

Aus der Neurochirurgischen Klinik

Direktor: Univ. Prof. Dr. med. H.-J. Steiger

Etablierung einer Methode zum
Nachweis der Wirksamkeit der Photodynamischen Therapie
nach Gabe von 5-Aminolävulinsäure beim Glioblastom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Robert Pannewitz

2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	3
1.1	Klinische Aspekte	3
1.2	5-Aminolävulinsäure (5-ALA) - induzierte Protoporphyrin--Akkumulation und deren Nutzungsmöglichkeiten.....	6
1.3	Pathogenese Glioblastom.....	10
1.4	Das Prinzip der Photodynamischen Therapie	12
1.5	Zielsetzung dieser Untersuchung.....	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Vorbereitungen der Methoden.....	19
2.1.1	Einrichtung einer Dunkelkammer.....	19
2.1.2	Zellkultur.....	20
2.1.3	Diodenlaser	22
2.1.4	Behandlungskammer.....	23
2.2	Versuchsordnung	25
2.2.1	Aufbau	25
2.2.2	Ablauf der Versuche	26
2.2.3	MTT-Assay	26
2.3	Statistische Methoden	28

3	Ergebnisse	29
3.1	Identifizierung und Elimination experimenteller Störfaktoren	29
3.2	Physikalische Einflussgrößen auf die Wirksamkeit.....	39
3.2.1	Lichtmenge und 5-Aminolävulinsäure-Dosis zur letalen Dosis 50.....	39
3.2.2	Sauerstoffüberangebot vor Belichtung.....	40
3.2.3	Fraktionierte Zellbelichtung.....	42
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	44
4	Diskussion	46
4.1	In vitro vs. in vivo	46
4.1.1	Spezifizierungen der Methode.....	48
4.1.2	Eignung des MTT Assays.....	51
4.2	Integration in ein Gesamtmodell: Therapie des GBM mittels PDT	55
5	Zusammenfassung	56
6	Literatur-, Abbildungs-, und Abkürzungsverzeichnis	58
7	Danksagung	74
8	Lebenslauf	75

1 Einführung

1.1 Klinische Aspekte

Intrakranielle Tumore sind in der Gesamtheit der beim Menschen auftretenden Tumore eher selten. Der Anteil der primären Gehirntumore des Erwachsenen beträgt nur etwas weniger als 2% aller Neoplasien.

Insgesamt beträgt die Inzidenz aller Hirntumoren 11,8/100.000 Menschen, die Inzidenz der malignen hirneigenen Tumoren allein 6,5/100.000 Menschen. Dabei zeigt sich in der Kindheit ein erster Krankheitsgipfel mit kongenitalen und frühkindlichen Krankheitsbildern. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit steigt nachfolgend um ca. 1,2% pro Jahr an, bis sie um das 70. Lebensjahr ein gleichbleibendes Plateau erreicht (Stupp et al. 2005)

Die häufigste und gleichzeitig prognostisch schlechteste primär-maligne Neoplasie des Gehirns ist das Glioblastoma multiforme, das statistisch allein etwa 50% der Gliome darstellt. (Abb. 1.1).

Die malignen Gliome stellen die Medizin vor eine große Aufgabe. Geringes Ansprechen auf von der Operation abzusehende Therapie, kurze Zeitintervalle bis zum Rezidiv und schnelles, destruierendes Wachstum mit neurologischen Defiziten sind nur die Hauptprobleme in der Bekämpfung dieses Krankheitsbildes.

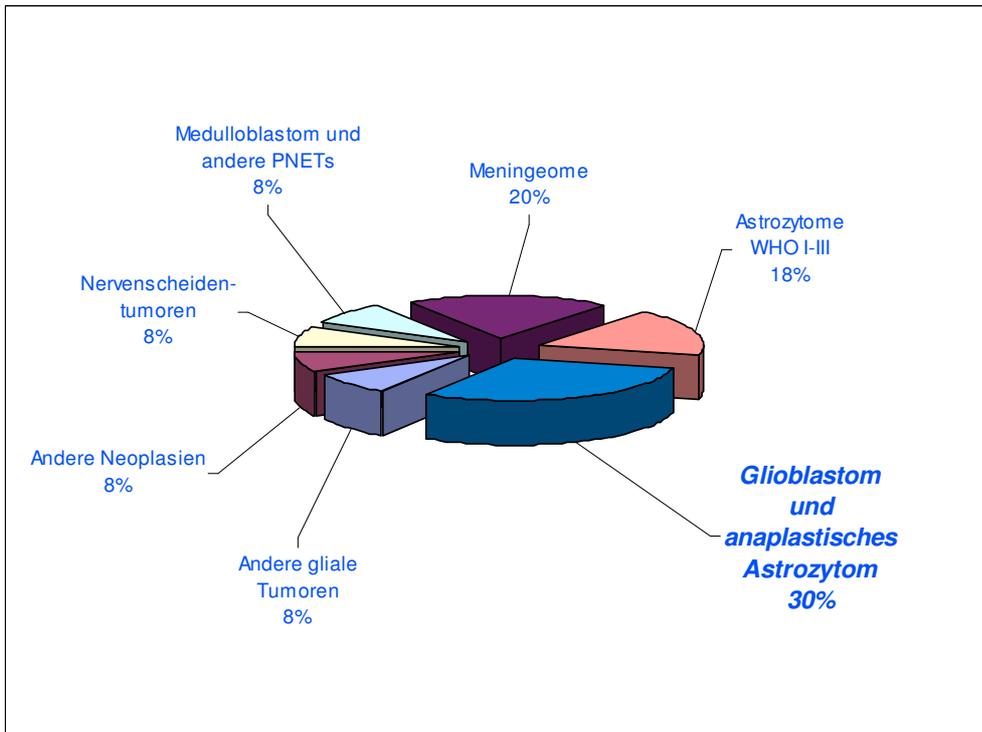


Abbildung 1.1:

Verteilung der Gehirntumoren

Die Resektion des Tumors und eine anschließende Radiochemotherapie sind derzeit als Standardtherapie anerkannt. Damit erreicht man momentan ein mittleres Überleben der Patienten von 15 Monaten, wohingegen der mediane natürliche Verlauf nach Diagnosestellung nur etwa 6 Monate beträgt (Stupp et al. 2005).

Die Radikalität der zumeist am Anfang stehenden Operation hat dabei aufgrund der oft ausgedehnten Infiltrationszone des Tumors einen entscheidenden prognostischen Einfluss im Sinne einer signifikant verlängerten Rezidivfreiheit. (Albert et al. 1994, Ammirati et al. 1987, Barker et al. 1996, Devaux et al. 1993, Keles et al. 1999, Nitta et al. 1995, Rostomily et al. 1994, Simpson et al. 1993, Winger et al. 1989, Wisoff et al. 1998, Wood et al. 1988, Yoshida et al. 1994, Stummer et al. 2006, 2008).

Dabei gestaltet sich die vollständige Resektion (über 90% der Gesamttumormasse) als problematisch, da operativ oft nicht mit ausreichender Sicherheit zwischen mit Tumorzellen infiltrierter Randzone und gesundem, teils eloquentem Nervengewebe unterschieden werden kann.

Seit einigen Jahren verspricht hier der Einsatz von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), als Vorstufe zur selektiven Tumormarkierung durch Protoporphyrin IX (PPIX), einen spezifischeren Erfolg bei der Identifizierung von Tumorzellen in vielen Fachgebieten der Tumormedizin.

Darüber hinaus wird seit einiger Zeit, besonders in dermatologischen, gynäkologischen, urologischen und neurochirurgischen Fachdisziplinen der Einsatz einer photodynamischen Therapie (PDT) diskutiert, bei der Anfärbung und Identifizierung von Tumorgewebe um den Aspekt einer gezielten, spezifischen Therapieform erweitert werden.

