur subkutanen Immunisierung zeigten sich bei einigen Tieren Granulome von bis zu 20 mm Durchmesser. Nach Stills und Bailey finden sich bei Injektionsmengen von 0,05 bis 0,1 ml Immunisierungslösung regelmäßig Granulome dieser Größe <sup>[193]</sup>. Die beobachteten Hautreaktionen schienen nicht druckschmerzhaft zu sein und wiesen auch sonst keine Entzündungszeichen auf, so dass eine sekundäre bakterielle Infektion mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden konnte <sup>[194]</sup>.

Die am 21. Tag durchgeführte intrakutane IgG-Injektion hatte in allen Fällen eine deutlich ausgeprägte Hautreaktion zur Folge. Nach Brouilhet et al. sowie Menhard und Dion korreliert die mit dem Hauttest nachgewiesene zellvermittelte Immunreaktion gegen das Fremdeiweiß mit dem Schweregrad der Synovialitis <sup>[195;196]</sup>. Bereits am Folgetag der intraartikulären Antigeninjektion war eine Schwellung der behandelten Kniegelenke mit Ergussbildung und Druckschmerzhaftigkeit zu beobachten. Einige der Gelenke waren im Vergleich zur unbehandelten Gegenseite überwärmt, im Gegensatz zu den Beschreibungen von Bräuer wurde jedoch keine Rötung festgestellt <sup>[186]</sup>. Fredriksson untersuchte in einer unserem Tiermodell vergleichbaren Studie verschiedene klinische Parameter nach Arthritisinduktion an Knie- und Kiefergelenken von Kaninchen. Er registrierte Hauttemperatur, Gelenkschwellung, Stress, Körpertemperatur und Druckschmerzhaftigkeit der



Gelenke. Von diesen Parametern war allein die Gelenkschwellung ein sicheres Zeichen der Entzündungsreaktion. Wie in unserer Untersuchung auch trat die Schwellung früh nach intraartikulärer Antigeninjektion auf, hier am zweiten Tag. Als Ursache der Schwellung vermutet Fredriksson ein Synovia- und Bindegewebsödem <sup>[197]</sup>. Püschel führt diese frühen Veränderungen auf eine Arthusreaktion zurück, die auf einer lokalen Immunkomplexbildung zwischen dem intraartikulär applizierten Antigen, den durch die Immunisierung induzierten und im Überschuss vorhandenen zirkulierenden Antikörpern sowie Komplement beruhe <sup>[57]</sup>. Die Histopathologie dieser frühzeitig wieder abklingenden Arthusreaktion in der Synovialis ist ausführlich beschrieben worden. Kennzeichnend sind Thrombovaskulitis, Ödem, Komplement-aktivierung, Granulozyteninvasion und Fibrinablagerung <sup>[181;198]</sup>.

Bei der histologischen Beurteilung der nach Arthritisinduktion nicht weiter behandelten Gelenke am Versuchsende zeigte sich eine stark hyperplastische synoviale Deckzellschicht mit ausgeprägter lymphozytärer und plasmazellulärer Infiltration. Es fanden sich außerdem in erhöhtem Ausmaß Gefäßsprossungen, granulozytäre und monozytäre Infiltrate sowie vermehrt Makrophagen. Diese Befunde entsprechen den Reaktionen, die Bräuer ab der dritten Wochen nach Antigenapplikation beschreibt. Dreher fand vergleichbare histopathologische Veränderungen bereits ab dem vierten Tag nach intraartikulärer Antigeninjektion <sup>[199]</sup>. Aufgrund des Fehlens einer ausgeprägten granulozytären Infiltration in den Histologien und der oben erwähnten unauffälligen klinischen Befunden konnten wir eine iatrogene, bakterielle Arthritis als Ursache der beschriebenen Reaktion ausschließen.

Auffallend war eine deutliche Variabilität in der Ausprägung der genannten Veränderungen. So reichte z.B. die reaktive Proliferation der Synoviozyten von einer wenige Zellagen betragenden Deckzellschicht bis hin zur ausgeprägten villösen Hyperplasie. Menard und Dion erklären diese Beobachtung durch eine unterschiedliche allergische Reaktionsbereitschaft von Kaninchen und sprechen in diesem Zusammenhang von „low responders“ und „high responders“ <sup>[196]</sup>.

Ein großer Vorteil der AIA gegenüber den meisten anderen Arthritismodellen ist ihre ausgeprägte Chronizität. So wurde ein Andauern der Arthritis von bis zu drei Jahren beobachtet <sup>[200]</sup>. Die Ursache dieser der Chronizität ist unklar. Als

mögliche Erklärungen werden eine Antigenpersistenz im Gelenk <sup>[63;180]</sup>, die Induktion einer zellvermittelten Immunität gegen das verabreichte Antigen im Sinne einer Autoimmunreaktion <sup>[201]</sup> sowie der Einfluss von Histokompatibilitätsantigenen diskutiert <sup>[202]</sup>. Auch das Freund-Adjuvans trägt durch die protrahierte Antigenfreisetzung aus seinem Öl-Depot entscheidend zur fortwährenden Entzündungsreaktion bei <sup>[187;195]</sup>.

Während die weiter oben beschriebene Arthusreaktion bereits am dritten Tag wieder abklingt, findet sich schon nach etwa drei Wochen das Vollbild einer chronischen Synovialitis. Von diesem Punkt an verändert sich das histologische Bild in den nächsten Monaten kaum <sup>[176]</sup>. In Anlehnung an diese Befunde wurden die Tiere in der vorliegenden Studie drei Wochen nach intraartikulärer Boosterung operiert, da zu diesem Zeitpunkt die stärkste synoviale Reaktion zu erwarten war <sup>[57]</sup>.

Die AIA gilt in der Literatur als dasjenige Modell, welches morphologisch die größte Ähnlichkeit zur chronischen Polyarthritits aufweist <sup>[57;201]</sup>. Wie alle zur Zeit bekannten Arthritismodelle ist allerdings auch die AIA nicht in der Lage, alle Eigenschaften der chronischen Polyarthritits zu imitieren. So manifestiert sich die Arthritits nur in induzierten Gelenken und es treten keine extraartikulären Symptome wie z.B. Rheumaknoten auf. Der für die chronische Polyarthritits typische schubweise Verlauf oder eine Progredienz der Symptome sind im Modell ebenfalls nicht zu beobachten. Auch durch das schnelle Auftreten der entzündlichen Gelenkveränderungen innerhalb einiger Wochen unterscheidet sich die AIA deutlich vom Verlauf der chronischen Polyarthritits des Menschen.

Die späte „ausgebrannte“ Phase der chronischen Polyarthritits ist durch ein Sistieren der Synovialitis und eine zunehmende Fibrosierung des Gewebes gekennzeichnet. Die zur Verfügung stehenden Arthritismodelle dagegen sind eher mit frühen, aktiven Stadien zu vergleichen <sup>[203;204]</sup>. Da die hier beschriebene photodynamische Therapie prinzipiell einer Synovektomie entspricht und ebenso wie herkömmliche chirurgische Synovektomien die besten Ergebnisse in frühen Erkrankungsstadien erwarten lässt, stellt dieser Umstand jedoch keinen Nachteil dar.

Zusammenfassend muss bei der Bewertung aller zur Zeit existierenden Arthritismodelle die begrenzte Übertragbarkeit vom Tier auf den Menschen

beachtet werden <sup>[205]</sup>. Solange die Pathogenese der chronischen Polyarthrititis nicht verstanden ist, kann es kein ideales Tiermodell geben. Doch auch die Existenz eines solchen Modells wäre nicht in der Lage, klinische Studien zu ersetzen, da prinzipiell von einer begrenzten Übertragbarkeit der Ergebnisse von einer Spezies auf eine andere (Tier – Mensch) ausgegangen werden muss <sup>[206]</sup>. Um konkrete Aussagen über die Wirkung der photodynamischen Therapie auf den Verlauf der chronischen Polyarthrititis machen zu können, bleibt somit letztlich nur der klinische Versuch.

## **4.2 Photodynamische Therapie**

Bereits um die Jahrhundertwende erstmals beschrieben, erlangte die photodynamische Therapie erst in den achtziger Jahren durch die zunehmende Verfügbarkeit geeigneter Laser eine gewisse Verbreitung. Neben ihrem Einsatz im Rahmen der Onkologie erweitert sich das Indikationsspektrum der photodynamischen Therapie in letzter Zeit verstärkt in den nicht-onkologischen Bereich.

Die pathologischen Veränderungen der Synovialmembran bei der chronischen Polyarthrititis ähneln in vielerlei Hinsicht soliden Neoplasien, insbesondere in Bezug auf Zellhyperproliferation und Neovaskularisation <sup>[207]</sup>. Nach den Erfolgen der photodynamischen Therapie in der Tumorbehandlung lag es also nahe, ihre Wirksamkeit bei der chronischen Polyarthrititis zu untersuchen. Der photodynamische Effekt bei der Tumorbehandlung lässt sich durch zwei verschiedene Mechanismen erklären: Durch direkte Zytotoxizität sowie durch Bildung von Thromben und Unterbrechung der Tumervaskularisierung mit der Folge einer ischämischen Nekrose des neoplastischen Gewebes. In welchem Ausmaß diese Effekte bei der photodynamischen Therapie der chronischen Polyarthrititis zum Tragen kommen ist bisher weitgehend ungeklärt.

Obwohl sich die klinische Anwendung der photodynamischen Therapie zur Behandlung verschiedener Krankheiten auf den ersten Blick sehr einfach darstellt, ergeben sich derzeit noch große Schwierigkeiten aus der Vielzahl der in einer Therapieplanung zu beachtenden Parameter. Hierzu zählen unter anderem die

- Auswahl eines geeigneten Photosensibilisators

- Gesamtdosis des Sensibilisators
- Zeitspanne zwischen Sensibilisatorapplikation und Bestrahlung
- Wahl der Lichtquelle
- Gesamtlichtdosis
- Lichtdosisrate
- Wellenlänge des verwendeten Lichts
- Art der Lichtapplikation.

Aufgrund der Komplexität synovialer Gelenke ergeben sich für die intraartikuläre Anwendung der photodynamischen Therapie zusätzliche Probleme. So ist der behandelte Bereich nicht einsehbar, geometrisch kaum berechenbar und aus verschiedenen Geweben wie Knorpel, Bandstrukturen und Synovialis zusammengesetzt, von denen nur letzteres therapiert, die übrigen möglichst ausgespart werden sollen. In einer 1999 erschienenen Arbeit untersucht Descalle die Geometrie dilatierter Kaninchenkniegelenke mittels dreidimensionaler Magnetresonanztomographie. Die Anatomie der Gelenkhöhle konnte in einer virtuellen Umgebung untersucht und ein geometrisches Modell entwickelt werden. Im Gegensatz zu anderen Modellen wurde hierbei die Gelenkhöhlenwand inklusive der Synovialmembran dargestellt. Mittels „Rapid Prototyping“ (Verfahren zur schnellen Erstellung eines Prototypen aus einem 3D-CAD-Datenmodell) entwickelte der Autor schließlich ein physikalisches Modell, an dem Lichtmessungen durchgeführt werden konnten. Drei Gelenkräume scheinen nach diesen Messungen für die Einbringung eines Lichtleiters zur intraartikulären photodynamischen Therapie bei chronischer Polyarthritits geeignet. Der größte Raum entspricht dabei dem in unseren Versuchen verwendeten oberen Rezessus, die beiden übrigen befinden sich dorsal im Bereich der Femurkondylen <sup>[208]</sup>.

### **4.3 Vorarbeiten**

Die vorliegende Studie basiert auf einer Reihe von Vorarbeiten. In Zellkulturexperimenten mit humanen Synovialfibroblasten vom Typ II und III von Patienten mit chronischer Polyarthritits wurde die Wirksamkeit der photodynamischen Therapie mit verschiedenen Sensibilisatoren untersucht.

Hierbei zeigten die langwirksamen Antirheumatika Methotrexat und Chloroquin durch Laserbestrahlung zwar eine 20fache Steigerung ihres zytotoxischen Effekts, die sehr geringe Eindringtiefe des zur Anregung nötigen Lichts der Wellenlänge 351 nm verhindert jedoch einen sinnvollen klinischen Einsatz <sup>[172]</sup>. In entsprechenden Experimenten mit Photosan 3 als Sensibilisator konnte ein dosisabhängiger zytotoxischer Effekt erzielt werden, wobei die Gabe von 10 µg/ml bei nachfolgender Laserbestrahlung mit 2 J/cm<sup>2</sup> der Wellenlänge 630 nm zum vollständigen Absterben der Zellen führte. Bei alleiniger Gabe von Photosan 3 überlebten hingegen 86 % der Zellen <sup>[209]</sup>. Die vielversprechenden Ergebnisse der photodynamischen Therapie an Zellkulturen führten nach Etablierung des oben beschriebenen Tiermodells der IgG-induzierten Arthritis zur Durchführung von *in vivo* Versuchen. Hierzu wurde zunächst vier Kaninchen nach Arthritisinduktion jeweils 20 mg Photosan 3 intraartikulär oder intravenös verabreicht. Nach 24 Stunden erfolgte die intraartikuläre Bestrahlung mit der Wellenlänge 635 nm bei einer Leistung von 50 mW/cm. Die nach einer Woche entnommenen Histologien zeigten eine hämorrhagische Demarkation der Synovialis bei Unversehrtheit der bradytrophen Gelenkstrukturen. Zwischen intraartikulärer und systemischer Sensibilisatorapplikation ergaben sich bei gleicher Gesamtdosis keine Unterschiede <sup>[173]</sup>.

Versuche von Trauner et al. mit intravenös verabreichtem Photofrin 2, ein dem Photosan 3 ähnlichen Hämatoporphyrinderivat, an 24 Kaninchen mit Immunarthritis bestätigten die selektive Wirkung der Behandlung auf die Synovialis, wenngleich der Autor eine im Vergleich zu den Versuchen unserer Arbeitsgruppe geringere Ausprägung der Effekte beschreibt <sup>[99]</sup>. Als Ursache hierfür kommt sowohl die Verwendung eines anderen Tiermodells, namentlich der Ovalbuminarthritis, als auch die von Trauner praktizierte Lichtapplikation mittels plan geschliffenem Faserende ohne Streukörper und damit erheblich kleinerem Bestrahlungsbereich in Frage.

