

# Aus dem Universitätsklinikum Münster

---

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
- Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h.c. Ulrich Joos -

## ***In vitro* Untersuchung zu der Wirkung von „Low-dose“ Methotrexat auf Endothelzellen**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Koiky, Cathrin Dorothea

aus Zell an der Mosel

2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Johannes Kleinheinz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Heidemarie Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 10.01.2013

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h.c. Ulrich Joos -  
Referent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Johannes Kleinheinz  
Koreferent: Prof. Dr. med. Heidemarie Becker

## ZUSAMMENFASSUNG

*In vitro* Untersuchung zu der Wirkung von „Low-dose“ Methotrexat auf Endothelzellen

Koiky, Cathrin Dorothea

Die vorliegende Arbeit zeigt die Wirkung von Methotrexat auf sog. HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells) *in vitro*.

Methotrexat wird als Standardtherapeutikum bei rheumatoider Arthritis eingesetzt. Die benötigten Endothelzellen wurden aus einer humanen Nabelschnur isoliert und unter Zugabe von MTX kultiviert. Die Medikamentenkonzentrationen orientieren sich an üblichen Dosierungen während einer Therapie bei rheumatoider Arthritis.

Die Messungen fanden nach verschiedener Dauer der Inkubation statt und ergänzend wurde eine Kontrollgruppe ohne MTX-Zusatz mitgeführt. Zellzahlveränderungen wurden mittels Cell Count erfasst. Morphologische Veränderungen konnten über Vergleiche von Photographien des mikroskopischen Bildes dargestellt werden. Die mitochondriale Stoffwechselaktivität wurde mit Hilfe eines MTT- Assay dokumentiert. Über die Dauer des Versuchs war eine dosisabhängige und statistisch signifikante Hemmung der Proliferation der Zellen zu beobachten. Diese war nach 6 Versuchstagen in ihrem Beginn und im weiteren Verlauf dann in stärkerer Ausprägung vorhanden. Sie wurde sowohl durch den Cell Count als auch durch das MTT- Proliferations- Assay bestätigt. Dabei war die Dosisabhängigkeit ausschließlich zwischen der Kontrollgruppe (ohne Zusatz von MTX), der Geringsten und den übrigen Konzentrationen statistisch signifikant. Die mikroskopischen Vergleiche ließen außerdem morphologische Veränderungen der Zellen unter MTX- Einfluss deutlich werden: Sie waren in ihrem Umriss atypisch, wiesen Hyperplasien wie auch vermehrt unregelmäßig geformte Zellausläufer auf.

Die ermittelten *in vitro* Erkenntnisse lassen sich nun allerdings nicht ohne Abstriche auf eine *in vivo* Situation übertragen. Hier werden die Zellen durch die Komplexität eines Organismus, durch die Funktionen der Zellen in dem jeweiligen Organ sowie durch äußere Faktoren, welche bei der isolierten Kultivierung im Labor minimiert werden, beeinflusst.

Tag der mündlichen Prüfung: 10.01.2013



## Inhalt

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Rheumatoide Arthritis.....	1
1.1.1 Definition der Rheumatoiden Arthritis .....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	1
1.1.3 Pathogenese.....	2
1.1.4 Klinik .....	4
1.2 Therapieansätze der RA .....	5
1.2.1 NSAID's .....	6
1.2.2 Kortikosteroide.....	7
1.2.3. DMARD's- Disease- modifying antirheumatic drugs.....	8
1.3. Methotrexat (MTX) .....	9
1.3.1 MTX: Allgemeine Informationen .....	9
1.3.2 Pharmakokinetik .....	9
1.3.3 Chemie von MTX und Folsäure .....	11
1.3.4 Wirkprinzipien von MTX.....	12
1.3.5 Nebenwirkungen bei MTX-Therapie .....	14
1.4. Endothelzellen.....	16
1.4.1 Die Funktion der Endothelzellen .....	16
1.4.2 Vaskulogenese und Angiogenese .....	18
1.4.3. Die Differenzierung von Endothelzellen.....	21
<b>2. Zielformulierung .....</b>	<b>22</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
3.1. Material .....	23
3.1.1. Zellkultur .....	23
3.1.2. MTT-Assay .....	24
3.1.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	24

3.2. Methoden.....	26
3.2.1. Präparation von Endothelzellen aus humaner Nabelschnur .....	26
3.2.2 Die Kultivierung der Endothelzellen.....	27
3.2.3. MTT-Assay .....	28
3.2.4 Fotodokumentation und Zellzählung .....	31
3.2.5. Statistische Methoden .....	32
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
4.1. Ergebnisse der Fotodokumentation.....	33
4.1.1. Morphologie der Endothelzellen vor Beginn der Versuchsperiode.....	33
4.1.2. Qualitative Beschreibung der Kontrollgruppen sowie der mit Methotrexat versetzten Vergleichsgruppen nach einem Tag der Kultivierung .....	34
4.1.3. Qualitative Beschreibung der Kontrollgruppen sowie der mit Methotrexat versetzten Vergleichsgruppen nach drei Tagen der Kultivierung .....	35
4.1.4. Qualitative Beschreibung der Kontrollgruppen sowie der mit Methotrexat versetzten Vergleichsgruppen nach sechs Tagen der Kultivierung.....	36
4.1.5. Qualitative Beschreibung der Kontrollgruppen sowie der mit Methotrexat versetzten Vergleichsgruppen nach acht Tagen der Kultivierung .....	38
4.1.6. Qualitative Beschreibung der Kontrollgruppen sowie der mit Methotrexat versetzten Vergleichsgruppen nach zehn Tagen der Kultivierung.....	40
4.1.7. Qualitative Beschreibung der Kontrollgruppen sowie der mit Methotrexat versetzten Vergleichsgruppen nach vierzehn Tagen der Kultivierung.....	42
4.2. Ergebnisse des Cell Counts.....	44
4.2.1. Veränderungen der Zellzahl der Kontrollgruppe sowie der Vergleichsgruppen nach einem Tag der Kultivierung .....	46
4.2.2. Veränderungen der Zellzahl der Kontrollgruppe sowie der Vergleichsgruppen nach drei Tagen der Kultivierung.....	47
4.2.3. Veränderungen der Zellzahl der Kontrollgruppe sowie der Vergleichsgruppen nach sechs Tagen der Kultivierung .....	48
4.2.4. Veränderungen der Zellzahl der Kontrollgruppe sowie der Vergleichsgruppen nach acht Tagen der Kultivierung .....	49
4.2.5. Veränderungen der Zellzahl der Kontrollgruppe sowie der Vergleichsgruppen nach zehn Tagen der Kultivierung.....	50
4.2.6. Veränderungen der Zellzahl der Kontrollgruppe sowie der Vergleichsgruppen nach vierzehn Tagen der Kultivierung .....	51

4.3. Ergebnisse des MTT-Assays.....	52
4.3.1. Ergebnisse des MTT-Assays nach einem Tag der Kultivierung.....	53
4.3.2. Ergebnisse des MTT-Assays nach drei Tagen der Kultivierung .....	54
4.3.3. Ergebnisse des MTT-Assays nach sechs Tagen der Kultivierung.....	55
4.3.4. Ergebnisse des MTT-Assays nach acht Tagen der Kultivierung.....	56
4.3.5. Ergebnisse des MTT-Assays nach zehn Tagen der Kultivierung.....	57
4.3.6. Ergebnisse des MTT-Assays nach vierzehn Tagen der Kultivierung.....	58
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>59</b>
5.1. Einordnung der Ergebnisse .....	59
5.2. Studienlage zum Einfluss von MTX auf Endothelzellen .....	60
5.3. Isolierung und Kultivierung der HUVEC's .....	62
5.4. Heterogenität der Endothelzellen.....	63
5.5. Mögliche weiterführende Versuchsansätze.....	63
5.6. Anti-inflammatorische Mechanismen des Methotrexats .....	65
5.7. Beeinflussung der Endothelzellen durch die multimedikamentöse Therapie der rheumatischen Arthritis .....	68
5.8. Auswirkungen der MTX- Therapie auf die Mundschleimhaut .....	69
5.9. Schlussfolgerung und Ausblick .....	71
<b>Übersicht.....</b>	<b>72</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>86</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>I</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Rheumatoide Arthritis**

#### **1.1.1 Definition der Rheumatoiden Arthritis**

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch verlaufende, entzündliche Erkrankung und wird in die Gruppe des rheumatischen Formenkreises eingeordnet. Durch autoimmune Reaktionen kommt es zur Infiltration der Gelenkschleimhäute und so zu einer proliferativen Synovialitis (Entzündung der Gelenkinnenhaut). Die chronischen Entzündungsmechanismen, die synoviale Hyperplasie und die darauf folgende pathologisch verstärkte Immunreaktion wirken nun gemeinsam auf das Gelenk ein [Müller-Ladner und Pap, 2005]. Die Destruktion von Gelenkknorpel, -knochen und inserierenden Sehnen ist die Folge. Die kleinen Hand-, Finger- und Fußgelenke sind charakteristischerweise primär betroffen. Es gibt allerdings eine große Variabilität im weiteren klinischen Erscheinungsbild [Krämer und Grifka, 2005]. Im Verlauf sind auch extraartikuläre und systemische Manifestationen in verschiedenen Organen möglich. Die Ätiologie der RA ist nicht geklärt. Es wird ein multifaktorielles Geschehen diskutiert, wobei neben einer genetischen Prädisposition auch Umwelteinflüsse, Infektionen und andere Faktoren als Auslöser der Autoimmunreaktion gelten [Riede, 2004].

#### **1.1.2 Epidemiologie**

Die RA ist die häufigste Erkrankung des rheumatischen Formenkreises. Die Prävalenz liegt zwischen 0,5- 2 % weltweit, wobei sich das Verhältnis zwischen Frauen und Männern bei etwa 3:1 Erkrankten befindet. Die jährliche Inzidenz beträgt in Deutschland ca. 100: 100000 Menschen. Betroffen sind alle Altersgruppen, jedoch gibt es die höchste Zahl an Neuerkrankungen bei Männern zwischen dem 60. und 70 Lebensjahr, bei Frauen etwa 5 Jahre zuvor. Es existieren jedoch Formen der juvenilen Arthritis, welche bereits bei Patienten vor dem 16. Lebensjahr beobachtet werden [Siegenthaler und Blum. Hubert E., 2006].

Die RA ist weltweit anzutreffen, jedoch mit regional verschiedenen Prävalenzen: So ist die Bevölkerung Afrikas weniger oft erkrankt, als die in Nordamerika lebenden Menschen. Zusammenhänge zwischen sozialem Status und der Häufigkeit der Erkrankung sind nicht vorhanden [Lee und Weinblatt, 2001].

### **1.1.3 Pathogenese**

Die genaue Ätiologie der RA ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht hinreichend geklärt. Studien haben die schon erwähnte mögliche genetische Prädisposition bestätigt. Hierbei handelt es sich um Allele der HLA-DR Region, welche für MHCII Moleküle bestimmter Art codieren. Die genaue Verbindung zwischen dieser genetischen Voraussetzung und der Entstehung sowie des Verlaufs der RA sind nicht bekannt. Die Existenz wird jedoch wie folgt bestärkt, so beträgt die Konkordanzrate zwischen monozygoten Zwillingen ungefähr 15%, zwischen heterozygoten Zwillingen nur ca. 4% [Silman et al., 1993].

Es wird also vermutet, dass es durch einen bestimmten Stimulus im prädispositionierten Organismus zur Reaktion, in Form eines entzündlichen autoaggressiven Mechanismus, kommt. In der Literatur werden verschiedene Auslöser diskutiert. Eine Hypothese legt den Fokus auf die Rolle von T-Helferzellen in der Pathogenese der RA [Lee und Weinblatt, 2001]. Zunächst kommt es im Gelenkinnenraum zur Phagozytose des unbekanntes Antigens durch Makrophagen und im Anschluss zu dessen Präsentation. Eingewanderte CD4-T-Helferzellen reagieren, die Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wird verstärkt, so z.B. TNF  $\alpha$  und IL 1,6,8. Dies hat als Konsequenz, dass Synoviozyten stimuliert werden [Geiler, 1996; Lee und Weinblatt, 2001; Riede, 2004]. Synoviozyten werden unterteilt in Typ A (Makrophagen ähnlich) und Typ B (Fibroblasten ähnlich), welche sich im Verhältnis 2:1 verhalten. Sie sezernieren nun vermehrt Matrix-Metallo-Proteinasen, Zytokine und Prostaglandine. Durch die enzymatische Aktivität der Matrix-Metallo- Proteinasen kommt es zur erosiven Destruktion der extrazellulären Matrix von Gelenkknorpel und –knochen [Lee und Weinblatt, 2001].

Andere Untersuchungen bezüglich der Pathogenese der RA messen den Fibroblasten eine größere Bedeutung bei. So kommt es durch die Aktivierung besagter Zellen zu deren morphologischen sowie funktionellen Veränderung, hin zu Zellen, die sich aggressiv und destruierend verhalten. In der Literatur werden diese auch als „tumorlike fibroblasts“ oder aktivierte Fibroblasten bezeichnet. Eine typische Eigenschaft ist die fehlende Reaktion auf Signale zur Apoptose. Ihre Lebensdauer wird so merklich verlängert und begünstigt das Voranschreiten der Hyperplasie des Synoviums. Durch die Aktivierung der Fibroblasten werden verschiedene Moleküle vermehrt exprimiert, so zum Beispiel matrixzerstörende Enzyme, Adhäsionsmoleküle und die erwähnten Inhibitoren des natürlichen Zelltodes.

Über die Adhäsionsmoleküle, v. A. Integrine, wird der Kontakt der Fibroblasten mit dem Gelenkknorpel ermöglicht. Im Falle der matrixzerstörenden Enzyme handelt es sich im Besonderen um Matrix- Metallo- Proteinase und Kathepsine [Müller-Ladner und Pap, 2005].

Die vermehrte Sekretion von Zytokinen, Prostaglandinen und weiteren Signalmolekülen hat auch eine Wirkung auf andere immunologische Zellen. So werden B-Zellen aktiviert, differenzieren zu Plasmazellen und von ihnen werden in erhöhtem Maß Autoantikörper gebildet. In diese Gruppe gehören auch die Rheumafaktoren. Es handelt sich um autoreaktive Antikörper, zumeist der Klasse IgM, die dann an der Bildung von Immunkomplexen beteiligt sind. Bei der Mehrzahl der Patienten lassen sie sich im Blutserum sowie der Synovia nachweisen. Die zu Immunkomplexen assoziierten Antikörper aktivieren zusätzlich das Komplementsystem, wodurch der entzündliche Prozess weiter vorangetrieben wird. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der Rheumafaktoren im Serum und dem Auftreten von extraartikulären Symptomen wie einer immunkomplexassozierten Vaskulitis [Siegenthaler und Blum. Hubert E., 2006].

Auch Osteoklasten, Chondrozyten, Endothelzellen sowie weitere T-Zellen und Makrophagen werden durch die vermehrte Ausschüttung der Zytokine stimuliert.

Die Endothelzellen werden durch die vermehrte Expression von Vascular Endothelial Growth factor zusätzlich stimuliert. Es kommt zur Angiogenese und so wird die Infiltration von Serum und Synovia durch Entzündungsmediatoren erleichtert. Die Symptome der entzündlichen Reaktion nehmen zu, die Zerstörung des umliegenden Gewebes ebenfalls [Seemayer et al., 2001].

Die histologische Darstellung der RA verändert sich mit dem Fortschreiten der Erkrankung. Zunächst dominieren die typischen Entzündungszeichen wie Hyperämie, Ödeme und Infiltration durch Leukozyten und Makrophagen als auch durch Plasmazellen. Synoviozyten, Lymphozyten, Fibroblasten und Endothel proliferieren und das Resultat ist die Veränderung der Synovialis hin zu einem gefäßreichen verdickten Granulationsgewebe, dem sog. Pannusgewebe [Lee und Weinblatt, 2001].

#### **1.1.4 Klinik**

Charakteristische primäre Symptome für die RA sind symmetrische Schwellungen und Schmerzhaftigkeiten der Gelenke der Hand und der Finger, die vermehrt in den Morgenstunden auftreten. Seltener können auch große Gelenke wie Knie- oder Hüftgelenk betroffen sein. Oftmals klagen Patienten noch zuvor allerdings über allgemeine unspezifische Beschwerden wie Müdigkeit und Abgeschlagenheit, leichtem Fieber sowie Gewichtsverlust. Der Verlauf ist stark variabel und so vergeht oftmals einige Zeit bis zur endgültigen Diagnosestellung [Lee und Weinblatt, 2001]. Die typischen Beschwerden der Gelenke, durch die Synovitis verursacht, sind zunächst die prallelastische Weichteilschwellungen, Schmerzen und Druckdolenzen als auch die charakteristische Morgensteifigkeit. Zumeist sind mehr als 3 Gelenke betroffen, es handelt sich vielmals um eine symmetrische Polyarthritits [Siegenthaler und Blum. Hubert E., 2006]. Im weiteren Fortschritt der Krankheit und abhängig vom Schweregrad leiden die Patienten unter Deviationen, Deformitäten und Subluxationen, was auf die progrediente Destruktion der Gelenke zurückzuführen ist.

Das aggressive Pannusgewebe greift sowohl Knorpel als auch subchondralen Knochen, später auch alle benachbarten Strukturen an.

Auch Sehnen und Bänder werden irreversibel geschädigt. Fibröse Ankylosen der Gelenke können schlimmstenfalls Folge der RA sein. Die Gelenkfunktion geht vollständig verloren [Riede, 2004]. Zu den häufig beobachteten Rheumazeichen der Hände zählen die sog. Schwanenhals- oder Knopflochdeformität, die ulnare Deviation des Handgelenks und der Fingergelenke und die Beugekontraktur der Hand [Krämer und Grifka, 2005]. Systemische Manifestationen der Erkrankung treten zumeist erst im späteren Verlauf auf. Dabei sind rheumatoide Granulome in der Haut zu nennen, diese sog. Rheumaknoten finden sich an druckexponierten Arealen. Seltener extraartikuläre Merkmale sind Vaskulitiden, welche in den verschiedenen Organen unterschiedliche Auswirkungen haben [Lee und Weinblatt, 2001].

## **1.2 Therapieansätze der RA**

Die Therapieansätze und Therapiemöglichkeiten der RA haben sich in den letzten Jahrzehnten stark entwickelt. Dabei steht die Behandlung der Symptome und die möglichst geringe Progression der Gelenkdestruktion im Vordergrund, nicht zuletzt aufgrund von verbliebenen Unklarheiten bezüglich der Ursachen der Erkrankung.

Die Ziele der Therapie können klar formuliert werden: Größtmögliche Schmerzfreiheit, eine Reduktion der Entzündung und damit zumindest die Stagnation der Gelenkerstörung, und das Vermeiden von systemischen Komplikationen werden angestrebt. Es kann grob zwischen einer nicht-medikamentösen und einer medikamentösen Therapieform unterschieden werden. So sind z.B. Physiotherapie, Ergotherapie und gleichermaßen die rheuma-chirurgische Intervention in die Gruppe der nicht-medikamentösen Möglichkeiten einzuordnen und für einen Therapieerfolg zum Teil unabdingbar. Diese Therapiebestandteile sollen hier jedoch nicht Gegenstand sein.

In den 80ern wurde das Behandlungskonzept als Pyramide aus einzelnen einander ergänzenden Therapiebestandteilen beschrieben. Die Basis bildeten physikalische Maßnahmen und nicht- medikamentöse Strategien. Die Mitte der Pyramide stellte die konservative Schmerzmedikation dar, hier wurden nicht- steroidale Antiphlogistika (NSAID- nonsteroidal antiinflammatory drugs) verschrieben. Die Dosierung war abhängig von der Ausprägung der Erkrankung und der beschriebenen Schmerzintensität des Patienten. Erst mit Erreichen der Spitze wurde mit einem einzelnen Präparat aus der Gruppe der DMARDs (Disease- modifying antirheumatic drugs) behandelt, ohne diese Therapie in absehbarer Zeit nochmals zu verändern [van Vollenhoven, 2009].

Diese zurückhaltende Stufentherapie wurde durch eine frühzeitige aggressive Intervention mittels DMARDs, teilweise in Kombination verschiedener Medikamente, abgelöst. Aus Gründen der Vollständigkeit soll ein kurzer Überblick über die einzelnen Medikamentengruppen gegeben werden.

### **1.2.1 NSAID's**

Nicht-steroidale Antiphlogistika werden vielmals noch vor der Diagnosebestätigung zur Schmerzlinderung sowie im akuten Schub verabreicht. Sie greifen im Wesentlichen in die Synthese von Thromboxan und Prostaglandinen ein.

Diese Mediatoren sind maßgeblich an der Entzündungsreaktion des Gewebes sowie am Auftreten von Schmerz und Fieber beteiligt. Die NSAID's lassen sich in zwei große Gruppen gliedern, die Gruppe der nicht-selektiven COX-Hemmer sowie die Gruppe der selektiven COX-2-Hemmer. Eine Hemmung der Cyclooxygenasen führt jedoch immer auch zu einer verminderten Synthese von physiologisch vorhandenen Eicosanoiden, was eine Reihe von Nebenwirkungen mit sich zieht.

Erosionen und Ulzerationen der Magenschleimhaut, sowie eine verminderte Diurese mit den einhergehenden kardiovaskulären Problemen sind bei einer längeren Einnahme von nicht-selektiven Cyclooxygenasehemmern unter Anderem zu befürchten. Ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Ereignissen besteht bei einer dauerhaften Anwendung von COX-2-Hemmstoffen [Lüllmann et al., 2010].

### **1.2.2 Kortikosteroide**

Präparate aus der Gruppe der Kortikosteroide werden ebenfalls in der antirheumatischen Arzneimitteltherapie eingesetzt. Ihr Einsatz findet sich im Besonderen in der Reaktion auf einen akuten Schub, außerdem kann die Latenzzeit bis zum Wirkeintritt eines Basistherapeutikums überbrückt werden. Kortikosteroide tragen ebenfalls nicht zu einer Remission des Krankheitsverlaufs bei, vielmehr wirken sie symptomlindernd. Dieser Effekt erklärt sich aus ihren antiproliferativen sowie immunsuppressiven Eigenschaften. Auch eine intraartikuläre Injektion von Kortikosteroiden kann in einzelnen Fällen indiziert sein. Die akuten Beschwerden können so bei minimalen systemischen Nebenwirkungen verringert werden. Kortikosteroide weisen eine Reihe schwerwiegender Nebenwirkungen auf, weshalb ein temporär limitierter Einsatz angestrebt werden sollte. Das Cushing- Syndrom, Hautmanifestationen, Osteoporose und Stammfettsucht stellen einige Beispiele unerwünschter Nebeneffekte dar. Außerdem sind die Patienten einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt [Lüllmann et al., 2010].

### 1.2.3. DMARD's- Disease- modifying antirheumatic drugs

Die DMARD's oder auch als Basistherapeutika bezeichnete Medikamentengruppe setzt sich aus einer Vielzahl unterschiedlicher Therapeutika zusammen: Gold, Hydroxychloroquin, D-Penicillamin, Sulfasalazin, verschiedene Cytokin- Hemmstoffe wie z. B. Etanercept oder Infliximab und der Folsäureantagonist Methotrexat.

Sie alle haben die Gemeinsamkeit eines langsamen Wirkeintritts von bis zu mehreren Monaten und sind in der Lage die Progredienz der Gelenkdestruktion zu vermindern oder sogar eine Remission zu erreichen. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrem Wirkmechanismus. Um einen optimalen Wirkungsgrad zu erreichen, werden häufig Kombinationen mehrerer Präparate eingesetzt. Schon ab Diagnosestellung werden heute Basistherapeutika angewendet, das Entstehen von irreparablen Destruktionen soll so verhindert werden.

Die folgende Tabelle soll die einzelnen Basistherapeutika und ihren Wirkmechanismus in Kürze vorstellen:

Basistherapeutikum	Einordnung in Präparategruppen	Wirkmechanismus
Organische Goldverbindungen  (Hydroxy-) Chloroquin	Substanzen mit lysosomaler Speicherung	Bei zunehmender Einlagerung in die Zelle kommt es zu Störungen der Funktion: Ausreifung, Migrationsfähigkeit und Immunreaktion nehmen ab,
D-Penicillamin	Genaue Wirkweise unbekannt	z. B. Hemmung der Kollagensynthese,
Sulfasalazin	Wirkweise unbekannt	Auch eingesetzt bei chron.-entz. Darmerkrankungen
Etanercept	Immunsuppressiv	Inhibition von TNF-Molekülen
Infliximab, Adalimumab, Golimumab	Immunsuppressiv	Antikörper gegen TNF- $\alpha$
Anakinra	Immunsuppressiv	Inhibition von IL-1
Methotrexat	Immunsuppressiv	Folsäureantagonist

Tab. 1: Übersicht der Basistherapeutika in der Behandlung der rheumatischen Arthritis [Lüllmann et al., 2010]

### **1.3. Methotrexat (MTX)**

#### **1.3.1 MTX: Allgemeine Informationen**

Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit den in vitro Auswirkungen von Methotrexat. Im Folgenden soll deshalb im Besonderen auf dieses Medikament näher eingegangen werden. Methotrexat gehört in die Gruppe der DMARD's und sein Einsatz hat im Laufe der Zeit in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis stark an Bedeutung gewonnen. Es handelt sich um einen Folsäuraantagonisten, der in den 40er Jahren entwickelt wurde und ursprünglich in der Therapie neoplastischer Erkrankungen Anwendung fand. Dort sollte MTX über die Synthesehemmung von Purinen und Pyrimidinen die Proliferation maligner Zellen reduzieren [Chan und Cronstein, 2002]. Schon 1951 wurde über die rheumatische Arthritis als Indikation diskutiert, die Hemmung der Proliferation von Entzündungszellen war damals das Therapieziel. Heute ist bekannt, dass weniger der antiproliferative Effekt als die antiinflammatorische Wirkung für die Therapieerfolge verantwortlich ist. In den 80er Jahren wurde MTX erstmals in der Rheumatologie eingesetzt [Weinblatt et al., 1985]. Schnell fand die Entwicklung zum Mittel der Wahl bei der Behandlung von rheumatoider Arthritis statt [Cronstein, 2005].