1.2 5-Aminolävulinsäure- induzierte Protoporphyrin-Akkumulation und deren Nutzungsmöglichkeiten

Als Vorläufersubstanz von PPIX ist 5-ALA ein Metabolit der Häm-Biosynthese und wird mit Hilfe der 5-ALA-Synthase aus Succinyl-Coenzym A, und der Aminosäure Glycin gebildet (Abb. 1.2). Aus insgesamt 8 Molekülen 5-ALA entsteht dabei das durch einen Porphyrinring gekennzeichnete, lipophile PPIX. (Abb. 1.3) Die zentrale Positionierung des Fe^{2+} -Atoms in PPIX erfolgt durch die mitochondriale Ferrochelatase und schließt den produktiven Part der Häm-Biosynthese ab. Die 5-ALA-Synthase erfährt dabei eine negative Rückkopplung, getriggert durch die ansteigende Konzentration von Häm-Molekülen.

Durch exogen beeinflusste Zufuhr von 5-ALA wird diese negative Abregulierung der Synthese von 5-ALA zwar nicht verhindert, jedoch unwirksam gemacht. Eine Akkumulation von PPIX tritt daraufhin deshalb ein, weil die mitochondriale Weitermetabolisierung von PPIX zu Häm durch die enzymatische Chelatbildung begrenzend für die Reaktionsgeschwindigkeit ist (Peng et al. 1997, Abb. 1.2).

Da die meisten körpereigenen Zellen für die oxidative Phosphorylierung im Rahmen ihres Stoffwechsels hämhaltige Enzyme zum Elektronentransport benötigen, wird davon ausgegangen, dass alle eukaryoten Zellen eine Kapazität zur Produktion von PPIX besitzen (Kennedy et al. 1992).

PPIX ist unter anderem durch seine Fähigkeit zur intensiven Fluoreszenz gekennzeichnet. Das Absorptionsmaximum liegt dabei bei 400 nm Wellenlänge. Die Fluoreszenzemission findet sich im roten Spektralbereich mit Emissionsmaxima bei 635 nm und 700 nm Wellenlänge.

Intraoperativ wird diese Eigenschaft unter Verwendung von blauem UV-Licht ausgenutzt um auch einzelne, operationsmikroskopisch darstellbare Zellverbände zu markieren und die Infiltrationszone des Tumors maximal selektiv zu resezieren (Abb. 2.1, Stummer et al. 1998, Abb. 2.2).

Zusätzlich dazu bietet PPIX mit dem Prinzip der PDT die gleichzeitige Möglichkeit einer Tumorreduktionstherapie (Stummer et al. 2005). Hohe Konzentrationen von PPIX haben neben dem fluoreszierenden Effekt eine photosensibilisierende Wirkung auf die damit beladene Zelle. Dies bedeutet eine operationstechnisch unabhängige Möglichkeit, Tumorgewebe mit Hilfe einer energiereichen Lichtquelle zu zerstören, indem die Zelle durch verschiedene Mechanismen von mechanischem Schaden (Nekrose) und Apoptosewegen (z.B. oxidativer Stress durch Singulett-Sauerstoff (Löffler et al. 1997)) zu Grunde geht (s. 4.1.2 Das Prinzip der PDT).

Diese Methode wird bereits schon heute auch ohne Kraniotomie angewandt, beispielsweise bei inoperablen Tumoren, Rezidiven oder Glioblastomen im Randbereich des Ventrikelsystems, indem die Glasfaser über eine stereotaktische Berechnung und lediglich eine Bohrlochtrepation bis zum Tumor geführt wird.

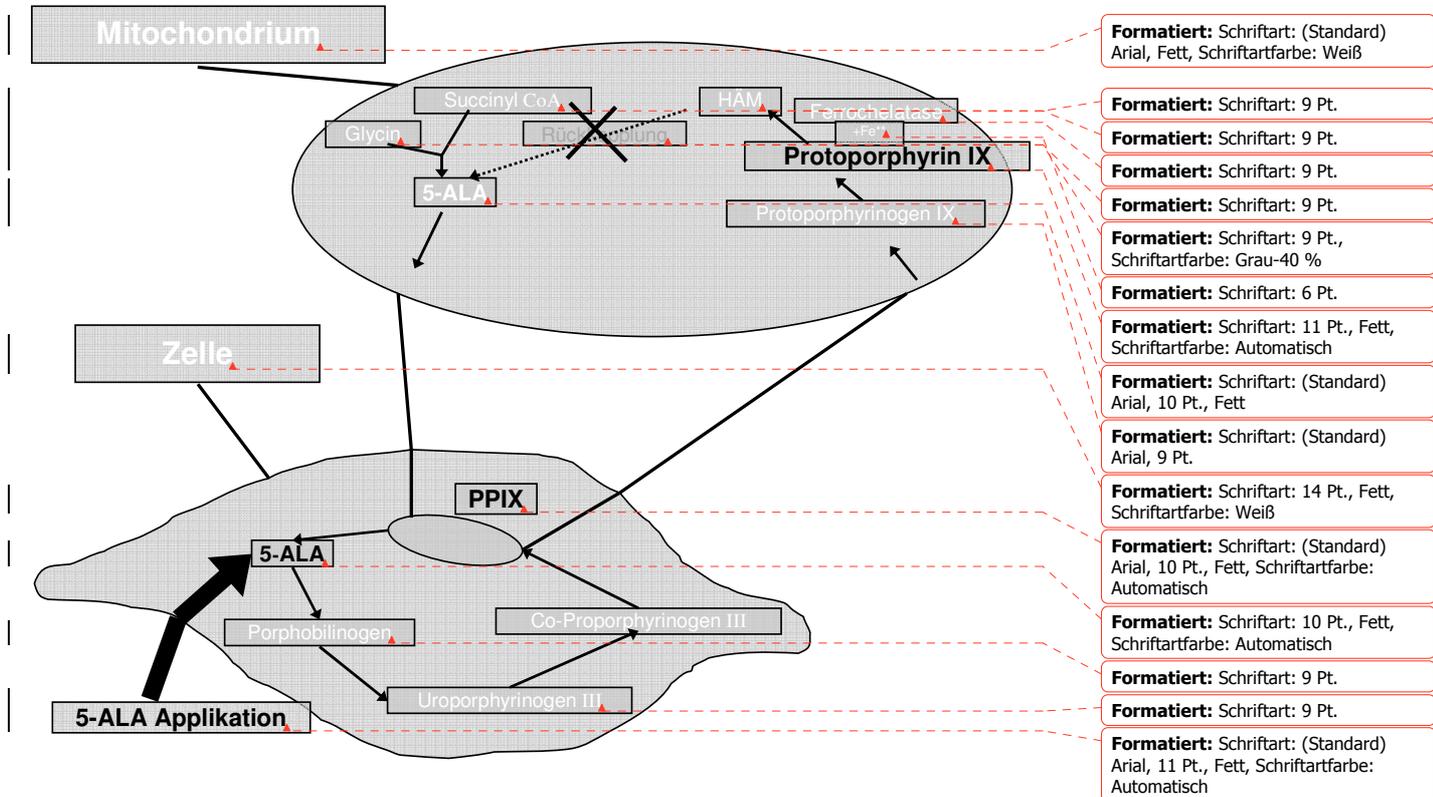


Abbildung 1.2:

Vereinfacht aus der Häm-Biosynthese : **5-Aminolävulinsäure** wird aus Succinyl-CoA und Glycine gebildet. Über die Zwischenschritte: Porphobilinogen -> Uroporphyrinogen III -> Protoporphyrinogen IX -> entsteht **Protoporphyrin IX**, das durch das Enzym Ferrochelatase zu Häm verstoffwechselt wird. Häm hemmt rückkoppelnd die 5-ALA Produktion, was durch exogene Zufuhr gegenstandslos wird. Durch eine begrenzte Aktivität der Ferrochelatase kommt es zu einer Akkumulation von PPIX

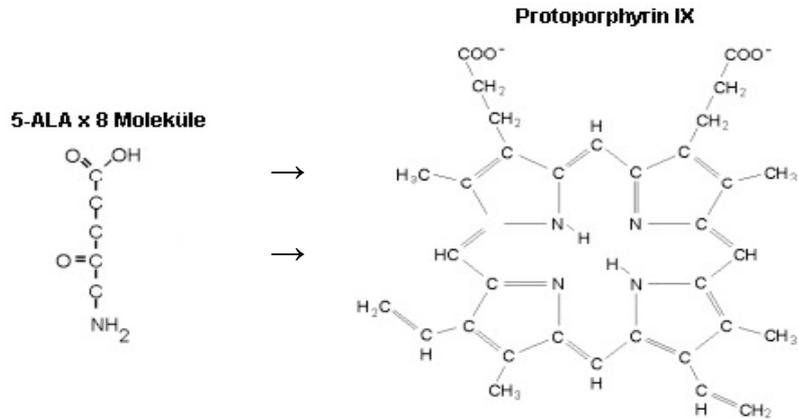


Abbildung 1.3:

Aus 8 Molekülen 5-ALA entsteht über 3 Zwischenstufen (Abb. 1.2) ein Molekül PPIX.