Einen wesentlichen Nachteil der Hämatoporphyrinderivate stellt die prolongierte Hautsensibilisierung dar, die wahrscheinlich auf der starken Affinität der Sensibilisatormoleküle zur Haut beruht <sup>[210]</sup>. So finden sich 24 Stunden nach Applikation noch 1 %, nach 75 Tagen noch 0,01 % des Photosan 3 in der Zirkulation <sup>[211]</sup>.

Die Suche nach geeigneteren Sensibilisatoren führte zu Studien mit ALA-induziertem Protoporphyrin IX (ALA-PpIX). Die Substanz zeichnet sich durch einen vollständigen Abbau innerhalb von 24 Stunden und der Möglichkeit zur wahlweise intraartikulären oder systemischen Applikation aus <sup>[212]</sup>. Zunächst wurde am AIA-Tiermodell das Anreicherungsverhalten des Farbstoffes in Abhängigkeit von der Applikationsform untersucht. Hierzu wurden nach Gabe des Sensibilisators Gewebeproben entnommen, als Kryostatschnitte aufgearbeitet und der Protoporphyrin-IX-Gehalt fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert. Es zeigte sich sowohl bei intraartikulärer als auch bei intravenöser Applikation bereits nach zwei Stunden eine signifikante Fluoreszenz in der Synovialis, die nach 24 Stunden wieder vollständig verschwunden war. Die systemische Sensibilisatorgabe führte zu einer selektiven Anreicherung in entzündeter gegenüber gesunder Synovialis. In den bradytrophen Geweben hingegen konnte erst nach 24 Stunden eine in den Lakunen der Chondrozyten lokalisierte Fluoreszenz beobachtet werden. Trotz dieser zunächst vielversprechenden Eigenschaften führte die intraartikuläre Bestrahlung durch einen Argonionengepumpten Farbstofflaser mit einer Wellenlänge von 635 nm zu keinerlei histologischen Veränderungen, so dass die Substanz für die photodynamische Synovektomie ungeeignet erscheint <sup>[173;213]</sup>.

#### **4.4 Photosensibilisatoren**

Trotz des zum Teil guten therapeutischen Effekts weisen die in den oben beschriebenen Versuchen verwendeten Photosensibilisatoren der ersten Generation eine Reihe von Nachteilen auf, die einer sinnvollen klinischen Anwendung im Wege stehen. Als komplexe Substanzgemische aus Mono-, Di-, und Polymeren bereiten sie größere galenische Probleme als die reinen oder aus einfachen Isomeren zusammengesetzten Substanzen der zweiten Generation <sup>[106;150]</sup>. Mit einem Absorptionsmaximum im Bereich um 630 nm erreicht das benötigte Anregungslicht keine befriedigende Eindringtiefe ins Gewebe, da in diesem Wellenlängenbereich abhängig von den Gewebeeigenschaften und der Dosimetrie die Penetrationstiefe auf 2-5 mm begrenzt bleibt <sup>[169]</sup>. Darüber hinaus stehen zur Erzeugung dieser Wellenlängen

bisher nur große und teure argonionengepumpte Farbstofflaser zur Verfügung. Wünschenswert sind daher Sensibilisatoren mit Absorptionsmaxima um 700 nm oder darüber. Als entscheidender Nachteil der Sensibilisatoren erster Generation gilt jedoch ihre bis zu sechs Wochen andauernde Hautsensibilisierung. Hierdurch werden die Patienten zur konsequenten Meidung von Sonnenlicht gezwungen, was insbesondere bei der Therapie nicht-onkologischer Erkrankungen die Akzeptanz deutlich reduziert.

Für die in der vorliegenden Studie beschriebenen Versuche wurde deshalb ein Photosensibilisator der zweiten Generation, das BPD-MA, gewählt. Die reine Verbindung aus zwei Regioisomeren besitzt ein Absorptionsmaximum bei 690 nm. Neben einer fast doppelten Penetrationstiefe gegenüber dem bei der photodynamischen Therapie mit Photofrin verwendeten Anregungslicht und einer deutlich kürzeren Hautsensibilisierung von nur zwei bis drei Tagen erweist sich die Verfügbarkeit von Diodenlasern für diesen Wellenlängenbereich als vorteilhaft.

Im August 2000 wurde BPD-MA von der Europäischen Union unter dem Handelsnamen Visudyne® zur Behandlung der feuchten altersbedingten makulären Degeneration (AMD) zugelassen <sup>[214;215]</sup>. Zur zweistufigen Behandlung der AMD werden dem Patienten zunächst über zehn Minuten 6 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche Verteporfin in eine Armvene injiziert und zehn Minuten nach Infusionsbeginn mit Laserlicht (689 nm, 50 J/cm<sup>2</sup>) aktiviert, welches im Patientenauge auf das krankhafte Areal strahlt. An einer Multicenterstudie mit 609 Patienten konnte die Wirksamkeit der Methode gezeigt werden. Als Vorsichtsmaßnahme wurden die Patienten instruiert, für 48 Stunden Haut und Augen vor Sonnenlicht und starkem Raumlicht zu schützen. Die Therapie wurde von den Patienten gut toleriert. An unerwünschten Wirkungen zeigten sich neben vorübergehenden Sehstörungen bei 13% der Testgruppe schmerzhaft, entzündete oder hämorrhagische Schwellungen im Bereich der Injektionsstelle. Zwei Prozent der Patienten klagten über Rückenschmerzen in Zusammenhang mit der Injektion <sup>[216;217]</sup>. Lediglich bei 0,6% der behandelten Patienten kam es zu transienten Lichtempfindlichkeitsreaktionen, wobei weder UV-Sonnenschutzmittel noch Medikamente wie z.B. Acetylcystein einen Einfluss auf die posttherapeutische

Lichtsensibilität haben <sup>[218]</sup>. Da die beschriebene Verteporfindosis in etwa derjenigen entspricht, die auch bei der photodynamischen Therapie zur Behandlung der chronischen Polyarthrits sinnvoll erscheint, sind hierbei vergleichbare Nebenwirkungen zu erwarten. Über eventuelle Langzeitschäden können derzeit noch keine Aussagen getroffen werden, da die Substanz erst seit wenigen Jahren am Menschen angewandt wird.

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse mit BPD-MA lässt der Fortschritt bei der Entwicklung neuer Photosensibilisatoren eine weitere Verbesserung der photodynamischen Therapie erwarten. So ist z.B. die Absorptionswellenlänge von BPD-MA mit 690nm zwar im Vergleich zu den Farbstoffen der ersten Generation ein großer Vorteil, durch eine Absorption im Bereich um 800 nm könnte die Penetrationstiefe des Anregungslichtes jedoch nochmals deutlich vergrößert werden. Sensibilisatoren die in Bereichen oberhalb 900 nm absorbieren machen hingegen wenig Sinn, da die Triplettenenergie (erforderlich sind mindestens 94,5 kJ/Mol) der Photonen hierbei zu niedrig ist, um photochemische Reaktionen auslösen zu können <sup>[219]</sup>.

Die Dauer der Hautsensibilisierung nach BPD-MA-Applikation ist wie bereits oben erwähnt im Vergleich zu früheren Photosensibilisatoren sehr kurz. Der empfohlene Haut- und Augenschutz für 48 Stunden nach Injektion stellt für die meisten Patienten sicher kein allzu großes Problem dar. BPD-MA weist allerdings eine breite Soretbande im Bereich um 400 nm auf (vgl. Abb. 11). Während diese Bande für die photodynamische Therapie keine Rolle spielt, da blaues Licht nicht tief genug ins Gewebe penetriert, ist eine hierdurch verursachte Schädigung der bestrahlten Haut durchaus denkbar. Die Entwicklung neuer Sensibilisatoren mit schmaler Absorptionsbande im roten Wellenlängenbereich bei möglichst geringer oder fehlender Absorption in den unteren Wellenlängenbereichen verspricht hingegen eine weitere Reduktion der Hautsensibilisierung.

#### **4.5 Dosis**

Das Behandlungsregime der photodynamischen Therapie ist durch eine Vielzahl veränderbarer Parameter gekennzeichnet. Hiervon sind für den



klinischen Einsatz vor allem eine adäquate Sensibilisatormenge sowie eine möglichst günstige Lichtdosis von Interesse.

Die biologisch wirksame Dosis, die sogenannte „photodynamische Dosis“, ergibt sich aus dem Produkt der akkumulierten Photosensibilisatormenge und der Lichtbestrahlungsdosis. Die optimalen Bestrahlungsdosen und -intensitäten für eine wirksame und dabei selektive photodynamische Therapie sind noch nicht sicher bestimmbar <sup>[220]</sup>. Um die prinzipielle Wirksamkeit von BPD-MA nachzuweisen, verwandten wir die relativ hohe Dosis von 2 mg/kg KG BPD-MA. Für diese Sensibilisatordosis konnten Trauner et al. in der Synovialis mittels gewebeextrahierender Methoden eine BPD-MA-Konzentration von 351 ng/g messen. Damit liegt die Sensibilisatorkonzentration im Zielgewebe innerhalb des Bereiches (10-500 ng/g), der sich für die photodynamische Therapie von Neoplasien bewährt hat <sup>[221;222]</sup>.

Neben der Substanzmenge kann über die applizierte Lichtdosis steuernd auf die photodynamische Therapie eingewirkt werden. Im Vergleich der beiden von uns verwandten Lichtdosen zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der hohen Dosis. Während die Bestrahlung mit 180 J zwar in der Mehrzahl der Fälle eine selektive Nekrose von Teilen der Synovialis zur Folge hatte, war der Effekt und damit die Radikalität der Therapie unter Verwendung der höheren Dosis von 490 J deutlich gesteigert. Trauner et al. beobachteten in ihren oben beschriebenen Versuchen bei gleicher Sensibilisatorkonzentration (2 mg/kg KG BPD-MA) eine geringere Wirkung der photodynamischen Therapie. Als Ursache hierfür kommt neben der Verwendung einfacher Applikatoren mit ungünstigeren Abstrahlcharakteristika vor allem die vergleichsweise niedrige Lichtdosis von 100 J/cm<sup>2</sup> in Frage.

#### **4.6 Fluoreszenzmikroskopie**

Ein Grundprinzip der photodynamischen Therapie ist die selektive Anreicherung des Sensibilisators im Zielgewebe. Zur quantitativen Bestimmung des Anreicherungsverhaltens von BPD-MA im Gelenk führten wir daher fluoreszenzmikroskopische Messungen an verschiedenen Geweben durch. Während in den bradytrophen Geweben wie Knorpel, Meniskus und Ligament keine Substanzanreicherung nachweisbar war, fanden sich im Muskelgewebe

Werte, die denen der Synovialis entsprachen. In ihren Untersuchungen beobachteten Trauner et al. ebenfalls eine vermehrte BPD-MA-Akkumulation in der Muskulatur, die sie auch durch spektroskopische Messungen nach Farbstoffextraktion bestätigen konnten. Hierbei fanden sich vergleichbare BPD-MA-Konzentrationen in Muskelgewebe und Synovialis <sup>[221]</sup>. Obwohl in der Literatur bisher keine Muskelnekrosen nach photodynamischer Therapie mit BPD-MA beschrieben sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Bestrahlung aus der Gelenkhöhle austretendes Licht in periartikulärem Muskelgewebe angereichertes BPD-MA aktiviert und zu Narbenbildung oder Fibrose führt <sup>[221]</sup>. In einer Distributionsstudie verglichen Chowdhary et al. in einem AIA-Modell am Kaninchen die BPD-MA-Anreicherung in den verschiedenen Gelenkstrukturen bei intraartikulärer und systemischer Sensibilisatorapplikation. Nach intravenöser BPD-MA-Gabe fanden die Autoren ähnlich hohe Sensibilisatorkonzentrationen in Synovialgewebe, Muskulatur und Haut, keine Anreicherung hingegen in den bradytrophen Gelenkstrukturen. Im Gegensatz zu Muskelgewebe und Haut kam es in der Synovialis innerhalb der ersten vier Stunden zu einem raschen Konzentrationsabfall, weswegen die Autoren für eine frühzeitige Bestrahlung argumentieren. Die intraartikuläre Sensibilisatorgabe führte im Vergleich zur intravenösen Injektion zu einer geringeren BPD-MA-Akkumulation im periartikulären Muskelgewebe und in der Haut, allerdings waren geringe Mengen des Farbstoffes im Knorpelgewebe und den Bandstrukturen nachweisbar. Die intraartikuläre Sensibilisatorapplikation führte zu einer deutlich langsameren synovialen Elimination des im Vergleich zur systemischen Gabe ungleichmäßiger in den Geweben angereicherten BPD-MA. Die Autoren beschreiben ferner eine ausgeprägte BPD-MA-Aufnahme durch Endothelzellen der synovialen Mikrogefäße und diskutieren die Möglichkeit einer anoxieinduzierten Nekrose der Synovialmembran durch photodynamischen Gefäßverschluss <sup>[151]</sup>. Ob eine intraartikuläre Injektion anstelle der systemischen Applikation als risikoärmere Alternative in Frage kommt und eine vergleichbare Selektivität gewährleistet, muss gegebenenfalls in weiteren Studien geklärt werden.

Das Ausbleiben einer Anreicherung insbesondere im Gelenkknorpel stellt eine entscheidende Voraussetzung für die klinische Anwendung dar. Hierbei wurden

die theoretischen Überlegungen bestätigt, dass Knorpelgewebe aufgrund seiner niedrigen metabolischen Aktivität und Avaskularität keinen oder nur minimal Sensibilisator aufnimmt. Durch das sehr sauerstoffarme Milieu dürfte sich jedoch selbst im Falle einer Anreicherung der zelluläre Schaden in Grenzen halten, da die Entstehung der für den photodynamischen Effekt erforderlichen freien Sauerstoffradikale das Vorhandensein von Sauerstoff voraussetzt. So erwiesen sich hypoxische Zellen mit einer Oxygenation von weniger als 5% resistent gegenüber einer photodynamischen Therapie <sup>[123;223]</sup>.

Auch die übrigen Gelenkstrukturen wie Nerven, Ligamente und Menisci sollen die photodynamische Therapie möglichst unbeschadet überstehen. Die Schädigung peripherer Nerven könnte motorische oder sensorische Funktionsstörungen zur Folge haben. In Untersuchungen mit dem Photosensibilisator Tetraphenylporphinsulfonat konnten Winkelman et al. neurotoxische Auswirkungen der photodynamischen Therapie auf periphere Nerven nachweisen <sup>[224]</sup>. Unsere fluoreszenzmikroskopischen Messungen ergaben hingegen keinerlei Hinweis auf eine Aufnahme von BPD-MA in Nervengewebe. Auch im Bereich der intra- und periartikulären Bandstrukturen und der Menisci konnte weder eine BPD-MA-Anreicherung noch eine morphologische Schädigung nach photodynamischer Therapie beobachtet werden.