Dabei wird es als sog. Low- dose MTX verabreicht, die Patienten erhalten wöchentlich eine Dosis zwischen 7,5 und 25mg. Durch die um ein vielfaches geringere Dosierung im Vergleich zur Tumortherapie werden die zytostatischen Nebenwirkungen verringert [Cutolo et al., 2001; Tian und Cronstein, 2007; McLean-Tooke et al., 2009; Lüllmann et al., 2010].

#### **1.3.2 Pharmakokinetik**

Methotrexat wird über zwei verschiedene Möglichkeiten in die Zelle aufgenommen: zum einen über einen reduzierten Folattransporter, der in nahezu allen Zellmembranen des Körpers zu finden ist, zum anderen über mehrere spezifische Folatrezeptoren. Dem Rezeptor vom Typ FR- $\beta$  kommt dabei eine gesteigerte Bedeutung zu, da er sich vermehrt auf synovialen Makrophagen von RA-Patienten befindet.

MTX wird vorwiegend über die Niere ausgeschieden, worauf sich auch die Plasmahalbwertszeit von 6-8h begründet. Man könnte nun schlussfolgern, dass ein wirksamer Plasmaspiegel nur kurzzeitig vorhanden ist. MTX wird jedoch wöchentlich oral oder subkutan verabreicht .

Die über einen längeren Zeitraum persistierende Wirksamkeit lässt sich vermutlich auf die Polyglutamierung des Moleküls zurückführen. Hierbei werden durch ein Enzym, die Polyglutamatsynthetase, immer wieder neue Glutamatreste an MTX- Moleküle im Zellinneren geknüpft. Dies bewirkt, dass das Molekül länger in der Zelle verbleibt und die Funktion des Folsäureantagonisten ausüben kann. Die Höhe des Plasmaspiegels scheint so nicht ausschlaggebend für die Wirksamkeit in der Behandlung der RA zu sein, vielmehr scheinen die angehängten Glutamatreste und damit die intrazelluläre Konzentration von Bedeutung [Cutolo et al., 2001; Chan und Cronstein, 2002; Fiehn, 2009]. In einer Studie wurden Blutproben von RA-Patienten unter oraler MTX-Therapie unter der Fragestellung der benötigten Zeit für die Glutamierung der MTX-Moleküle untersucht. Dabei wurden intrazelluläre Polyglutamate von Erythrozyten beobachtet, da MTX bekanntlich nur eine kurze Plasmahalbwertszeit aufweist. Zunächst entstehen nur langsam MTX-Polyglutamate, was auf die Dauer des biochemischen Prozesses zurückzuführen ist. Es wird schließlich nach mehreren Wochen der Gabe von MTX ein Steady- State erreicht, so ist die Latenzzeit des Medikaments zu erklären. Bei Abbruch der Therapie werden weitere Wochen benötigt, bis eine vollständige Deglutaminierung stattgefunden hat, bzw. bis die Nachweisgrenze unterschritten wird. Die antiphlogistische Wirkung ist somit nicht mit der letzten Einnahme beendet, sondern erst mit dem Ausschleusen der letzten MTX- Moleküle aus der Zelle. Alle Ergebnisse zeigten Unterschiede zwischen Molekülen mit verschiedener Anzahl an Glutamatresten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, je größer die Zahl der Polyglutamate, desto länger der Zeitraum zum Erreichen einer konstanten Konzentration [Dalrymple et al., 2008]. Dervieux et al. [Dervieux et al., 2004] stellten unter anderem heraus, dass sich die Konzentration der intrazellulären Polyglutamate in Erythrozyten eignet, um eine MTX-Therapie zu überwachen.

### 1.3.3 Chemie von MTX und Folsäure

Die genaue Bezeichnung für Methotrexat, welches auch Amethopterin genannt wird, lautet (S)-2-{4-[(2,4-Diaminopteridin-6-ylmethyl)methylamino]benzoylamino}pentandisäure. Chemisch gesehen ist Methotrexat eng verwandt mit der Folsäure. Lediglich eine Hydroxyl-Gruppe wird durch eine Aminogruppe und ein Wasserstoffatom durch eine Methylgruppe substituiert [Cutolo et al., 2001; Fiehn, 2009].

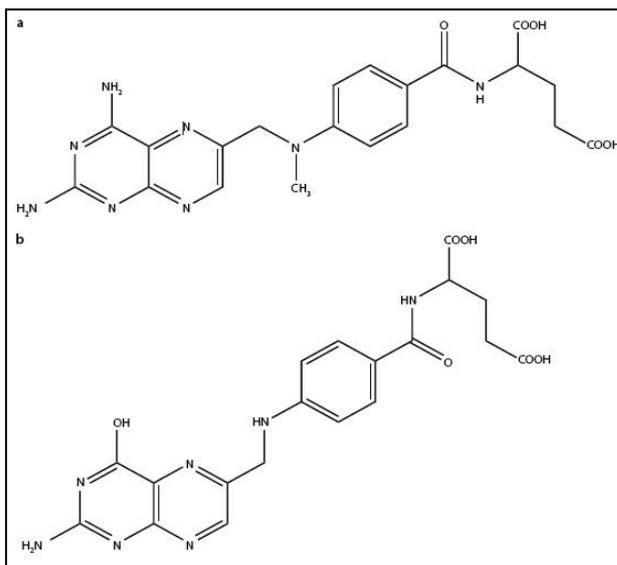


Abb. 1: : Strukturformeln von Folsäure und MTX [Fiehn, 2009]

Die Folsäure ist ein wasserlösliches Vitamin und vermehrt in Gemüse wie z. B. Spinat oder Salat enthalten. Sie setzt sich zusammen aus drei Teilen, Glutamat, p-Aminobezoesäure und dem ringförmigen Pteridin. Diese inaktive Form des Folats wird nun über die Dihydrofolat- bzw. Folatreduktase unter Mitwirken des Coenzym NADPH+ H<sup>+</sup> aktiviert. Es entsteht Tetrahydrofolat, welches eine tragende Aufgabe im Rahmen der Nukleotidsynthese inne hat.

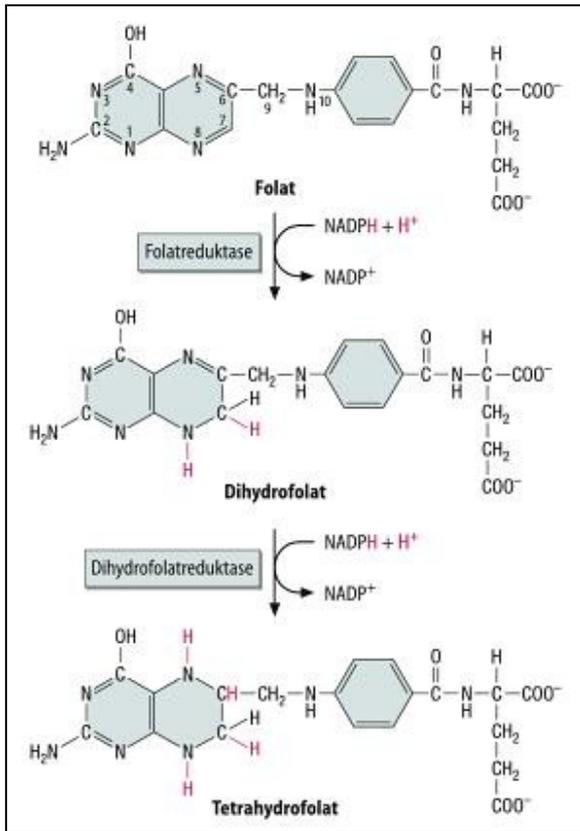


Abb. 2: Folsäurestoffwechsel [Löffler, 2007]

### 1.3.4 Wirkprinzipien von MTX

FH<sub>4</sub> fungiert als Überträger von C<sub>1</sub>-Gruppen, die bei der Bildung von Purinen und Pyrimidinen benötigt werden. Ist keine ausreichende Menge an Tetrahydrofolat vorhanden, kommt es zur Inhibition der DNA- Synthese. Die Zellproliferation kann nicht länger ungehindert stattfinden. Methotrexat inhibiert nun folsäureabhängige Enzyme in Form einer kompetitiven Hemmung. Zu diesen Enzymen gehört die oben erwähnte Dihydrofolatreduktase, welche die Synthese des aktiven Tetrahydrofolats katalysiert. Die Thymidylatsynthese wird ebenfalls gehemmt, sie ist verantwortlich für den letzten Schritt der Synthese der Pyrimidinbase Thymin: dUMP –Desoxyribose-Uridinmonophosphat- erhält über das Coenzym FH<sub>4</sub> eine Methylgruppe und es entsteht dTMP –Desoxyribose- Thymidinmonophosphat [Königshoff und Brandenburger, 2007].

Der detaillierte Zusammenhang zwischen einem verminderten Angebot von  $\text{FH}_4$  und Verbesserung einer rheumatischen Arthritis ist nicht komplett erschlossen. Die Wirkung von Methotrexat ist jedoch nicht ausschließlich auf die Intervention in den Folsäurestoffwechsel begründet, es scheinen vielmehr antiphlogistische Effekte von Bedeutung zu sein. So hat der Einsatz von MTX eine Hemmung mehrere Enzyme zur Folge.

Neben den oben Genannten wird auch die AICAR- Transformylase (AICAR = 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-ribonucleotid) blockiert [Cutolo et al., 2001; Prey und Paul, 2009]. Es resultiert daraus schließlich ein erhöhter extrazellulärer Spiegel von Adenosin. Adenosin bindet dort sehr schnell an spezifische Adenosinrezeptoren an der Zelloberfläche und wirkt so über Signalkaskaden auf den Entzündungsmechanismus ein [Tian und Cronstein, 2007]. Es ist unter anderem an der Hemmung der Zytokinproduktion sowie der Verhinderung einer Akkumulation von neutrophilen Granulozyten beteiligt. So soll die antiphlogistische Wirkung des Methotrexats zu großen Anteilen auf die Adenosininduktion zurückzuführen sein [Cutolo et al., 2001]. Die nachfolgende Tabelle soll mögliche Wirkmechanismen nochmals in der Übersicht darstellen.

<b>Beeinflussung wichtiger pathophysiologischer Mechanismen durch Hemmung folatabhängiger Enzyme</b>	
Induktion von extrazellulärem Adenosin mit Adenosinrezeptor vermittelten anti-inflammatorischen Effekten	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Reduzierung von Chemotaxis und Leukozytenmigration</li> <li>– Hemmung der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL-) 1, IL-6, IL-8, GM-CSF und möglicherweise auch Tumornekrosefaktor <math>\alpha</math></li> <li>– Anti-atherogene Wirkung durch Verminderung der Bildung von Schaumzellmakrophagen und Förderung des zellulären Cholesterinrücktransports</li> </ul>
Hemmende Effekte von MTX auf zelluläre Funktionen	<ul style="list-style-type: none"> <li>– In höheren Dosen Induktion von Apoptose und Hemmung der Proliferation von T-Lymphozyten</li> <li>– Hemmung der Knorpelinvasion von synovialen Fibroblasten</li> <li>– Hemmung der Monozyten/Makrophagen-Aktivierung</li> </ul>
Wirkung auf sonstige Mediatoren	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Hemmung der Metalloproteinasebildung</li> <li>– Hemmung der Prostaglandin-E2- und Superoxydproduktion</li> <li>– Hemmung der Kollagenaseexpression</li> </ul>

Tab. 2: Beeinflussung wichtiger pathophysiologischer Mechanismen durch Hemmung folatabhängiger Enzyme [Fiehn, 2009]

### 1.3.5 Nebenwirkungen bei MTX-Therapie

Die Behandlung einer rheumatoiden Arthritis mit Methotrexat kann verschiedene Arzneimittelnebenwirkungen mit sich bringen. Häufig kann es bei oraler Einnahme zu gastrointestinalen Beschwerden wie Übelkeit und Erbrechen der auch Appetitlosigkeit kommen. Bei 13% der Patienten wird ein Anstieg der Transaminasen beobachtet, eine Leberschädigung ist jedoch nicht vergesellschaftet. Haarausfall und Mukositis treten ebenfalls auf. Das hämatopoetische System kann in Form einer Knochenmarksdepression involviert sein, um dies zu vermeiden ist insbesondere eine Überdosierung zu vermeiden.

Ein Teil der unerwünschten Effekte geht einher mit dem Folsäuremangel, der bei MTX-Gabe intrazellulär entsteht. Eine Substitution von Folsäure kann die Veränderungen der Leberwerte abschwächen und wird, um die Wahrscheinlichkeit eines Therapieabbruchs zu verringern, empfohlen [Ortiz et al., 2000; Whittle und Hughes, 2004]. Die Dosierung wird dabei in der Literatur unterschiedlich angegeben.

Es kann 5-25mg Folsäure in der Woche oder aber einmal wöchentlich 1-5mg Folinsäure, die aktive Form der Folsäure, verabreicht werden.

Die Mehrzahl der genannten Nebenwirkungen lassen sich auf die Hemmung der Purin- und Pyrimidinsynthese, also auf den antiproliferativen Effekt, des Medikamentes zurückführen [Lee und Weinblatt, 2001; Tian und Cronstein, 2007; Prey und Paul, 2009].

Methotrexat ist ein teratogener Stoff und somit in der Schwangerschaft streng kontraindiziert. Es kann in geringer Form in die Muttermilch übergehen und daher sollte das Stillen unterbleiben [Lloyd et al., 1999]. Eine weitere aber seltene Komplikation stellt die medikamentenallergische Pneumonitis dar [Fiehn, 2009]. Patienten mit rheumatoider Arthritis leben mit einem höheren Risiko für das Entstehen von Lymphomen, so wurde auch unter MTX- Therapie das Auftreten von Non- Hodgkin- Lymphomen beobachtet. Ein Zusammenhang zur medikamentösen Therapie mit Methotrexat wurde jedoch bislang nicht nachgewiesen, vielmehr ist die Erkrankung an sich der Risikofaktor [Salliot und van der Heijde, 2009].

## **1.4. Endothelzellen**

Im Focus dieser Arbeit steht die in vitro Beobachtung von Endothelzellen. Daher soll zu Beginn ein Überblick zu dieser Zellart geschaffen werden. Das gesamte Gefäßsystem wird im Lumen von einer Zellschicht ausgekleidet – den Endothelzellen. Die Gefäßoberfläche eines erwachsenen Menschen beträgt bis zu  $7\text{m}^2$  und allein die Endothelzellen können 720g des Körpergewichts ausmachen [Cines et al., 1998; Bachetti und Morbidelli, 2000; Bouïs et al., 2001]. Zusammen mit der Basalmembran bildet das Endothel die Tunica intima aller Blutgefäße. Je nach Art des Gefäßes sind noch weitere Zellschichten vorhanden, Kapillare bestehen ausschließlich aus Endothelzellen, der Basalmembran und umliegenden Perizyten.

### **1.4.1 Die Funktion der Endothelzellen**

Die Endothelzellschicht fungiert als Trennschicht zwischen dem Gewebe und dem zirkulierenden Blut und ist somit verantwortlich für jegliche Austauschprozesse zwischen den beiden Medien. Abhängig von der Lokalisation im Körper und von den Anforderungen der jeweiligen Organe unterscheiden sich die Kontaktarten zwischen einzelnen Endothelzellen. Die Permeabilität ist also an die verschiedenen Qualitäten und Quantitäten des geforderten Stoffaustausches angepasst.

Gerinnung und Fibrinolyse, Blutdruckregulation sowie Entzündungsprozesse sind ebenfalls durch Endothelzellen beeinflusst [Bouïs et al., 2001; Welsch, 2009]. Es wird also deutlich, dass das Endothel als Ganzes eine Vielzahl von unterschiedlichster Funktionen aufweist [Kroll und Waltenberger, 2000]:

- Regulation des Gefäßtonus
- Kontrolle über die Aktivierung der glatten Muskelzellen
- Kontrolle der Permeabilität und Thrombogenität
- Beeinflussung von inflammatorischen und immunologischen Prozessen

Um diesen Aufgaben gerecht zu werden befinden sich verschiedene Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen um dort die Steuerung zu gewährleisten (Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Anti- und Koagulantien, LDL, Metabolite und Hormone).

Mehrere Signalstoffe, die für die Kommunikation und Funktionssteuerung von Bedeutung sind, werden von den Endothelzellen selbst gebildet: NO und Prostacyclin (Vasodilatation).

- Endothelin und Angiotensin II (Vasokonstriktion)
- PDGF- platelet-derived growth factor, VEGF-A- vascular endothelial growth factor, bFGF- basic fibroblast growth factor, TGF- $\beta$ - transforming growth factor- $\beta$ , MCP-1- monocyte chemoattractant protein-1 (Wachstumsfaktoren)
- ICAM- intracellular adhesion molecule, VCAM- vascular cell adhesion molecule (Adhäsionsmoleküle)
- MHC-II (Antigene)
- Hämostatische und trombolytische Faktoren

Tab. 3: Beeinflussung wichtiger pathophysiologischer Mechanismen durch Hemmung folatabhängiger Enzyme [Fiehn, 2009]

In diesem Zusammenhang ist besonders die Rolle der Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren hervorzuheben. Sie sind verantwortlich für Proliferation und Migration von Endothelzellen und für verschiedene andere Aufgaben des Endothels [Kroll und Waltenberger, 2000]. Schon nach diesem kurzen Überblick wird deutlich, dass es sich bei Endothelzellen um dynamische, heterogene, systemisch unterschiedliche Zellen mit sekretorischen, synthetischen, metabolischen und immunologischen Funktionen handelt [Cines et al., 1998].

### 1.4.2 Vaskulogenese und Angiogenese

Das Gefäßsystem wird schon sehr früh in der Embryonalentwicklung ausgebildet um die Nährstoffversorgung sicherzustellen. Man unterscheidet hier zwischen der Vaskulogenese und der Angiogenese. Die Endothelzellen stammen vom mesodermalen Gewebe ab [Cines et al., 1998]. Die Vaskulogenese bezeichnet die de novo Synthese von Gefäßen, während der embryonalen Entwicklungsphase. Aus dem Mesoderm differenzieren sich sog. Hämangioblasten und aggregieren zu Blutinseln zusammen. Die Zellen im Inneren der Inseln differenzieren zu Vorläuferzellen des Blutes, die Zellen der äußeren Schichten zu primitiven Endothelzellen. Es kommt dann zur Verbindung der Endothelzellen untereinander und zur Entstehung von vaskulären Netzwerken und schließlich zur Entstehung eines komplexen Gefäßsystems [Kroll und Waltenberger, 2000].

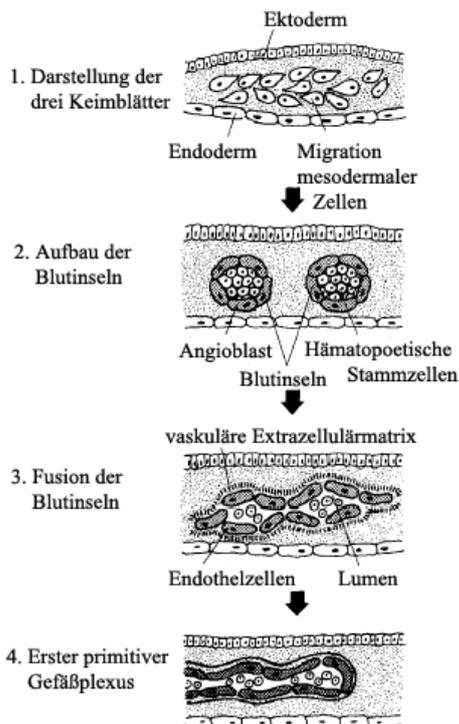


Abb. 3: Schemazeichnung zur Vaskulogenese [Risau und Flamme, 1995]

Bei der Angiogenese handelt es sich um die Gefäßbildung ausgehend von schon vorhandenen Gefäßen. Sie findet bei physiologischen Prozessen wie dem weiblichen Zyklus und der Wundheilung statt, spielt allerdings auch eine Rolle bei verschiedenen pathologischen Vorgängen, allen voran die Vaskularisation bei der Versorgung von Tumorgewebe [Folkman und Shing, 1992; Cines et al., 1998].

Der Beginn der Angiogenese liegt in der Entstehung von Lücken in der Basalmembran initiiert durch die Sekretion von Plasminogen und Proteasen durch Endothelzellen. Durch den Verlust des engen Kontaktes zwischen den einzelnen Endothelzellen kommt es zur Aktivierung, und schließlich zur Migration und Proliferation der Zellen. Die Richtung wird durch verschiedene angiogene Faktoren vorgegeben, wodurch auch Perizyten und weitere zur Gefäßbildung nötige Zellen angelockt werden [Kroll und Waltenberger, 2000]. Die Regulation erfolgt durch das Gleichgewicht zwischen Inhibitoren und Induktoren.

<b>Angiogene Faktoren</b>	<b>Angiostatische Faktoren</b>
Ang-1, Ang-2, Tie-1, Tie-2	Endostatin
Angiogenin	Angiostatin
aFGF, bFGF, PDGF-B	Thrombospondin-1, -2, -3 und -4
IFN $\gamma$ , IFN2 $\alpha$	PF-4, IP-10, MIG
VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
VEGF-R1, VEGF-R2	Typ I (PAI-1), PAI-2
Urokinase-type Plasminogen Aktivator (u-PA), Urokinase-type Plasminogen Aktivator Receptor (u-PAR)	
Prolactin	
$\beta$ 3-Integrin, $\beta$ 1-Integrin	
TGF $\beta$ 1, TNF $\alpha$ , HGF, EGF	
MCP-1, ENA-78, Gro- $\alpha$	

Tab. 4: Synopsis der angiogenen und angiostatischen Faktoren [Siegenthaler und Blum. Hubert E., 2006]

Früher ging man davon aus, dass postnatal eine Gefäßneubildung ausschließlich über Teilung und Bildung von Ausläufern möglich ist. Heute gibt es Studien zu der Existenz von endothelialen Vorläuferzellen im ausgewachsenen Organismus und ihren Einfluss auf die Angiogenese. Es gibt also zirkulierende Vorläuferzellen, die so etwas wie Vaskulogenese noch nach der embryonalen Entwicklung möglich machen [Asahara et al., 1997].

Nach diesen Studien können diese Zellen durch bestimmte Signalstoffe (z.B. Wachstumsfaktoren, Hypoxie u.a.) aus dem Knochenmark ins Gefäßsystem gelangen und an Orten der Angiogenese zu Endothelzellen differenzieren [Murasawa und Asahara, 2005]. Dieser Aspekt ist besonders aus therapeutischer Sicht interessant.

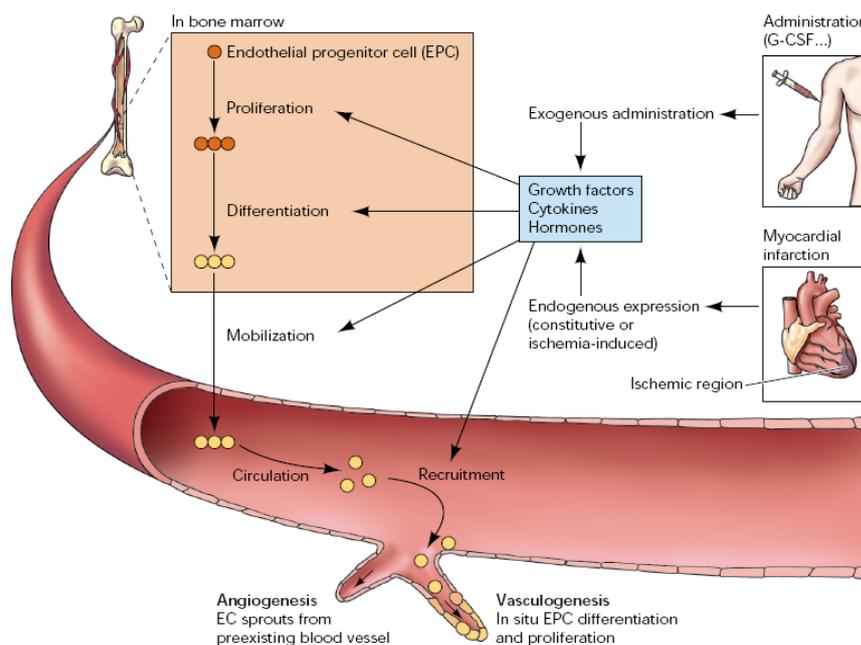


Abb. 4: Bewegungspotential von endothelialen Vorläuferzellen (EPC's) [Murasawa und Asahara, 2005]

### 1.4.3. Die Differenzierung von Endothelzellen

Der Hämangioblast gilt als gemeinsame Vorläuferzelle für hämatopoetische Vorläuferzellen und Angioblasten (im Embryo) bzw. endotheliale Vorläuferzellen (Endothelial Progenitor Cells- EPC's). [Reyes 2002]. Die Theorie des gemeinsamen Ursprungs stützt sich auf die enge räumliche Nähe der Zellarten und vor Allem auf die gemeinsamen Expression verschiedener Gene [Asahara et al., 1997]. Flk-1 (VEGF-R1) wird, wie der nachfolgenden Zeichnung (Abb.5) zu entnehmen ist, bei dem gemeinsamen Vorläufer exprimiert und dann verringert. Dies ist ein Hinweis, dass sich an dieser Stelle der gemeinsame Entwicklungsweg gabelt. Die hämatopoetischen Vorläuferzellen weisen diesen Rezeptor nicht mehr auf. Studien mit Vorläuferzellen, die den Flk-1-Rezeptor besaßen, zeigten deren Fähigkeiten zur Differenzierung und Bildung von Gefäßstrukturen. Zellen mit Flk-1 (VEGF-R2) wurden beim Maus- und Affenmodell schon als endotheliale Vorläufer benannt [Sone et al., 2003].