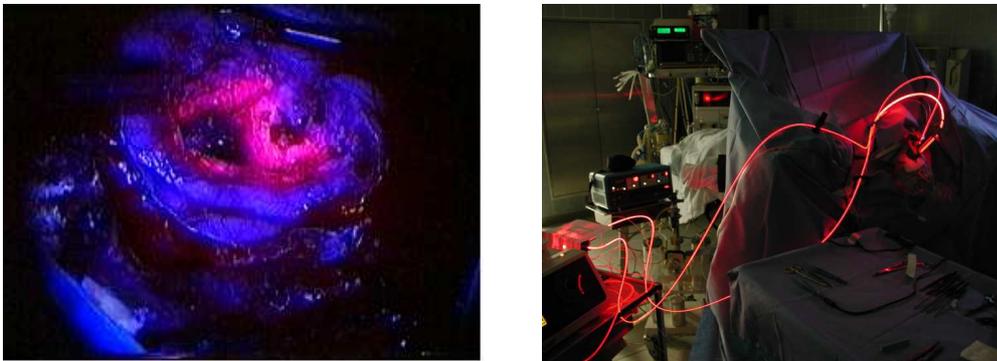


Abbildung 2.1 und 2.2:

Fluoreszenzgestützte Resektion eines Glioms. Die Tumoranteile fluoreszieren bei ausgeschaltetem Raumlicht und eingeschaltetem UV-Licht rot.

Adjuvant wird hier nach Resektion das Operationsfeld mit einem Diodenlaser nach Behandlungsschema bestrahlt, um maligne Zellen in der Infiltrationszone zu eliminieren (Stummer et al. 2004).

1.3 Pathogenese des Glioblastoms

Die World Health Organisation (WHO) teilt die Gliome, die sich von der Neuroglia, dem Stützgewebe des zentralen Nervensystems ableiten, entsprechend ihrer Dignität in 4 Grade ein. Als häufigste maligne Formen seien hier das anaplastische Astrozytom (WHO III^o) und das angesprochene Glioblastoma multiforma (WHO IV^o) genannt.

Beim Glioblastom handelt es sich um einen astrozytär differenzierten Tumor, der das umliegende Hirngewebe diffus infiltriert, wodurch seine Grenzen makroskopisch schwer darstellbar sind. Die diagnostische Abgrenzung vom anaplastischen Astrozytom gelingt durch den histopathologischen Nachweis von zentralen Nekrosen und vielseitig hochgradig pathologischen Gefäßveränderungen.

Immunhistochemisch gelingt oft der Nachweis von GFAP (Glial fibrillary acidic protein), das zur Abgrenzung gegenüber Hirnmetastasen anderer Genese beitragen kann.

Glioblastome entstehen vor allem beim älteren Patienten de novo, entwickeln sich aber auch aus weniger malignen Astrozytomen mit etwas früherem Altersgipfel.

Molekularbiologisch lassen sich Gendefekte nachweisen, die vor allem beim sekundären GBM das Tumorsuppressorgen TP53 auf Chromosom 17 betreffen, sowie Deletionen auf Chromosom 22, 13 und den Verlust von Chromosom 10 (Ricket et al. 2001). Beim primären GBM finden sich häufig Deletionen des PTEN-Gens (Putative protein tyrosine phosphatase), sowie eine Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens (Epidermal-growth-factor) (Oghaki et al. 2004).

Die Therapiemöglichkeiten des GBM sind wie bei allen Arten von malignen Neoplasien einem ständigen Wandel unterzogen.

Die klinische Besserung der Symptomatik mit Dexamethason zur Behandlung des vasogenem Ödems steht am Anfang einer Therapieplanung. Nach neurochirurgischer Intervention schließt sich normalerweise eine Radiochemotherapie an, um das rezidivfreie Intervall zu verlängern.

Besonders Patienten, bei denen ein Nachweis auf genetische Inaktivierung des DNA-Reparaturenzyms O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) gelingt, scheinen von einer adjuvanten chemotherapeutischen Behandlung mit Temozolomid zu profitieren (Stupp et al. 2005). Weitere Chemotherapeutika, die unter anderem beim Rezidiv eingesetzt werden, sind Nitroseharnstoffe, Vinkaalkaloide und Cytosinarabinosid. Auch gentherapeutische, sowie experimentelle Behandlungsansätze mit Nanopartikeln gehören mittlerweile zum im Rahmen klinischer Studien erprobten Spektrum der Forschung zur Therapie dieses Krankheitsbildes. Bisher zeigen viele neuartige Behandlungsansätze unterschiedliche Ergebnisse in Tierversuchsmodellen (Maier-Hauff et al. 2007, Jordan et al. 2006).

Aus diesem Grund liegt die 5-Jahres-Überlebenszahl nach Diagnose bei immer noch nur 2-4%. Weniger als ein Fünftel der Patienten, bei denen allein eine Operation durchgeführt wurde, lebte länger als 12 Monate. Entscheidende Faktoren für die Prognose des GBM sind das Erkrankungsalter, die körperliche Konstitution (nach Karnofsky-Index) bei Diagnose, sowie die Tumorlokalisation (Smith et al. 2000).

Stark körperlich beeinträchtigende und psychisch für alle Beteiligten belastende Symptome in Verbindung mit einer schlechten Prognose machen den Umgang mit diesem Krankheitsbild für die Betroffenen, Angehörige, sowie für die behandelnden Ärzte in vielerlei Hinsicht zu einer Herausforderung.

Trotz nachgewiesenen positiv-prognostischem Einfluss einer radikalen Operation muss in vielen Fällen Rücksicht auf die Erhaltung eloquenten Gewebes und der Verhinderung der postoperativen neurologischen Defizite genommen werden. Aufgrund der ohnehin bereits schlechten Prognose und der früh absehbaren Rezidivierung muss man im Rahmen des palliativen Gedankens als Erstes die Erhaltung einer höchstmöglichen Lebensqualität des Patienten voran stellen und neurologische Schäden und zu erwartende Defizite vermeiden (Wood et al. 1988, Vecht et al. 1990, Albert et al. 1994, Kowalczyk et al. 1997).

Aufgrund dieser Überlegungen entstanden in der Vergangenheit viele Techniken zur Anfärbung der Tumorzellen. Initial war dabei der Einsatz von Fluorochromen zu beobachten, die sich selektiv und spezifisch im Tumorgewebe anzureichern schienen (Moore et al. 1958, Poon et al. 1992, Kabuto et al. 1997).

1.4 Das Prinzip Photodynamische Therapie

Anfang des 20. Jahrhunderts von Tappeiner und Raab (1903) in München erstmalig als „Lichtinduzierte Reaktion in biologischen System unter Beteiligung von Sauerstoff“ beschrieben, tauchte der Begriff „Photodynamische Therapie“ in den Forschungsgebieten der verschiedensten biologischen und medizinischen Fachrichtungen und Fragestellungen auf. Tappeiner und Raab beobachteten, wie Wimperntierchen nach Anfärbung mit Acridin-Orange erst bei zusätzlicher Einwirkung von Licht starben.

Demnach sind Wechselwirkungen von Licht mit Photosensibilisatoren in Gewebe entscheidende Grundvoraussetzung der PDT. Diese Sensibilisatoren sind Farbstoffe, die auf Licht mit Fluoreszenzemission oder in Form von auf Sauerstoffradikalen

basierender Toxizität oder beidem reagieren. Dabei dient die Emission eher der Diagnostik mit z.B. Identifizierung malignen Gewebes, die phototoxischen Effekte dienen im Rahmen der Therapie beispielsweise der Bekämpfung eines Tumors.