#### **4.7 Laser**

Die Verwendung eines Laser als Lichtquelle im Rahmen der photodynamischen Therapie bietet eine Reihe von Vorteilen. Durch seine Monochromasie lässt sich das von ihm erzeugte Anregungslicht auf die Absorptionscharakteristik des verwendeten Farbstoffes abstimmen. Zwar kann durch entsprechende Filterung Licht ausreichender Leistungsdichte auch durch Hochleistungslampen erzeugt werden, jedoch ist dieses immer breitbandiger als das Licht eines Lasers, so dass bei vergleichbarer photodynamischer Wirkung häufig unkontrollierbare Hyperthermieeffekte hinzutreten <sup>[225]</sup>.

Anders als bei chirurgischen Lasern, deren Licht zum Schneiden oder Koagulieren fokussiert wird, kommt es bei der photodynamischen Therapie darauf an, relativ energiearmes Licht möglichst gleichmäßig über die zu

behandelnde Fläche zu streuen, ohne thermische Schäden zu setzen <sup>[77]</sup>. Bisher wurden bei der photodynamischen Therapie fast ausschließlich Farbstofflasersysteme verwendet. Ihr Vorteil besteht in der Stimmbbarkeit, d.h. der Möglichkeit zur stufenlosen Variation der Abstrahlwellenlänge innerhalb eines Wellenlängenbandes. Im Gegensatz zu diesen herkömmlichen Lasern stehen seit kurzer Zeit Diodenlaser zur Verfügung, die sich durch einen günstigeren Preis, ein wesentlich handlicheres Format, längere Haltbarkeit sowie eine einfachere Handhabung auszeichnen. Diodenlaser erreichen inzwischen vergleichbare Leistungen wie konventionelle Laser und sind sofort nach dem Einschalten einsatzbereit. Da keine Gasflaschen gewechselt oder Spiegel justiert werden müssen, sind sie zudem deutlich wartungsfreundlicher als Gaslaser. Durch ihren hohen Wirkungsgrad benötigen Diodenlaser weder eine spezielle Stromversorgung noch eine aufwendige Wasserkühlung <sup>[225]</sup>. Im Gegensatz zu Farbstofflasern sind Diodenlaser nicht stimmbbar, d.h. sie besitzen ein definiertes und nicht variiertes Wellenlängenband von  $\pm 3$  nm. Stimmbare Laser sind dann unverzichtbar, wenn mit mehreren Photosensibilisatoren mit jeweils unterschiedlichem Absorptionsmaximum gearbeitet werden soll <sup>[226]</sup>. In der vorliegenden Studie wurde der Prototyp eines im Medizinischen Laserzentrum Lübeck entwickelten Diodenlasers mit einer Leistung von bis zu acht Watt eingesetzt.

#### **4.8 Applikatoren**

Neben der Entwicklung neuer Lasersysteme spielt auch die Weiterentwicklung auf dem Gebiet der Lichtapplikatoren eine wichtige Rolle für die Optimierung der photodynamischen Therapie, insbesondere wenn es um die Bestrahlung von Hohlräumen geht. Das Licht kann am Ende des Lichtleiters entweder über eine Linse fokussiert oder mit Hilfe von Lichtdiffusoren der Geometrie des Zielorgans angepasst werden. In beiden Fällen erweist sich eine intraartikuläre Lichtapplikation aufgrund der Komplexität synovialer Gelenke als schwierig. Da die Geometrie dieser Gelenke nicht hinreichend erforscht ist und bisher keine befriedigenden Modelle existieren, ist eine selektive Bestrahlung einzelner Gelenkstrukturen und insbesondere eine adäquate Dosimetrie kaum möglich. Von den unterschiedlichen Geweben wie Knorpel, Ligament und Synovium soll

letzteres möglichst lückenlos behandelt, die übrigen hingegen ausgespart werden. Anzustreben ist unter diesen Voraussetzungen eine homogene Bestrahlung der gesamten Gelenkhöhle, wobei die gewünschte Selektivität durch das Anreicherungsverhalten des Photosensibilisators gewährleistet wird [227]. In Messungen an Gelenkphantomen erreichten wir die beste Lichtverteilung durch zirkuläre Anordnung mehrerer ringförmig abstrahlender Fasern [228]. Während die Applikation mehrerer Fasern für die Behandlung größerer Gelenke wie z.B. Kniegelenke durchaus sinnvoll erscheint, scheidet sie aufgrund Platzmangels für die Anwendung im Bereich kleiner Gelenke aus. Neben der Bestrahlung selbst bereitet auch die Therapiekontrolle gewisse Schwierigkeiten. Ist bei der Behandlung größerer Gelenke sowohl eine visuelle Kontrolle über ein Arthroskop als auch eine Fluoreszenzmessung mittels zusätzlich eingebrachter Messfasern möglich, so kommen diese Methoden bei der Behandlung kleiner Gelenke mit den derzeit zur Verfügung stehenden Mitteln aufgrund Platzmangels nicht in Frage.

#### **4.9 Dosimetrie**

Grundvoraussetzung zum besseren Verstehen und Planen photodynamischer Behandlungsmethoden sind detaillierte Kenntnisse darüber, wie der Singulett-Sauerstoff auf die verschiedenen Gewebe wirkt und welche Parameter geändert werden können, um eine maximale Schädigung pathologisch veränderten Gewebes unter Schonung des gesunden Gewebes zu erzielen. Neben den relativ einfach zu ändernden Variablen Sensibilisatorkonzentration und Lichtdosis, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, existieren eine Reihe weiterer die Behandlung beeinflussende Faktoren. Hierzu zählen in erster Linie die Bioverfügbarkeit und das Anreicherungsverhalten des Photosensibilisators, die Gefäß- und damit die Sauerstoffversorgung sowie die optischen Eigenschaften des behandelten Gewebes. Für eine ideale Dosimetrie müssten alle diese Faktoren berücksichtigt werden. Da ein derartiger Aufwand nicht praktikabel ist, gilt es nach Möglichkeiten zu suchen um mit einfachen Mitteln zuverlässige Aussagen über die Konzentration des Photosensibilisators im Verlauf der Bestrahlung treffen zu können. Während die zu applizierende Sensibilisatormenge in der Regel anhand der Körperoberfläche ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) oder

weniger genau über das Körpergewicht (mg/kg) berechnet wird, lässt sich hiermit noch keinerlei Aussage über die tatsächliche Substanzkonzentration am Zielort treffen. Darüber hinaus beschreiben mehrere Autoren große Unterschiede (Faktor fünf und mehr) sowohl des intra- als auch interindividuellen Anreicherungsverhaltens<sup>[169]</sup>. Eine qualitative Bestimmung der Sensibilisatorkonzentration lässt sich nur mit Hilfe gewebeextrahierender Verfahren nach Biopsieentnahme bewerkstelligen. Diese Methoden sind jedoch in der klinischen Praxis aus kosten-, zeit- und methodischen Gründen kaum durchführbar.

Die Bestrahlung betreffend kann der Operateur Lichtenergie, Bestrahlungsdauer und den Ort der Bestrahlung variieren, wobei das eingebrachte Licht bei intraartikulärer Anwendung aufgrund von Reflexionen nicht auf die Zielregion beschränkt bleibt.

Ein vielversprechender Ansatz zur Dosimetrie bei der photodynamischen Therapie ist die Bestimmung der relativen Sensibilisatorkonzentration mit Hilfe der quantitativen Fluoreszenzspektroskopie (auch Laserinduzierte Fluoreszenz – LIF) *in vivo*<sup>[136]</sup>. Dieses System ermöglicht ein Monitoring der Sensibilisatorkonzentration sowie der Konzentration eventueller Photoprodukte im untersuchten Gewebe in Echtzeit, d.h. während der Behandlung<sup>[134-136]</sup>. Die Messung kann beliebig oft an derselben Stelle und ohne Schädigung des Gewebes wiederholt und durch endoskopische Techniken auch in kleinen Hohlräumen durchgeführt werden<sup>[168]</sup>.

Um Informationen über das Anreicherungsverhalten sowie das Ausbleichen von BPD-MA in den verschiedenen Gelenkstrukturen zu erhalten, führten wir intraoperative Fluoreszenzmessungen durch. Die eigens hierfür entwickelte 90°-Fluoreszenzmessfaser erlaubt gegenüber herkömmlichen 0°-Messfasern eine einfachere Handhabung und kann über einen kleineren Zugang eingebracht werden. Die geringere Signalausbeute der Faser lässt sich durch Mitteln mehrerer Messungen leicht kompensieren. Mit zunehmendem Abstand der Messfaser zum Gewebe ändert sich sowohl die Signalintensität als auch die Form der LIF-Spektren. Dieser Effekt tritt jedoch nur bei größeren Abständen auf und ist für die in unseren Untersuchungen durchgeführten Kontakt- bzw. Fastkontaktmessungen irrelevant.

Durch Bestimmung der relativen Sensibilisatorkonzentration im Zielgewebe lässt sich die individuell benötigte Lichtdosis abschätzen und somit jede einzelne Behandlung optimieren. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass die gemessenen Werte keinesfalls eine quantitative Bestimmung der Sensibilisatorkonzentration ermöglichen. Dies liegt an der Vielzahl von Faktoren, welche die Fluoreszenz beeinflussen, wie z.B. dem Aggregationszustand des Sensibilisators, der Mikroumgebung des Farbstoffmoleküls (Sauerstoffgehalt, pH), den optischen Eigenschaften des behandelten Gewebes und nicht zuletzt dem Kapillarreichtum der untersuchten Region <sup>[229]</sup>. Während wir mit unseren intraoperativen Messungen zwar vergleichende Aussagen bezüglich der Fluoreszenzintensität und damit der Sensibilisatormenge in den verschiedenen Geweben treffen konnten, hing der Absolutwert für ein und dasselbe Gewebe aufgrund der inhomogenen Verteilung des BPD-MA stark von der genauen Positionierung der Messfaser ab. Ein weiteres Problem stellte der Umstand dar, dass mit unserer Versuchsanordnung die Bestrahlung für jede Messung unterbrochen, die Messfaser eingeführt und erneut positioniert werden musste. Die wiederholte Messung an exakt derselben Stelle war damit kaum möglich. Eine Verbesserung der Ergebnisse konnte jedoch durch wiederholte Messungen und anschließendes Mitteln der Ergebnisse erzielt werden, wobei die Faser jedes Mal geringfügig verschoben wurde.

Bei Fluoreszenzmessungen an Mundschleimhaut, Ösophagus und Bronchien von Patienten mit Ösophagus- und Bronchialkarzinomen nach Injektion von mTHPC (Foscan<sup>®</sup>) beobachteten Zellweger et al. mit einem vergleichbaren LIF-System Fluoreszenzunterschiede bei wiederholten Messung am selben Patient von bis zu 59% vom Mittelwert. Die Streubreite war bei Messungen an der leicht zugänglichen Mundhöhle im Vergleich zu Ösophagus und Bronchien deutlich geringer. Zwischen verschiedenen Patienten lagen die Unterschiede im Bereich einer Größenordnung. Die Autoren nennen als Ursache metabolische Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden und beschreiben eine statistische Methode zur Korrelation der Werte mehrerer Patienten <sup>[229]</sup>.

Die Fluoreszenzmessungen der vorliegenden Arbeit zeigen eine deutliche Mehranreicherung des Sensibilisators in der Synovialis sowie der Muskulatur im

Vergleich zu Knorpel und Hoffa-Fettkörper. Quantitative Aussagen lassen sich aufgrund der Versuchsanordnung und der zu geringen Stichprobenzahl nicht treffen.

Neben dem Anreicherungsverhalten spielt für die Dosimetrie vor allem die Degradation, das sogenannte Photobleaching des Sensibilisators eine entscheidende Rolle. Photobleaching bezeichnet die Inaktivierung des Photosensibilisators durch Interaktion mit Singulett-Sauerstoff oder durch direkte photochemische Reaktionen <sup>[136]</sup>. Die Farbstoffmoleküle werden unter Lichteinwirkung chemisch verändert und verlieren ihre Fähigkeit zu fluoreszieren. Das Ausmaß der Photodegradation kann somit anhand der Fluoreszenzabnahme verfolgt werden und ist proportional zur Lichtexposition <sup>[134]</sup>. Ist der gesamte Sensibilisatorvorrat im Gewebe durch diesen Prozess aufgebraucht, führt ein Mehr an Photonen zu keinem weiteren Effekt. In der Praxis ergibt sich aus diesem selbstlimitierenden Prinzip ein Schutz vor Anwendung zu hoher Lichtdosen. In unseren Versuchen zeigte sich unter Bestrahlung eine dosisabhängige Reduktion der BPD-MA-Fluoreszenz, die offensichtlich mit dem histologischen Effekt korrelierte. Während bei der hohen Lichtdosis ein vollständiges Ausbleichen und ein ausgeprägter histologischer Effekt zu beobachten waren, zeigte sich bei der niedrigen Lichtdosis kein vollständiges Ausbleichen und ein geringer ausgeprägter histologischer Effekt. In Versuchen zur photodynamischen Therapie mit BPD-MA bei Ratten mit metastasierten Adenokarzinomen beobachteten Papainoannou und Maarek nach 30sekündiger Bestrahlung eine Reduktion der Fluoreszenz um 80% <sup>[230]</sup>. Iinuma et al. beschreiben Versuche zum Photobleaching von BPD-MA an einem Blasenmormodell bei Ratten. Nach intravenöser Injektion von 1 mg/kg Körpergewicht BPD-MA wurden die Tiere mit 30 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Hierbei beobachteten die Autoren die Bildung eines neuen Photoproduktes mit einem Fluoreszenzpeak bei 650 nm <sup>[231]</sup>. Bei den im Rahmen unserer Arbeit während und nach Bestrahlung durchgeführten Messungen konnte im Bereich zwischen 530 und 670 nm kein entsprechender Fluoreszenzpeak nachgewiesen werden. Durch adäquate Dosierung des Photosensibilisators lässt sich unter Verwendung ausreichend hoher Lichtmengen ein selektiver Therapieeffekt auch in größeren Gewebetiefen dadurch erzeugen, dass bei vollständigem



Ausbleichen die photodynamische Dosis über der Nekroseschwellendosis des pathologisch veränderten Gewebes, aber unter der Nekroseschwellendosis des gesunden Gewebes liegt <sup>[232]</sup>. Kompliziert wird dieser Zusammenhang für unsere Fragestellung durch die Tatsache, dass sich in der Muskulatur offenbar vergleichbare Mengen Sensibilisator anreichern wie in der Synovialis, ein destruktiver Effekt hier jedoch keinesfalls erwünscht ist.