So ist der spezifische Rezeptor Flk-1 sowohl beim noch nicht vollständig differenzierten Hämangioblast als auch bei den Endothelzellen nachgewiesen. Die Rezeptoren (Flk-1 und Flt-1) wie auch das „VE-cadherin“ (vascular endothelial cadherin), zur Vermittlung der Zellkontakte und zur Ausbildung eines Netzwerkes, sind zur Vaskulogenese von Bedeutung [Vittet et al., 1997].

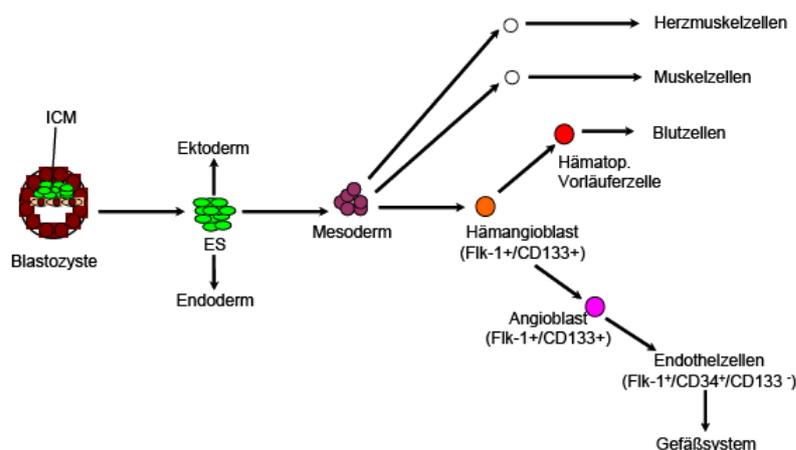


Abb. 5: Differenzierung von der embryonalen Stammzelle zur Endothelzelle. Legende: ICM (inner cell mass), ES (embryonale Stammzellen) [Jänich, 2009]

## 2. Zielformulierung

In Deutschland leiden schätzungsweise 800.000 Menschen an rheumatoider Arthritis, viele Weitere an einer anderen Erkrankung des rheumatischen Formenkreises. Methotrexat wird bei einer Vielzahl dieser Patienten als Basistherapeutikum eingesetzt. In einer großen deutschen Zeitschrift wurden bestimmte Rheumamedikamente als Kontraindikation für das Setzen von Implantaten genannt, jedoch ohne diese Aussage auf eine wissenschaftliche Evidenz zu stützen. Die erfolgreiche Therapie mittels Implantaten setzt, wie auch andere oralchirurgische Eingriffe, eine möglichst ungehinderte Wundheilung sowie Geweberegeneration voraus. Viele verschiedene Faktoren und Zellarten sind an den genannten Prozessen beteiligt. Die Endothelzellen stellen in diesem Zusammenhang eine wichtige Zellart dar, da sie für die Angiogenese und so für die Versorgung des sich regenerierenden Gewebes verantwortlich sind.

Zielsetzung dieser Arbeit ist es nun, den Einfluss von Methotrexat auf Endothelzellen *in vitro* zu beobachten und zu dokumentieren. Im Focus stehen im Wesentlichen drei Aspekte: quantitative Veränderungen der Zellen, morphologische Auffälligkeiten und Änderungen in der Stoffwechselaktivität der Endothelzellen. Abschließende Zielsetzung ist es, eine Aussage sowohl über das Vorhandensein und die Ausprägung eines Hemmeffektes durch MTX auf Endothelzellen *in vitro* als auch über eine mögliche Dosisabhängigkeit zu treffen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Zellkultur

Zellen:

- Primäre Endothelzellen aus der humanen Vena umbilica (sog. HUVECs – human umbilical vein endothelial cells).

Nährmedium:

- Endothelial Cell Growth Medium (Promocell, Heidelberg) mit Zusätzen:
  - 0,4 % ECG/H,
  - 2% FKS,
  - 1,0 µg/ml Hydrocortison,
  - 0,1 ng/ml Epidermal Growth Factor,
  - 1,0 ng/ml Basic Fibroblast Factor,
  - 50 ng/ml Amphotericin B
  - 50 ng/ml Gentamicin.

Lösungen und Reagenzien:

- Collagenase A 1% (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) von Clostridium histolyticum, Lagerung bei 4°C im Kühlschrank, Arbeitslösung ist 0,05%, dazu in entsprechender Menge PBS lösen und steril filtrieren.
- PBS-Puffer Dulbecco (Phosphate Buffered Saline) ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (Biochrom AG, Berlin), pH 7,4  
9,5 g/l in aqua dest. lösen und im Anschluss autoclavieren.
- Gelatine 2% Solution Type B from Bovine Skin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), zur Beschichtung der Schalen mit PBS auf 0,5% verdünnen, den Boden benetzen, 20-30 min bei 37°C inkubieren und dann Überschüsse absaugen. Zweifach mit PBS waschen. Die beschichteten Platten sind bis zu einer Woche haltbar.
- Ethanol 70% vergällt mit Ketonen technisch (AppliChem GmbH, Darmstadt).

- Trypsin / EDTA Solution 0,05% / 0,02%(Biochrom AG, Berlin) in PBS w/o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , Lagerung bei maximal  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Aqua dest.
- CasyTon- Lösung
- CasyClean- Lösung

### 3.1.2. MTT-Assay

Lösungen und Reagenzien

- 2-Propanol (Merck, Darmstadt).
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma-Aldrich, Co. St.Louis).

Medikament:

- Methotrexat 15,00mg(Apotheke des Universitätsklinikums), unverdünnt 0,60ml, zwischen 2 und  $8^{\circ}\text{C}$  lichtgeschützt aufzubewahren.

### 3.1.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien

- $\text{CO}_2$ -Inkubator HeraCell240 (Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf)
- Einmalklingen Nr.21 für Mehrwegskalpelle (Bayha, Tuttlingen)
- Einmalskalpelle Nr.21 (Bayha, Tuttlingen)
- Elisa Reader  $\mu$ Quant (Bio-Tek Instruments Bad Friedrichshall)
- Lichtmikroskop Diaphot-TMD (Nikon Kogaku K.K., Tokyo, Japan)
- Maxi- Kulturschalen
- Pinzetten
- Rüttler KS 25basic (Janke & Kunkel GmbH & Co KG IKA Labortechnik, Staufen)
- Scherenklemmen
- Skalpellhalter
- Spiegelreflexkamera Nikon 801 (Nikon Kogaku K.K., Tokyo, Japan)
- Spritzen 10ml und 5ml
- Spülkanüle

- Sterilbank HeraSafe(Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf) mit Zubehör wie Pipettus, Einmalpipetten, sterilisierte Pasteurpipetten, Absaugvorrichtung
- Sterile Tücher
- Sterile Zentrifugenröhrchen (NUNC, Wiesbaden)
- Zellkulturplatten, 24er und 96er Wellplates (TPP, Trasadingen, Schweiz)
- Zellkulturschalen Nunclon (NUNC, Roskilde, Dänemark) mit 92 mm Durchmesser
- Zellzählsystem CASY I TT (Schärfe System GmbH, Reutlingen)
- Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R (Karl Willers Laborbedarf OHG)

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Präparation von Endothelzellen aus humaner Nabelschnur

Die benötigten Endothelzellen werden aus dem venösen Gefäß der menschlichen Nabelschnur gewonnen und sind aus diesem Grund als sogenannte HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells) zu bezeichnen. Eine Nabelschnur enthält eine Vena umbilica und zwei Arterien, die Wände der Arterien sind deutlich dicker und stabiler, ihr Durchmesser geringer als der der Vene. Die Nabelschnur empfiehlt sich aus mehreren Gründen für die Isolierung von Endothelzellen: Sie ist im Vergleich zu anderen Gefäßen relativ leicht zu beschaffen und zudem meist ohne pathologische Befunde. Die Nabelschnur sollte nicht von einer Mutter mit nachgewiesenen Infektionskrankheiten stammen und nach der Entbindung so schnell wie möglich abgetrennt werden. Sie wird dann in einem sterilen Gefäß mit Transportmedium bei 4°C gelagert und sollte im Anschluss möglichst zeitnah präpariert werden.

Vor dem Beginn werden die benötigten Reagenzien Medium, PBS und Kollagenase im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Alle Arbeiten finden nun unter der Sterilbank statt. Die Präparation wird in einer Maxi- Kulturschale durchgeführt. Die Nabelschnur wird aus dem Transportmedium entnommen und mit 70%igem Alkohol abgespült. Bereiche, die durch eine Klammer verletzt wurden, sollten entfernt werden. Eine Spülkanüle wird nun in die Vene eingeführt und fixiert, dies kann mit einer Scherenklemme passieren. Um die Blutrückstände im Gefäß zu entfernen wird durch die Kanüle zunächst mit PBS gespült, bis makroskopisch keine Reste mehr erkennbar sind. Rückstände der Spülflüssigkeit werden durch die Injektion von Luft in die Kanüle herausgeblasen.

Nun muss das andere Ende der Nabelschnur mit einer weiteren Klemme verschlossen werden. Die Nabelschnur wird mit Collagenase 0,05% geflutet und für 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Es folgt eine kurze äußere Desinfektion mit Alkohol 70%. Eine Massage der Nabelschnur unterstützt das Ablösen der Zellen der Gefäßwand.

Der Inhalt, der die abgelösten Zellen enthält, wird nun über die Kanüle in ein Falconröhrchen mit Medium abgelassen. Weitere 5ml Medium werden in die Nabelschnur gefüllt und tropfen nach leichtem Massieren in ein zweites Röhrchen. Es folgt das Zentrifugieren beider Röhrchen bei 1200U/min für 7min. Die Überstände des

Mediums , bis auf einen kleinen Rest, über die Absaugvorrichtung entfernt, es verbleibt ein Pellet am Boden des Röhrchens. Das Pellet kann nun mit frischem Medium resuspendiert werden.

### **3.2.2 Die Kultivierung der Endothelzellen**

Die eigentliche Gewinnung der Endothelzellen ist damit abgeschlossen, die nächsten Arbeitsschritte gehören bereits zur Kultivierung der Zellen. Die Zellkulturschalen wurden dazu im Vorfeld mit 0,5% Gelatine beschichtet. Im Anschluss wird der Gelatineüberschuss abgesaugt und die Kulturschalen mit PBS zweifach gewaschen. Sie sind nun bereit für die Zellkultivierung und die Endothelzellen werden ausgesiedelt. Die Inkubationszeit beträgt 24h im Brutschrank bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>. Danach sollten die Zellen mit PBS zweifach gewaschen werden und neues Nährmedium erhalten [Jaffe et al., 1973; Breithaupt-Faloppa et al., 2008].

Sobald die Zellen konfluent sind, können sie passagiert werden. Die Zellen werden zunächst mit PBS zweimal gewaschen. Im Folgenden werden 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA zum Ablösen der Zellen zugesetzt. Die Inkubationszeit beträgt nur wenige Minuten bei Raumtemperatur. Der Ablösevorgang kann im Lichtmikroskop kontrolliert werden. Die Zugabe von 4ml Medium beendet die Trypsinwirkung. Zum endgültigen Ablösen wird die Zellsuspension mittels Pipette in einer schrägen Haltung der Schale am tiefsten Punkt abgesaugt und zurückgespült. Die Zellsuspension wird nun in ein Röhrchen überführt, für 4 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird bis auf einen kleinen Rest abgesaugt und das Pellet mit Endothelial Cell Growth Medium resuspendiert. An dieser Stelle wird noch die Zellzahl ermittelt: Hierzu werden 100µl der ursprünglichen Suspension in ein CasyTon-Gefäß gegeben und die Zellzahl im Zellcounter Casy I TT bestimmt.

Das Gerät gibt auch die Größen der kleinsten sowie der größten Zelle an. Nach dem Zentrifugieren und der Resuspension kann so die gewünschte Zelldichte für den Versuch durch Zugabe der entsprechenden Menge Medium ermittelt und ausgesiedelt werden. In diesem Fall wurde mit einer Zelldichte von 10.000 Zellen/ ml gearbeitet. Es werden 24er Well-Plates der Firma TPP für die Versuche verwendet. Ab diesem Zeitpunkt sollte ein Mediumwechsel jeden zweiten Tag stattfinden.

In der Regel wird die zweite Passage für Versuche genutzt, die Zellen können dazu vorher nach morphologischen Gesichtspunkten und über spezielle Antikörper (anti vWF, anti CD31 oder eine negative Reaktion auf anti-  $\alpha$ - smooth- muscle-actin) als Endothelzellen identifiziert werden [Breithaupt-Faloppa et al., 2008].

### 3.2.3. MTT-Assay

Der MTT-Test basiert auf der Verstoffwechslung des Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide durch die Dehydrogenasen der Mitochondrien der zu untersuchenden Zellen. MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) wie die vollständige chemische Bezeichnung ist, gehört zu den Mono- Tetrazolium- Salzen und ist von gelblicher Farbe. Es wird zum in vitro Nachweis von Stoffwechselaktivität genutzt und funktioniert somit nur bei vitalen Zellen [Mosmann, 1983; Staton et al., 2009]. [Hatok 2009]

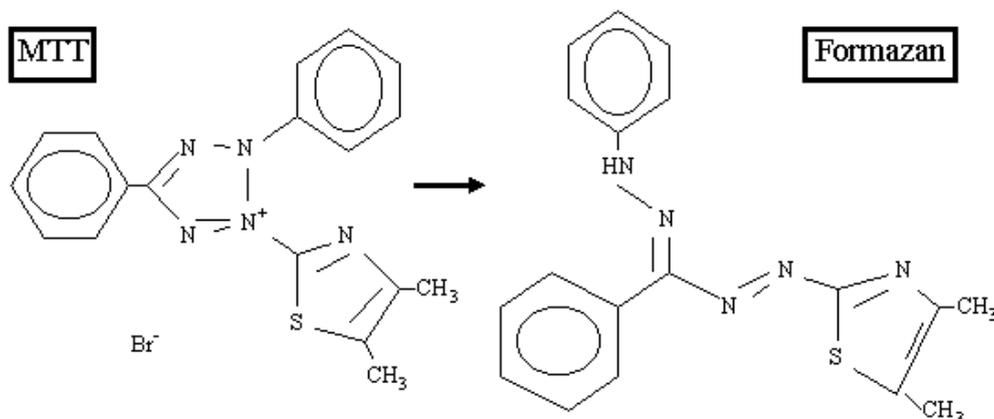


Abb. 6: Farbreaktion vom gelblichen MTT zu purpurfarbenem Formazan [Schulz, 1998]

Der Tetrazoliumring des gelösten MTT wird bei der Reaktion gespalten. Das Produkt ist Formazan, welches sich unlöslich als purpurfarbene Kristalle am Boden des Well niederschlägt. Die Menge der Kristalle und somit die spätere Absorption verhält sich proportional zur Menge der vitalen Zellen. Die Kristalle werden nach vorherigem Absaugen des Mediums in Isopropanol gelöst und die Absorption der entstandenen Lösung kann mit Hilfe des Elisa Readers gemessen werden [Mosmann, 1983].

Der MTT-Test wurde in diesem Fall an Zellen mit einer Zelldichte von  $10.000/\text{cm}^2$  in den 24er Well-Plates durchgeführt. Das Arbeitsvolumen beträgt 1ml pro Vertiefung. An sieben Messzeitpunkten wird der MTT-Test durchgeführt. Demnach ist zu Beginn der Versuchsreihe der Versuchsansatz in siebenfacher Form herzustellen.

Für jede Messung werden die Platten nach demselben Schema pipettiert:

Die erste Platte enthält je sechs Vertiefungen mit einer Medikamentenkonzentration, die nächste Reihe wird jeweils mit der nächst geringeren Konzentration bestückt. Die Gewebekonzentration von Methotrexat soll zwischen 0 und 1000nM simuliert werden. Aus diesem Grund werden vier Gefäße benötigt um die einzelnen Nährmedien mit der entsprechenden Medikamentenkonzentrationen herzustellen.

Die erste Reihe der Plates werden mit einer Maximalkonzentration von 1000nM bestückt, die Weiteren mit 100nM, 10nM und 1nM. Die zweite Platte dient der Negativkontrolle, hier werden nur Zellen und Medium, ohne Medikamentenzusatz, in die Vertiefungen der ersten beiden Reihen gegeben. Die unteren Reihen bleiben leer. Die Messungen finden nach 1, 3, 6, 8, 10 und 14 Tagen der Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und  $\leq 5\% \text{ CO}_2$  statt. Ein Mediumwechsel erfolgt alle zwei Tage während des gesamten Versuchszeitraumes. Dabei werden  $600\mu\text{l}$  Medium vorsichtig abpipettiert, ohne dabei den Boden des Wells zu berühren und so die dort adhärenen Zellen zu beeinflussen.  $600\mu\text{l}$  frisches Medium werden ersetzt, hierzu ist wie schon bei Versuchsansatz, die Herstellung von Medium mit den vier verschiedenen Konzentrationen MTX erforderlich. In der Vorbereitung für die Messung wird die MTT-Gebrauchslösung hergestellt. Dazu werden 7,5ml des MTT-Stocks, der zuvor in 2ml aliquotiert und eingefroren wurde, mit 30ml Medium versetzt.

Der MTT-Stock ist die Lösung von 50mg des festen gelben MTT in 10ml PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  / $\text{Mg}^{2+}$ ). Pro Well wird nun 1ml der MTT- Gebrauchslösung hinzugegeben. Die Platten müssen nun 3h bei 37°C inkubiert werden und im Anschluss wird die Gebrauchslösung vorsichtig abgesaugt. Der Boden der Wells sollte möglichst nicht mit der Pipette berührt werden um die Formazan- Kristalle nicht zu entfernen. In jedes Well werden nun 350µl 2- Propanol pipettiert und die Platte wird für 10min auf dem Rüttler platziert, so werden die Kristalle gelöst und es entstehen unterschiedlich stark gefärbte violette Lösungen. Bei einer Wellenlänge von 570nm, was das Absorptionsmaximum von Formazan darstellt, kann nun im Elisa Reader die Absorption in jedem einzelnen Well gemessen werden. Sie verhält sich proportional zu der Menge der Kristalle, worüber man auf die Proliferation der Zellen schließen kann. Direkt nach der Messung wird nochmal aus einem Well je zweimal 100µl in ein 96er Well umpipettiert. Eine Reihe enthält folglich die gleiche Medikamentenkonzentration. So wird eine zweite photometrische Messung bei gleicher Wellenlänge durchgeführt.

### **3.2.4 Fotodokumentation und Zellzählung**

Über den gesamten Messzeitraum ist eine hinreichende Dokumentation sicherzustellen und es sind zusätzlich morphologische Auffälligkeiten der Zellen, sowie deutliche Veränderungen der Zellzahl festzustellen. Um dies zu gewährleisten, wird beim Versuchsansatz eine weitere Platte angefertigt, die jedoch zu keinem Messzeitpunkt mit MTT versetzt wird. Sie dient über den kompletten Zeitraum ausschließlich der Dokumentation. Schon vor Versuchsbeginn wird am Boden der Wells mit wasserfestem Stift mittig ein Kreuz gezeichnet um später eine beim Blick durch das Mikroskop exakt reproduzierbare Einstellung möglich zu machen. Zu jedem der Messzeitpunkte wird dann pro Well mikroskopisch, bei einer 10x Vergrößerung mit der Kamera Nikon 801 und der zugehörigen Software NIS-Elements, ein Bild aufgenommen und archiviert. Das Foto sollte, im Bezug zu dem gezeichneten Kreuz, möglichst an der gleichen Stelle entstehen. Es werden also an jeden Versuchstag sechs Bilder mit identischer MTX- Konzentration von den vier Vergleichsgruppen und zwölf Bilder der Kontrollgruppe angefertigt. Die Bilder können später nach morphologischen Kriterien verglichen werden und über die Software Image J kann eine Zellzählung stattfinden. Dabei werden per Mausclick alle Zellen eines Fotos markiert und durch die Software erfasst und addiert. Man erhält so sechs Werte für jeden Medikamentenkonzentration und zwölf Kontrollgruppenwerte.

### **3.2.5. Statistische Methoden**

Die statistische Auswertungen wurden ausnahmslos mit der Software SPSS 15.0 für Windows (SPSS Inc. , Illinois, USA) durchgeführt.

Für die festgesetzten Messzeitpunkte nach einem, 3, 6, 8, 10 und 14 Tagen wurden jeweils die identischen Werte berechnet. Dabei wurde für die jeweiligen Gruppen (Kontrollgruppe ohne MTX-Zusatz , 4 Gruppen mit den 4 unterschiedlichen MTX-Konzentrationen 1000nm, 100nm 10 nm und 1nm) der arithmetische Mittelwert (mean) und die Standardabweichung (SD) sowie die 95%-Konfidenzintervalle (CI) bestimmt. Die Analyse der Gruppendifferenzen auf Signifikanz erfolgte durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) unter Verwendung des Tamhane T2 - Post-Hoc-Tests als robustes konservatives Testverfahren.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Ergebnisse der Fotodokumentation**

#### **4.1.1. Morphologie der Endothelzellen vor Beginn der Versuchsperiode**

Die Endothelzellen wurden durch Präparation einer humanen Nabelschnur gewonnen und zunächst kultiviert. Nach Erreichen eines konfluenten Monolayers wurde passagiert. Die Konfluenz wurde mikroskopisch festgestellt und war zumeist ca. 3- 5 Wochen nach der Isolierung zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt wurde noch in keines der Wells Methotrexat hinzugefügt. Konfluente Endothelzellen befinden sich in engem Zellkontakt, die Oberfläche des Wells ist nahezu komplett von einer Zellschicht bedeckt. Die Zellgrenzen sind jedoch deutlich ersichtlich sowie die Zellkerne ohne Überlappungen. Die Endothelzellen reagieren auf Zell- Zell- Kontakte mit einer Einstellung der Replikation. Es handelte sich somit um ein einlagige Zellschicht an der Welloberfläche. Die Zellen wiesen die für sie charakteristischen morphologischen Merkmale auf. Sie waren in ihrer Form oval bis spindelförmig und relativ flach an der Welloberfläche. Der Zellkern befand sich jeweils zentral, war von ovalem Umriss. An dieser Stelle wiesen die Endothelzellen ihre größte Dicke auf, die Ausläufer in der Peripherie der Zelle sind dünn und dementsprechend mikroskopisch transparenter. Zum Teil waren pro Zelle mehrere Nukleoli sichtbar. In den folgenden Punkten sind die einzelnen Versuchstage dargestellt. Repräsentativ sind je drei Photographien aus Wells mit der höchsten MTX-Konzentration und drei mit der Niedrigsten ausgewählt worden. Zusätzlich vergleichend fungieren drei Abbildungen der Negativkontrollen. Unterschiede in der gesamten Farbgebung der einzelnen Bilder sind auf eine voneinander abweichende Belichtung zurückzuführen und daher bei der Beschreibung zu vernachlässigen.