Zusätzlich ist von entscheidender Bedeutung, dass dieser Photosensibilisator möglichst verträglich, selektiv für Tumorgewebe und am besten systemisch verabreichbar ist. Es gibt jedoch auch Beispiele für topische Anwendungen (Dougherty 2002, Loh et al. 1993).

Tappeiner behandelte 1903 mit Hilfe von Eosin erstmals Hauttumore, was jedoch zu dieser Zeit noch zu starken Nebenwirkungen führte. Erst 1961 konnten gynäkologische Tumoren mit höherer Erfolgsrate und geringeren Nebenwirkungen behandelt werden konnten (Lipson et al. 1961).

1981 fand Photofrin[®] erstmals als kommerziell zugelassener Photosensibilisator den Zugang zur Therapie, was jedoch noch immer zu lang anhaltenden, kutanen Lichtüberempfindlichkeitsreaktionen bei den Patienten führte.

Erst ab 1990 wurden höher selektive und nebenwirkungsärmere Sensibilisatoren entwickelt, zu denen auch das synthetische Protoporphyrin IX (PPIX) gehört.

Auf molekularer Ebene scheint die Schädigung von Zellmembran, Mitochondrien und Zellkernorganellen verantwortlich für den Zelluntergang zu sein (Kessel et al. 1981 und 1986, Coppola et al. 1980). Zusätzlich wird den Superoxidradikalen die Wirkung zugesprochen, die DNA dahingehend zu modifizieren, dass es durch Veränderung der Desoxyribose zu Strangbrüchen kommen kann, sowie durch Veränderung der Basen zur Änderung der Komplementärbase und/oder zum oxidativen Abbau des geschädigten Abschnittes (Löffler et al. 1997), was zu Modifikation oder dem Ausfall

von Proteinaktivitäten führt. Gehäuft tritt dies bei Proteinketten auf, die eine oder mehrere der Aminosäuren Cystein, Methionin, Histidin oder Tryptophan enthalten. Löffler et al. untersuchten 1997 besonders die Wirkung auf die Lipidmembran der Zelle und stellten dabei die Modifizierung der ungesättigten Fettsäuren heraus. Hier kommt es durch Akkumulation von Lipidperoxiden durch autokatalytische Prozesse zur Entstehung von Aldehyden, Dialdehyden, Dicarbonyl-Verbindungen und Ketonen, was die Funktion der Membran und damit der gesamten Zelle beeinflusst. Demnach wird vor allem eine Lyse der Zelle im Sinne einer nekrotischen Reaktion diskutiert, wohingegen die oxidativ-molekularen, nukleären Auswirkungen oft der Anstoß zu apoptotischen Zelluntergangskaskaden sind.

Auf physikalischer Ebene wirkt die PDT über eine Absorptionsreaktion. Dabei wird mit Hilfe des photosensibilisierenden Farbstoffs ein Photon auf ein Elektron der Atomhülle eines Moleküls übertragen. Dieses Elektron wird auf eine energiereichere Bahn getragen, was man als (Energie-)Absorption bezeichnet und das Elektron in einen angeregten („Singulett“-) Zustand versetzt. Da das Elektron bestrebt ist, wieder auf das ursprüngliche Level zurückzukehren, geschieht eine von zwei Möglichkeiten: Entweder gibt das Elektron die überschüssige Energie in Form von Bewegungswärme ab oder es entsteht ein neues Photon, was man als Fluoreszenz messen kann.

Bei entsprechenden langlebigen Photosensibilisatoren im so genannten Triplett-Zustand gibt es zusätzlich die Möglichkeit, die überschüssige Energie auf ein anderes Atom oder Molekül zu übertragen und so z.B. ein Sauerstoffradikal ($^1\text{O}_2$) entstehen zu lassen. Im besten Falle kehrt der Photosensibilisator danach wieder in den Urzustand zurück und steht für weitere Photonenabsorptionen bereit. Dieser

Vorgang wird als Typ II- Mechanismus beschrieben, wohin gehend bei einem Typ I- Mechanismus der Photosensibilisator nach Abgabe zerfällt (Kessel et al. 1981).

Doch auch bei einem Typ II- Mechanismus erfolgt eine Abnahme der Konzentration des Photosensibilisators („Bleaching“), was darauf zurück zu führen ist, dass das aggressive $^1\text{O}_2$ nicht nur seine molekularen Wirkungen auf die Zellorganellen entfaltet (s.o.), sondern die Struktur des Sensibilisators selbst ebenfalls angreift.

Damit finden wir als weitere wichtige Eigenschaft eines Photosensibilisators die langlebige Stabilität in Form einer Triplett-Ausbeute.

In bisherigen Studien hat sich 5-ALA als nebenwirkungsarmes Medikament erwiesen (Stummer et al. 1998). Bis heute sind ernsthafte persistierende, unerwünschte Arzneimittelwirkungen, die sich bei fluoreszenzgestützter Therapie oder bei photodynamischer Therapie mittels 5-ALA zeigten, nicht bekannt. In der Dermatologie eingesetztes Methyl-5-ALA führte bei topischer Bestrahlung durch Rotlicht bei 630nm Wellenlänge zu kutanen Schmerzreaktionen während der Bestrahlung, während 5-ALA eine signifikant bessere Tolerabilität zeigte (Kasche et al. 2004). Man ging davon aus, dass die Schmerzen bei Behandlung aus der entzündlichen Gewebereaktion aufgrund des Zellzerfalls bei Bestrahlung resultierten. Außerdem zeigte sich bei topisch-kutaner Anwendung in Form einer Salbe eine sonnenbrandähnliche Überempfindlichkeit der Haut gegenüber von Sonnenlicht, die nach 2-3 Wochen abgeklungen war. Systemische Nebenwirkungen von 5-ALA sind nicht beschrieben (Jocham et al. 2000).

Aminolävulinsäure zeigt keine Plasmaeiweißbindung bei einer Plasmahalbwertszeit von 1-3 Stunden (Löhning et al. 2006).

Als körpereigene Substanz sind keine immunologischen Reaktionen zu erwarten.

Die Applikation von Sauerstoff, sowie die Belichtung von gesundem Hirngewebe lässt keine unerwünschten Behandlungsauswirkungen vermuten.

Jedoch zeigten sich in vielen Studien aufkommende Zweifel an der Selektivität des Photosensitizers für Tumorgewebe. Nach weiterführenden Untersuchungen gelangte man zu der Ansicht, dass diese Selektivität oft nur als Täuschung angesehen werden muss und durch Störungen der Blut-Hirn-Schranke innerhalb der Gliome zustande kommt (Stummer et al. 1993).

1.5 Zielsetzung dieser Untersuchung

Die 5-ALA gestützte PDT wurde in den letzten Jahren bereits in experimentellen Studien untersucht. Eine sichere Methode zum Nachweis des Ausmaßes der Wirkung auf humane Gliomzellen und eine Dosis-Wirkungs-Kurve der verschiedenen Einflussfaktoren auf das Behandlungsergebnis fehlen jedoch.

Das Ziel der Untersuchung bestand daher darin, ein Zellmodell zu entwickeln und - unter Beachtung und ständiger Kontrolle der klinischen Möglichkeiten - eine Methode der Behandlung des Zellmodells mittels PDT zu etablieren, an der sich weitere experimentelle Studien orientieren können.

Als eine Voraussetzung zur Umsetzung musste eine standardisierte Behandlungskammer eingerichtet und ein Ablauf der PDT gefunden werden, der ebenso oder ähnlich reproduzierbar unter Operationsbedingungen durchführbar ist.

Ein weiteres Ziel bestand darin, mittels experimenteller Versuchsreihen die jeweilige Behandlungsdosis der PDT-Komponenten zu finden, die im kombinierten Minimalprinzip zu einer LD50 im Zellmodell führen sollte, also zu einer Dosierung der Parameter, bei der 50% der Zellen zugrunde gehen. Auch hier bestand die Aufgabe der möglichen klinischen Umsetzbarkeit am Patienten.