Zytotoxische Sauerstoffradikale entstehen bei der photodynamischen Therapie bei Absorption von Photonen durch funktionsfähigen Photosensibilisator. Wenn es also nicht gelingt, den Sensibilisator selektiv in der Synovialis im Vergleich zur Muskulatur anzureichern, so muss der Lichtflux im Muskelgewebe auf ein Minimum reduziert werden. Ein gewisser Schutz lässt sich bereits durch eine intraartikuläre Lichtapplikation erzielen, da die Muskulatur hierbei nicht direkt der Bestrahlung ausgesetzt wird. Bei Anregungswellenlängen um 690 nm kommt es etwa alle 2-3 mm zur Halbierung des Lichtflusses im Gewebe, so dass die Anzahl der das Muskelgewebe erreichenden Photonen bereits deutlich reduziert ist. Als Grenze für die mit adäquaten Lichtdosen erreichbare Behandlungstiefe finden sich in der Literatur Angaben zwischen 6 und 8 mm <sup>[233]</sup>. Während die Dicke der Synovialis mit 0,1 bis 5 mm innerhalb dieses Bereiches liegt, dürfte eine stärkere Schädigung von Muskelgewebe aufgrund der relativ großen Entfernung vom Applikator weitgehend ausgeschlossen sein <sup>[234]</sup>.

Ein Hauptproblem der lokalen photodynamischen Therapie zur Behandlung der chronischen Polyarthrititis ist wie bereits weiter oben erwähnt eine kontrollierte und homogene Bestrahlung der Gelenkstrukturen <sup>[99;235]</sup>. Unsere Versuche zeigen, dass unter Verwendung therapeutischer Lichtdosen das Ausmaß des Photobleaching messbar ist und mit den histologischen Effekten korreliert. Für den klinischen Einsatz wäre die Verfügbarkeit einer Online-Dosimetrie erstrebenswert, etwa in Form eines in den Applikator integrierten Fluoreszenzdetektors.

#### **4.10 Effekt**

Welche Mechanismen den Wirkungen der photodynamischen Therapie in der Behandlung der chronischen Polyarthrititis zugrunde liegen ist bisher nicht

hinreichend bekannt. Die beobachteten Therapieerfolge sind größtenteils durch eine synoviale Nekrose und damit einem der herkömmlichen Synovektomie vergleichbaren Effekt erklärbar. Neben diesen lokalen Zellschädigungen werden in der Literatur aber auch entzündungshemmende und immunmodulierende Effekte diskutiert <sup>[236-238]</sup>.

Die Auswertung unserer Kontrollgruppen zeigte weder für die intravenöse BPD-MA-Applikation ohne nachfolgende Bestrahlung, noch für die intraartikuläre Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 470 J ohne vorhergehende BPD-MA-Injektion eine morphologische Veränderung der Gelenkstrukturen im Vergleich zu den unbehandelten Gelenken. Auch Ratkay et al. und Trauner et al. finden in ihren Untersuchungen zur transdermalen und perkutanen photodynamischen Therapie keinerlei Hinweis auf einen Effekt durch alleinige Sensibilisator- bzw. alleinige Lichtapplikation. Demgegenüber sind in der Literatur einige Berichte über die positive Wirkung einer niederenergetischen Laserbestrahlung auf rheumatisch veränderte Gelenke beschrieben <sup>[239;240]</sup>. Amano et al. untersuchten den histologischen Effekt einer transdermalen Laserbestrahlung an 14 Kniegelenken von Patienten mit chronischer Polyarthritits, bei denen die Implantation einer Totalendoprothese geplant war. Die Bestrahlung wurde mit einem Gallium-Aluminium-Arsenid-Laser mit der Wellenlänge 790 nm und einer Ausgangsleistung von 10 mW an sechs verschiedenen lateralseitigen Punkten für je 80 Sekunden und über sechs Tage durchgeführt. Die histologische Untersuchung der so behandelten Synovialmembran zeigte eine Abflachung der Epithelzellen, Verminderung der villösen Proliferationen, Abnahme der Gefäßdurchmesser sowie eine Reduktion der Entzündungszellen <sup>[241]</sup>.

Unsere Studie konzentrierte sich auf die Induktion einer Nekrose der entzündlich veränderten Synovialmembran. Wie eine Vielzahl von Arbeiten nahe legen, scheint dies jedoch nicht der einzige Wirkmechanismus bei der photodynamischen Therapie mit BPD-MA zu sein. So konnte *in vitro* die selektive Aufnahme von BPD-MA durch aktivierte Immunzellen wie Makrophagen, T-Helferzellen und HLA-DR2-positive Zellen nachgewiesen werden <sup>[99;221;242;243]</sup>. Ratkay et al. beobachteten bei transdermalen photodynamischer Lasertherapie (tPDT) in einem AIA-Tiermodell einen immunmodulierenden Effekt. In weitergehenden Versuchen erzielten sie durch

tPDT mit LED's als Lichtquelle eine Reduktion der subsynovialen Entzündung sowie der Pannusbildung <sup>[244]</sup>. In Übereinstimmung mit Untersuchungen von Richter et al. kam es dabei zu keiner Hautsensibilisierung <sup>[245;246]</sup>. North et al. konnten durch photodynamische Therapie mit BPD-MA in einem heterogenen Zellgemisch selektiv diejenigen aktivierten Lymphozyten zerstören, die entweder IL-2-Rezeptoren oder HLA-DR2 exprimierten <sup>[247]</sup>. Die Arbeitsgruppe um Ratkay beschreibt eine ausgeprägte Apoptose von T-Helferzellen nach photodynamischer Therapie mit BPD-MA <sup>[244]</sup>.

Neben der direkten Zerstörung von Zellen scheinen noch weitere Mechanismen für die beschriebene Immunmodulation verantwortlich zu sein, da diese auch bei Sensibilisator- und Lichtdosen beobachtet wurde, die nicht zum Zelluntergang führen. Ratkay et al. postulieren eine modifizierte Expression von Adhäsionsmolekülen durch veränderte Signaltransduktion sowie die Induktion einer Apoptose in Makrophagen und T-Helferzellen. In ihren Versuchen zur tPDT am Arthritismodell beobachteten die Autoren kaum Nekrosen, jedoch eine deutlich erhöhte Apoptoserate in der behandelten Synovialis. Anders als bei der perkutanen Lichtapplikation würde über diesen Mechanismus kein zusätzlicher Entzündungsreiz durch nekrotische Zelltrümmer gesetzt <sup>[244]</sup>. Inwieweit die bei der perkutanen Technik erzeugten intraartikulären Nekrosen zu einer sekundären Entzündungsreaktion führen, die unter Umständen weitere Maßnahmen wie eine arthroskopische Spülung oder die Instillation von Corticosteroiden erfordert, wurde bisher nicht untersucht. In der vorliegenden Studie war die Nachbeobachtungszeit wahrscheinlich zu kurz um entsprechende Reaktionen beobachten zu können. Darüber hinaus dürfte sich die Abgrenzung einer derartigen Reaktion von der durch das persistierende Antigen des Tiermodells induzierten Entzündung schwierig gestalten, da dieses durch die Behandlung nicht eliminiert wird. Untersuchungen zur Chemo- und Radiosynoviorthese haben gezeigt, dass das Ausmaß einer sekundären Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von der Menge der nekrotischen Zelltrümmer und der Entzündungsbereitschaft des Patienten stark variieren kann <sup>[221]</sup>. Ein persistierender Entzündungsreiz ist auch bei mangelnder Radikalität zu erwarten. Unsere Studie entsprach einer subtotalen Synovektomie, da nur der obere mediale Rezessus bestrahlt wurde. Es ist

daher davon auszugehen, dass die Synovialis der unbehandelten Gelenkanteile weiterhin Entzündungsmediatoren freisetzt und so zur Entzündungspersistenz führt.

Die geschilderten Eigenschaften lassen die tPDT als eine sehr elegante Behandlungsmethode erscheinen, insbesondere beim Einsatz an kleinen Gelenken wie z.B. im Bereich der Hände. Aus der Tatsache, dass bei der tPDT das Gelenk nicht eröffnet werden muss, resultiert darüber hinaus ein deutlich vermindertes Infektionsrisiko in der klinischen Anwendung.

Trotz all dieser Vorteile ist der klinische Erfolg einer tPDT in der Therapie der chronischen Polyarthrititis fraglich. Bisher konnte nicht gezeigt werden, dass die oben beschriebene Immunmodulation dauerhaft ist bzw. wie häufig die Behandlung wiederholt werden muss, um einen anhaltenden Effekt zu erzielen [144]. In Versuchen zur Strahlungsflussdichte zwischen Knochen und Kapsel bzw. Knochen und Haut wurden bei einseitig flächiger Bestrahlung 85% der eingebrachten Leistung bereits in der Haut umgesetzt. Dies bedeutet, dass nur 15% der Strahlungsflussdichte die Synovialis überhaupt erreichen. Des Weiteren stützen sich die beschriebenen Ergebnisse zur tPDT auf Versuche an Mäusen, deren Haut wesentlich dünner ist als die des Menschen. Um einen therapeutischen Effekt zu erzielen, muss demnach entweder mit sehr hohen Leistungen oder langer Bestrahlungszeit gearbeitet werden. Für die bei der photodynamischen Therapie mit BPD-MA übliche Solldosis von  $100 \text{ J/cm}^2$  errechnet sich unter Verwendung aktuell verfügbarer Lasersysteme (Diodenlaser mit drei Watt Ausgangsleistung) eine Gesamtbestrahlungszeit von über 100 min. Bei adäquater allseitiger Bestrahlung mit der Lichtdusche ergab sich für ein Testsystem mit 164 Photodioden und einer Ausgangsleistung von  $30 \text{ mW/cm}^2$  aufgrund der niedrigeren Gesamtleistung sogar eine Bestrahlungszeit von über 185 min. Bei einer sechsfach höheren Lichtdosis auf der Haut im Vergleich zum Gelenk sind Lichtüberempfindlichkeitsreaktionen zu befürchten. Ferner muss insbesondere bei der flächenhaften Lichtapplikation mit derart hohen Dosen von thermischen Schädigungen der Haut ausgegangen werden, da hier wie bereits erwähnt 85% der Ausgangsbestrahlungsstärke absorbiert werden, was bei der oben genannten Solldosis einer Leistung von  $817 \text{ mW/cm}^2$  entspricht. Untersuchungen zur Phototoxizität an Kaninchen nach

photodynamischer Therapie mit 2 mg/kg KG BPD-MA und Hautbestrahlung mit  $30 \text{ J/cm}^2$  bei  $127 \text{ mW/cm}^2$  führte zur Abblassung der behandelten Haut mit nachfolgendem Ödem, Purpura und Unterbrechung des Haarwuchses bis hin zur Bildung atrophischer Narben, wenn die Bestrahlung innerhalb von fünf Stunden nach Sensibilisatorapplikation erfolgte. Eine Bestrahlung nach mehr als fünf Stunden führte hingegen nur zu geringen und vorübergehenden Hautirritationen <sup>[248]</sup>.

Während die tPDT also zu einer starken Belastung der Haut führt, ist die in der oben beschriebenen Untersuchung an der Synovialis wirkende Bestrahlungsstärke mit  $9 \text{ mW/cm}^2$  für eine schnelle und vollständige Umsetzung des Sensibilisators zu gering. Damit erweist sich die tPDT als lokale Therapie im Sinne einer photodynamischen Synovektomie für die klinische Anwendung aufgrund der geringen Effektivität und der langen Bestrahlungszeiten als unpraktikabel. Die Entwicklung stärkerer Photodioden könnte die tPDT mit der „Lichtdusche“ für diese Therapieform jedoch in Zukunft interessant werden lassen.

Der zuvor diskutierte Sachverhalt vergleicht die lokale Behandlung der synovialen Strukturen mittels transdermaler und perkutaner photodynamischer Therapie. Sollte die Wirkung der tPDT nicht auf einer direkten Beeinflussung der veränderten Synovialmembran, sondern auf einer systemischen Wirkung, etwa auf im Blutkreislauf zirkulierende Entzündungszellen beruhen, wäre der Einsatz der tPDT durchaus sinnvoll. Zwischen 10 und 20% des gesamten Blutvolumens befinden sich ständig in der kutanen Mikrozirkulation, ein kompletter Umsatz findet alle vier bis sechs Minuten statt. Mit Immunzellen assoziiertes BPD-MA könnte somit problemlos transkutan photoaktiviert werden. Ob die Grundvoraussetzungen (Immunmodulation über einen systemischen Wirkmechanismus) für einen solchen Therapieansatz gegeben sind muss jedoch zunächst in entsprechenden Studien gezeigt werden.

Eine Erhöhung des photodynamischen Effektes bei transdermaler aber auch perkutaner photodynamischer Therapie könnte sich durch fraktionierte Bestrahlung erreichen lassen. Verschiedene Studien belegen, dass durch kurze Bestrahlungspausen ein stärkerer photodynamischer Effekt erzielt werden kann <sup>[249-251]</sup>. Ursächlich liegt diesen Beobachtungen wahrscheinlich ein Ausgleich

des während der Bestrahlung entstehenden Sauerstoffdefizits zugrunde. Als möglicher Vorteil ergibt sich eine Verminderung der benötigten Sensibilisator- bzw. Lichtdosis. Darüber hinaus führen fraktionierte Bestrahlungen unter Umständen zur Erhöhung der Selektivität der photodynamischen Therapie, da sie das Ausbleichen des Sensibilisators im normalen Gewebe verstärken und so zu dessen Schonung beitragen <sup>[115]</sup>.