#### 4.1.2. Qualitative Beschreibung der Kontrollgruppen sowie der mit Methotrexat versetzten Vergleichsgruppen nach einem Tag der Kultivierung

Zu diesem frühen Versuchszeitpunkt sind keinerlei morphologische Unterschiede zwischen den Endothelzellen der einzelnen Gruppen zu beobachten. Die Zellwände sind klar definiert, die Zellkerne deutlich abgrenzbar, sowie einzelne Nukleoli sichtbar. Alle Wells weisen eine noch niedrige Besiedlungsdichte auf. Es entstehen Zellausläufer und die Zellen bilden an Stellen räumlicher Nähe erste Zell-Zell-Kontakte aus. (vgl. Abb.7-9)

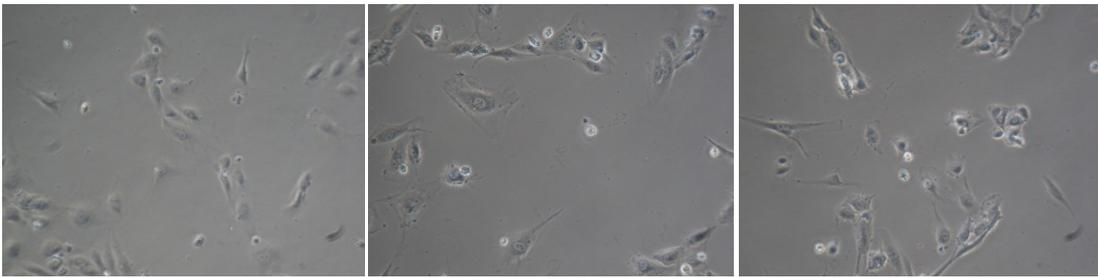


Abb. 7: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach einem Tag. Wells mit der höchsten MTX-Konzentration von 1000nm (Wells A1, A3 und A5)

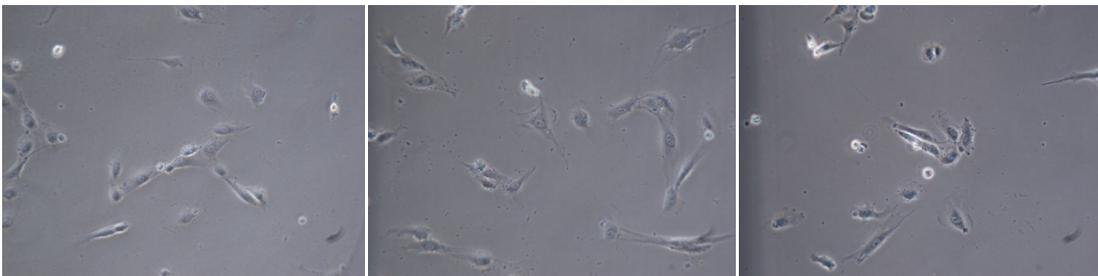


Abb. 8: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach einem Tag. Wells mit der niedrigsten MTX-Konzentration von 1 nm (Wells D2, D3 und D5)

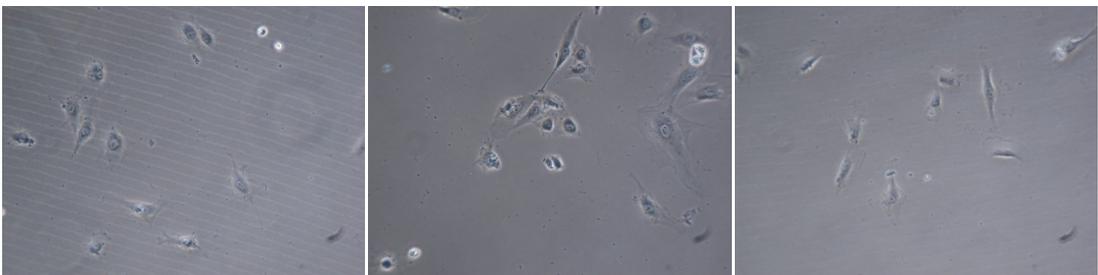


Abb. 9: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach einem Tag. Wells der Kontrollgruppe ohne MTX-Zusatz (Wells E2, E3 und E6)

#### 4.1.3. Qualitative Beschreibung der Kontrollgruppen sowie der mit Methotrexat versetzten Vergleichsgruppen nach drei Tagen der Kultivierung

Auch nach drei Tagen sind keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den Endothelzellen der Versuchsgruppen auszumachen. Die Zahl der Zell-Zell-Kontakte hat auf Grund der Proliferation zugenommen. Vereinzelt ist eine spindelförmige Anordnung der Zellen zu erkennen. Es könnte bei diesen wenigen repräsentativen Aufnahmen beinahe der Eindruck entstehen, dass die Besiedelung der Well-Oberfläche in der Kontrollgruppe weniger Regelmäßigkeiten aufweist, als die der Vergleichsgruppen. (vgl. Abb. 10-12). Die Kontrollgruppe (Abb.12) zeigt noch größere zellfreie Areale, die Spindelform der Zellen ist minimal stärker ausgeprägt.

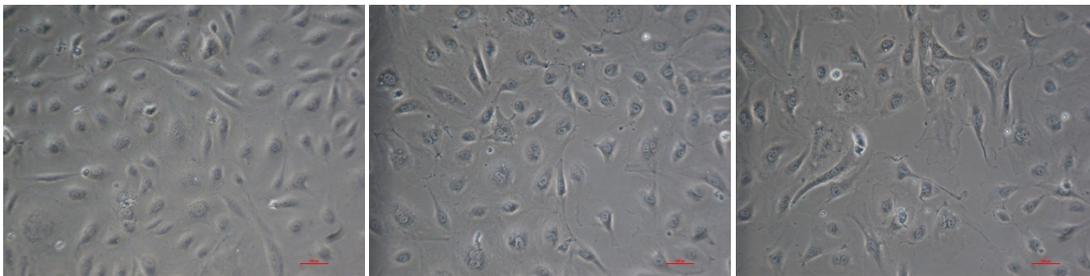


Abb. 10: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach drei Tagen. Wells mit der höchsten MTX-Konzentration von 1000nm (Wells A1, A4 und A5)

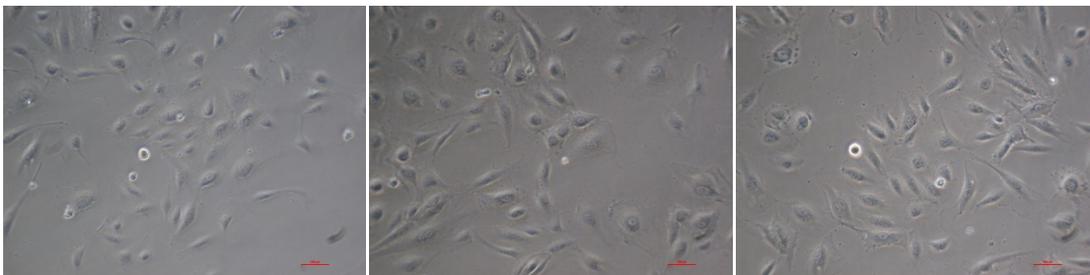


Abb. 11: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach drei Tagen. Wells mit der niedrigsten MTX-Konzentration von 1nm (Wells D1, D2 und D3)

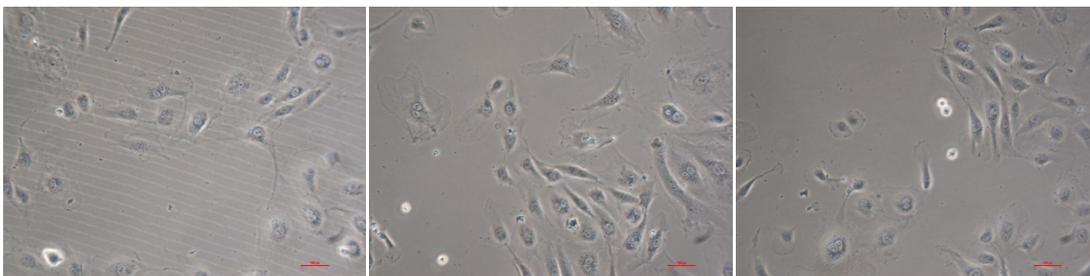
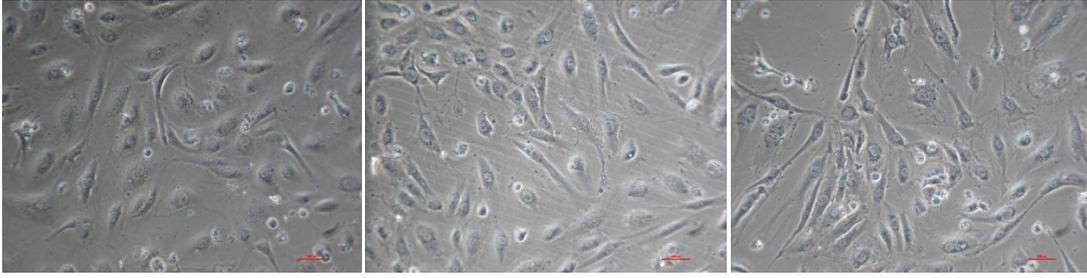


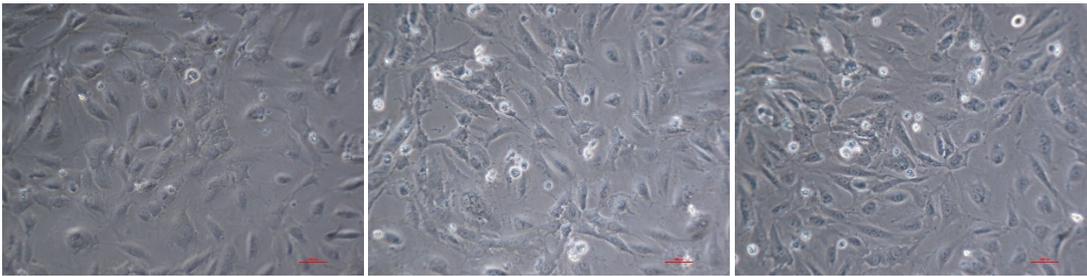
Abb. 12: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach drei Tagen. Wells der Kontrollgruppe ohne MTX-Zusatz (Wells E2, E3 und E5)

#### **4.1.4. Qualitative Beschreibung der Kontrollgruppen sowie der mit Methotrexat versetzten Vergleichsgruppen nach sechs Tagen der Kultivierung**

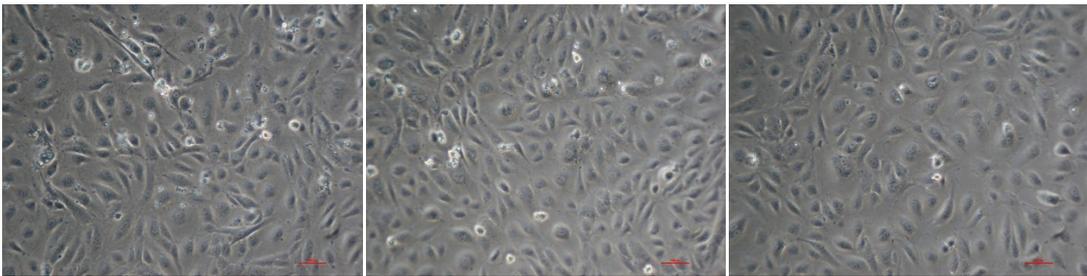
Der sechste Versuchstag zeigt erstmals morphologische Unterschiede der Zellen in den Gruppen. Die Kontrollgruppe besitzt eine dichte regelmäßige Besiedlung der Oberfläche. Die Zellausläufer sind weniger dominierend als zuvor und die Zellwände beschreiben insgesamt regelmäßigeren Formen. In einigen Bereichen lässt sich die typische stromlinienförmige Anordnung der Zellen zueinander erkennen. Zellgrenzen und Zellkerne sind deutlich auszumachen (Abb.15). Anders liegt der Fall bei beiden Versuchsgruppen. Die Zellformen sind hier weniger regelmäßig, sie erscheinen durch Zellausläufer zum Teil stark in die Länge gezogen. Dabei lässt sich nochmals zwischen der Gruppe mit der 1000nm MTX-Konzentration in der oberen Reihe (Abb.13) und der geringeren 1nm Konzentration (Abb.14) differenzieren. Die Besiedlungsdichte ist im Fall der Vergleichsgruppen, auch schon ohne CellCount, sichtbar niedriger anzusetzen als die der Kontrollgruppe.



**Abb. 13:** Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach sechs Tagen. Wells mit der höchsten MTX-Konzentration von 1000nm (Wells A1, A2 und A5)



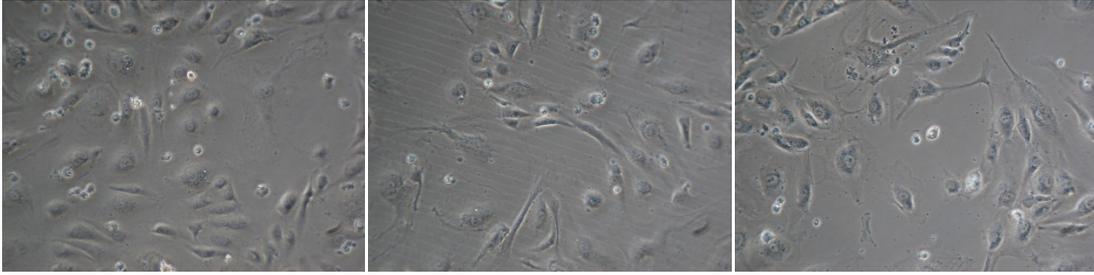
**Abb. 14:** Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach sechs Tagen. Wells mit der niedrigsten MTX-Konzentration von 1nm (Wells D1, D4 und D5)



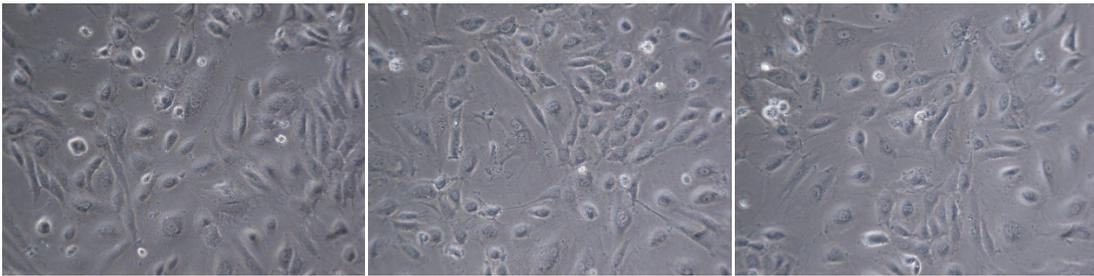
**Abb. 15:** Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach sechs Tagen. Wells der Kontrollgruppe ohne MTX-Zusatz (Wells F3, F4 und F5)

#### **4.1.5. Qualitative Beschreibung der Kontrollgruppen sowie der mit Methotrexat versetzten Vergleichsgruppen nach acht Tagen der Kultivierung**

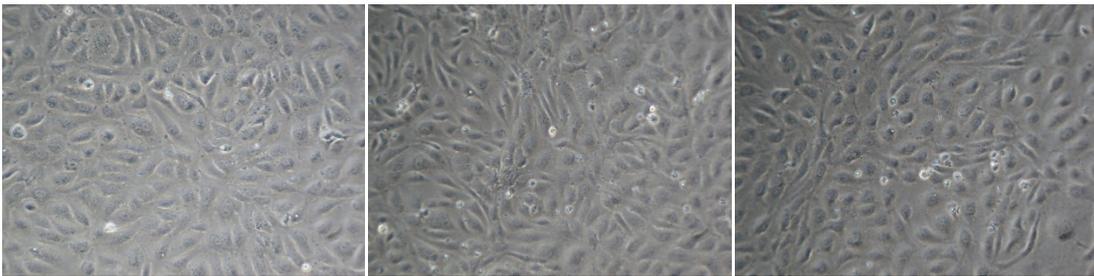
Versuchstag acht bestätigt die Beobachtungen des sechsten Tages bezüglich morphologischer Unterschiede der Vergleichsgruppen. Auch hier zeigt sich in der Kontrollgruppe eine starke Regelmäßigkeit der Zellanordnung und der Zellform. Die Zellen erscheinen kleiner als die der Vergleichsgruppen, Zellausläufer sind kaum mehr vorhanden. Auch zu diesem Zeitpunkt sind Stromlinien in der Zellanordnung sichtbar. Zellgrenzen und Zellkerne sind weiterhin deutlich zu erkennen (Abb.18). Beide Versuchsgruppen hingegen zeigen im Vergleich hyperplastisch erscheinende Zellen mit unregelmäßigen Zellausläufern. Die Unterscheidung zwischen den beiden Gruppen mit der maximalen MTX-Konzentration (Abb.16) und der minimalen Konzentration (Abb.17) anhand von Zellzahl und Zellgröße wird auch hier deutlich.



**Abb. 16:** Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach acht Tagen. Wells mit der höchsten MTX-Konzentration von 1000nm (Wells A1, A2 und A5)



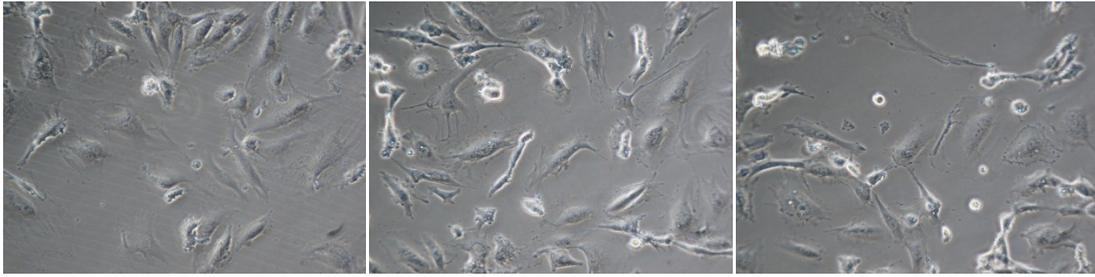
**Abb. 17:** Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach acht Tagen. Wells mit der niedrigsten MTX-Konzentration von 1nm (Wells D2, D4 und D6)



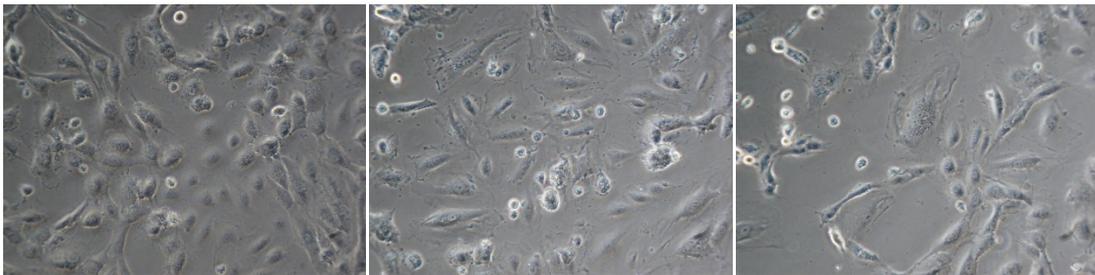
**Abb. 18:** Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach acht Tagen. Wells der Kontrollgruppe ohne MTX-Zusatz (Wells E6, F2 und F3)

#### **4.1.6. Qualitative Beschreibung der Kontrollgruppen sowie der mit Methotrexat versetzten Vergleichsgruppen nach zehn Tagen der Kultivierung**

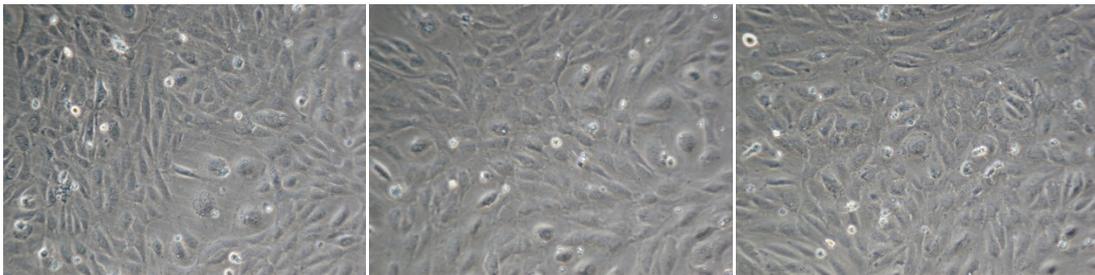
Die Dokumentation des zehnten Versuchstages untermauert die bisherigen Ergebnisse eindeutig. Bei den Zellen der Kontrollgruppe sind keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu Versuchstag acht zu beschreiben. Die regelmäßigen Zellen erscheinen konfluent und besiedeln die Well-Oberfläche nahezu vollständig. Es sind keinerlei Auffälligkeiten zu beobachten (Abb.21). Die Zellen in den Abbildungen 19 und 20 lassen sich gut gegeneinander abgrenzen: Die Wells mit der höchsten MTX-Zugabe besitzen relativ große zellfreie Areale, diese sind in Abb. 20 schon wesentlich kleiner. Hyperplastische, zackige und im Vergleich zur Kontrollgruppe unförmige Zellen lassen sich in beiden Gruppen finden, im Besonderen gehäuft jedoch bei der höchsten MTX-Konzentration im Medium (Abb.20). Auch hier lassen sich die Unterschiede der Zellzahl allein durch Inspektion der Photographien und ohne CellCount feststellen. Die Zellzahl nimmt mit steigender MTX-Konzentration ab.



**Abb. 19:** Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach zehn Tagen. Wells mit der höchsten MTX-Konzentration von 1000nm (Wells A2, A4 und A5)



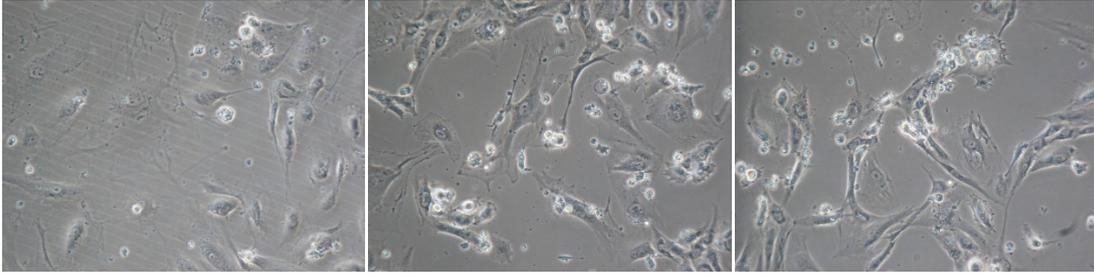
**Abb. 20:** Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach zehn Tagen. Wells mit der niedrigsten MTX-Konzentration von 1nm (Wells D2, D3 und D6)



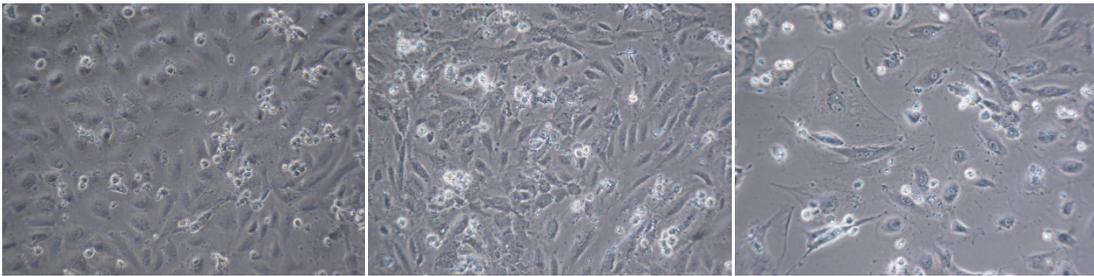
**Abb. 21:** Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach zehn Tagen. Wells der Kontrollgruppe ohne MTX-Zusatz (Wells E2, E4 und E6)

#### **4.1.7. Qualitative Beschreibung der Kontrollgruppen sowie der mit Methotrexat versetzten Vergleichsgruppen nach vierzehn Tagen der Kultivierung**

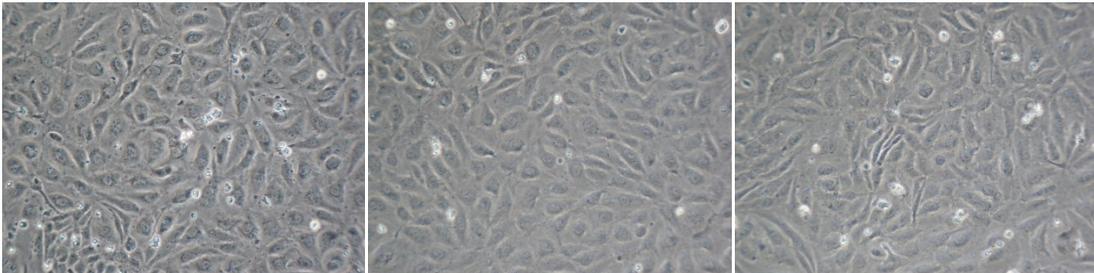
Der vierzehnte und letzte Tag des Versuchs unterstützt die bisher gewonnen Erkenntnisse. Die Kontrollgruppe, in Abb. 24 dargestellt, zeigt keine morphologischen Auffälligkeiten. Die Zellen sind konfluent, deutlich voneinander zu differenzieren und die Zellwände bilden eine regelmäßige Kontur. Es liegt weiterhin ein Monolayer vor. Anders verhalten sich die Vergleichsgruppen (Abb.22 und 23). Besonders die Zellen, die der hohen MTX-Konzentration ausgesetzt waren, sind auffallend hyperplastisch. Ihre ausgeprägten Zellausläufer lassen sie unregelmäßig und atypisch geformt erscheinen. Die Zelldichte ist auch an diesem Tag hier eindeutig am niedrigsten. Heller erscheinende, rundliche und größtenteils punktuelle Veränderungen sind nicht den Zellen zugehörig. Hierbei handelt es sich voraussichtlich um Mineralablagerungen. Sie sind während der kompletten Versuchsperiode in allen Wells zu beobachten, nehmen jedoch mit der Dauer an Größe und Anzahl zu.