Abschließend sollten zwei weitere mögliche Einflussfaktoren auf das Ergebnis der PDT untersucht werden. Dabei handelte es sich zum Einen um das Prinzip der fraktionierten Beleuchtung der Zellen. Hierbei stellten wir uns durch eine prolongierte und wiederholte Stoffwechselzeit der Zellen eine mehrzeitig erhöhte PPIX-

Akkumulation über eine längere Zeit hinweg vor. Zum Anderen sollte der Einfluss von Sauerstoffsubstitution in die Zellnährlösung vor Belichtung untersucht werden, in der Annahme, dass ein Überangebot von Sauerstoff für eine Beschleunigung der Akkumulation von reaktiven Sauerstoff-Spezies führt und damit die Zelltoxizität steigert. Beide Einflussfaktoren sollten im Zellmodell vor dem Hintergrund einer denkbaren pragmatischen Behandlungsform am Patienten betrachtet werden, wobei die zuvor ermittelte LD50 der PDT ohne Untersuchung der beiden Faktoren zugrunde liegen sollte.

2 Material und Methoden

Die Experimente wurden im neurochirurgischen Labor der Universitätsklinik zu Düsseldorf durchgeführt.

2.1 Vorbereitung der Methoden

2.1.1 Einrichtung einer Dunkelkammer

Nach Vorgaben der Arbeitssicherheit und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Neuropathologie der Universitätsklinik Düsseldorf, Prof. Dr. Reifenberger, wurde in den Räumen des neurochirurgischen Labors ein Raum geschaffen, der bei Bedarf von Tageslicht abgeschlossen verdunkelt werden kann, sowie alle Brandschutzbestimmungen im Umgang mit Laser-Geräten erfüllt. Hauptbestandteile dabei waren die Entfernung allen brennbaren Materials, sowie die Minimierung von reflexionsfähigen Flächen.

Hauptziele der Dunkelkammer waren isolierte Behandlung der Versuchszellen ohne Einfluss von Tageslicht, sowie ein abschließbarer Raum mit Warnhinweisen, die während des Versuchsvorgangs sichtbar gemacht werden konnten. Die Behandlung der Zellen mittels 5-ALA und die nach der Belichtung durchgeführte Anfärbung (s. 2.2 Versuchsanordnung) konnten aus Gründen der Keimfreiheit nicht in der Dunkelkammer ausgeführt werden. Sie wurden daher im Zelllabor (BIO I, BIO II und S II) realisiert, die Zellen danach vor Licht geschützt in Styropor in die Dunkelkammer transportiert.

2.1.2 Zellkultur

1. Zelllinie

Als Zelllinie wurden humane Gliomzellen G112 ausgewählt und zur erstmaligen Aufzucht aufgetaut. Retrospektiv erwies sich G112 als äußerst robust gegenüber Kontamination, reagierte jedoch sehr sensibel auf Schwankungen im Nahrungsangebot.

2. Medium

Um ein stabiles Medium zu gewährleisten, das nährstoffreich, unempfindlich gegenüber äußeren Einflüssen und in nachfolgender Experimentenreihe verwertbar sein sollte, entschieden wir uns vorerst für eine Standard-Zusammensetzung (Tabelle 1). Besonderheiten stellten hierbei das obligat farblose fetale Kälberserum dar, um die Extinktion der Suspension nicht zu beeinflussen. Weiterhin wurden in den Sommermonaten Fungizome[®] verwendet, unter denen es zu keinem Zeitpunkt zur Kontamination der Kultur kam.

3. Splitten

Nach vorsichtigem Absaugen des Mediums unter Schonung der am Boden adhären Zellverbände folgten die Spülung und die Zellablösung mittels Trypsin. Der Erfolg wurde mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurden 7ml Medium hinzugegeben und die Suspension entsprechend Schema geteilt.

4. Zellzählung

50µl Zellsuspension wurden mit 150µl Trypanblau gemischt und jeweils 10µl in beide Felder der Neubauerkammer pipettiert. Die anschließende Zellzählung erfolgte nach der Neubauerkammermethode (mind. 8 Quadrate).

Methoden der Zellkultur	Benötigte Hilfsmittel
Zellen	Linie G112
Medium Anzucht Zusammensetzung	DNEM 500ml FCS (farblos!) 50ml PenStrep 5ml Sodium/Pyruvat 5ml
Splitting	PBS Trypsin 3ml Medium s.o.
Zellzählung	Zellsuspension n. Splitten s.o. Typtanblau 150µl

Tabelle 1:

Übersicht über Hilfsmittel und Methoden der Zellkultur

In den folgenden Versuchen wurden nach Zellzählung der verdünnten Suspension jeweils n=5000 Zellen pro Well ausgesät. Jede der 4 Behandlungsgruppen (Blocks) bestand aus 4 Wells (s. auch Versuchsanordnung, Abb. 7.1).

2.1.3 Diodenlaser und Lichtleiter

In dieser experimentellen Studie wurde ein Lasersystem der Firma BioLitec GmbH, das CeraLas 635 verwendet, ein Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 635nm. Dieses System ermöglicht eine homogene Leistungsentfaltung nach vorheriger Kalibrierung über einen Lichtapplikator. Die Behandlungsparameter werden programmiert, danach schaltet das Gerät automatisch ab. Als Applikator diente ein Glasfaser-Lichtwellenleiter mit aufgesetzter Diffusor-Linse, mit der homogenes Licht in einem Kegel zerstreut wird, was als optimal zu steuernde Lichtquelle angesehen wurde (Abb. 3.1 und 3.2).

Bei einem Abstand von 93mm von Linse bis zum Well erreicht man bei 1 Watt Leistung eine Applikation von $25\text{mW}/\text{cm}^2$, was einem Lichtfluss entspricht, der auch von anderen Arbeitsgruppen bereits als sicher zytotoxisch bewiesen wurde (Hirschberg et al 2006, Madsen, et al. 2001, 2006).



Abbildung 3.1 und 3.2:

Das Lasersystem CeraLas 635 mit eingesetztem Applikator (Glasfaserkabel), eingerichtet in der Dunkelkammer des neurochirurgischen Labors der Universitätsklinik Düsseldorf.

2.1.4 Behandlungskammer

Mit freundlicher Unterstützung der Firma WELABO Düsseldorf wurde eine Behandlungskammer entwickelt und in der eingerichteten Dunkelkammer untergebracht (Abb. 3.2).

Dabei handelt es sich um eine Vorrichtung zur Belichtung der Zellen in 96-Well-Platten von unten. Dies geschah unter der Vorstellung, die anzunehmende, enorme Lichtbrechung an der Oberfläche des Nährmediums zu umgehen, da diese eine hohe Konkavität aufweist und einen großen Anteil des gebündelten Lichts nach außen ableiten könnte. (Abb. 4) Des Weiteren sedimentieren die inkubierten Zellen nach der Einwirkungszeit durch 5-ALA an den Boden der Platte, wo sie dem Licht von unten am unmittelbarsten ausgesetzt sind (Abb. 5.1, Abb. 5.2, Abb. 6).

Diese Planung ermöglichte den Schutz der photosensibilisierten Gliomzellen vor exogenem Licht und dessen Einfluss auf deren Zerfall.

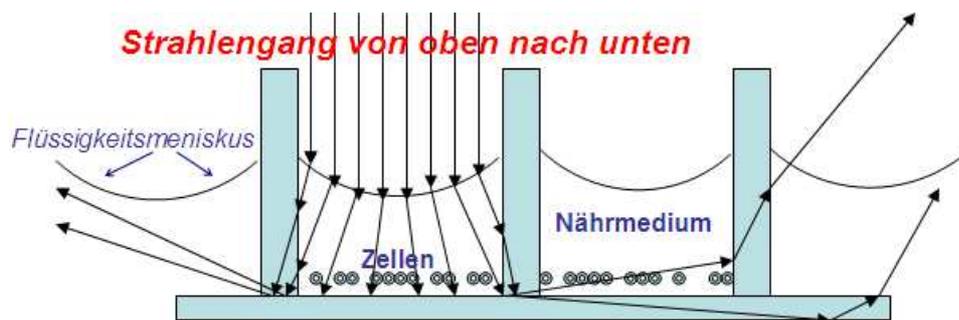


Abbildung 4:

Das Licht trifft bei Strahlengang von unten auf eine ebene Fläche und wird, im Gegensatz zur dargestellten Beleuchtung von oben gleichmäßiger weitergeleitet. Der Effekt durch Reflexionen von der Kunststoff-Oberfläche ist aufgrund der Gleichartigkeit der Versuche zu vernachlässigen.