In Anlehnung an klinische Erfahrungen mit BPD-MA zur Tumor-PDT führten wir die Bestrahlung drei Stunden nach intravenöser Applikation des Photosensibilisators durch. Zu diesem Zeitpunkt ist die maximale Konzentration in Tumoren beschrieben, danach kommt es zu einem raschen Abfall des Sensibilisators <sup>[252]</sup>. Aufgrund des schnellen Absinkens der Sensibilisator-konzentration im Serum und Tumorgewebe und wegen seiner relativ geringen Tumorselektivität hat sich BPD-MA zur photodynamischen Behandlung von Tumoren nicht durchgesetzt. In LIF-Studien zur Verteporfinanreicherung in der Synovialis fanden Trauner et al. in einer unserem Tiermodell entsprechenden Studie bereits 15-30 Minuten nach Injektion maximale Sensibilisatorkonzentrationen mit langsamem Abfall über sechs Stunden, während die Serumkonzentration nach ein bis zwei Minuten ein Maximum erreichte und anschließend sehr schnell absank <sup>[221]</sup>.

#### **4.11 Fazit und Zukunftsperspektiven**

Die photodynamische Lasertherapie ist ein vielversprechendes neuartiges Therapiekonzept zur minimal-invasiven lokalen Behandlung der chronischen Synovialitis. Nach Injektion eines Photosensibilisators genügt die Lichtapplikation über eine Quarzfaser, die über eine Nadel in das Gelenk eingeführt werden kann, um eine selektive Zerstörung der entzündlich veränderten Gelenkstrukturen hervorzurufen.

Während diese Methode im Tierversuch ausgezeichnete Ergebnisse liefert, müssen vor einem routinemäßigen klinischen Einsatz einige weitere Fragen geklärt werden.

Von grundlegender Bedeutung ist die Übertragbarkeit der Tierversuche auf die Verhältnisse beim Menschen. Insbesondere die Pathologie der Arthritis, aber auch Gelenkgeometrie und andere Faktoren korrelieren nur bedingt. Unklar ist

bisher auch der für die beobachteten Wirkungen in erster Linie verantwortliche Mechanismus. In Frage kommt neben der in unseren Versuchen beobachteten direkten Zerstörung der entzündlich veränderten Synovialis auch eine hypoxische Schädigung des Zielgewebes durch Störung der Mikrovaskularisation oder eine Wirkung durch Modulation der Immunantwort. Klinischen Studien vorbehalten sind unter anderem Erkenntnisse über Art der Bestrahlung (transdermal oder intraartikulär), Sensibilisatorapplikation (systemisch oder lokal), Zeitpunkt der Anwendung im Krankheitsverlauf, Auswahl behandelbarer Gelenke (große und/oder kleine Gelenke) sowie Kombination der photodynamischen Therapie mit etablierten chirurgischen oder medikamentösen Therapieverfahren.

Als entscheidende Schwierigkeit des Verfahrens ist neben einer homogenen Bestrahlung der intraartikulären Strukturen die Bereitstellung einer effektiven Dosimetrie anzusehen. Nur so kann ein reproduzierbarer Behandlungserfolg garantiert und eine Überbehandlung verhindert werden.

Die Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der Lasertechnologie sowie exaktere Kenntnisse der Geometrie menschlicher Gelenke durch Verbesserung bildgebender Verfahren lassen eine Optimierung der lokalen photodynamischen Therapie zur Behandlung der chronischen Polyarthritiden erwarten. Erstrebenswert wäre in diesem Zusammenhang beispielsweise die Konstruktion eines Lichtapplikators mit integriertem Fluoreszenzdetektor um eine Online-Dosimetrie zu ermöglichen.

Durch die Einführung neuer Photosensibilisatoren wird eine höhere Effektivität durch größere Selektivität bei langwelligeren Absorptionsmaxima und kürzerer Hautsensibilisierung denkbar. Mit den genannten Verbesserungen bietet die photodynamische Therapie ein Potential für die zukünftige minimalinvasive Behandlung chronisch entzündlicher Gelenkerkrankungen.

## 5. Zusammenfassung

Die photodynamische Therapie (PDT) hat sich in verschiedenen Tiermodellen als vielversprechender Ansatz zur Behandlung entzündlicher Arthritiden erwiesen. Das Prinzip der photodynamischen Therapie beruht hierbei auf der Applikation einer photosensiblen Substanz und deren präferentiellen Anreicherung in der entzündeten Synovialis. Die anschließende Bestrahlung des betroffenen Areals mit Licht einer für den Photosensibilisator charakteristischen Wellenlänge führt zur selektiven Zerstörung der erkrankten Strukturen.

Die vorliegende Studie untersucht die photodynamische Wirkung des Photosensibilisators Benzoporphyrinderivat (BPD-MA) im Tiermodell der chronischen Polyarthritis. Ziel der Arbeit war die Darstellung der Effekte unterschiedlicher Licht- und Sensibilisatordosen auf die Synovialmembran und die umliegenden Strukturen sowie die Entwicklung eines Konzeptes zur intraartikulären Dosimetrie.

Als Tiermodell diente die bereits in den Vorversuchen erfolgreich eingesetzte Antigeninduzierte Arthritis des Kaninchens. Die Arthritisinduktion erfolgt hierbei durch systemische Immunisierung mittels einer Lösung aus IgG in komplettem Freund-Adjuvans und um drei Wochen verzögerte intraartikuläre IgG-Boosterinjektion. In die Studie waren 38 Versuchstiere eingeschlossen.

Für die photodynamische Therapie wurde den Tieren 2 mg/kg BPD-MA intravenös injiziert. Nach drei Stunden erfolgte die Bestrahlung mit einem Diodenlaser der Wellenlänge 690 nm bei zwei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen (180 J und 470 J), wobei die Applikatoren entweder nach Punktion durch ein Kanülenlumen intraartikulär platziert oder nach Mini-Arthrotomie am eröffneten Kniegelenk positioniert wurden. Als Kontrolle dienten 14 Tiere, die im Anschluss an die Arthritisinduktion entweder keine BPD-MA-Injektion erhielten oder nicht bestrahlt wurden.

Während der Bestrahlung wurden semiquantitative Messungen der Sensibilisatorfluoreszenz mit einer neuentwickelten Fluoreszenzmessfaser durchgeführt.



Zur quantitativen Bestimmung der Sensibilisatoranreicherung in den unterschiedlichen Gelenkstrukturen wurden bei einem Tier drei Stunden nach intravenöser BPD-MA-Injektion Gewebeproben für spektroskopische Messungen entnommen.

Nach Opferung der übrigen Kaninchen am 14. postoperativen Tag wurden Gewebeproben entnommen und für die histologische Untersuchung aufbereitet.

Die mikroskopische Untersuchung der arthritisinduzierten, aber nicht photodynamisch behandelten Gelenke zeigte bei allen Tieren eine ausgeprägte Proliferation des synovialen Deckzellayers auf 15-30 Zellagen, eine deutliche Hypervaskularisation sowie ein dichtes lymphoplasmazelluläres Infiltrat.

Bei den Versuchen zur photodynamischen Therapie korrelierte der histologische Effekt mit der Lichtdosis. Die Gesamtdosis von 470 J führte bei sechs von neun behandelten Tieren zu einer teilweisen oder vollständigen Ablösung der Synovialis vom darunter liegenden Gewebe mit ausgeprägter synovialer Nekrose. In einem Fall reichte die Nekrose in die angrenzende Muskulatur. Bei den übrigen drei Tieren dieses Kollektivs wurden entsprechende Veränderungen beobachtet, allerdings von geringerem Ausmaß. Die Behandlung mit der niedrigeren Gesamtdosis von 180 J führte bei neun von 15 Tieren ebenfalls zu synovialen Nekrosen. Im Gegensatz zur hohen Dosis war der synoviale Zellschaden hierbei jedoch weit geringer ausgeprägt. Bei sechs Tieren dieser Behandlungsgruppe führte die photodynamische Therapie zu keinen signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Kontrolltieren.

An den bradytrophen Gelenkstrukturen wurde unter allen oben genannten Behandlungsregimen keinerlei Schädigung beobachtet. Der Vergleich zwischen Bestrahlung am eröffneten Kniegelenk und der intraartikulären Lichtapplikation ergab keinen signifikanten Unterschied.

Die fluoreszenzspektroskopischen Messungen zeigten vor Bestrahlungsbeginn einen für BPD-MA charakteristischen Fluoreszenzpeak bei 690 nm, der sich im Bestrahlungsverlauf proportional zur Lichtdosis verringerte. Während die Gesamtdosis von 490 J zu einem vollständigen Verschwinden der Fluoreszenz führte, war bei der niedrigeren Dosis (180 J) ebenfalls eine

sukzessive Reduktion der Fluoreszenz nachweisbar, allerdings in geringerem Ausmaß und mit niedrigem Fluoreszenz Gipfel am Bestrahlungsende.

Die photodynamische Therapie stellt ein neues Verfahren zur Behandlung chronisch-entzündlicher Gelenkerkrankungen dar. Ihre Vorteile sind Effektivität und maximale Selektivität bei gleichzeitig minimaler Invasivität. BPD-MA zeichnet sich gegenüber den Photosensibilisatoren der ersten Generation durch ein höheres Absorptionsmaximum (690 nm) und der damit verbundenen größeren Penetrationstiefe des Anregungslichtes aus. Mit Diodenlasern stehen vergleichsweise günstige und unkomplizierte Lichtquellen für die photodynamische Therapie mit BPD-MA zur Verfügung. Darüber hinaus verspricht die deutlich verkürzte Hautsensibilisierung eine höhere Akzeptanz in der klinischen Anwendung. Ein Hauptproblem der lokalen photodynamischen Therapie in der Behandlung der chronischen Polyarthritiden ist die kontrollierte und homogene Bestrahlung der intraartikulären Strukturen. Wie unsere Versuche zeigen, kann das Ausbleichen des Sensibilisators bei therapeutischen Lichtdosen *in vivo* gemessen werden und korreliert mit dem histologischen Effekt. Dieses sogenannte „photobleaching“ bietet damit einerseits einen Schutz vor Unter- oder Überbehandlung, andererseits ist auf dieser Grundlage die Etablierung einer Online-Dosimetrie, etwa in Form eines in den Lichtapplikator integrierten Fluoreszenzdetektors denkbar.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Keitel W, Häntzschel H, Gromnica-Ihle E, Kalden JR, Genth E, Raspe HH, Mathies H, Schneider M, Warnatz H, Zacher J. Qualitätssicherung in der Rheumatologie. Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie. Internet. 2001. [http://www.rheumanet.org/qs\\_dgrh](http://www.rheumanet.org/qs_dgrh).
2. Miehle W. Nomenklatur und Geschichte. In: Fehr K, Miehle W, Schattenkirchner M, Tillmann K (Hrsg.) *Rheumatologie in Praxis und Klinik*. Stuttgart: Thieme, 1989; 1-9.
3. Copeman WSC, Scott JT. Historical. In: Scott JT (Hrsg.) *Copeman's Textbook of the Rheumatic Diseases*. Edinburgh-London-New York: Churchill Livingstone, 1978; 3-13.
4. Moll W. Geschichte des Rheumatismus. In: Schoen R, Böni A, Miehle K (Hrsg.) Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1970; 4-10.
5. Snorrason E. Landre-Beauvais and his goutte asthenique primitive. *Acta Med Scand* 1952; 142: 115-118.
6. Benedek TG, Rodnan GP. A brief history of the rheumatic diseases. *Bull Rheum Dis* 1982; 32: 59-68.
7. Garrod AB. The great practical importance of separating rheumatoid arthritis from gout. *Lancet* 1892; 2: 1033-1037.
8. Harris ED. History and epidemiology of Rheumatoid Arthritis: How long has it affected us, and who is at risk? In: Harris ED, Barnett GD (Hrsg.) *Rheumatoid Arthritis*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996; 21-38.
9. Bube K-U. Untersuchungen zur Langzeit-Compliance von Basistherapeutika in der Therapie der chronischen Polyarthrit. Dissertation, Medizinische Poliklinik der Universität München; 1993.
10. Sundry JS, Haynes BF. Rheumatoid Arthritis. In: Rose NR, Mackay IR (Hrsg.) *The autoimmune diseases*. San Diego, CA: Academic Press, Inc., 1988; 343-380.
11. McInnes IB, Capell HA. Management of rheumatoid arthritis. *Scott Med J* 1995; 40: 35-36.
12. Callahan LF, Pincus T. Formal education level as a significant marker of clinical status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 1346-1357.
13. Mitchell JM, Burkhauser RV, Pincus T. The importance of age, education, and comorbidity in the substantial earnings losses of individuals with symmetric polyarthrit. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 348-357.

14. Leeb BF, Machold KP, Smolen JS. Diagnose und Therapie der chronischen Polyarthritis. *Radiologe* 1996; 36: 657-663.
15. Raspe HH, Mau W, Wasmus A. Treatment profiles in different groups of RA-sufferers: description, analysis, evaluation. *Scand J Rheumatol Suppl* 1989; 79: 57-65.
16. Hettenkofer HJ (Hrsg.) *Rheumatologie: Diagnostik - Klinik - Therapie*. Stuttgart: Thieme, 1998.
17. Gschwend N (Hrsg.) *Die operative Behandlung der chronischen Polyarthritis*. Stuttgart: Thieme, 1977.
18. Allaire SH, Prashker MJ, Meenan RF. The costs of rheumatoid arthritis. *Pharmacoeconomics* 1994; 6: 513-522.
19. Baumgart T, Hof D, Polizzotto G, Preiß C, Schwarz G. Rheuma – Erkrankung und mögliche Therapieformen. Internet. 2001. <http://www.galenik.de/fertigarzneimittelseminar/index.html>.
20. Kaiser H (Hrsg.) *Chronische Polyarthritiden. Differentialdiagnose und Therapie*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1985.
21. Smolen JS, Steiner G. Rheumatoid arthritis is more than cytokines: autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2218-2220.
22. Epplen JT, Marker-Herrmann E, Melchers I. Zur Immungenetik entzündlich-rheumatischer Erkrankungen. *Internist* 2001; 42: 188-191.
23. Harris ED. Is there one cause of rheumatoid arthritis? In: Harris ED, Barnett GD (Hrsg.) *Rheumatoid Arthritis*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996; 41-51.
24. Hyrich KL, Inman RD. Infectious agents in chronic rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13: 300-304.
25. Gay S, Gay R, Koopman WJ. Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 39-47.
26. Hiepe F. Rheumatische Krankheiten und Kollagenosen. In: Stobbe H (Hrsg.) *Innere Medizin*. Berlin: Ullstein Mosby, 2001; 1039-1100.
27. Miehle W, Fehr K, Schattenkirchner M (Hrsg.) *Rheumatologie in Praxis und Klinik*. Stuttgart: Thieme, 2000.
28. Steinbrocker O, Traeger CH, Hill AGS, Hill H. Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *J Am Med Assoc* 1949; 140: 659-662.

29. Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, Spitz PW, Haga M, Kleinheksel SM, Cathey MA. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 481-494.
30. Kvalvik AG. Die Mortalität bei chronischer Polyarthritis. *Rheumatol Eur* 1996; 25: 9-14.
31. Lipsky PE. Immunopathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1992; 19: 92-94.
32. Krüger K. Medikamentöse Therapie der rheumatoiden Arthritis. *Orthopäde* 1999; 28: 181-188.
33. Sieper J. Basistherapeutika in der Behandlung von Arthritiden. *Orthopäde* 1998; 27: 576-580.
34. Menninger H. Basistherapeutische Kombinationstherapie bei chronischer Polyarthritis: Ein Überblick. *Z Rheumatol* 1998; 57/1: 25-30.
35. Tugwell P. Combination therapy in rheumatoid arthritis: metaanalysis. *J Rheumatol* 1996; 44: 43-46.
36. Verhoeven AC, Boers M, Tugwell P. Combination therapy in rheumatoid arthritis: Updated systematic review. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 612-619.
37. Aeschlimann AG. Rheumatoide Arthritis - Konservative Therapiemöglichkeiten heute und in der Zukunft. *Orthopäde* 1988; 27: 160-165.
38. Paulus R. Die arthroskopische Synovektomie bei chronischer Polyarthritis und Monoarthritis. Dissertation, Orthopädische Klinik, Universität München; 1992.
39. Hagena FW. Ist die Synovektomie bei chronischer Polyarthritis gerechtfertigt? *Z Rheumatol* 1996; 55: 371-375.
40. Kerschbaumer F, Kandziora F, Herresthal J, Hertel A, Hör G. Synovektomie und Synoviorthese als Kombinationstherapie bei rheumatoider Arthritis. *Orthopäde* 1998; 27: 196.
41. Kerschbaumer F, Herresthal J. Arthroskopische Synovektomie und Radiosynoviorthese. *Z Rheumatol* 1996; 55: 388-393.
42. Paus AC. Arthroscopic synovectomy. When, which diseases and which joints. *Z Rheumatol* 1996; 55: 394-400.
43. Yoshino S. Surgical synovectomy in rheumatoid arthritis. *Ryumachi* 1998; 38/1: 45-51.
44. Hagena FW, Simmen BR (Hrsg.) *The Wrist in Rheumatoid Arthritis*. Basel: Karger, 1992.

45. Gschwendt N. Indikationen rheumachirurgischer Eingriffe und Prioritäten im langfristigen Behandlungsplan. *Z Rheumatol* 1985; 44: 30-32.
46. Tillmann K. Möglichkeiten und Grenzen der Rheumaorthopädie. *M Kurse ärztl Fortb* 1976; 26: 41.
47. Zoma A, Sturrock RD, Fischer WD, Freeman PR, Hamblen DL. Surgical stabilisation of the rheumatoid cervical spine: indications and results. *J Bone Joint Surg* 1987; 69B: 8-12.
48. Winkler F. Zur Klinik der operativen Therapie der chronischen Polyarthrit. Dissertation, Orthopädische Klinik, Universität Hannover; 1995.
49. Gschwendt N (Hrsg.) *Surgical treatment of rheumatoid arthritis*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1980.
50. London PS. Synovectomy of the knee in rheumatoid arthritis, an essay in surgical salvage. *J Bone Joint Surg* 1955; 37B: 392.
51. Roggenbuck C, Zacher J. Arthroscopic synovectomy of the knee joint in rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 1997; 56: 190-199.
52. Klein W, Jensen KU. Arthroscopic synovectomy of the knee joint: indication, technique and follow-up results. *Arthroscopy* 1988; 4: 63-71.
53. Gschwend N. Moderne Rheumachirurgie: Chancen, Gefahren, Ergebnisse. *Schweiz Rundsch Med Prax* 1993; 82: 377-385.
54. Engel JM, Ströbel G (Hrsg.) *Rheumatherapie*. Weinheim: VCH, 1990.
55. Marmor L. Surgery of the rheumatoid knee. Synovectomy and debridement. *J Bone Joint Surg* 1973; 55: 535-544.
56. Paus AC, Pahle JA. Arthroscopic evaluation of the synovial lining before and after open synovectomy of the knee joint in patients with chronic inflammatory joint diseases. *Scand J Rheumatol* 1990; 19: 193-201.
57. Püschel W. Die Histopathogenese der Synovialitis bei experimenteller allergischer Arthritis des Kaninchens. Vergleichende Untersuchungen zur rheumatoiden Synovialitis. *Z Rheumatol* 1982; 41: 7-15.
58. Hang L, Theofilopoulos AN. A spontaneous rheumatoid arthritis-like disease in MRL/lpr mice. *J Exp Med* 1982; 155: 1690-1701.
59. Pearson CM. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvant. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 91: 95-101.
60. Cromartie WJ, Craddock JG, Schwab JH, Anderle SK, Yang CH. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J Exp Med* 1977; 146: 1585-1602.

61. Wooley PH. Collagen-induced arthritis in the mouse. *Method Enzymol* 1988; 162: 361-373.
62. Pettipher ER, Higgs GA, Henderson B. Studies on interleukin-1-induced arthritis. *Dev Biol Stand* 1988; 69: 111-114.
63. Cooke TD, Jasin HE. The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen-induced arthritis. The role of antigen on the local immune response. *Arthritis Rheum* 1972; 15: 327-337.
64. Crofford LJ, Wilder RL. Arthritis and autoimmunity in animals. In: Mc Carty DJ, Koopman WJ (Hrsg.) *Arthritis and Allied Conditions*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993; 525-539.
65. van den Berg WB, van den Broek MF, van den Putte LBA, van Bruggen CJ, van Lent PLEM. Experimental arthritis: Importance of T cells and antigen mimicry in chronicity and treatment. In: Kresina TF (Hrsg.) *Monoclonal antibodies, cytokines and arthritis*. New York: Dekker, 1991; 327-352.
66. Dumonde DC, Glynn LE. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol* 1962; 43: 373-383.
67. Sack U. Tierexperimentelle Arthritismodelle. *Arthritiden*. Lengerich: Pabst, 1997; 254-262.
68. Jennings VM. Review of selected adjuvants used in antibody production. *ILAR Journal* 1995; 37: 119-125.
69. van den Berg WB, van den Loo FAJ, van Lent PLEM, Joosten LAB. Mechanisms of cartilage destruction in joint inflammation. *Agents Actions* 1993; Suppl. 39: 49-60.
70. Eichler J, Seiler T. Grundlagen medizinischer Lasergeräte. *Lasertechnik in der Medizin*. Berlin: Springer-Verlag, 1991; 1-14.
71. Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature* 1960; 187: 493-494.
72. Stengel K. Gaslaser, Farbstofflaser, Halbleiterlaser und Festkörperlaser. Internet. 2000. <http://pc-cube01.pci.uni-heidelberg.de/fpraktikum/ws0001/ws000104.pdf>.
73. Tradowsky K (Hrsg.) *Laser kurz und bündig: Grundlagen, Technik, Anwendungen*. Berlin: Vogel-Verlag, 1975.
74. Jori G. Photosensitized processes in vivo: proposed phototherapeutic applications. *Photochem Photobiol* 1990; 52: 439-443.

75. Dick B. Physikalisch-chemisches Praktikum. Strahlungsquellen und Strahlungsdetektoren. Internet. 2001. <http://www-dick.chemie.uni-regensburg.de/studium/praktikum1c.html>.
76. Papworth WA, Mitchell WL, Severson DD, Warner JA, Rocklin G, Garbo G, Doiron DR. Diode laser systems for photodynamic therapy. *Proc SPIE* 1995; 2392: 63-70.
77. Freiherr G. Advances in photodynamic therapy lure device innovators. 1997. R&D Horizons. Medical Device & Diagnostic Industry Column.
78. Epstein JM. Phototherapy and photochemotherapy. *N Engl J Med* 1990; 1149-1151.
79. Daniell MD, Hill JS. A history of photodynamic therapy. *Aust N Z J Surg* 1991; 340-348.
80. von Tappeiner H. Ueber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. *Münch Med Wochenschr* 1900; 5-7.
81. von Tappeiner H, Jesionek A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Münch Med Wochenschr* 1903; 2042-2044.
82. von Tappeiner H, Jodlbauer A (Hrsg.) *Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung*. Leipzig: FCW Vogel, 1907.
83. Hausmann W. Die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins. *Biochem Z* 1911; 276-316.
84. Meyer-Betz F. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs. *Dtsch Arch Klin Med* 1913; 476-503.
85. Zalar GL, Poh-Fitzpatrick M, Drohn DL. Induction of drug photosensitization in man after parenteral exposure to hematoporphyrin. *Arch Dermatol* 1973; 1392-1397.
86. Policard A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood. *CR Soc Biol* 1924; 1423-1424.
87. Auler H, Banzer G. Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. *Z Krebsforsch* 1942; 65-68.
88. Figge FHJ, Weiland GS, Manganiello LOJ. Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc Soc Exp Biol Med* 1948; 640-641.



89. Schwartz SK, Absolon K, Vermund H. Some relationships of porphyrins, X-rays and tumors. *Univ Minn Med Bull* 1955; 7-13.
90. Lipson RL, Blades EJ. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. *Arch Dermatol* 1960; 508-516.
91. Lipson R. L., Gray M. J., Blades E. J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. In: Proc 9th International Cancer Congress. 1966; 393. Tokyo, Japan.
92. Dougherty TJ, Kaufmann JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 1978; 2628-2635.
93. Krammer B. Photodynamische Tumortherapie und -diagnose. Internet. 2001. <http://www.pdt.sbg.ac.at/workgroup/therapy/Principles/details.html>.
94. Ben Hur E, Geacintov NE, Studamire B, Kenney ME, Horowitz B. The effect of irradiance on virus sterilization and photodynamic damage in red blood cells sensitized by phthalocyanines. *Photochem Photobiol* 1995; 61: 190-195.
95. Smetana Z, Mendelson E, Manor J, Van Lier JE, Ben Hur E, Salzberg S, Malik Z. Photodynamic inactivation of herpes viruses with phthalocyanine derivatives. *J Photochem Photobiol B* 1994; 22: 37-43.
96. Boehncke WH, Sterry W, Kaufmann R. Treatment of psoriasis by topical photodynamic therapy with polychromatic light. *Lancet* 1994; 343: 801.
97. Herter W. Photodynamische Therapie bei Endometriose: Untersuchung der Phototoxizität verschiedener Sensibilisatoren an Endometrium- und Endometriosezellkulturen. Dissertation, Universität Ulm; 1995.
98. Steiner RA, Tadir Y, Tromberg B, Wyss P, Walt H, Haller U. Benzoporphyrinderivat-Monosäure zur Photodynamischen Therapie des Endometriums. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1996; 56: 1-7.
99. Trauner KB, Hasan T. Photodynamic treatment of rheumatoid and inflammatory arthritis. *Photochem Photobiol* 1996; 64: 740-750.
100. Hourigan AJ, Kells AF, Schwartz HS. In vitro photodynamic therapy of musculoskeletal neoplasms. *J Orthop Res* 1993; 11: 633-637.
101. Kusuzaki K, Aomori K, Suginosita T, Minami G, Takeshita H, Murata H, Hashiguchi S, Ashihara T, Hirasawa Y. Total tumor cell elimination with minimum damage to normal tissues in musculoskeletal sarcomas following photodynamic therapy with acridine orange. *Oncology* 2000; 59: 174-180.

102. Judy MM, Jackson RW, Nosir HR, Matthews JL, Loyd JD, Lewis DE, Utecht RE, Yuan D. Healing results in meniscus and articular cartilage photochemically welded with 1,8-naphthamide dyes. *Proc SPIE* 1997; 2970: 257-260.
103. Manyak MJ, Russo A, Smith PD, Glatstein E. Photodynamic therapy. *J Clin Oncol* 1988; 6: 380-391.
104. Lin CW. Photodynamic therapy of malignant tumors - recent developments. *Cancer Cells* 1991; 3: 437-444.
105. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B* 1997; 39: 1-18.
106. Hesse U. Photodynamische Therapie mit Tetrapyrrolderivaten: Untersuchungen an HPD und Modellsensibilisatoren. Dissertation, Universität Paderborn; 1996.
107. Foote CS (Hrsg.) *Photosensitization*. Berlin: Springer, 1988.
108. Michaeli A, Feitelson J. Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. *Photochem Photobiol* 1994; 59: 284-289.
109. Giulivi C, Sarcansky M, Rosenfeld E, Boveris A. The photodynamic effect of rose bengal on proteins of the mitochondrial inner membrane. *Photochem Photobiol* 1990; 52: 745-751.
110. Rück A. Photochemische Wirkungen. In: Berlien HP, Müller G (Hrsg.) *Angewandte Lasermedizin*. Landsberg-München-Zürich: Ecomed, 1989.
111. Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 1991; 54: 659.
112. Penning LC, Dubbelman TMAR. Fundamentals of photodynamic therapy: cellular and biochemical aspects. *Anticancer Drugs* 1994; 5: 139-146.
113. Landthaler M, Ruck A, Szeimies RM. Photodynamische Therapie von Hauttumoren. *Hautarzt* 1993; 44: 69-74.
114. Ben Hur E, Carmichael A, Riesz P, Rosenthal I. Photochemical generation of superoxide radical and the cytotoxicity of phthalocyanines. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1985; 48: 837-846.
115. Wolf P. Photodynamische Therapie. *Hautarzt* 1997; 48: 137-148.
116. Moan J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *J Photochem Photobiol B* 1990; 6: 343-347.
117. Scott LJ, Goa KL. Verteporfin. *Drugs Aging* 2000; 16: 139-146.