**Abb. 22:** Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach vierzehn Tagen. Wells mit der höchsten MTX-Konzentration von 1000nm (Wells A2,A3 und A5)



**Abb. 23:** Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach vierzehn Tagen. Wells mit der niedrigsten MTX-Konzentration von 1nm (Wells D1,D3 und D5)



**Abb. 24:** Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach vierzehn Tagen. Wells der Kontrollgruppe ohne MTX-Zusatz (Wells E3, E5 und E6)

## 4.2. Ergebnisse des Cell Counts

Im Folgenden werden diese Abkürzungen und Symbole verwendet :

Mean = arithmetischer Mittelwert,

SD = Standardabweichung,

95 % CI = 95 % Konfidenzintervall,

\* =  $p < 0,05$ ,

\*\* =  $p < 0,01$ ,

\*\*\* =  $p < 0,001$ .

Die Zellzählung mittels Image J wurde neben der Fotodokumentation genutzt, um Auswirkungen von Methotrexat auf Endothelzellen *in vitro* sichtbar zu machen. Die folgende Abb. 25 zeigt eine Übersicht der Veränderungen der Zellzahl im Versuchsverlauf. Im Anschluss wird noch auf die einzelnen Ergebnisse der unterschiedlichen Messzeitpunkte eingegangen. Die x-Achse beschreibt den zeitlichen Verlauf mit den Messpunkten an den Versuchstagen 1, 3, 6, 8, 10 und 14. Die y-Achse zeigt die Zellzahl einer Einheit, wobei eine Einheit die Größe eines Fotos bei 10facher Vergrößerung umfasst. Dargestellt sind die 95%-Konfidenzintervalle die sich bei sechs Wells pro Medikamentenkonzentration bzw. bei zwölf Wells der Kontrollgruppe ergeben. An Tag 1 sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der blau dargestellten Kontrollgruppe sowie den andersfarbigen Vergleichsgruppen ersichtlich. Die Abbildung zeigt den weiteren Verlauf. Erkennbar am stärksten ist die Proliferation der Zellen der Kontrollgruppe zwischen Tag 3 und Tag 8, was an der Steigung des Graphen abzulesen ist. Danach stellt sich das Wachstum ein, die Zellzahl nimmt zum Ende des Versuches sogar leicht ab, die Steigung des Graphen ist negativ. Die maximale Zellzahl beträgt 222 Zellen in einer Einheit bei der Kontrollgruppe nach acht Versuchstagen, die Vergleichsgruppen weisen zum Teil weniger als ein Drittel der Zellen auf. Dabei kann klar von einer dosisabhängigen Hemmung der Proliferation ab Tag 6 gesprochen werden.

Die Zellzahlen der Vergleichsgruppe mit 1nM MTX sind bereits ab Tag sechs signifikant höher als die der Gruppen höherer MTX- Konzentrationen. Die 1nM- Gruppe zeigt eine deutlich gedämpfte Zellzunahme im Vergleich zur blauen Kurve. Ihre Entwicklung ähnelt stark denen der höheren Konzentrationen, jedoch auf einem höheren Niveau.

Allen Konzentrationen gemein ist eine anfängliche starke Zunahme der Zellzahl, die jedoch bereits nach drei Tagen ihre Klimax erreicht. Im weiteren Verlauf ist eine stetige Abnahme zu verzeichnen. Die Unterschiede zwischen den Konzentrationen von 10nM bis 1000nM sind nicht signifikant und zu vernachlässigen.

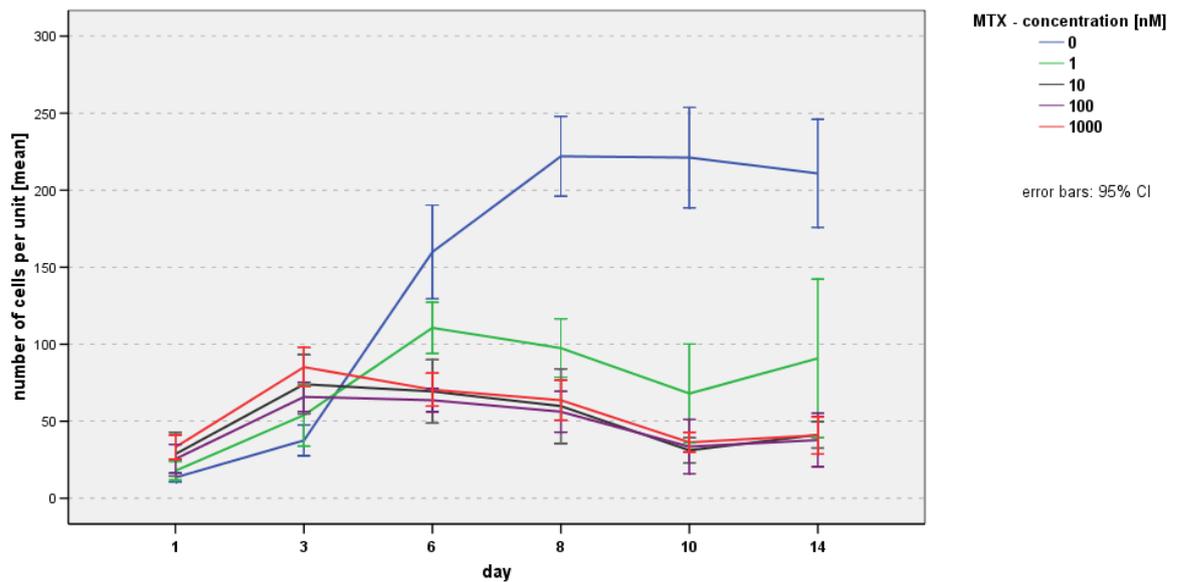


Abb. 25: Übersicht der Ergebnisse des Cell Counts.

#### 4.2.1. Veränderungen der Zellzahl der Kontrollgruppe sowie der Vergleichsgruppen nach einem Tag der Kultivierung

Die nachfolgende Tab. 5 beschreibt die ermittelten Zellzahlen für den ersten Tag nach Versuchsbeginn. Die ermittelten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe ohne MTX-Zusatz und der Konzentrationen von 1000 nM MTX sind dabei als schwach signifikant ( $p < 0,05$ ) einzuordnen, alle übrigen Gruppenvergleiche ergaben keine signifikanten Unterschiede. Ein Effekt auf die Zellproliferation, sei er inhibierend oder fördernd, durch MTX ist noch nicht klar ersichtlich. Abb. 26 verdeutlicht die Messwerte als Boxplot.

Tag 1	Mean	SD	95 % CI	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Kontrolle	13,50	4,76	10,48	16,52
MTX 1 nM	17,83	5,74	11,81	23,86
MTX 10 nM	28,67	13,55	14,45	42,88
MTX 100 nM	25,50	9,01	16,05	34,95
MTX 1000 nM	33,17	7,49	25,30	41,03

Tab. 5: Ergebnisse des Cell Counts an Tag 1 nach Versuchsbeginn

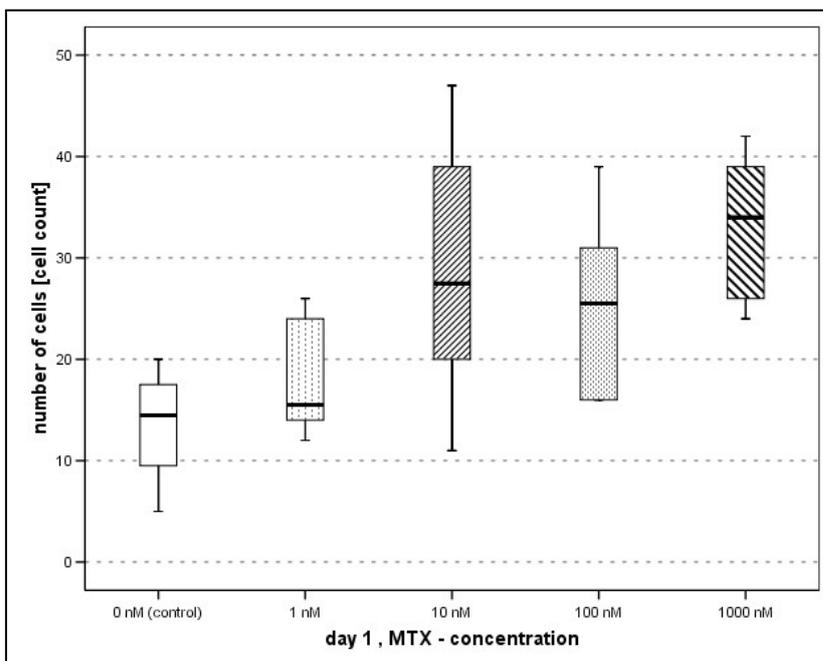


Abb. 26: Ergebnisse des CellCounts nach einem Versuchstag

#### 4.2.2. Veränderungen der Zellzahl der Kontrollgruppe sowie der Vergleichsgruppen nach drei Tagen der Kultivierung

Tag 3	Mean	SD	95 % CI	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Kontrolle	37,58	15,72	27,59	47,57
MTX 1 nM	54,00	19,22	33,84	74,16
MTX 10 nM	74,00	18,24	54,86	93,14
MTX 100 nM	65,83	9,04	56,34	75,32
MTX 1000 nM	85,17	12,07	72,50	97,84

Tab. 6: Ergebnisse des CellCounts an Tag 3 nach Versuchsbeginn

Die Ergebnisse des CellCounts der vitalen Zellen an Tag 3 (Tabelle 6, Abb 27) zeigt ebenfalls noch keine Auswirkungen des Methotrexates. Ausschließlich die Gruppendifferenzen zwischen der Kontrolle einerseits und den Konzentrationen 10, 100 und 1000 nM MTX andererseits erreichen das 5%-Signifikanzniveau ( $p < 0,05$ ).

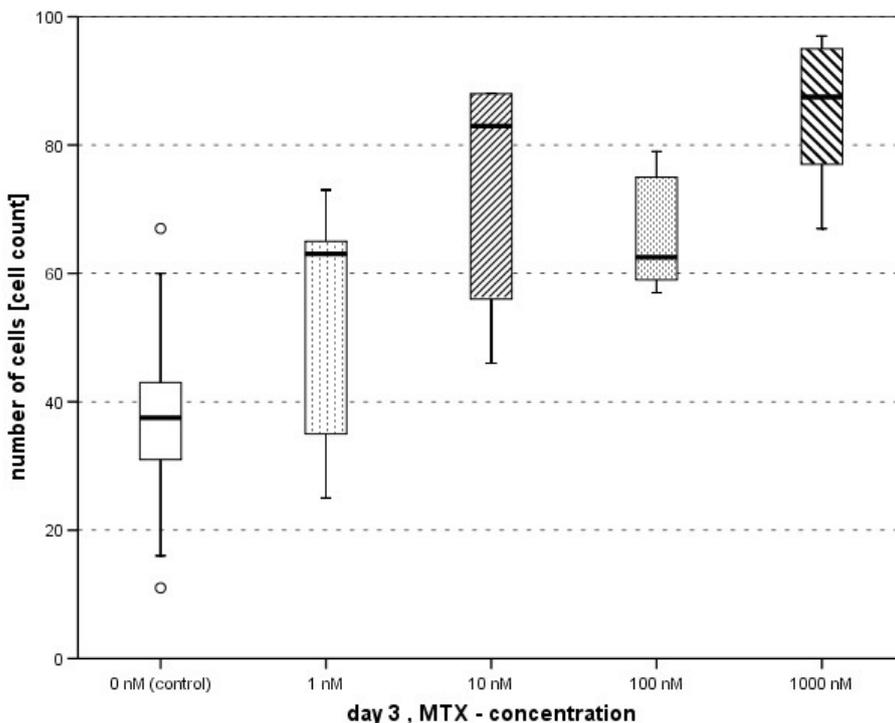


Abb. 27: Ergebnisse des CellCounts nach drei Versuchstagen

### 4.2.3. Veränderungen der Zellzahl der Kontrollgruppe sowie der Vergleichsgruppen nach sechs Tagen der Kultivierung

Tag 6	Mean	SD	95 % CI	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Kontrolle	159,92	47,86	129,51	190,33
MTX 1 nM	110,67	15,85	94,04	127,30
MTX 10 nM	69,33	19,63	48,73	89,94
MTX 100 nM	63,67	7,23	56,08	71,25
MTX 1000 nM	70,50	10,21	59,78	81,22

Tab. 7: Ergebnisse des CellCounts nach sechs Versuchstagen

Die Ergebnisse von Tag 6 werden in Tabelle 7 sowie in Abbildung 28 dargestellt. Es lassen sich in Bezug auf die Anzahl vitaler Zellen im CellCount statistisch hochsignifikante Hemmeffekte nachweisen ( $p < 0,001$  für die Vergleiche Kontrolle versus 10, 100 und 1000 nM MTX). Lediglich der Vergleich zwischen Kontrolle und 1 nM MTX erreicht mit  $p = 0,056$  noch nicht das 5%-Signifikanzniveau. Die Differenzen zwischen 1 nM MTX und den übrigen MTX-Konzentrationen sind ebenfalls statistisch signifikant ( $0,003 < p < 0,027$ ).

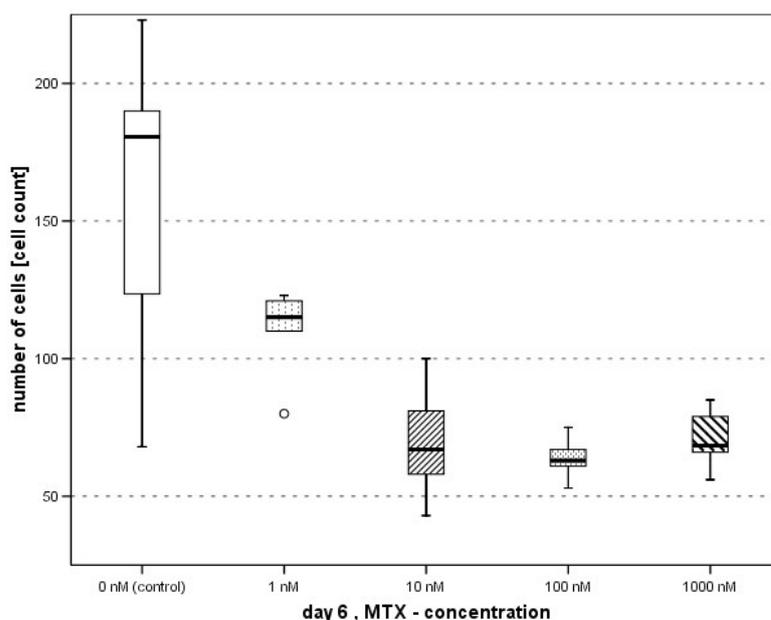


Abb. 28: Ergebnisse des CellCounts nach sechs Versuchstagen

#### 4.2.4. Veränderungen der Zellzahl der Kontrollgruppe sowie der Vergleichsgruppen nach acht Tagen der Kultivierung

Tag 8	Mean	SD	95 % CI	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Kontrolle	222,00	40,72	196,13	247,87
MTX 1 nM	97,50	18,08	78,53	116,47
MTX 10 nM	59,83	23,10	35,60	84,07
MTX 100 nM	56,17	12,70	42,84	69,50
MTX 1000 nM	63,67	12,31	50,75	76,58

Tab. 8: Ergebnisse des CellCounts nach acht Versuchstagen

Die Werte der Zellzählung an Tag 8 sind in Tabelle 8 und Abb. 29 dargestellt. Alle Differenzen zwischen der Kontrollgruppe ohne MTX und den Vergleichsgruppen sind statistisch hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Signifikante Differenzen ergeben sich zudem zwischen 1 nM MTX und 100 nM MTX ( $p = 0,013$ ) sowie zwischen 1 nM MTX und 1000 nM MTX ( $p = 0,044$ ).

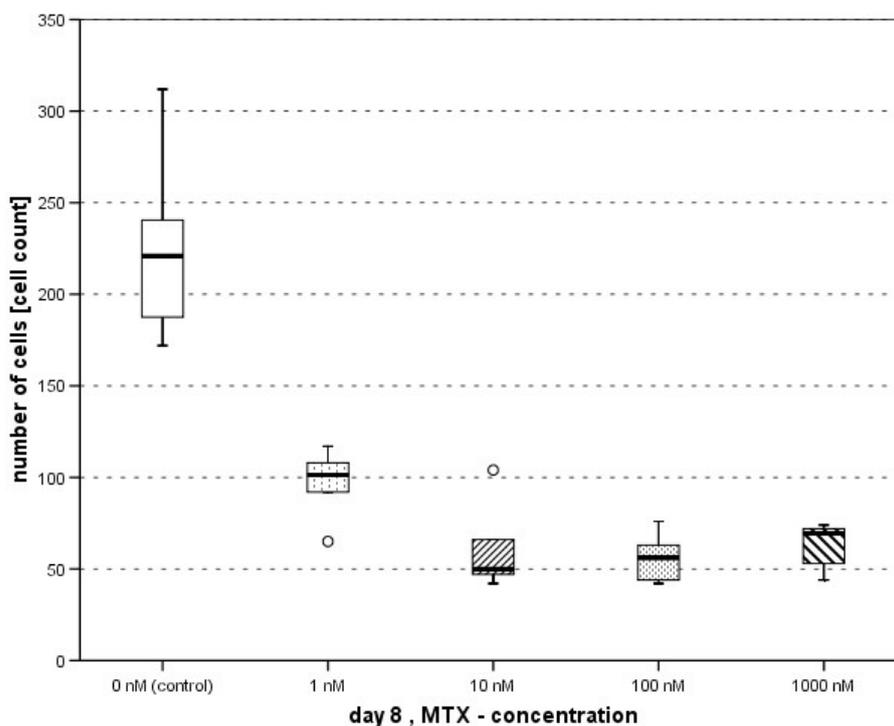


Abb. 29: Ergebnisse des CellCounts nach acht Versuchstagen

#### 4.2.5. Veränderungen der Zellzahl der Kontrollgruppe sowie der Vergleichsgruppen nach zehn Tagen der Kultivierung

Tag 10	Mean	SD	95 % CI	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Kontrolle	221,17	51,30	188,57	253,76
MTX 1 nM	68,00	30,68	35,80	100,20
MTX 10 nM	31,17	7,71	23,08	39,25
MTX 100 nM	33,50	16,79	15,88	51,12
MTX 1000 nM	36,33	6,22	29,81	42,86

Tab. 9: Ergebnisse des CellCounts nach zehn Versuchstagen

Die Tabelle 9 und Abbildung 30 beschreiben die Zellzahlveränderungen am zehnten Tag nach Versuchsbeginn. Die statistischen Signifikanzen der Gruppenunterschiede gleichen denen an Tag 8. Wiederum sind alle Differenzen zwischen Kontrolle und MTX-Gruppen für alle Konzentrationen hochsignifikant ( $p < 0,001$ ).

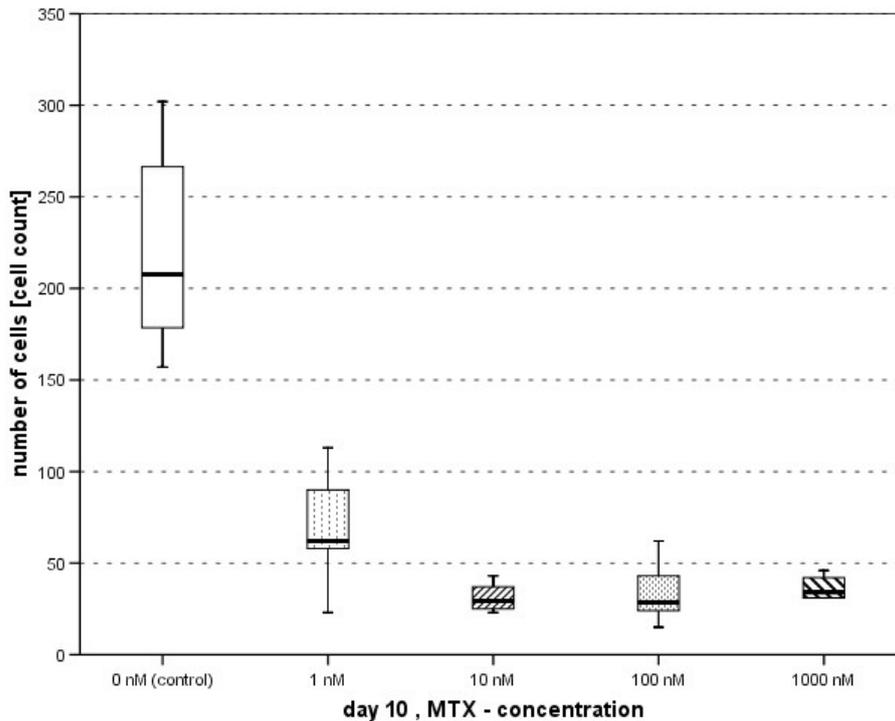


Abb. 30: Ergebnisse des CellCounts nach zehn Versuchstagen

#### 4.2.6. Veränderungen der Zellzahl der Kontrollgruppe sowie der Vergleichsgruppen nach vierzehn Tagen der Kultivierung

Tag 14	Mean	SD	95 % CI	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Kontrolle	210,92	55,25	175,82	246,02
MTX 1 nM	90,83	49,07	39,34	142,32
MTX 10 nM	41,17	8,09	32,68	49,65
MTX 100 nM	37,83	16,52	20,49	55,17
MTX 1000 nM	40,83	11,48	28,79	52,88

Tab. 10: Ergebnisse des CellCounts nach vierzehn Versuchstagen

Analog zu den Werten an Tag 8 und 10 sind wiederum die in Tabelle 10 und Abbildung 31 dargestellten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (0 nM MTX) und den MTX-Gruppen signifikant (Kontrolle versus 1 nM MTX :  $P = 0,006$ ) bzw. hochsignifikant (Kontrolle versus 10, 100 und 1000 nM MTX :  $p < 0,001$ ). Die Differenzen zwischen den MTX-Gruppen untereinander sind nicht statistisch signifikant.

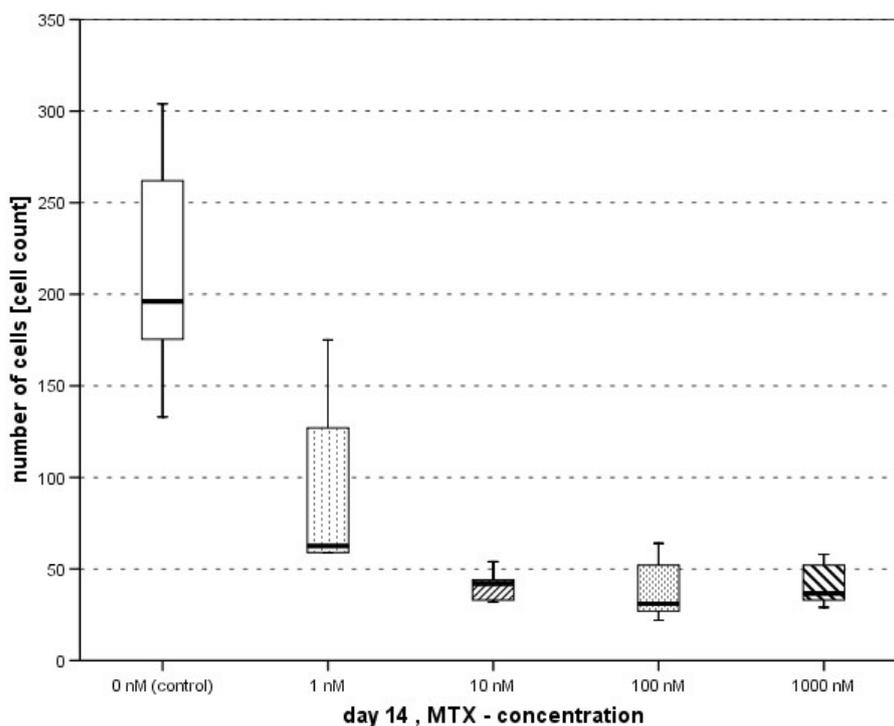


Abb. 31: Ergebnisse des CellCounts nach vierzehn Versuchstagen

### 4.3. Ergebnisse des MTT-Assays

Die Ermittlung der mitochondrialen Stoffwechselaktivität der Endothelzellen unter Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Methotrexat wurde unter Zuhilfenahme des MTT- Assay durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigen den dosisabhängigen Einfluss des Medikamentes, welcher sich proliferationshemmend auf die Zellen auswirkt. Die Abbildung 32 liefert eine zusammenfassende Übersicht des gesamten Versuchszeitraums. Sie zeigt die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm auf der y- Achse dargestellt. Auch hier wird jeweils ein 95%-Konfidenzintervall aller Werte einer Medikamentenkonzentration abgebildet. Die x-Achse beschreibt den zeitlichen Verlauf in Tagen. Die maximale Absorption war bei der Kontrollgruppe an Versuchstag 10 zu beobachten. Ab dem 6. Versuchstag gibt es signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und einer Konzentration von 1 nM MTX sowie den übrigen Vergleichsgruppen. Im Gegensatz zum CellCount lässt sich auch bei einer Konzentration von 1nM MTX eine kontinuierliche steigende Kurve beobachten, jedoch nicht in dem Maße wie sie die Kontrollgruppe aufweist. Die höheren Konzentrationen zeigen ab dem dritten Versuchstag nur noch geringe Steigungen bis hin zu einem nahezu gleichbleibenden Niveau. Alle Kurven verlaufen zwischen den letzten beiden Messzeitpunkten mit einer leicht negativen Steigung. Im Folgenden werden die einzelnen Versuchstage noch separat dargestellt.