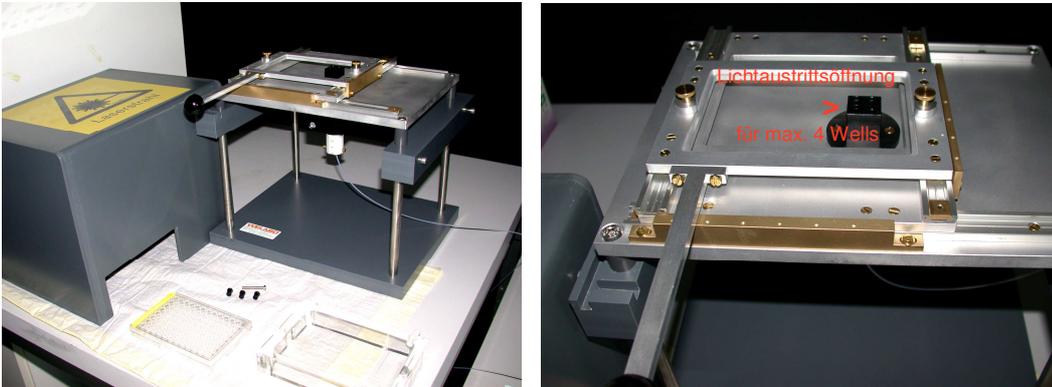
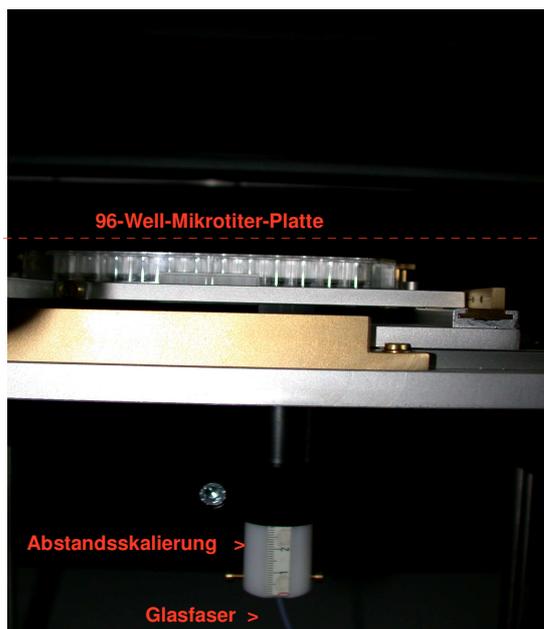


Abbildung 5.1 und 5.2:

Durch eine abgeschlossene Kammer mit exakter Lichtführung einer Glasfaserdiode zur Unterseite der Wells der Behandlungsgruppe und eine in 2 Freiheitsgrade justierbare Fixationseinheit können 1 bis 4 Wells zugleich behandelt werden.



Formatiert: Schriftart: (Standard)
Arial, 9 Pt., Schriftartfarbe: Rot

Abbildung 6:

Die Entwicklung erfolgte nach eigenen Plänen. Zusätzlich zur Haube wird die Platte durch einen Plexiglasverschluss abgeschlossen, in dem sich eine weitere Schrauböffnung befindet, um bei Bedarf eine Gasquelle oder einen Luftabzug anzuschließen. Die Lichtquelle wird durch einen Zylinder mit Skala an der Unterseite eingeführt.

2.2 Versuchsanordnung

2.2.1 Aufbau der Behandlungsplatte

Nach Anzuchtung der Zellen und Zellzählung (2.1.2 Zellkultur) wurden die Zellen auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte in Nährmedium entsprechend eines standardisiert wiederholbaren Versuches angeordnet. Dabei wurden pro Well 5000 Zellen ausgesät (Abb. 7.1). Die entsprechenden Gruppen wurden mit gelöstem 5-ALA aufgefüllt. Die Wells ohne 5-ALA (Block I, „Hell-Standard“) wurden mit Nährlösung auf gleiches Volumen gebracht.

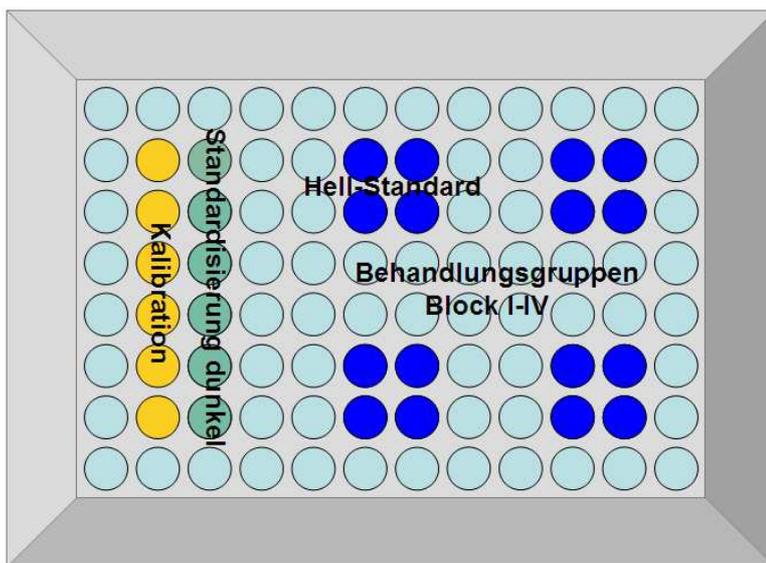


Abbildung 7.1:

Anordnung der Behandlungsgruppen auf einer 96-Well-Platte. Die randständigen Wells wurden nach entsprechender Programmierung des ELISA-Readers mit Nährmedium gefüllt. Des Weiteren bestand beim Befüllen der Wells dadurch eine Eigenkontrolle auf Vollständigkeit und mögliche Verunreinigung des verwendeten Mediums.

2.2.2 Ablauf der Versuche

Nach laut Versuchsreihe unterschiedlichen Inkubationszeiten im dunklen Brutschrank bei 37°C und 5% pCO₂ wurden die Zellen möglichst schnell und unter möglichst wenig Lichteinwirkung gewaschen. Die Zellen sind bis zu diesem Zeitpunkt auf den Boden der Wells sedimentiert und waren dort adhärent. Somit wurden beim Waschvorgang keine Zellen mit ausgewaschen. Anschließend wurde die Platte vor Licht geschützt in die Dunkelkammer verbracht und in die Behandlungskammer eingesetzt.

Zuvor wurde bereits das Lasersystem kalibriert und auf die geplanten Versuchsparemeter eingestellt. Daraufhin wurde in 4 Bestrahlungsabschnitten jede Behandlungsgruppe mit den festgelegten Parametern behandelt.

2.2.3 MTT - Assay

Nach der Behandlung wurden die Zellen unter Lichtschutz zurück in den Brutschrank verbracht, daraufhin mittels MTT-Assay angefärbt und nach standardisierter Zeit mit einem Stabilisator versehen, der den Extinktionsstatus der Zellen konservieren sollte. Der MTT Assay ist eine Lösung zur Anfärbung und Messung der Zellproliferation und damit der Vitalität von Zellen.

Dieses Werkzeug misst die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen. Der Tetrazoliumring des MTT wird durch Dehydrogenasen aufgebrochen. So entsteht aus dem schwach neongelb gefärbten MTT dunkelblau-violettes Formazan (Abb. 7.1).

Die Extinktion der lebenden Zellen wurde mittels ELISA-Reader colorimetrisch bestimmt und ausgewertet.

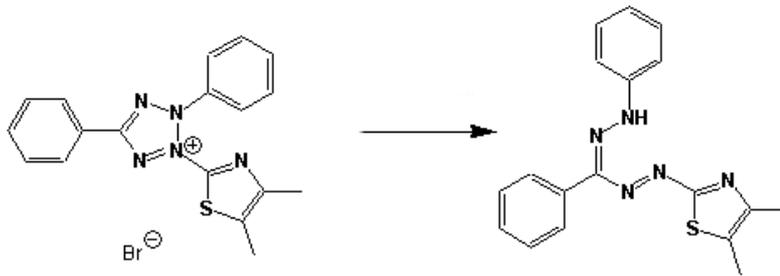


Abbildung 7.1:

Reduktion von MTT-Bromid durch die mitochondriale Reduktase zu Formazansalz.