118. Fisher AMR, Murphree AL, Gomer CJ. Clinical and preclinical photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 1995; 2-31.
119. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Nat Cancer Inst* 1998; 90: 889-905.
120. Lin CW, Amano T, Rutledge AR, Shulok JR, Prout GR, Jr. Photodynamic effect in an experimental bladder tumor treated with intratumor injection of hematoporphyrin derivative. *Cancer Res* 1988; 48: 6115-6120.
121. Malik Z, Babushkin T, Sher S, Hanania J, Ladan H, Nitzan Y, Salzberg S. Collapse of K<sup>+</sup> and ionic balance during photodynamic inactivation of leukemic cells, erythrocytes and Staphylococcus aureus. *Int J Biochem* 1993; 25: 1399-1406.
122. Specht KG, Rodgers MA. Depolarization of mouse myeloma cell membranes during photodynamic action. *Photochem Photobiol* 1990; 51: 319-324.
123. Henderson BW, Fingar VH. Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. *Cancer Res* 1987; 47: 3110-3114.
124. Jain RK. Delivery of novel therapeutic agents in tumors: Physiological barriers and strategies. *J Nat Cancer Inst* 1989; 81.
125. Fingar VH, Wieman TJ, Wiehle SA, Cerrito PB. The role of microvascular damage in photodynamic therapy: The effect of treatment on vessel constriction, permeability and leukocyte adhesion. *Cancer Res* 1992; 52: 4914-4921.
126. Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ, Evans HH, Antunez AR, Oleinick NL. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res* 1991; 51: 5993-5996.
127. Webber J, Luo Y, Crilly R, Fromm D, Kessel D. An apoptotic response to photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin in vivo. *J Photochem Photobiol B* 1996; 35: 209-211.
128. Krosi G, Korbek M, Krosi J, Dougherty GJ. Potentiation of photodynamic therapy-elicited antitumor response by localized treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Cancer Res* 1996; 56: 3281-3286.
129. Korbek M. Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg* 1996; 14: 329-334.
130. Cox GS, Whitten GD. Mechanisms for the photooxidation of protoporphyrin IX in solution. *J Am Chem Soc* 1982; 104: 516-521.

131. König KF, Wabnitz HF, Diemel W. Variation in the fluorescence decay properties of haematoporphyrin derivative during its conversion to photoproducts. *J Photochem Photobiol B* 1990; 8: 103-111.
132. Brown SB, Brown JE, Vernon DI. Photosensitizing drugs - their potential in oncology. *Expert Opin Investig Drugs* 1999; 8: 1967-1979.
133. Georgakoudi I, Foster TH. Singlet oxygen- versus nonsinglet oxygen-mediated mechanisms of sensitizer photobleaching and their effects on photodynamic dosimetry. *Photochem Photobiol* 1998; 67: 612-625.
134. Robinson DJ, de Bruijn HS, van d, V, Stringer MR, Brown SB, Star WM. Fluorescence photobleaching of ALA-induced protoporphyrin IX during photodynamic therapy of normal hairless mouse skin: the effect of light dose and irradiance and the resulting biological effect. *Photochem Photobiol* 1998; 67: 140-149.
135. Forrer M, Glanzmann T, Braichotte D, Wagniers G, van den Bergh H, Savary J-F, Monnier P. In vivo measurement of fluorescence bleaching of meso-tetra hydroxyphenyl chlorin (mTHPC) in the esophagus and oral cavity. *Proc SPIE* 1996; 2627: 33-39.
136. Wilson BC, Patterson MS, Lilge L. Implicit and Explicit Dosimetry in Photodynamic Therapy: A New Paradigm. *Lasers Med Sci* 1997; 12: 182-199.
137. Ismail MSZM. Untersuchungen zur Pharmakokinetik verschiedener Photosensibilisatoren für die photodynamische Therapie. Dissertation, Freie Universität Berlin; 1996.
138. Pont F. Synthese von Chlorinen für die photodynamische Therapie. Dissertation, Universität Bremen; 1998.
139. Unsöld E, Steinmetz M. Photodynamische Lasertherapie (PDT). In: Siebert WE, Wirth CJ (Hrsg.) *Laser in der Orthopädie*. Stuttgart: 1998; 107-113.
140. Gomer CJ, Doiron DR, Rucker N, Razum NJ, Fountain SW. Action spectrum (620-640 nm) for hematoporphyrin derivative induced cell killing. *Photochem Photobiol* 1984; 39: 365-368.
141. Svaasand LO, Wyss P, Wyss MT, Tadir Y, Tromberg BJ, Berns MW. Dosimetry model for photodynamic therapy with topically administered photosensitizers. *Lasers Surg Med* 1996; 18: 139-149.
142. Martin M. Herstellung, Charakterisierung und Einsatz von photosensibilisator-markierten Rezeptormolekülen für die photodynamische Tumortherapie. Dissertation, Universität Heidelberg; 1997.

143. Ortel B, Calzavara-Pinton PG, Szeimies RM, Hasan T. Perspectives in cutaneous photodynamic sensitization. *J Photochem Photobiol B* 1996; 36: 209-211.
144. Ochsner M. Photodynamic therapy: the clinical perspective. Review on applications for control of diverse tumorous and non-tumorous diseases. *Arzneimittelforschung* 1997; 47: 1185-1194.
145. Boehncke WH, Kaufmann R. Die photodynamische Therapie an der Schwelle zur klinischen Anwendung bei disseminierten Dermatosen. *Hautarzt* 1996; 47: 825-831.
146. Lin GC, Tsoukas ML, Lee MS, Gonzalez S, Vibhagool C, Anderson RR, Kollias N. Skin necrosis due to photodynamic action of benzoporphyrin depends on circulating rather than tissue drug levels: implications for control of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 1998; 68: 575-583.
147. Anderson RR, Parrish JA. The optics of human skin. *J Invest Dermatol* 1981; 77: 13-19.
148. Patrice T. Sensitizers. Internet. 1998. <http://www.sante.univ-nantes.fr/med/laser/sensitizers.html>.
149. Moser JG (Hrsg.) *Photodynamic Tumor Therapy*. London: Harwood Publishers, 1998.
150. Boyle RW, Dolphin D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol* 1996; 64: 469-485.
151. Chowdhary RK, Ratkay LG, Canaan AJ, Waterfield JD, Richter AM, Levy JG. Uptake of verteporfin by articular tissues following systemic and intra-articular administration. *Biopharm Drug Dispos* 1998; 19: 395-400.
152. Arbeitsausschuss "Ärztliche Behandlung" des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen. Photodynamische Therapie mit Verteporfin bei altersabhängiger feuchter Makuladegeneration mit subfoveolären klassischen choroidalen Neovaskularisationen. Geschäftsführung des Arbeitsausschusses "Ärztliche Behandlung" des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen, 2001; 22-24.
153. Sternberg ED, Dolphin D. Pyrrolic Photosensitizers. *Curr Med Chem* 1996; 3: 239-272.
154. Allison BA, Waterfield E, Richter AM, Levy JG. The effects of plasma lipoproteins in in-vitro tumor cell killing and in-vitro tumor sensitization with benzoporphyrine derivative. *Photochem Photobiol* 1991; 54: 709-715.
155. Lui H, Anderson RR. Photodynamic therapy in dermatology: recent developments. *Dermatol Clin* 1993; 11: 1-13.

156. Gold Standard Multimedia (Hrsg.). Verteporfin. 2001. Clinical Pharmacology.
157. Rosenthal DI, Glatstein E. Clinical applications of photodynamic therapy. *Ann Med* 1994; 405-409.
158. Levy JG, Obochi M. New applications in photodynamic therapy. Introduction. *Photochem Photobiol* 1996; 64: 737-739.
159. Jori G, Beltramini M, Reddi E, Salvato B, Pagnan A, Ziron L, Tomio L, Tsanov T. Evidence for a major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carriers in vivo. *Cancer Lett* 1984; 24: 291-297.
160. Maziere JC, Morliere P, Santus R. The role of the low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of lipophilic photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B* 1991; 8: 351-360.
161. Fingar VH, Kik PK, Haydon PS, Cerrito PB, Tseng M, Abang E, Wieman TJ. Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (BPD). *Br J Cancer* 1999; 79: 1702-1708.
162. Ciba Vision. Visudyne Produktinformation. 1999. CIBA Vision AG.
163. Ciba Vision. Product Monograph Visudyne. 2000. CIBA Vision AG.
164. Telstra (Hrsg.). The Australian Prescription Products Guide; Health Answers Drug Database. Internet. 2002. <http://healthanswers.telstra.com/drugdata/>.
165. Aveline B, Hasan T, Redmond RW. Photophysical and photosensitizing properties of benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD-MA). *Photochem Photobiol* 1994; 59: 328-335.
166. Schmidt Erfurth U, Miller J, Sickenkey M. Photodynamic therapy for choroidal neovascularization in phase II study. Preliminary results of multiple treatments. *Assoc Res Vision Ophthalmology* 1997; 38: 74.
167. European agency for the evaluation of medicinal products (EMA). Opinion of the committee for proprietary medicinal products on the granting of a marketing authorisation for verteporfin CPMP/897/00-EN EMA/II/C/305. 2000; 1-7.
168. Lee CC, Pouge BW, Strawbridge RR, Moodie KL, Bartholomew LR, Burke GC, Hoopes PJ. Comparison of photosensitizer (AIPcS2) quantification techniques: in situ fluorescence microsampling versus tissue chemical extraction. *Photochem Photobiol* 2001; 74: 453-460.

169. Zellweger M, Grosjean P, Monnier P, van den BH, Wagnieres G. Stability of the fluorescence measurement of Foscan in the normal human oral cavity as an indicator of its content in early cancers of the esophagus and the bronchi. *Photochem Photobiol* 1999; 69: 605-610.
170. Laing TJ, Ike RW, Griffiths CE, Richardson BC, Grober JS, Keroack BJ, Toth MB, Railan D, Cooper KD. A pilot study of the effect of oral 8-methoxypsoralen and intraarticular ultraviolet light on rheumatoid synovitis. *J Rheumatol* 1995; 22: 29-33.
171. Trauner K, Gandour-Edwards R, Bamberg M, Nishioka NS, Flotte T, Autry S, Hasan T. Influence of light delivery on photodynamic synovectomy in an antigen-induced arthritis model for rheumatoid arthritis. *Lasers Surg Med* 1998; 22: 147-156.
172. Steinfeldt H. K. Experimentelle Untersuchungen zu photodynamischen Effekten von Photosan und Photofrin an Synovialfibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Dissertation, Medizinische Hochschule Hannover; 1998.
173. Lehnert C. Photodynamische Therapie zur Behandlung der Chronischen Polyarthritits im Tiermodell. Dissertation, Medizinische Hochschule Hannover; 1997.
174. Reichel W, Weber KJ. The stabilizing effect of synovectomy on the synovial membrane in arthritic rabbit knees. *Arch Orthop Trauma Surg* 1986; 105: 11-17.
175. Hendrich C, Diddens H, Lehnert C, Hüttmann G, Dröge G, Siebert WE. Photodynamische Lasertherapie für die chronische Polyarthritits. *Lasermedizin* 1995; 11: 73-77.
176. Püschel W, Geiler G. Arthritismodelle. *Erg Exp Med* 1980; 35: 249-260.
177. Chang YH, Pearson CM. Pathogenesis of adjuvant arthritis in rats. *Arthritis Rheum* 1978; 21: 169-170.
178. Owen RT. Adjuvant induced polyarthritits. An overview. *Meth find exp clin Pharmacol* 1980; 2: 199-204.
179. Muirden KD, Peace G. Light and electron microscope studies in carrageenin, adjuvant, and tuberculin-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 1969; 28: 392-401.
180. Consden R, Doble A, Glynn LE, Nind AP. Production of a chronic arthritis with ovalbumin. Its retention in the rabbit knee joint. *Ann Rheum Dis* 1971; 30: 307-315.
181. Graham RC, Griffin R. Arthus synovitis with horseradish peroxidase as antigen: sequential participation of platelets and leucocytes. *Br J Exp Pathol* 1972; 53: 578-585.

182. Steffen C, Ludwig H, Knapp W, Thumb N, Eberl R, Frank O, Freilinger H. Collagen antibodies and collagen-anticollagen immune complexes in rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 1975; 34: 391-399.
183. Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 1977; 20: 841-850.
184. Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR, Miller JF. Studies on antigen-induced arthritis in mice. Immunologic correlate of arthritis susceptibility in mice. *J Immunol* 1977; 118: 1639-1644.
185. Griffiths RJ. Characterisation and pharmacological sensitivity of antigen arthritis induced by methylated bovine serum albumin in the rat. *Agents Actions* 1992; 35: 88-95.
186. Bräuer R. Untersuchungen zur Pathogenese der experimentellen Arthritis des Kaninchens unter besonderer Berücksichtigung der zellvermittelten Immunität. Dissertation, Universität Jena; 1987.
187. Glynn LE. The role of bacterial adjuvant in experimental arthritis. *Rheumatology* 1975; 6:283-7.: 283-287.
188. Ghadially FN (Hrsg.) *Fine Structure of Synovial Joints*. London: Butterworths, 1983.
189. Haelow E, Lane D (Hrsg.) *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Harbor Laboratory, 1988.
190. Broderson JR. A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. *Lab Anim Sci* 1989; 39: 400-405.
191. Amyx HL. Control of animal pain and distress in antibody production and infection disease studies. *J Am Vet Med Assoc* 1987; 191: 1287-1289.
192. Grumstrup-Scott J, Greenhouse DD. NIH intramural recommendations for the research use of complete Freund's adjuvant. *ILAR News* 1988; 30: 9.
193. Stills HF, Bailey MQ. The use of Freund's complete adjuvant. *Lab Anim (US)* 1991; 20: 25-30.
194. Johnston BA, Eisen H, Fry D. An evaluation of several adjuvant emulsion regimens for the production of polyclonal antisera in rabbits. *Lab Anim Sci* 1991; 41: 15-21.
195. Brouilhet H, Kahan A, Piatier D, Jouanneau M. Physiopathological aspect of Glynn's type of experimental arthritis. *Rheumatology* 1975; 6:308-19.: 308-319.