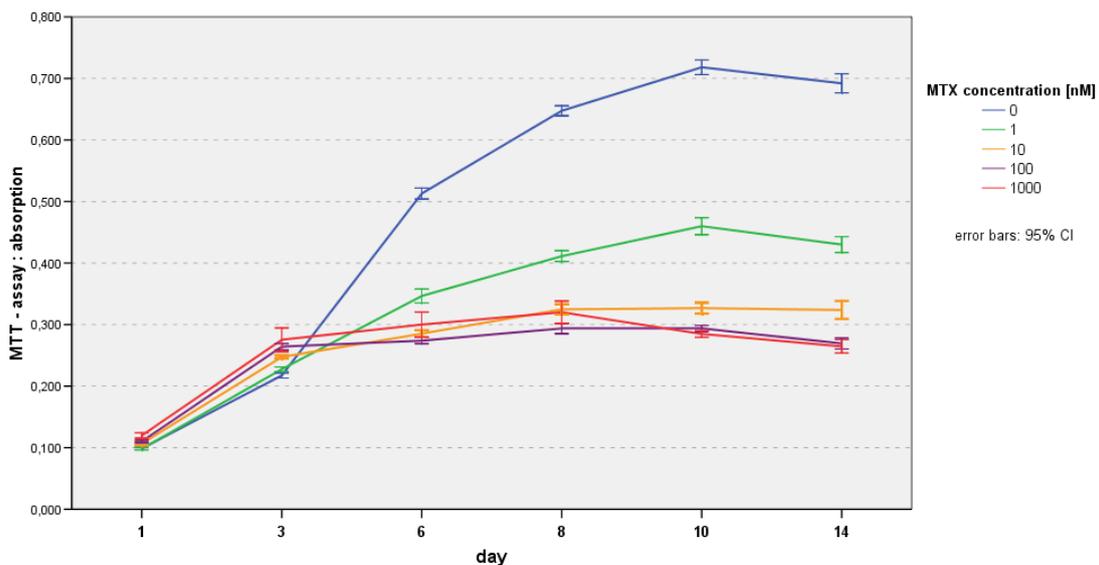


Abb. 32: Ergebnisse des MTT- Assay

### 4.3.1. Ergebnisse des MTT-Assays nach einem Tag der Kultivierung

Tag 1	Mean	SD	95 % CI	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Kontrolle	0,0987	0,0052	0,0965	0,1008
MTX 1 nM	0,0983	0,0041	0,0961	0,1004
MTX 10 nM	0,1067	0,0031	0,1041	0,1092
MTX 100 nM	0,1103	0,0069	0,1083	0,1122
MTX 1000 nM	0,1198	0,0092	0,1155	0,1242

Tab. 11: Ergebnisse des MTT-Assays (gemessen wurde die Absorption) am ersten Versuchstag

In der Tabelle 11 werden die ermittelten MTT-Absorptionsmesswerte für den ersten Tag nach Versuchsbeginn zusammenfassend dargestellt. Die ermittelten Differenzen zwischen der Kontrollgruppe ohne MTX-Zusatz und den Konzentrationen von 10, 100 und 1000 nM MTX sind dabei schwach signifikant ( $p < 0,05$ ) einzuordnen, alle übrigen Gruppenvergleiche ergeben keine signifikanten Abweichungen. Ein Hemmeffekt durch MTX ist hier nicht sichtbar. Abb. 33 verdeutlicht die Messwerte als Boxplot.

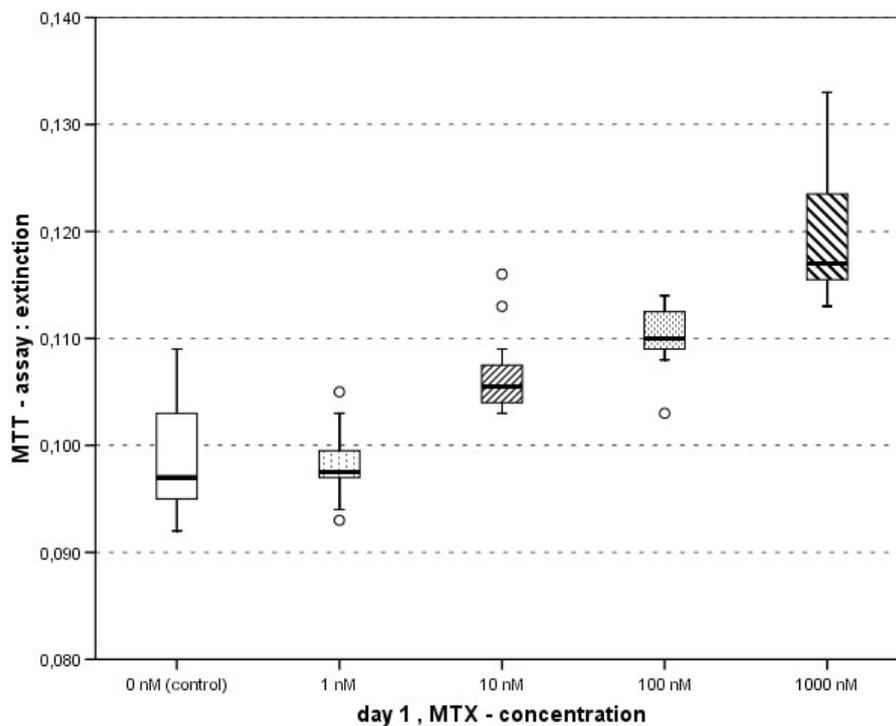


Abb. 33: Ergebnisse des MTT-Assays am ersten Versuchstag

### 4.3.2. Ergebnisse des MTT-Assays nach drei Tagen der Kultivierung

Tag 3	Mean	SD	95 % CI	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Kontrolle	0,2174	0,0101	0,2131	0,2217
MTX 1 nM	0,2275	0,0057	0,2239	0,2312
MTX 10 nM	0,2474	0,0041	0,2448	0,2500
MTX 100 nM	0,2641	0,0082	0,2590	0,2694
MTX 1000 nM	0,2754	0,0304	0,2561	0,2947

Tab. 12: Ergebnisse des MTT-Assays (gemessen wurde die Absorption) am dritten Versuchstag

Die Tabelle 12 sowie die Abbildung 34 zeigen die Ergebnisse des MTT-Assays anschaulich. Auch an diesem Messzeitpunkt ist eine Auswirkung des Methotrexats auf den endothelialen mitochondrialen Stoffwechsel der Endothelzellen noch nicht zu beobachten. Die Gruppendifferenzen zwischen der Kontrolle und den vier MTX-Gruppen ist wiederum auf dem 5%-Niveau signifikant

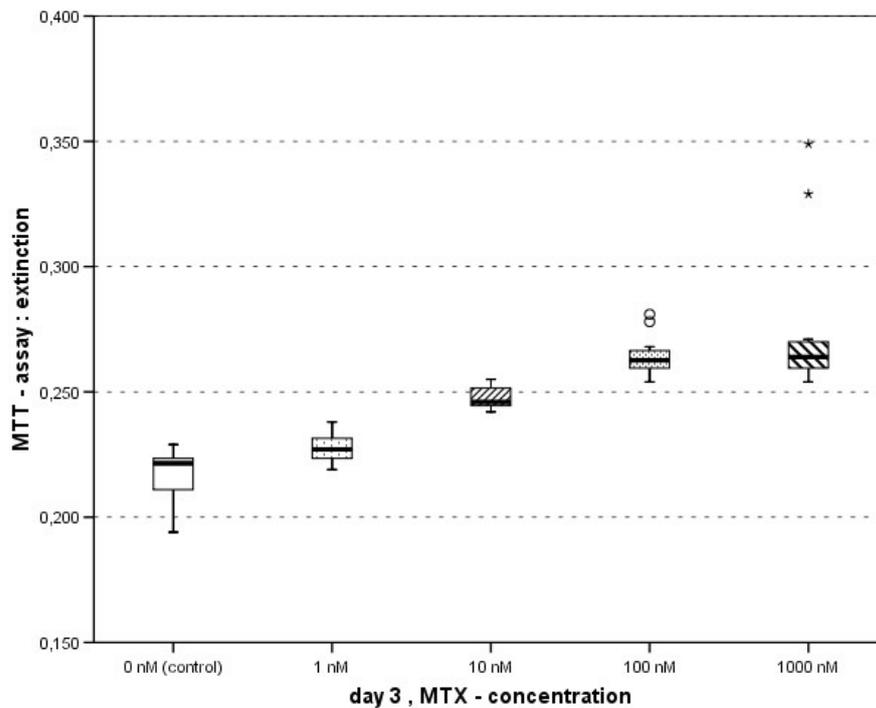


Abb. 34: Ergebnisse des MTT-Assays am dritten Versuchstag

### 4.3.3. Ergebnisse des MTT-Assays nach sechs Tagen der Kultivierung

Tag 6	Mean	SD	95 % CI	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Kontrolle	0,5129	0,0210	0,5041	0,5218
MTX 1 nM	0,3465	0,0179	0,3351	0,3579
MTX 10 nM	0,2853	0,0088	0,2797	0,2909
MTX 100 nM	0,2739	0,0077	0,2690	0,2788
MTX 1000 nM	0,3000	0,0323	0,2795	0,3205

Tab. 13: Ergebnisse des MTT-Assays am sechsten Versuchstag

Ab dem 6. Tag lassen sich in Bezug auf den mitochondrialen Stoffwechsel im MTT statistisch hochsignifikante Hemmeffekte nachweisen ( $p < 0,001$  für die Vergleiche Kontrolle versus alle MTX-Gruppen). Die Differenzen zwischen 1 nM MTX und den übrigen MTX-Konzentrationen sind ebenfalls statistisch signifikant ( $p = 0,004$  für 1 nM versus 1000 nM, sonst  $p < 0,001$ ). Die Differenz zwischen 10 nM und 100 nM ist ebenfalls signifikant ( $p = 0,027$ ). Lediglich zwischen bei 10 nM und 1000 nM sowie 100 und 1000 nM ergeben sich nicht signifikante Werte. (vgl. Tabelle 13, Abb. 35)

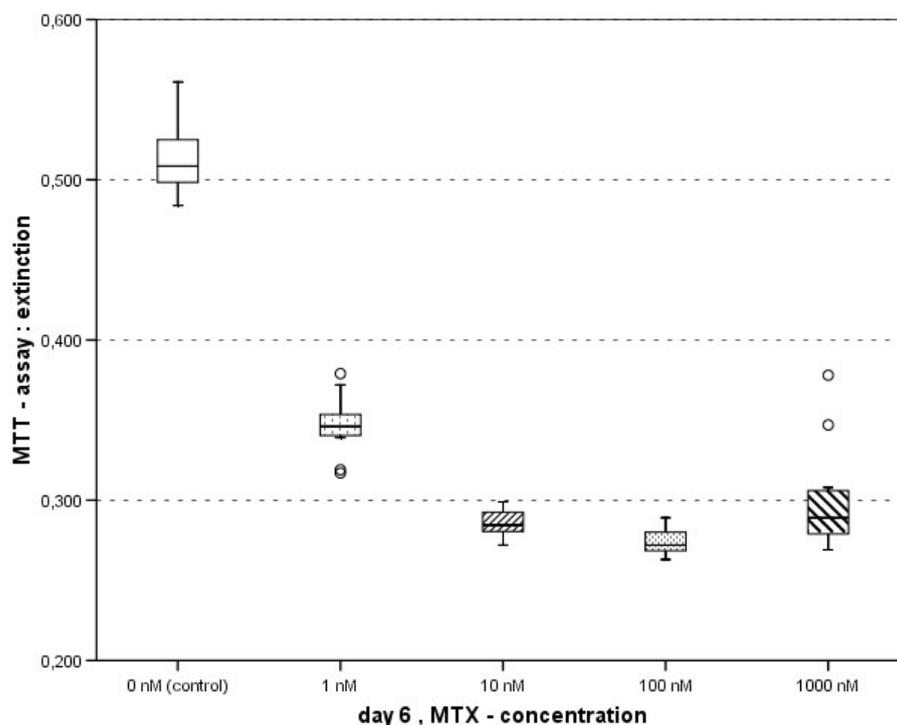


Abb. 35: Ergebnisse des MTT-Assays nach sechs Versuchtagen

#### 4.3.4. Ergebnisse des MTT-Assays nach acht Tagen der Kultivierung

Tag 8	Mean	SD	95 % CI	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Kontrolle	0,6475	0,0190	0,6395	0,6555
MTX 1 nM	0,4113	0,0138	0,4025	0,4200
MTX 10 nM	0,3248	0,0132	0,3164	0,3332
MTX 100 nM	0,2938	0,0133	0,2854	0,3023
MTX 1000 nM	0,3202	0,0289	0,3018	0,3385

Tab. 14: Ergebnisse des MTT-Assays nach acht Versuchstagen

Die Ergebnisse des MTT-Proliferationsassays an Tag 8 sind in Tabelle 14 und Abb. 36 dargestellt. Sowohl die Differenzen zwischen der Kontrollgruppe ohne MTX und den MTX-Gruppen, als auch die Differenzen zwischen den unterschiedlichen MTX-Gruppen sind mit Ausnahme der Vergleiche 10 versus 1000 nM MTX und 100 versus 1000 nM MTX statistisch hochsignifikant ( $p < 0,001$ ).

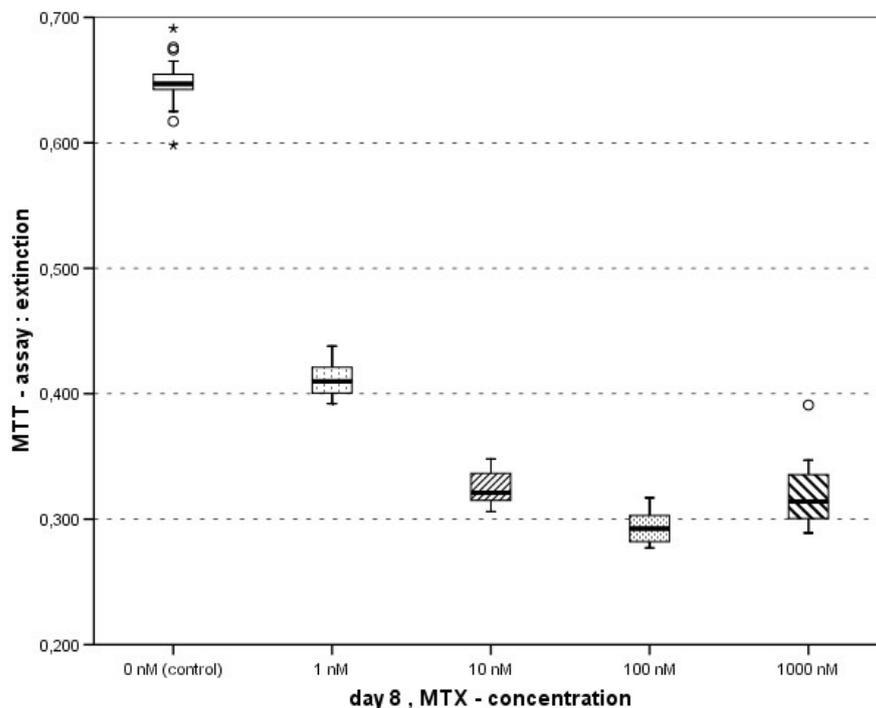


Abb. 36: Ergebnisse des MTT-Assays am achten Versuchstag

#### 4.3.5. Ergebnisse des MTT-Assays nach zehn Tagen der Kultivierung

Tag 10	Mean	SD	95 % CI	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Kontrolle	0,7181	0,0283	0,7062	0,7301
MTX 1 nM	0,4599	0,0217	0,4461	0,4737
MTX 10 nM	0,3268	0,0139	0,3179	0,3356
MTX 100 nM	0,2939	0,0078	0,2890	0,2989
MTX 1000 nM	0,2848	0,0086	0,2794	0,2903

Tab. 15: Ergebnisse des MTT-Assays am zehnten Versuchstag

Tabelle 15 und Abbildung 37 beschreiben die Messwerte am zehnten Versuchstag. Die statistischen Signifikanzen der Gruppenunterschiede gleichen denen an Tag 8. Wiederum sind alle Differenzen zwischen Kontrolle und MTX-Gruppen für alle Konzentrationen hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Auch alle Differenzen der MTX-Konzentrationen untereinander sind mit Ausnahme des Vergleichs 100 versus 1000 nM MTX hochsignifikant ( $p < 0,001$ ).

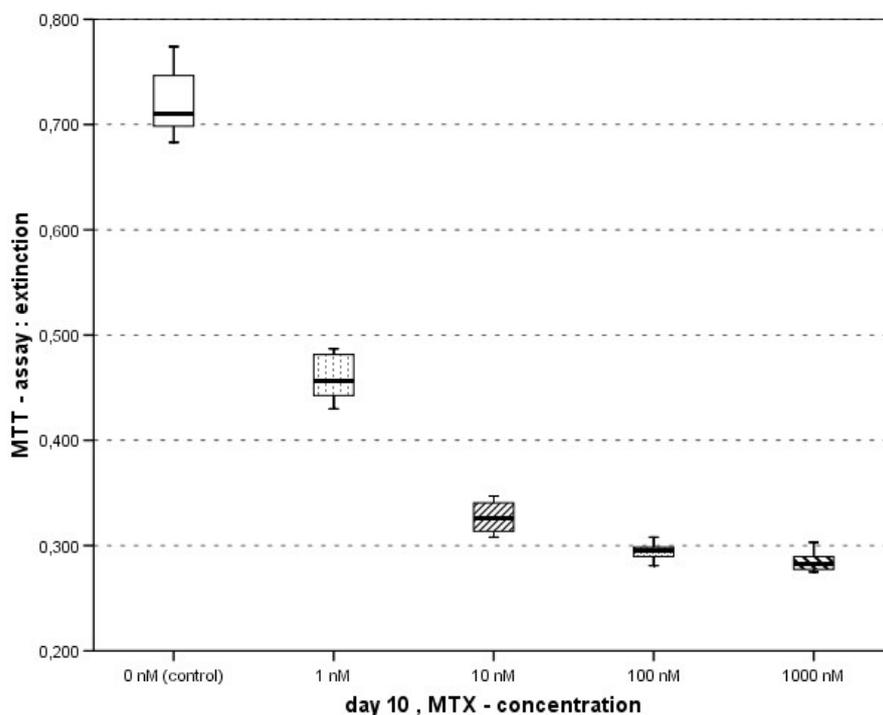


Abb. 37: Ergebnisse des MTT-Assays nach zehn Versuchstagen

#### 4.3.6. Ergebnisse des MTT-Assays nach vierzehn Tagen der Kultivierung

Tag 14	Mean	SD	95 % CI	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Kontrolle	0,6920	0,0369	0,6765	0,7076
MTX 1 nM	0,4301	0,0203	0,4172	0,4430
MTX 10 nM	0,3238	0,0229	0,3092	0,3384
MTX 100 nM	0,2693	0,0139	0,2605	0,2782
MTX 1000 nM	0,2645	0,0169	0,2538	0,2752

Tab. 16: Ergebnisse des MTT-Assays nach vierzehn Versuchstagen

Auch an Tag 14 können keine Unterschiede der statistischen Signifikanzen den bereits an Tag 10 berechneten Werten festgestellt werden, so dass erneut alle Gruppenvergleiche mit Ausnahme 100 versus 1000 nM MTX auf dem 0,1%-Niveau ( $p < 0,001$ ) signifikant sind. Tabelle 16 und Abb. 38 stellen die Messwerte dar. Mit dem vierzehnten Versuchstag endet die Versuchsreihe.

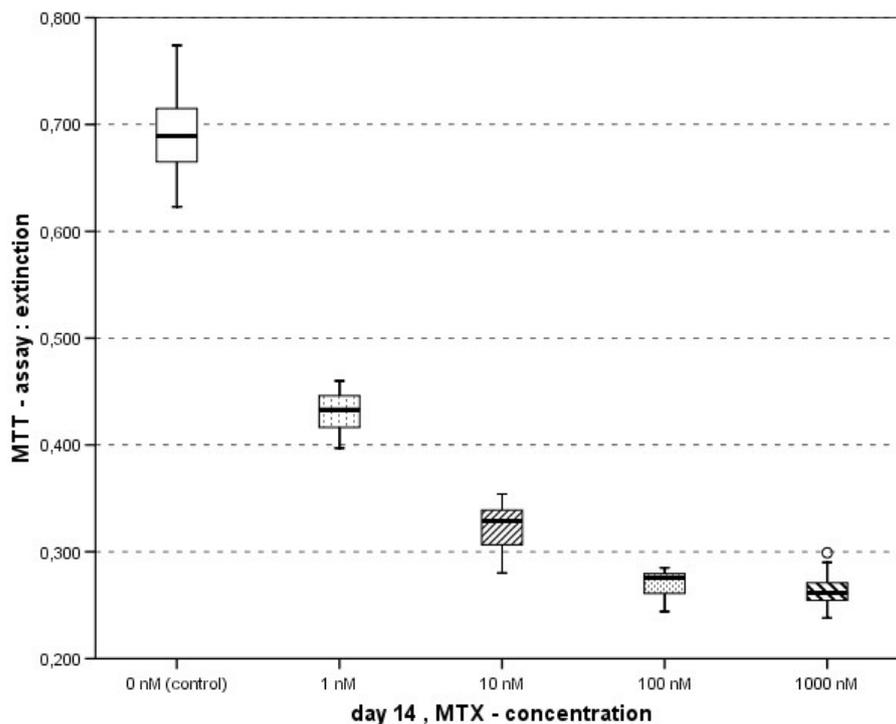


Abb. 38: Ergebnisse des MTT-Assays am vierzehnten Tag nach Versuchsbeginn

## 5. Diskussion

In der Behandlung der rheumatoiden Arthritis ist der Einsatz des Folsäureantagonisten Methotrexat in einer Low-dose-Variante weit verbreitet [Scott et al., 2010]. Die möglichen Nebenwirkungen auf den gesamten Organismus wurden mehrfach untersucht und dokumentiert [Albrecht et al. 2010]. Es existieren jedoch deutlich weniger Studien die sich speziell mit Effekten des MTX auf zellulärer Ebene beschäftigen. Eventuell vorhandene Auswirkungen auf die Mundhöhle sind in der Literatur ebenfalls kaum beschrieben [Pedrazas et al.].

### 5.1. Einordnung der Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Hypothese eines möglichen Effektes von Methotrexat auf Endothelzellen *in vitro* zu überprüfen. Dabei galt es drei Faktoren zu beachten: quantitative Veränderungen der Zellen, morphologische Auffälligkeiten und Änderungen in der Stoffwechselaktivität der Endothelzellen. Es konnte gezeigt werden, dass MTX einen statistisch signifikanten Hemmeffekt auf Endothelzellen *in vitro* ausübt. Die Zellen wurden in allen oben genannten zu erfassenden Kriterien durch den Zusatz von MTX beeinflusst. Die Arbeitshypothese kann somit als bestätigt angesehen werden.

Im Folgenden sollen die einzelnen Teilbereiche der vorliegenden Arbeit nochmals betrachtet werden.

## 5.2. Studienlage zum Einfluss von MTX auf Endothelzellen

Die Progression der Gelenkdestruktion bei Patienten mit rheumatoider Arthritis ist maßgeblich mit der Zunahme von entzündlich veränderter Synovialis vergesellschaftet. Die Neovaskularisation dieses Gewebes spielt dabei eine zentrale Rolle. Hirata et al. beschäftigten sich 1989 mit den Auswirkungen von Methotrexat in der low dose Variante auf Endothelzellen *in vitro*, wie auch auf die Gefäßneubildung der Cornea am Beispiel des Kaninchens. Es konnte eine signifikante Hemmung der DNA-Synthese der Endothelzellen bei einer MTX-Konzentration von  $5 \times 10^{-9} \text{M}$  nachgewiesen werden. Den Versuchstieren wurde das Medikament per i. m. Injektion verabreicht und erzielte auch hier eine Verringerung der Neovaskularisation. Diese Ergebnisse stützen die der vorliegenden Arbeit vollständig, gleichwohl ist zu beachten, dass hier mit anderen Medikamentenkonzentrationen gearbeitet wurde [Hirata et al., 1989].