2.3 Statistische Methoden

Zur Berechnung der statistischen Werte wurde das Programm SPSS für Windows, sowie die Tabellenkalkulation Excel/Office für Windows benutzt.

Die statistischen Daten wurden mittels Regressionsanalysen und dem Oneway-ANOVA-Test ermittelt.

Für die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde ein Wert von $p < 0,05$ festgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung und Elimination experimenteller Störfaktoren

Als erste Maßnahme zur Etablierung eines zuvor noch nicht detailliert beschriebenen Versuchsablaufs erschien es uns wichtig, die Zellextinktion für G112 im MTT-Assay zu bestimmen und damit eine lineare Korrelation zwischen Zellzahl und Extinktion nachzuweisen (Abb. 8.1).

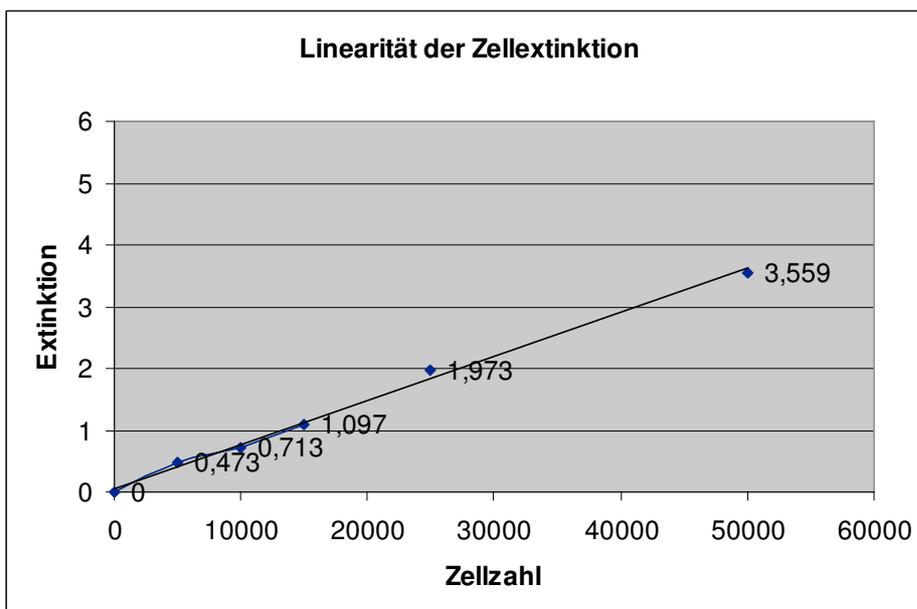


Abbildung 8.1:

Nachweis eines linearen Zusammenhangs zwischen vitaler Zellzahl pro Well und Extinktion via ELISA-Reader nach MTT-Assay ($r=0,998$, $p=0,000$).

Das Ziel des ersten Versuches war ein prinzipieller Wirkungsnachweis bei selbst gewählten und abgeschätzten Variablen (Abb. 8.2). Dabei wurden folgende Parameter gewählt:

5000 Zellen/Well

5-ALA-Konzentration 0, 10, 50, 100 µg/ml jeweils x4 Wells

625 Sekunden bei 1 Watt (25mW/cm²) Bestrahlung durch den Laser

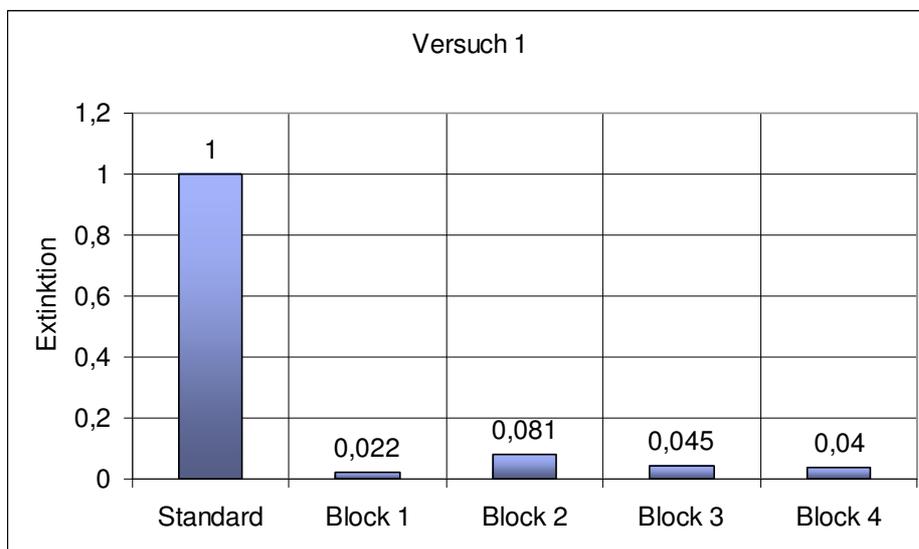


Abbildung 8.2:

Erster Versuch zur Wirksamkeit von Behandlung der Zellen mittels 5-ALA und Belichtung durch den Laser.

Nach Auswertung der Ergebnisse erschien die Extinktion des Standards (1) als einziger Wert einen Sinn zu ergeben, die Zellen in den Blöcken waren aus den Werten ablesbar inhomogen tot oder nicht nachweisbar.

Als mögliche Fehlerquellen identifizierten wir die zu hoch gewählte Dosis der Behandlungsparameter für Licht und 5-ALA, die Aufbereitung der Zellen, sowie weitere denkbare, systemische Fehlerursachen innerhalb der Methode.

Daher verzichteten wir bei Versuch 2 auf den Waschvorgang, um einen dabei auftauchenden systemischen Fehler im Sinne einer akzidentiellen Auswaschung auszuschließen und änderten die Konzentration von 5-ALA auf 0 (Block 1 und 2) und 50 µg/ml (Block 3 und 4) (Abb. 8.3):

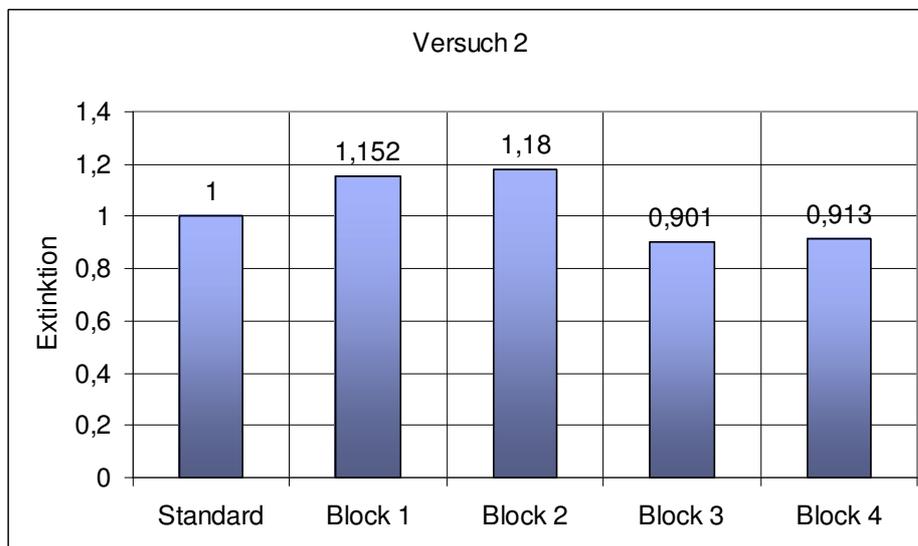


Abbildung 8.3:

Versuch 2 mit den Parametern: Block 1 und 2: 0 µg/ml, Block 3 und 4: 50 µg/ml nachfolgend gleichbleibende 625 Sekunden Belichtung.

Das Ergebnis des Versuchs erbrachte keine genügende Ursachenklärung für die Fehlerquellen des ersten Versuchs. So nahmen wir an, die Konzentration an 5-ALA erheblich erhöhen zu müssen, wobei gleichzeitig das ermittelte Weglassen des Waschvorgangs als sinnvoll betrachtet wurde.