196. Menard H.A., Dion J. Experimental immune arthritis: host factors. *J Rheumatol* 1975; 2: 373-383.
197. Fredriksson L. Clinical features of antigen-induced exacerbant chronic arthritis in rabbit temporomandibular joint and knee joint. Dissertation, Karolinska Institutet, Huddinge, Schweden; 1999.
198. Elliott S, Cooke TD. Scanning electron microscopy of antigen induced arthritic joints. Inflammatory cell interactions at synovial-meniscal surfaces during the Arthus response. *J Rheumatol* 1986; 13: 401-407.
199. Dreher R, Gornert C, Macholt U, Rohrbach B, Federlin K. Klassifikation der synovitischen Reaktionstypen bei rheumatoider Arthritis aufgrund zellkinetisch-morphologischer Befunde bei der experimentellen Immunarthritis. *Immun Infekt* 1981; 9: 204-212.
200. Page-Thomas DP. Aspects of experimental inflammatory arthritis. In: Gordon JL, Hazleman BL (Hrsg.) *Rheumatoid Arthritis*. Amsterdam: North-Holland Biomedical Press, 1977; 173-179.
201. Glynn LE. The chronicity of inflammation and its significance in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1968; 27: 105-121.
202. Doble A, Fox A, Glynn LE, Kingston D. The non-passage of mycobacteria from Freund's complete adjuvant granuloma depots to arthritic joints. *Br J Exp Pathol* 1975; 56: 537-543.
203. Geiler G, Emmrich J. Veränderungen an der Synovialmembran bei Frühfällen der rheumatoiden Arthritis. Histologische Untersuchungen. *Z Rheumatol* 1980; 39: 33-45.
204. Schumacher HR, Kitridou RC. Synovitis of recent onset. A clinicopathologic study during the first month of disease. *Arthritis Rheum* 1972; 15: 465-485.
205. Ismaiel S, Hollander AP, Atkins RM, Elson CJ. Differential responses of human and rat cartilage to degrading stimuli in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 1991; 43: 207-209.
206. Arner EC, Harris RR, DiMeo TM, Collins RC, Galbraith W. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits proteoglycan breakdown in antigen induced but not polycation induced arthritis in the rabbit. *J Rheumatol* 1995; 22: 1338-1346.
207. Ratkay LG, Chowdhary RK, Neyndorff HC, Tonzetich J, Waterfield JD, Levy JG. Photodynamic therapy; a comparison with other immunomodulatory treatments of adjuvant-enhanced arthritis in MRL-lpr mice. *Clin Exp Immunol* 1994; 95: 373-377.
208. Descalle M-A. Photochemotherapy of rheumatoid arthritis: modeling and monte carlo simulations. Dissertation, University of Michigan; 1999.

209. Hendrich C, Diddens H, Heyke C, Nosir H, Siebert WE. Treatment of rheumatoid arthritis using photodynamic therapy. *Proc SPIE* 1995; 2371: 592-595.
210. Evensen JF, Moan J, Hindar A, Sommer S. Tissue distribution of Haematoporphyrin derivative and its main components, <sup>67</sup>Ga and <sup>131</sup>I-albumin in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Prog Clin Biol Res* 1984; 170: 541-562.
211. Dubbelman TM, Prinsze C, Penning LC, Van Steveninck J. Photodynamic therapy: membrane and enzyme photobiology. In: Dougherty TJ, Henderson BW (Hrsg.) *Photodynamic therapy: basic principles and clinical applications*. New York: Dekker, 1992; 37-46.
212. Kennedy JC, Pottier RH. Endogenous protoporphyrin IX, a clinical useful photosensitizer for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol B* 1992; 14: 275-292.
213. Seara J, Hüttmann G, Hendrich C, Houserek S, Lehnert C, Siebert WE. Experimentelle photodynamische Lasertherapie für die chronische Polyarthrititis mit verschiedenen Photosensibilisatoren. *Arthroskopie* 1999; 12: 50-54.
214. Franks W. Photodynamic therapy for age-related macular degeneration. *Age Ageing* 2002; 31: 5-6.
215. Mandal N, Chisholm IH. Identifying the proportion of age related macular degeneration patients who would benefit from photodynamic therapy with verteporfin (Visudyne). *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 118-119.
216. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: two-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no classic choroidal neovascularization-verteporfin in photodynamic therapy report 2. *Am J Ophthalmol* 2001; 131: 541-560.
217. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: one-year results of 2 randomized clinical trials-TAP report. Treatment of age-related macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) Study Group. *Arch Ophthalmol* 1999; 117: 1329-1345.
218. Baas P, van Mansom I, van Tinteren H, Stewart FA, van Zandwijk N. Effect of N-acetylcysteine on Photofrin induced skin photosensitivity in patients. *Lasers Surg Med* 1995; 16: 359-367.
219. Kreitner M. Untersuchungen zum Einsatz der photodynamischen Therapie in der Onkologie. Dissertation, Universität für Bodenkultur, Wien; 1996.

220. Wolf P. Photodynamische Therapie: Grundlagen und klinische Anwendung in der Dermatologie. *Deutsches Ärzteblatt* 1999; 22: 1493-1498.
221. Trauner KB, Gandour-Edwards R, Bamberg M, Shortkroff S, Sledge C, Hasan T. Photodynamic synovectomy using benzoporphyrin derivative in an antigen-induced arthritis model for rheumatoid arthritis. *Photochem Photobiol* 1998; 67: 133-139.
222. Richter AM, Jain AK, Obochi M, Meadows H, Canaan AJ, Levy JG. Photophysical and photosensitizing properties of benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD-MA). *Photochem Photobiol* 1994; 59: 328-335.
223. See KL, Forbes IJ, Betts WH. Oxygen dependence of phototoxicity with haematoporphyrin derivative. *Photochem Photobiol* 1984; 39: 631-634.
224. Winkelman JW, Collins GH. Neurotoxicity of tetraphenylporphyrinsulfate TPPS4 and its relation to photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 1987; 46: 801-807.
225. Moesta KT, Hünerbein M, Schlag PM. Laser in der Onkologie. *Der Onkologe* 1995; 1: 384-396.
226. Zopf T, Rosenbaum A, Apel D, Jakobs R, Arnold JC, Riemann JF. Photodynamic therapy of dysplasias and early carcinomas in Barrett esophagus with a diode laser system - a pilot study. *Med Klin* 2001; 96: 212-216.
227. Tortora GJ (Hrsg.) *Principles of human anatomy*. New-York: Harper-Collins, 1992.
228. Wörmer S. Die Lichtdosimetrie für die photodynamische Therapie (PDT): Phantome zur Untersuchung der Lichtverteilung in Gelenken. Diplomarbeit. 1998. Medizinisches Laserzentrum Lübeck.
229. Wang I. Photodynamic therapy and laser-based diagnostic studies of malignant tumours. Dissertation, Lund University Hospital; 1999.
230. Papaioannou T, Maarek JM. Simultaneous photobleaching monitoring of endogenous and exogenous (BPB-MA) fluorescence in a tumor bearing rat model. Internet. 1999. <http://www.usc.edu/dept/biomed/graduate/grodins/GRODINS1999/papaioannou.html>.
231. Iinuma S, Schomacker KT, Wagnieres G, Rajadhyaksha M, Bamberg M, Momma T, Hasan T. In vivo fluence rate and fractionation effects on tumor response and photobleaching: photodynamic therapy with two photosensitizers in an orthotopic rat tumor model. *Cancer Res* 1999; 59: 6164-6170.

232. Ma LW, Moan J, Berg K. Comparison of the photobleaching effect of three photosensitizing agents: Meso-tetra (m-hydroxyphenyl) chlorin, Meso-tetra (m-hydroxyphenyl) porphyrin and photofrin during photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 1994; 9: 127-132.
233. Moesta KT, Hünerbein M, Schlag PM. Photodynamische Therapie zur Behandlung des Ösophaguskarzinoms. *Onkologe* 1997; 3: 653-659.
234. Edwards JCW, Cambridge G. Rheumatoid arthritis: The predictable effect of small immune complexes in which antibody is also antigen. *Br J Rheumatol* 1998; 37/2: 126-130.
235. Hendrich C, Hüttmann G, Vispo-Seara JL, Houserek S, Siebert WE. Experimental photodynamic laser therapy for rheumatoid arthritis with a second generation photosensitizer. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2000; 8: 190-194.
236. Jamieson C, Richter A, Levy JG. Efficacy of benzoporphyrin derivative, a photosensitizer, in selective destruction of leukemia cells using a murine tumor model. *Exp Hematol* 1993; 21: 629-634.
237. Ratkay LG, Chowdhary RK, Neyndorff HC, Levy JG, Waterfield JD. Treatment of experimental murine arthritis with transdermal photodynamic therapy. *Proc SPIE* 1995; 2371: 596-600.
238. Berger CL, Perez M, Laroche L, Edelson R. Inhibition of autoimmune disease in a murine model of systemic lupus erythematosus induced by exposure to syngenic photoinactivated lymphocytes. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 52-57.
239. Ishihara Y, Amano A, Aoyama I. Analgesic effect of low energy laser to finger joints in rheumatoid arthritis. *J J A Phys M Baln Clim* 1988; 51: 73-77.
240. Goldman JA, Chiapella J, Casey H, Bass N, Graham J, McClatchey W, Dronavalli RV, Brown R, Bennett WJ, Miller SB, Wilson CH, Pearson B, Haun C, Persinski L, Huey H, Muckerheide M. Laser therapy of rheumatoid arthritis. *Lasers Surg Med* 1980; 1: 93-101.
241. Amano A, Miyagi K, Azuma T, Ishihara Y, Katsube S, Aoyama I, Saito I. Histological studies on the rheumatoid synovial membrane irradiated with a low energy laser. *Lasers Surg Med* 1994; 14: 355-361.
242. Hunt DW, Jiang HJ, Levy JG, Chan AH. Sensitivity of activated murine peritoneal macrophages to photodynamic killing with benzoporphyrin derivative. *Photochem Photobiol* 1995; 61: 417-421.
243. North J, Neyndorff H, Levy JG. Photosensitizers as virucidal agents. *J Photochem Photobiol B* 1993; 17: 99-108.

244. Ratkay LG, Chowdhary RK, Iamaroon A, Richter AM, Neyndorff HC, Keystone EC, Waterfield JD, Levy JG. Amelioration of antigen-induced arthritis in rabbits by induction of apoptosis of inflammatory cells with local application of transdermal photodynamic therapy. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 525-534.
245. Richter AM, Yip S, Waterfield E, Logan PM, Slonecker CE, Levy JG. Mouse skin photosensitization with benzoporphyrin derivatives and Photofrin: macroscopic and microscopic evaluation. *Photochem Photobiol* 1991; 53: 281-286.
246. Richter AM, Jain AK, Obochi M, Meadows H, Canaan AJ, Levy JG. Activation of benzoporphyrin derivative in the circulation of mice without skin photosensitivity. *Photochem Photobiol* 1994; 59: 350-355.
247. North J, Neyndorff H, King D, Levy JG. Viral inactivation in blood and red cell concentrates with benzoporphyrin derivative. *Blood Cells* 1992; 18: 129-139.
248. Tsoukas MM, Lin GC, Lee MS, Anderson RR, Kollias N. Predictive dosimetry for threshold phototoxicity in photodynamic therapy on normal skin: red wavelengths produce more extensive damage than blue at equal threshold doses. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 501-505.
249. Muller S, Walt H, Dobler-Girdziunaite D, Fiedler D, Haller U. Enhanced photodynamic effects using fractionated laser light. *J Photochem Photobiol B* 1998; 42: 67-70.
250. Messmann H, Milkvy P, Buonaccorsi G, Davies CL, MacRobert AJ, Bown SG. Enhancement of photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin photosensitisation in normal rat colon by threshold and light fractionation studies. *Br J Cancer* 1995; 72: 589-594.
251. van der Veen N, van Leengoed HL, Star WM. In vivo fluorescence kinetics and photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin: increased damage after multiple irradiations. *Br J Cancer* 1994; 70: 867-872.
252. Richter AM, Cerruti-Sola S, Sternberg ED, Dolphin D, Levy JG. Biodistribution of tritiated benzoporphyrin derivative (3H-BPD- MA), a new potent photosensitizer, in normal and tumor-bearing mice. *J Photochem Photobiol B* 1990; 5: 231-244.

## **Danksagung**

An der Entstehung dieser Dissertation sind viele Menschen beteiligt gewesen, die aktiv oder unterstützend, genannt und ungenannt zum Gelingen beigetragen haben. Die Fertigstellung gibt mir Gelegenheit, mich bei Ihnen zu bedanken.

Für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation an der Orthopädischen Universitätsklinik König-Ludwig-Haus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. J. Eulert bedanken.

Herrn Prof. Dr.-Ing. R. Thull danke ich dafür, das Zweitgutachten dieser Arbeit zu erstellen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. C. Hendrich für die Überlassung des Themas, die hervorragende Unterstützung bei der Realisierung der Arbeit sowie die Revision des Manuskriptes. Durch seine Erfahrung, Diskussionsbereitschaft und Hilfe in wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Jose Seara, der durch seine unverwechselbare Art in besonderem Maße zur guten Atmosphäre beigetragen hat, danke ich für die umfangreiche Hilfe bei der Durchführung der Versuche und der Auswertung der Histologien.

Den Mitarbeitern des Medizinischen Laserzentrums Lübeck, allen voran Herrn Dr. Gereon Hüttmann danke ich für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei der Planung, dem Aufbau der Apparatur sowie für die Gastfreundschaft während meiner Aufenthalte in Lübeck.

Im Rahmen Ihrer Diplomarbeit leisteten Stephan Wörmer und Frank Ralfs wichtige Beiträge zu dieser Arbeit.

Für die Aufbereitung der Gewebeproben zur histologischen Untersuchung danke ich Frau J. Schneiderei.

Herrn Dr. Timo Gomille bin ich für die Einführung in die Arbeitstechniken und die Mithilfe bei den ersten Versuchen dankbar.

Den Tierpflegern am Tierhaus Würzburg, insbesondere Frau Maike Panzner danke ich für die liebevolle Versorgung unserer Kaninchen.

Für seine Hilfe beim Erstellen einiger Bilder dieser Arbeit danke ich Herrn H. Adelman.

Meiner Freundin Iris Zeilmann danke ich für ihr Interesse, Manuskriptdurchsicht, fortwährende Motivation und für die liebevolle Unterstützung während der Erstellung der Arbeit.

Mein letzter Dank gilt jenen, denen ich am meisten zu verdanken habe, meinen Eltern.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name Sven Houserek  
Geburtsdatum/ -ort 9. Mai 1973 in Rüsselsheim

### **Schulbildung**

1979 - 1983 Grundschule in Maar  
1983 - 1992 Alexander - von - Humboldt - Gymnasium, Lauterbach

### **Hochschulbildung**

1993 - 2000 Studium der Humanmedizin, Universität Würzburg  
1997 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
1998 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
1998 - 1999 Auslandsstudium an der Universität Wien  
1999 - 2000 Praktisches Jahr  
2000 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Berufserfahrung**

2001 - 2002 Arzt im Praktikum: Orthopädische Universitätsklinik  
König - Ludwig - Haus, Würzburg  
seit 2002 Assistenzarzt (Chirurgie): Ilmtalklinik, Pfaffenhofen a.  
d. Ilm

München im April 2003