In einer weiteren tierexperimentellen Studie wurden die Effekte von MTX bei lokaler Anwendung an der Cornea von Kaninchen untersucht. Dazu wurde zunächst chirurgisch ein Pellet nach einem gängigen Hornhautimplantationsmodell eingebracht. Dieses enthielt u. A. den sog. Fibroblast Growth Factor, der die Gefäßneubildung an der Cornea des jeweiligen Auges anregen sollte. Das Methotrexat wurde nun in Form eines Gels in der Konzentration von 0,2 mg/d in den unteren Konjunktivalsack eingebracht. Die Behandlung fand an einem Auge statt, das Andere diente der Kontrolle. Die Neovaskularisation wurde mittels Operationsmikroskop beobachtet und dokumentiert. Zusätzlich fanden Konzentrationsbestimmungen des MTX im Serum wie auch im, durch Punktion gewonnenen, Kammerwasser statt. Die unbehandelten Augen zeigten eine deutlich stärkere Form der Neovaskularisation. Jousen et al. schlussfolgerten so eine antiangiogene Wirkung des regelmäßig lokal applizierten Methotrexats. Die Serumkonzentration von MTX war bei keinem der Versuchstiere signifikant. Die Untersuchung des entnommenen Kammerwassers zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstagen, jedoch reduzierte sich die Konzentration innerhalb von 24h nach Applikation um mehr als die Hälfte [Jousen et al., 1999].

Die vorliegende Arbeit beleuchtet das Verhalten proliferierender und somit in der längsten Phase des Versuchs noch nicht konfluenten Endothelzellen. Es existiert eine Studie von Merkle et al., die postmitotische Endothelzellen unter MTX im Vergleich zu subkonfluenten Endothelzellen betrachtet. Anders als in dieser Arbeit wurden dazu bovine Endothelzellen aus der Pulmonalarterie gewonnen und kultiviert. Es wurde u. A. ebenfalls ein auf Colorimetrie basierendes Verfahren angewandt, um die Proliferation und Vitalität der Zellen zu ermitteln. Die zugesetzten MTX-Konzentrationen lagen bei Werten zwischen  $10^{-9}$  und  $10^{-5}$ M. Die Proliferation und damit die Zellzahl verringerte sich mit steigender MTX-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant. Die bereits konfluenten Endothelzellen zeigten gleichfalls eine Abnahme der Zellzahl. Mikroskopisch wurden Lücken im Monolayer sichtbar und die Entstehung von Apoptosekörperchen konnte nachgewiesen werden. Merkle et al. zeigten somit die durch MTX induzierte Apoptose der postmitotischen Endothelzellen [Merkle et al., 2000]. Der Versuchsaufbau sowie die verwendeten Medikamentenkonzentrationen zeigen Parallelen zu dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuch. Die Ergebnisse decken sich größtenteils, wenn auch Zellen anderen Ursprungs verwendet wurden.

Fuskevåg et al. ermittelten in einer tierexperimentellen Untersuchung mit Ratten die akuten Toxizitätsgrenzen nach 8h von Methotrexat im Vergleich zu 7-Hydroxy-Methotrexat (7-OH-MTX), dem wirksamen Metaboliten des MTX. Dazu bekamen die Tiere zunächst einen Bolus über 10 Minuten und im Anschluss über die nächsten 2h eine kontinuierliche i. v. Gabe der jeweiligen Konzentration. MTX wurde in den Grenzen 1,8- 11,3 g/kg und 7-OH-MTX in den Grenzen 0,1-1,2 g/kg verabreicht. Zwei Kontrollgruppen erhielt lediglich eine NaCl- bzw. Mannitol- Lösung über den gleichen Zeitraum. Es fand eine Überwachung der Körpertemperatur, des Blutdrucks sowie des Elektrokardiogramms statt. Von der maximal tolerierten Dosis wird gesprochen, wenn 90% der Versuchsratten in der Lage waren eine chronische Gabe dieser Dosis zu überleben.

Die Studie ergab eine Maximaldosis von 3-5 g/kg MTX bzw. von weniger als 0,1 g/kg 7-OH-MTX. Als limitierender Faktor für die Maximaldosis sollte laut diesem Ratten-Modell somit immer die Konzentration des Metaboliten 7-OH-MTX angesehen werden [Fuskevåg et al., 2000].

### **5.3. Isolierung und Kultivierung der HUVEC's**

Die benötigten Endothelzellen wurden für diese Arbeit einem Protokoll folgend gewonnen, welches schon seit fast 40 Jahren seine Anwendung findet. Die benötigten Zellen stammen dabei aus der Vene einer humanen Nabelschnur. [Jaffe et al., 1973; Marin et al., 2001; Breithaupt-Faloppa et al., 2008]. Der menschlichen Nabelschnur und ihrem Blut kommt vor allem im Rahmen der Transplantationsmedizin eine wachsende Bedeutung zu [Rogers und Casper; Cohen und Nagler, 2004]. Die Isolierung der Zellen aus der humanen Nabelschnur hat jedoch auch für Forschungszwecke entscheidende Vorteile. So ist die Nabelschnur ein menschliches Gewebe, welches in jeder gynäkologischen Klinik einfach zu beschaffen ist. Sie ist somit leicht verfügbar und die Gewinnung der Zellen ist zudem als ethisch relativ unbedenklich einzustufen. Die gewonnenen Zellen sind außerdem jung und besitzen eine hohe Proliferationsrate.

Sie sind mit bis zu 5 Monaten in der Lage eine lange Zeit in der Kultivierung zu überleben [Jaffe et al., 1973; Bouïs et al., 2001]. Komplikationen bei der Zellisolation können durch eine Kontamination während der Geburt entstehen. Dieses Problem konnte jedoch durch den Zusatz von Antibiotika und Antimykotika im Medium behoben werden.

#### **5.4. Heterogenität der Endothelzellen**

Endothelzellen besitzen außerdem je nach Gewebeart eine hohe Heterogenität [McCarthy et al., 1991]. So geht das Vorhandensein bestimmter Eigenschaften, wie beispielsweise das Expressieren von Oberflächenantigenen, der Zellen Hand in Hand mit ihrem Ursprungsort und der Größe der Gefäße dort [Page et al., 1992; Lang et al., 2001]. Die Endothelzellen sind also an ihre Aufgaben an verschiedenen Lokalisationen im Organismus angepasst. Es existieren Untersuchungen, dass sie, herausgelöst aus ihrem natürlichen Umfeld, die für sie sonst typische Eigenschaften nicht länger aufweisen. So haben sog. HEVEC's (High endothelial venule endothelial cells), gewonnen aus Kapillaren der Tonsille, schon nach 2 Tagen der Kultivierung, ohne den Kontakt zu lymphatischem Gewebe für sie charakteristische Eigenschaften verloren [Lacorre et al., 2004]. Unter anderem aus diesen Gründen lassen sich die gewonnenen Ergebnisse nicht ohne Weiteres auf eine *in vivo* Reaktion übertragen. Hier spielen noch diverse zusätzliche Faktoren eine Rolle.

Der Ursprung der Endothelzellen, das umliegende Gewebe sowie einwirkende Zytokine könnten Einfluss auf die Reaktion der Endothelzellen nehmen.

Auch Parameter wie die vorliegende Durchblutung, mögliche Infektionen des Organismus oder andere äußere Gegebenheiten stellen Unterschiede zur Situation *in vitro* dar.

#### **5.5. Mögliche weiterführende Versuchsansätze**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Endothelzellen kultiviert. So konnte das typische Verhalten der Zellen auf den Kontakt mit MTX hin ohne den Einfluss anderer Zellarten herausgestellt werden. Bei diesem Vorgehen bleibt es allerdings ungeachtet, dass in einem Organismus die verschiedenen Zellarten bei komplexen Vorgängen wie beispielsweise der Wundheilung, an welcher die Endothelzellen maßgeblich beteiligt sind, miteinander interagieren [Watt et al., 2010].

Eine Zellart, die im Falle von oralchirurgischen Eingriffen nicht unerheblich zur Heilung beiträgt, sind die Osteoblasten.

Nach jeder Osteotomie und im Falle einer angestrebten Osseointegration nach Implantation sind sie involviert [Pivodova et al., 2011]. Ihr *in vitro* Verhalten bei Inkubation mit MTX wird ebenfalls im UKM untersucht.

Die Implantation in den Kieferknochen stellt oftmals eine Alternative zu konservativem Zahnersatz dar, die mehr und mehr Patienten in Anspruch nehmen. Hierbei steht die Osseointegration, die Verbindung zwischen Implantatoberfläche und dem umliegenden knöchernen Gewebe, im Vordergrund. Eine weiterführende Fragestellung liegt somit im Bereich der Reaktion der Zellen unter MTX auf künstlichen Oberflächen wie beispielsweise Titan. Auch dazu werden Versuche im UKM durchgeführt.

Alle bisher erläuterten *in vitro* Ansätze beschäftigen sich ausschließlich mit einer isolierten Zelllinie in einem zweidimensionalen Modell. Denkbar wären Untersuchungen an komplexeren Modellen, welche Kokulturen und dreidimensionale *in vitro*-Modelle einschließen. Es gibt Möglichkeiten die Differenzierung von Endothelzellen und die Bildung von kapillarähnlichen tubulösen Strukturen im Labor künstlich herbeizuführen. Dabei ist vor allem die umgebende Matrix entscheidend, dort handelt es sich z.B. um eine Kollagen- oder Fibrin-Matrix [Lawley und Kubota, 1989]. Sie stellt die Gegebenheiten im Gewebe nach und regt die Zellen sowohl zur Migration als auch zur Differenzierung an.

Der Verlauf der Angiogenese wird simuliert [Staton et al., 2009]. So könnte ein Prozess, der im Laufe der Geweberegeneration eine wichtige Rolle spielt, in die Untersuchungen der Wirkung von MTX auf Endothelzellen eingebunden werden.

Um die Endothelzellen nicht länger isoliert zu betrachten, könnten Kokulturen unter den bekannten Gesichtspunkten untersucht werden. Hier bieten sich, wie bereits erwähnt, osteoblasten ähnliche Zellen an.

Es kann in Modelle mit direktem Kontakt und Modelle mit indirekter Kommunikation der Zelltypen unterschieden werden [Zhang et al., 2010]. Modelle ohne direkten Kontakt zeigen den Einfluss von parakriner Signalübertragung wie z.B. über den VEGF (vascular endothelial growth factor) [Clarkin et al., 2008].

Im Fall des direkten Zell-Kontaktes sind jedoch beide Weg der Kommunikation vorhanden und die Situation ist somit der *in vivo* ähnlicher. Zusätzlich wurde gezeigt, dass parakrine Signaltransduktion bei Osteoblasten und Endothelzellen nicht die gleiche Effektivität wie direkte Kontakte erzielen kann [Villars et al., 2002].

### **5.6. Anti-inflammatorische Mechanismen des Methotrexats**

Der detaillierte Wirkmechanismus von Methotrexat war nicht vollständig bekannt, als es erstmalig in der Rheumatologie eingesetzt wurde. Verschiedene Wirkmechanismen tragen zur Stagnation oder gar Remission der rheumatoiden Arthritis bei.

Ein entscheidender Aspekt ist der Folsäureantagonismus des MTX, welcher die Synthese von Purinen und Pyrimidinen vermindert. Dies bedeutet zwangsläufig eine verringerte Zellproliferation. Dabei proliferieren auch die Zellen in geringerem Maße, welche für die Unterhaltung der Entzündungsreaktionen in den betroffenen Gelenken verantwortlich sind, wie beispielsweise T-Lymphozyten [Genestier et al., 1998; Chan und Cronstein, 2002]. Es ist denkbar, dass die beobachtete Proliferationshemmung der Endothelzellen in Zusammenhang mit der Inhibition der folsäureabhängigen Enzyme wie z. B. der Dihydrofolatreduktase steht.

Methotrexat ist außerdem in der Lage Einfluss auf die Migration von Entzündungszellen, wie z. B. Makrophagen, und ihre Funktion zu nehmen. So wird durch MTX der intrazelluläre Glutathion-Spiegel gesenkt [Babiak et al., 1998; Cronstein, 2005]. Glutathion wird in allen Körperzellen gebildet, setzt sich zusammen aus Cystein, Glutamat und Glycin und hat eine Vielzahl von Funktionen inne. Es dient als Ersatzmolekül für die reaktive Aminosäure Cystein und wird bei deren Abwesenheit zur Proteinbiosynthese verwendet.

Die reduzierte Form ermöglicht außerdem die Abgabe von Elektronen und kann so die Oxidation verschiedenster Proteine verhindern. Das Molekül fungiert somit als Reduktionsmittel. Sinkt die Glutathion-Konzentration, steigt somit die Zahl der reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species-ROS) an. [Löffler, 2007]. Phillips et al. untersuchten die entzündungshemmende Wirkung von MTX unter diesem Gesichtspunkt, u. A. lag das Augenmerk dabei auf der Adhäsion von Monozyten am Endothel unter MTX-Therapie. Es zeigte sich eine reduzierte Anhaftung der Monozyten ausschließlich bei, mittels Lipopolysaccharide (LPS) aktivierter, Endothelzellen [Phillips et al., 2003]. Diese Funktionsänderung kann auf die durch das MTX bedingte ROS der Entzündungszellen zurückzuführen sein.

Diese Wirkung des MTX kann aus naheliegenden Gründen nicht verantwortlich für eine Proliferationshemmung der Endothelzellen im vorliegenden Versuch sein. Sie würde jedoch bei einer *in vivo* Untersuchung zum Tragen kommen und dort die Zell-Zell-Kommunikation zwischen Entzündungszellen und Endothel beeinflussen. Die Migration der Entzündungszellen in das entzündlich veränderte Gewebe wird gestört.

Als weiteren bedeutenden Wirkmechanismus des Methotrexats ist die Adenosininduktion zu nennen. Die Polyglutamate des Methotrexats sind dabei für die Hemmung der AICAR- Transformylase verantwortlich. Diese Inhibition führt über die Hemmung weiterer Enzyme (Adenosindeaminase und AMP-Deaminase) zu einer erhöhten Konzentration dieser Enzyme sowie ihrer Metaboliten. Als Folge kommt es zu einem extrazellulären Anstieg der Adenosinkonzentration. Die anti-entzündliche Wirkung begründet sich letztendlich auf eine Interaktion mit Adenosinrezeptoren der Entzündungszellen [Chan und Cronstein, 2002; Cronstein, 2005]. Das Adenosin nimmt auch Einfluss auf die Barrierefunktion des Endothels. So wird die Gefäßpermeabilität über einen Adenosinrezeptor verringert. Die Gelenkdestruktion wird durch eine kleinere Anzahl migrierender Entzündungszellen und geringere Ödembildung verlangsamt [Lennon et al., 1998]. Zusätzlich wird die Synthese verschiedener Zytokine (IL-6 und IL-8), die als Entzündungsmediatoren fungieren, sowie die Produktion von Zelladhäsionsmolekülen der Endothelzellen wie ICAM-1 durch den erhöhten Adenosinspiegel gemindert [Bouma et al., 1996].

Dieser weist noch einen weiteren direkten Einfluss auf die Endothelzellen auf. So zeigten Ethier et al., dass die Proliferation der HUVEC's maßgeblich durch erhöhte Adenosinkonzentrationen gesteigert wird [Ethier et al., 1993]. Die Oberflächenrezeptoren A<sub>2</sub>-Adenosinrezeptor und β<sub>2</sub>-Adrenorezeptor sind dabei für die Signaltransduktion verantwortlich [Sextl et al., 1995].

Diese Aussage geht nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit einher. Demnach müsste eine Stimulation der Proliferation der HUVEC's zu beobachten sein, welche dann auf die durch MTX induzierte erhöhte Adenosinkonzentration zurückzuführen wäre.

Nun treten die beschriebenen hauptsächlichen Wirkmechanismen zur gleichen Zeit ein, ergänzend kommen noch weitere weniger bedeutende bzw. noch nicht bekannte Mechanismen hinzu. Somit ist auch nicht einzig eine der Hypothesen alleine für das erhaltene Ergebnis verantwortlich zu machen.

Abschließend ist zu erwähnen, dass bei der Betrachtung von *in vitro* Studien, in denen die Wirkung von Methotrexat beurteilt wird, bedacht werden muss, auf welchen Umfang sich der Untersuchungszeitraum beläuft. MTX ist bei Patienten noch wochenlang nach Absetzen des Medikamentes nachweisbar, was auf die intrazelluläre Polyglutamierung und nur langsame Deglutaminierung des Moleküls zurückzuführen ist. Zellversuche belaufen sich häufig auf Stunden oder wenige Tage [Cronstein, 2005]. In dem vorliegenden Versuch war ab Tag 6 eine signifikante Hemmung der Proliferation erkennbar.

Diese Verzögerung könnte auf die noch zu geringe Zellzahl zu Beginn des Versuches oder aber auch auf die noch zu geringe Menge intrazellulärer MTX-Moleküle zurückzuführen sein.

### **5.7. Beeinflussung der Endothelzellen durch die multimedikamentöse Therapie der rheumatischen Arthritis**

Wie schon zuvor erläutert setzt sich die Therapie eines Patienten mit rheumatoider Arthritis aus mehreren Komponenten zusammen. Die medikamentöse Behandlung spielt dabei eine zentrale Rolle und besteht heutzutage nur in den seltensten Fällen aus einem einzelnen Präparat. In der Regel werden Kombinationen verschiedener Medikamentengruppen verabreicht. Die Mehrzahl der Patienten nimmt dauerhaft nicht-steroidale Antiphlogistika als Schmerzmedikation ein, im Falle eines akuten Schubes der Erkrankung werden zusätzlich Kortikosteroide verschrieben [Cronstein, 2005]. Zur Erzielung größerer Therapieerfolge werden Kombinationen aus der Gruppe der DMARD's gegeben. Das in dieser Arbeit untersuchte Methotrexat ist das am häufigsten angewandte Präparat. Kommt es unter MTX-Therapie in der maximalen Dosis dennoch zum Fortschritt der Erkrankung, kann ein weiteres Präparat hinzugefügt werden.

Die zusätzliche Gabe eines TNF- $\alpha$ - Inhibitors verringert nachgewiesen das Zunehmen eines Gelenkschadens und beugt Funktionsstörungen vor. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede der Effektivität zwischen den einzelnen TNF- $\alpha$ -Inhibitoren Etanercept, Adalimumab und Infliximab gefunden [Hochberg et al., 2003]. St Clair et al. zeigten gar einen Vorteil des frühen bis direkten Einsatzes von Infliximab gemeinsam mit MTX bei Patienten mit moderater bis schwerer Ausprägung der RA und einer schlechten Prognose [St Clair et al., 2004]. O'Dell et al. untersuchten die Kombinationstherapien von Methotrexat mit den DMARD's Hydroxychloroquin und Sulfasalazin über 2 Jahre hinweg. Dabei zeigte sich die 3-fach Therapie bei guter Verträglichkeit in ihrem Erfolg gegenüber einer Kombination von MTX mit nur einem der beiden genannten DMARD's überlegen [O'Dell et al., 2002]. Mit diesen Informationen wird deutlich, dass eine Behandlung einzig mit MTX nicht der Realität entspricht.

Die Zellversuche dieser Arbeit sind auf MTX beschränkt und bilden somit eine Basis, können jedoch nicht die Situation *in vivo* widerspiegeln. Hier wirken die verschiedenen Therapeutika gemeinsam und es ist eine denkbare Option, dass mögliche Wechselwirkungen auf zellulärer Ebene stattfinden können und somit das Verhalten der Endothelzellen beeinflussen können.

### **5.8. Auswirkungen der MTX- Therapie auf die Mundschleimhaut**

Eine direkte Übertragung der Ergebnisse auf ein mögliches klinisches Erscheinungsbild bei einem RA-Patienten ist wie schon erläutert nicht ohne Weiteres zulässig. Es existieren jedoch einige wenige klinische Studien, die die dargelegte Hypothese unterstützen. So führten Pedrazas et al. [Pedrazas et al.] im Jahr 2005 eine Querschnittstudie durch, die insgesamt 49 Patienten erfasste. Die gesamte Gruppe litt unter rheumatoider Arthritis und 28 von ihnen wurden mindestens in den vergangenen 6 Monaten mit Low-dose MTX behandelt. 21 Patienten wurden mit gängigen anderen Medikamenten therapiert, sie stellen die Kontrollgruppe dar. Ziel der Studie war es, mögliche orale Manifestationen als eine direkte Folge von MTX-Einnahmen zu erfassen. Es wurden bei 76,8 % (22 Patienten) der ersten Gruppe orale Läsionen festgestellt. Es handelte sich hierbei vor Allem (57,1%) um ulzeröse oder erosive Läsionen der Alveolarmukosa, der Zunge, des Gaumens oder der Regio buccalis. Bei 3 Patienten wurde eine Candidiasis diagnostiziert. In der Kontrollgruppe waren nur 23,8% (5 Patienten) von oralen Komplikationen betroffen. Pedrazas et al. schlussfolgern ein erhöhtes Risiko für RA Patienten unter einer Methotrexat-Therapie an ulzerösen oder erosiven Läsionen der oralen Schleimhäute zu erkranken. Diese Aussage unterstützt die Ergebnisse dieser Arbeit, obgleich die Patientenzahl in der erläuterten Studie nicht sehr hoch angesetzt wurde. Eine Dosisabhängigkeit oder eine Korrelation bezüglich des Patientenalters und dem Auftreten von Arzneimittelnebenwirkungen wurden in diesem Fall nicht bestätigt.

In einer umfangreicheren Studie (411 Patienten), die sich mit äußeren Faktoren beschäftigt, die Einfluss auf Wirkung und Toxizität nehmen, wurde jedoch eine Beziehung gefunden. So ist das Auftreten von Arzneimittelnebenwirkungen abhängig von Alter, Geschlecht und Body Mass Index in unterschiedlicher Häufigkeit zu erwarten [Hoekstra et al., 2003]. Bei der Studie von Carpenter et al. [Carpenter et al., 1997] handelt es sich um eine Untersuchung bezüglich des Auftretens von oralen Nebenwirkungen bei der Einnahme von DMARD's im Allgemeinen. Von 178 MTX einnehmenden Patienten waren 8 auf Grund von entzündlichen Veränderungen der Mukosa gar gezwungen die Therapie zu beenden.

Maiguma et al. zeigten in einer Untersuchung den Zusammenhang zwischen oraler Mukositis und high dose MTX-Therapie bei Kinder in der Behandlung einer akuten lymphatischen Leukämie. Die 49 Patienten wurden jeweils 48h und 72h nach der Gabe von  $3\text{g}/\text{m}^2$  MTX für 24h i. v. untersucht und ihre MTX- Serum-Konzentration wurde bestimmt. Es stellte sich keine Abhängigkeit zwischen der Ausprägung oraler Nebenwirkungen und der Serum-Konzentration ein [Maiguma et al., 2008].

### 5.9. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit können als ein Anhaltspunkt in der Frage nach einer Auswirkung von Methotrexat-Einnahme bei Patienten mit rheumatoider Arthritis auf die orale Wundheilung dienen. Rein an diesen Ergebnissen orientiert, könnte man eine negative Beeinflussung der Wundheilung vermuten. Die Endothelzellen wurden statistisch signifikant durch MTX in ihrer Proliferation und ihrem physiologischen Stoffwechsel gestört. Betrachtet man dieses Ergebnis gemeinsam mit der vorangegangenen Studien von Pedrazas et al. [Pedrazas et al.] wird die Vermutung bestätigt. Allerdings muss die Beeinflussung der Endothelzellen allein nicht ausschlaggebend für die Manifestation von klinischen Symptomen sein. An der Wundheilung sind andere Zellarten, wie z.B. die genannten Osteoblasten, und eine Vielzahl von Mechanismen beteiligt. Deren mögliche Reaktion auf Methotrexat in der Low-Dose-Variante kann ebenfalls ursächlich für Wundheilungsstörungen und orale Arzneimittelnebenwirkungen sein.

Tierexperimentelle Studien fehlen zum jetzigen Zeitpunkt ebenfalls noch und eine Überprüfung der gewonnenen Erkenntnisse in dieser Form könnten dazu beitragen, die Ergebnisse vergleichbarer mit einer Situation *in vivo* zu gestalten. Auch wenn es Hinweise bei den Ergebnissen der *in vitro* Tests der vorliegenden Arbeit gibt, lassen sich aufgrund der zusätzlichen Einflüsse – wie diskutiert – die Ergebnisse nicht unkontrolliert auf die *in vivo* Situation übertragen. Sollten weiterführende Versuche bestätigend ausfallen, müssten klinische Studien ermitteln, in wieweit der Erfolg oralchirurgischer Eingriffe tatsächlich durch Arzneimittelnebenwirkungen von MTX gefährdet ist. Erst im Anschluss daran könnte im Falle einer gleichzeitigen MTX-Therapie bei rheumatoider Arthritis von einer Kontraindikation für das Inserieren dentaler Implantate bzw. für andere oralchirurgische Eingriffe gesprochen werden. Weitere Forschungsergebnisse sind abzuwarten.

## Übersicht

Im Magazin „Focus“ wurde in der Ausgabe Mai 2009 im Rahmen eines Artikels bezüglich zahnärztlicher Implantation von Kontraindikationen für die genannte Behandlung berichtet. In diesem Zusammenhang wurde unter Anderem die Einnahme verschiedener Medikamente genannt, die regelmäßig in der Therapie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt werden. Eine Literaturrecherche diesbezüglich ergab keine ausreichende Evidenz für die beschriebene These. Basierend auf dieser Fragestellung ist am UKM eine Arbeitsgruppe entstanden, die sich mit grundlegenden Aspekten dieser Annahme beschäftigt.

Diese Arbeit zeigt die Wirkung von Methotrexat auf sog. HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells) *in vitro*. Endothelzellen spielen neben Osteoblasten und zahlreichen anderen Faktoren eine wesentliche Rolle im Prozess der Wundheilung. Die Migration, Proliferation und Differenzierung der Zellen wird z. B. durch fehlende Zellkontakte und verschiedene Wachstumsfaktoren stimuliert. Dies ist bei der Neovaskularisation im Rahmen der Wundheilung von essentieller Bedeutung. So wird die Versorgung des sich regenerierenden Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet. Die erfolgreiche Einheilung eines Implantates im Kiefer oder auch die erfolgreiche Durchführung eines jeden oralchirurgischen Eingriffes erfordert eine funktionierende Wundheilung und somit die Fähigkeiten der Endothelzellen.

Methotrexat ist ein Standardtherapeutikum bei rheumatoider Arthritis und darf als Mittel der Wahl bezeichnet werden. Ursprünglich wurde es in weit höheren Dosen als Zytostatikum in der Tumorbehandlung eingesetzt. MTX ist ein Folsäureantagonist und chemisch nahe dem Vitamin anzusiedeln. Es entfaltet seine Wirkung nach Aufnahme in die Zelle, dort findet eine Polyglutamierung statt, welche den intrazellulären Verbleib des Moleküls zur Folge hat. Durch Beeinflussung folsäureabhängiger Enzyme kommt es zum antiproliferativen Effekt, die Bildung von Purin- und Pyrimidinbasen wird kompetitiv gehemmt. Zusätzlich werden antiphlogistische Prozesse gefördert, indem der extrazelluläre Adenosinspiegel steigt.

Die benötigten Endothelzellen wurden aus einer humanen Nabelschnur isoliert und im Anschluss kultiviert, bis sie für weitere Versuche verwendet werden konnten. Um einen möglichen Einfluss von MTX auf die HUVECs zu zeigen, wurden die zuvor gewonnenen Zellen unter Zugabe von MTX kultiviert. Die Medikamentenkonzentrationen orientieren sich an üblichen Dosierungen während einer Therapie bei rheumatoider Arthritis.

Die Messungen fanden nach verschiedener Dauer der Inkubation statt und um die Ergebnisse einordnen zu können, wurde eine Kontrollgruppe ohne MTX-Konzentration mitgeführt. Mögliche Zellzahlveränderungen wurden mittels Zellzählung erfasst. Morphologische Veränderungen konnten über Vergleiche von regelmäßigen Photographien des mikroskopischen Bildes dargestellt werden. Die mitochondriale Stoffwechselaktivität wurde mit Hilfe eines MTT- Assay dokumentiert. Hierbei handelt es sich um einen kolorimetrischen Test, bei dem ein gelbes Tetrazoliumsalz enzymatisch gespalten wird. Es resultieren blauviolette Formazankristalle, die den Farbumschlag mit sich bringen. Die Kristalle werden in Isopropanol gelöst und die kolorimetrische Messung bei 570nm durchgeführt. Die Absorption korreliert so mit der Aktivität und der Anzahl der Zellen.

Über die Dauer des Versuchs war eine dosisabhängige und statistisch signifikante Hemmung der Proliferation der Endothelzellen zu beobachten. Diese war nach sechs Versuchstagen in ihrem Beginn und im weiteren Verlauf dann in stärkerer Ausprägung vorhanden. Sie wurde sowohl durch den Cell Count als auch durch das MTT-Proliferations- Assay bestätigt. Dabei war die Dosisabhängigkeit ausschließlich zwischen der Kontrollgruppe (ohne Zusatz von MTX), der Geringsten und den übrigen Konzentrationen statistisch signifikant. Zwischen den Vergleichsgruppen mit mittleren und hohen MTX- Konzentrationen konnte nicht differenziert werden.

Die mikroskopischen Vergleiche ließen außerdem morphologische Veränderungen der Zellen unter MTX- Einfluss deutlich werden: Zunehmend mit der Dauer des Versuchs zeigen die Versuchsgruppen eine direkt auf den Fotos erkennbare geringere Anzahl an Zellen. Sie sind in ihrem Umriss atypisch, weisen Hyperplasien wie auch vermehrt unregelmäßig geformte Zellausläufer auf.

Die ermittelten *in vitro* Erkenntnisse lassen sich nun allerdings nicht ohne Abstriche auf eine *in vivo* Situation übertragen. Hier werden die Zellen durch die Komplexität eines Organismus, durch die Funktionen der Endothelzellen in dem jeweiligen Organ sowie durch äußere Faktoren, welche bei der isolierten Kultivierung im Labor minimiert werden, beeinflusst. Um eine präzisere Aussage bezüglich des Effektes von MTX bei oraler Implantation treffen zu können, könnten in weiterführenden Studien Endothelzellen unter MTX auf einer Titanoberfläche untersucht werden.

## Literaturverzeichnis

1. **Albrecht K, Müller-Ladner U (2010):** Side effects and management of side effects of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol* 28: S95-101.
2. **Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997):** Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964–967.
3. **Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB (1998):** Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem. Funct* 16: 283–293.
4. **Bachetti T, Morbidelli L (2000):** Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol. Res* 42: 9–19.
5. **Bouïs D, Hospers GA, Meijer C, Molema G, Mulder NH (2001):** Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* 4: 91–102.
6. **Bouma MG, van den Wildenberg FA, Buurman WA (1996):** Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. *Am. J. Physiol* 270: C522-9.
7. **Breithaupt-Faloppa AC, Lima WT de, Oliveira-Filho RM, Kleinheinz J (2008):** In vitro behaviour of endothelial cells on a titanium surface. *Head Face Med* 4: 14.
8. **Carpenter EH, Plant MJ, Hassell AB, Shadforth MF, Fisher J, Clarke S, Hothersall TE, Dawes PT (1997):** Management of oral complications of disease-modifying drugs in rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol* 36: 473–478.
9. **Chan ESL, Cronstein BN (2002):** Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res* 4: 266–273.
10. **Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM (1998):** Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91: 3527–3561.

11. **Clarkin CE, Emery RJ, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CPD (2008):** Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. *J. Cell. Physiol* 214: 537–544.
12. **Cohen Y, Nagler A (2004):** Cord blood biology and transplantation. *Isr. Med. Assoc. J* 6: 39–46.
13. **Cronstein BN (2005):** Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol. Rev* 57: 163–172.
14. **Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Serio B, Straub RH (2001):** Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis* 60: 729–735.
15. **Dalrymple JM, Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, Barclay ML (2008):** Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58: 3299–3308.
16. **Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, Kremer J (2004):** Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50: 2766–2774.
17. **Ethier MF, Chander V, Dobson JG (1993):** Adenosine stimulates proliferation of human endothelial cells in culture. *Am. J. Physiol* 265: H131-8.
18. **Fiehn C (2009):** Methotrexat in der Rheumatologie. *Z Rheumatol* 68: 747-56; quiz 757.
19. **Folkman J, Shing Y (1992):** Angiogenesis. *J. Biol. Chem* 267: 10931–10934.
20. **Fuskevåg OM, Kristiansen C, Lindal S, Aarbakke J (2000):** Maximum tolerated doses of methotrexate and 7-hydroxy-methotrexate in a model of acute toxicity in rats. *Cancer Chemother. Pharmacol* 46: 69–73.
21. **Geiler G (1996):** Pathologie und Progression der intraartikulären Entzündung bei Rheumatoid-Arthritis. *Verh Dtsch Ges Pathol* 80: 46–57.

22. **Genestier L, Paillot R, Fournel S, Ferraro C, Miossec P, Revillard JP (1998):** Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. *J. Clin. Invest* 102: 322–328.
23. **Hirata S, Matsubara T, Saura R, Tateishi H, Hirohata K (1989):** Inhibition of in vitro vascular endothelial cell proliferation and in vivo neovascularization by low-dose methotrexate. *Arthritis Rheum* 32: 1065–1073.
24. **Hochberg MC, Tracy JK, Hawkins-Holt M, Flores RH (2003):** Comparison of the efficacy of the tumour necrosis factor alpha blocking agents adalimumab, etanercept, and infliximab when added to methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis* 62 Suppl 2: ii13-6.
25. **Hoekstra M, van Ede AE, Haagsma CJ, van de Laar MAFJ, Huizinga TWJ, Kruijsen MWM, Laan RFJM (2003):** Factors associated with toxicity, final dose, and efficacy of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis* 62: 423–426.
26. **Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973):** Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest* 52: 2745–2756.
27. **Jänich S (2009):** Optimiertes Protokoll zur Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen und deren angiogene Charakterisierung in vitro und in vivo. Inaugural-Dissertation. <http://www.freidok.uni-freiburg.de/volltexte/6978/>.
28. **Joussen AM, Kruse FE, Völcker HE, Kirchhof B (1999):** Topical application of methotrexate for inhibition of corneal angiogenesis. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol* 237: 920–927.
29. **Königshoff M, Brandenburger T (2007):** Kurzlehrbuch Biochemie. 80 Tabellen. Thieme, 2., überarb, Stuttgart ;, New York. S.374-378
30. **Krämer J, Grifka J (2005):** Orthopädie. Springer, 7., korr. und aktualisierte Aufl., Berlin [u.a.]. S.113-116

31. **Kroll J, Waltenberger J (2000):** Regulation der Endothelfunktion und der Angiogenese durch den Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor-A (VEGF-A). *Z Kardiol* 89: 206–218.
32. **Lacorre D, Baekkevold ES, Garrido I, Brandtzaeg P, Haraldsen G, Amalric F, Girard J (2004):** Plasticity of endothelial cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment. *Blood* 103: 4164–4172.
33. **Lang I, Hoffmann C, Olip H, Pabst MA, Hahn T, Dohr G, Desoye G (2001):** Differential mitogenic responses of human macrovascular and microvascular endothelial cells to cytokines underline their phenotypic heterogeneity. *Cell Prolif* 34: 143–155.
34. **Lawley TJ, Kubota Y (1989):** Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. *J. Invest. Dermatol* 93: 59S-61S.
35. **Lee DM, Weinblatt ME (2001):** Rheumatoid arthritis. *Lancet* 358: 903–911.
36. **Lennon PF, Taylor CT, Stahl GL, Colgan SP (1998):** Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J. Exp. Med* 188: 1433–1443.
37. **Lloyd ME, Carr M, McElhatton P, Hall GM, Hughes RA (1999):** The effects of methotrexate on pregnancy, fertility and lactation. *QJM* 92: 551–563.
38. **Löffler G (2007):** Biochemie und Pathobiochemie. Mit 192 Tabellen : [+ online specials]. Springer, 8., vollst. neu bearb, Heidelberg. S.707-109
39. **Lüllmann H, Mohr K, Hein L, Kuschinsky G (2010):** Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker ; 130 Tabellen. Thieme, 17., vollst. überarb, Stuttgart, New York, NY. S. 313-324

40. **Marin V, Kaplanski G, Grès S, Farnarier C, Bongrand P (2001):** Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J. Immunol. Methods* 254: 183–190.
41. **Maiguma T, Hayashi Y, Ueshima S, Kaji H, Egawa T, Chayama K, Morishima T, Kitamura Y, Sendo T, Gomita Y, Teshima D (2008):** Relationship between oral mucositis and high-dose methotrexate therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int J Clin Pharmacol Ther* 46: 584–590.
42. **McCarthy SA, Kuzu I, Gatter KC, Bicknell R (1991):** Heterogeneity of the endothelial cell and its role in organ preference of tumour metastasis. *Trends Pharmacol. Sci* 12: 462–467.
43. **McLean-Tooke A, Aldridge C, Waugh S, Spickett GP, Kay L (2009):** Methotrexate, rheumatoid arthritis and infection risk: what is the evidence? *Rheumatology (Oxford)* 48: 867–871.
44. **Merkle CJ, Moore IM, Penton BS, Torres BJ, Cueny RK, Schaeffer RC, Montgomery DW (2000):** Methotrexate causes apoptosis in postmitotic endothelial cells. *Biol Res Nurs* 2: 5–14.
45. **Mosmann T (1983):** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55–63.
46. **Müller-Ladner U, Pap T (2005):** Das Immunsystem ist nicht alles. *Z Rheumatol* 64: 396–401.
47. **Murasawa S, Asahara T (2005):** Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda)* 20: 36–42.
48. **O'Dell JR, Leff R, Paulsen G, Haire C, Mallek J, Eckhoff PJ, Fernandez A, Blakely K, Wees S, Stoner J, Hadley S, Felt J, Palmer W, Waytz P, Churchill M, Klassen L, Moore G (2002):** Treatment of rheumatoid arthritis with methotrexate and hydroxychloroquine, methotrexate and sulfasalazine, or a combination of the three medications: results of a two-year, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 46: 1164–1170.

49. **Ortiz Z, Shea B, Suarez Almazor M, Moher D, Wells G, Tugwell P (2000):** Folic acid and folinic acid for reducing side effects in patients receiving methotrexate for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*: CD000951.
50. **Page C, Rose M, Yacoub M, Pigott R (1992):** Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am. J. Pathol* 141: 673–683.
51. **Pedrazas CHS, Azevedo MNL de, Torres SR:** Oral events related to low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *Braz Oral Res* 24: 368–373.
52. **Phillips DC, Woollard KJ, Griffiths HR (2003):** The anti-inflammatory actions of methotrexate are critically dependent upon the production of reactive oxygen species. *Br. J. Pharmacol* 138: 501–511.
53. **Pivodova V, Frankova J, Ulrichova J (2011):** Osteoblast and gingival fibroblast markers in dental implant studies. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 155: 109–116.
54. **Prey S, Paul C (2009):** Effect of folic or folinic acid supplementation on methotrexate-associated safety and efficacy in inflammatory disease: a systematic review. *Br. J. Dermatol* 160: 622–628.
55. **Riede SW (2004):** Allgemeine und spezielle Pathologie. Thieme, 5., komplett überarb, Stuttgart. S.1169-1171
56. **Risau W, Flamme I (1995):** Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 11: 73–91.
57. **Rogers I, Casper RF:** Stem cells: you can't tell a cell by its cover. *Hum. Reprod. Update* 9: 25–33.
58. **Salliot C, van der Heijde D (2009):** Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. *Ann. Rheum. Dis* 68: 1100–1104.
59. **Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ (2010):** Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376: 1094–1108.
60. **Seemayer CA, Distler O, Kuchen S, Müller-Ladner U, Michel BA, Neidhart M, Gay RE, Gay S (2001):** Die Rheumatoide Arthritis: Neuentwicklungen in der Pathogenese unter besonderer Berücksichtigung der synovialen Fibroblasten. *Z Rheumatol* 60: 309–318.

61. **Sexl V, Mancusi G, Baumgartner-Parzer S, Schütz W, Freissmuth M (1995):** Stimulation of human umbilical vein endothelial cell proliferation by A<sub>2</sub>-adenosine and beta 2-adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol* 114: 1577–1586.
62. **Siegenthaler W, Blum. Hubert E. (2006):** *Klinische Pathophysiologie*. Thieme, 9., völlig neu bearb, Stuttgart. S.1010-1015
63. **Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WE (1993):** Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br. J. Rheumatol* 32: 903–907.
64. **Sone M, Itoh H, Yamashita J, Yurugi-Kobayashi T, Suzuki Y, Kondo Y, Nonoguchi A, Sawada N, Yamahara K, Miyashita K, Park K, Shibuya M, Nito S, Nishikawa S, Nakao K (2003):** Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. *Circulation* 107: 2085–2088.
65. **St Clair EW, van der Heijde DMFM, Smolen JS, Maini RN, Bathon JM, Emery P, Keystone E, Schiff M, Kalden JR, Wang B, Dewoody K, Weiss R, Baker D (2004):** Combination of infliximab and methotrexate therapy for early rheumatoid arthritis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum* 50: 3432–3443.
66. **Staton CA, Reed MWR, Brown NJ (2009):** A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol* 90: 195–221.
67. **Tian H, Cronstein BN (2007):** Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 65: 168–173.
68. **van Vollenhoven RF (2009):** Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009. *Nat Rev Rheumatol* 5: 531–541.
69. **Villars F, Guillotin B, Amédée T, Dutoya S, Bordenave L, Bareille R, Amédée J (2002):** Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am. J. Physiol., Cell Physiol* 282: C775-85.

70. **Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, Dejana E, Huber P (1997):** Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94: 6273–6278.
71. **Watt SM, Athanassopoulos A, Harris AL, Tsaknakis G (2010):** Human endothelial stem/progenitor cells, angiogenic factors and vascular repair. *J R Soc Interface* 7 Suppl 6: S731-51.
72. **Weinblatt ME, Coblyn JS, Fox DA, Fraser PA, Holdsworth DE, Glass DN, Trentham DE (1985):** Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med* 312: 818–822.
73. **Welsch U (2009):** Sobotta Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. Urban & Fischer in Elsevier, 2. Aufl., 2. Nachdr., München [u.a.]. S.248
74. **Whittle SL, Hughes RA (2004):** Folate supplementation and methotrexate treatment in rheumatoid arthritis: a review. *Rheumatology (Oxford)* 43: 267–271.
75. **Zhang Y, Schedle A, Matejka M, Rausch-Fan X, Andrukhov O (2010):** The proliferation and differentiation of osteoblasts in co-culture with human umbilical vein endothelial cells: An improved analysis using fluorescence-activated cell sorting. *Cell. Mol. Biol. Lett* 15: 517–529.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: : Strukturformeln von Folsäure und MTX [Fiehn, 2009].....	11
Abb. 2: Folsäurestoffwechsel [Löffler, 2007].....	12
Abb. 3: Schemazeichnung zur Vaskulogenese [Risau und Flamme, 1995].....	18
Abb. 4: Bewegungspotential von endothelialen Vorläuferzellen (EPC's) [Murasawa und Asahara, 2005] .....	20
Abb. 5: Differenzierung von der embryonalen Stammzelle zur Endothelzelle. Legende: ICM (inner cell mass), ES (embryonale Stammzellen) [Jänich, 2009] .....	21
Abb. 6: Farbreaktion vom gelblichen MTT zu purpurfarbenem Formazan [Schulz, 1998] .....	28
Abb. 7: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach einem Tag. Wells mit der höchsten MTX-Konzentration von 1000nm (Wells A1, A3 und A5).....	34
Abb. 8: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach einem Tag. Wells mit der niedrigsten MTX-Konzentration von 1 nm (Wells D2, D3 und D5) .....	34
Abb. 9: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach einem Tag. Wells der Kontrollgruppe ohne MTX-Zusatz (Wells E2, E3 und E6) .....	34
Abb. 10: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach drei Tagen. Wells mit der höchsten MTX-Konzentration von 1000nm (Wells A1, A4 und A5).....	35
Abb. 11: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach drei Tagen. Wells mit der niedrigsten MTX-Konzentration von 1nm (Wells D1, D2 und D3) .....	35
Abb. 12: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach drei Tagen. Wells der Kontrollgruppe ohne MTX-Zusatz (Wells E2, E3 und E5) .....	35
Abb. 13: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach sechs Tagen. Wells mit der höchsten MTX-Konzentration von 1000nm (Wells A1, A2 und A5).....	37
Abb. 14: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach sechs Tagen. Wells mit der niedrigsten MTX-Konzentration von 1nm (Wells D1, D4 und D5) .....	37
Abb. 15: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach sechs Tagen. Wells der Kontrollgruppe ohne MTX-Zusatz (Wells F3, F4 und F5).....	37
Abb. 16: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach acht Tagen. Wells mit der höchsten MTX-Konzentration von 1000nm (Wells A1, A2 und A5).....	39
Abb. 17: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach acht Tagen. Wells mit der niedrigsten MTX-Konzentration von 1nm (Wells D2, D4 und D6) .....	39
Abb. 18: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach acht Tagen. Wells der Kontrollgruppe ohne MTX-Zusatz (Wells E6, F2 und F3).....	39
Abb. 19: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach zehn Tagen. Wells mit der höchsten MTX-Konzentration von 1000nm (Wells A2, A4 und A5).....	41
Abb. 20: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach zehn Tagen. Wells mit der niedrigsten MTX-Konzentration von 1nm (Wells D2, D3 und D6) .....	41
Abb. 21: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach zehn Tagen. Wells der Kontrollgruppe ohne MTX-Zusatz (Wells E2, E4 und E6) .....	41
Abb. 22: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach vierzehn Tagen. Wells mit der höchsten MTX-Konzentration von 1000nm (Wells A2,A3 und A5) .....	43

<b>Abb. 23: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach vierzehn Tagen. Wells mit der niedrigsten MTX-Konzentration von 1nm (Wells D1,D3 und D5).....</b>	<b>43</b>
<b>Abb. 24: Repräsentative Aufnahmen der Endothelzellen nach vierzehn Tagen. Wells der Kontrollgruppe ohne MTX-Zusatz (Wells E3, E5 und E6) .....</b>	<b>43</b>
<b>Abb. 25: Übersicht der Ergebnisse des Cell Counts. ....</b>	<b>45</b>
<b>Abb. 26: Ergebnisse des CellCounts nach einem Versuchstag .....</b>	<b>46</b>
<b>Abb. 27: Ergebnisse des CellCounts nach drei Versuchstagen.....</b>	<b>47</b>
<b>Abb. 28: Ergebnisse des CellCounts nach sechs Versuchstagen .....</b>	<b>48</b>
<b>Abb. 29: Ergebnisse des CellCounts nach acht Versuchstagen .....</b>	<b>49</b>
<b>Abb. 30: Ergebnisse des CellCounts nach zehn Versuchstagen .....</b>	<b>50</b>
<b>Abb. 31: Ergebnisse des CellCounts nach vierzehn Versuchstagen .....</b>	<b>51</b>
<b>Abb. 32: Ergebnisse des MTT- Assay.....</b>	<b>52</b>
<b>Abb. 33: Ergebnisse des MTT-Assays am ersten Versuchstag .....</b>	<b>53</b>
<b>Abb. 34: Ergebnisse des MTT-Assays am dritten Versuchstag.....</b>	<b>54</b>
<b>Abb. 35: Ergebnisse des MTT-Assays nach sechs Versuchtagen.....</b>	<b>55</b>
<b>Abb. 36: Ergebnisse des MTT-Assays am achten Versuchtag .....</b>	<b>56</b>
<b>Abb. 37: Ergebnisse des MTT-Assays nach zehn Versuchstagen .....</b>	<b>57</b>
<b>Abb. 38: Ergebnisse des MTT-Assays am vierzehnten Tag nach Versuchsbeginn.....</b>	<b>58</b>

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der Basistherapeutika in der Behandlung der rheumatischen Arthritis [Lüllmann et al., 2010] .....	8
Tab. 2: Beeinflussung wichtiger pathophysiologischer Mechanismen durch Hemmung folatabhängiger Enzyme [Fiehn, 2009] .....	14
Tab. 3: Beeinflussung wichtiger pathophysiologischer Mechanismen durch Hemmung folatabhängiger Enzyme [Fiehn, 2009] .....	17
Tab. 4: Synopsis der angiogenen und angiostatischen Faktoren [Siegenthaler und Blum. Hubert E., 2006].....	19
Tab. 5: Ergebnisse des Cell Counts an Tag 1 nach Versuchsbeginn .....	46
Tab. 6: Ergebnisse des CellCounts an Tag 3 nach Versuchsbeginn .....	47
Tab. 7: Ergebnisse des CellCounts nach sechs Versuchstagen .....	48
Tab. 8: Ergebnisse des CellCounts nach acht Versuchstagen .....	49
Tab. 9: Ergebnisse des CellCounts nach zehn Versuchstagen.....	50
Tab. 10: Ergebnisse des CellCounts nach vierzehn Versuchstagen.....	51
Tab. 11: Ergebnisse des MTT-Assays (gemessen wurde die Absorption) am ersten Versuchstag .....	53
Tab. 12: Ergebnisse des MTT-Assays (gemessen wurde die Absorption) am dritten Versuchstag .....	54
Tab. 13: Ergebnisse des MTT-Assays am sechsten Versuchstag.....	55
Tab. 14: Ergebnisse des MTT-Assays nach acht Versuchstagen .....	56
Tab. 15: Ergebnisse des MTT-Assays am zehnten Versuchtag.....	57
Tab. 16: Ergebnisse des MTT-Assays nach vierzehn Versuchstagen.....	58

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen Dank sagen, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei:

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Johannes Kleinheinz danke ich für die Unterstützung meines Promotionsvorhabens.

Herzlich danken möchte ich Frau Dr. med. Heidemarie Becker für ihren Beitrag als Koreferentin.

Herrn Dr. med. Dr. med. dent. Kai Wermker danke ich für die Überlassung der Fragestellung sowie für die immer freundliche, engagierte und zuverlässige Betreuung über den gesamten Zeitraum ganz herzlich.

Ebenso danke ich den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Irene Grabiniok, Frau Hildegard Schütte und Frau Gunda Dehmer-Möller für ihre tatkräftige Hilfe in labortechnischen Belangen. Die Atmosphäre war stets freundlich und ihre fachkundige Unterstützung hat entscheidend zum Erfolg dieser Dissertation beigetragen.

Von ganzem Herzen danke ich Lennart van Exel, der mich oftmals motiviert hat und mit wertvollen Tipps unterstützt hat. Er hatte große Geduld mit mir, wenn es galt meine Computerkenntnisse aufzubessern.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, auf deren Unterstützung ich mich zu jedem Zeitpunkt des Studiums und der Dissertation habe verlassen können, danke ich von ganzem Herzen. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

## Lebenslauf