Versuch 3 behandelte die Zellen daher mit erheblich erhöhten und verschiedenen Parametern zur Probe (Abb. 8.4).

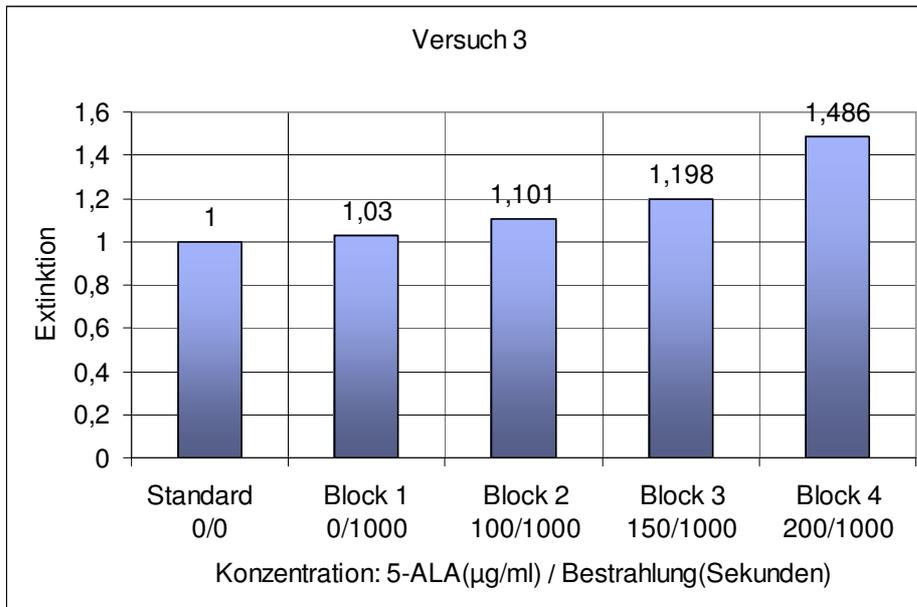


Abbildung 8.4:

Versuch 3 mit verschiedenen Parametern (s. Abb.) der Behandlungsblöcke zur Orientierung und Identifizierung von Störfaktoren.

Aufgrund dieses Ergebnisses, bei dem bei höheren Konzentrationen der Parameter scheinbar mehr Zellen vital wurden als vor der Behandlung, entstand die These, dass womöglich das entstehende PPIX eine additional Eigenextinktion zeigen könnte.

Daraufhin untersuchten wir synthetisches Protoporphyrin IX mittels MTT Assay auf Eigenextinktion (Abb. 8.5). Es wurde eine sehr hohe PPIX-Dosis (max. 1g pro ml Aqua injectable) mit ansteigender logarithmischer Verdünnung auf jeweils 6 Wells in weiteren 5 Reihen angesetzt und in insgesamt 6 Gruppen gegenüber destilliertem Wasser verglichen.

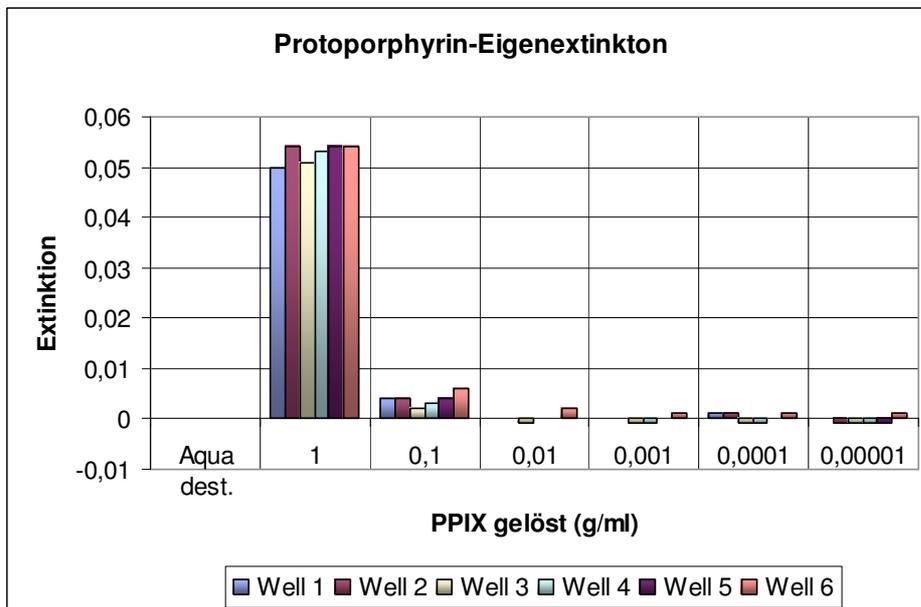


Abbildung 8.5:

Darstellung der Extinktion von synthetischem PPIX zum Ausschluss der Versuchsbeeinflussung mit log. Verdünnung.

Selbst bei eskalierender Dosierung von PPIX (Spalte 2, Gruppe 1) von 1g/ml zeigte sich keine nennenswerte Extinktion (Maximum PPIX = 0,054 gegenüber Aqua dest. = 0). Zudem wäre unter unseren Versuchsbedingungen eine derartige Dosierung nicht möglich gewesen.

Diese Erkenntnis schloss die zuvor angeführte These zur Eigenextinktion von PPIX praktisch aus. Gleichzeitig musste jedoch ermittelt werden, ob unverbrauchtes 5-ALA in der Suspension eine Eigenextinktion mittels MTT zeigen könnte.

Diese Vermutung wurde bestätigt. 5-ALA zeigte in sterilem H₂O keine Extinktion, genauso wie PPIX. In farblosem Nährmedium mit FCS (fetalem Kälberserum) jedoch extinguierte 5-ALA (Abb. 8.6).

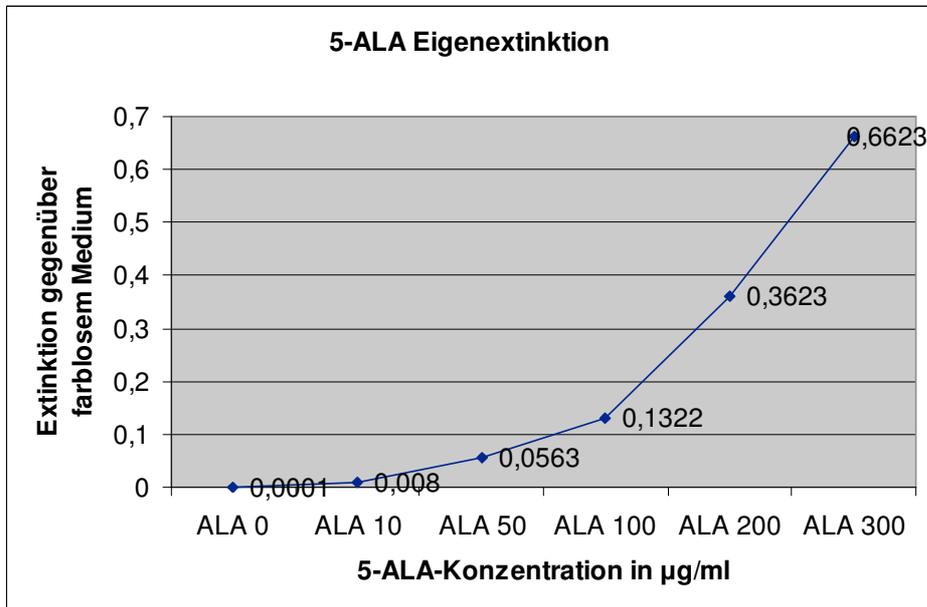


Abbildung 8.6:

Nachweis der Eigenextinktion von 5-ALA bei Verbindung mit FCS, sowie Anstieg der messbaren Extinktionswerte in Dosisabhängigkeit

Schlussfolgernd musste der zuvor eliminierte Waschvorgang der Zellen nach 5-ALA-Inkubation doch wieder mit in den Versuchsablauf aufgenommen werden, um das extrazellulär verbliebene 5-ALA aus der colorimetrischen Messung auszuschließen.

Es blieb lange nicht plausibel, warum nach Eliminierung des 5-ALA die Zellen unabhängig dessen Konzentration und auch in der Hell-Kontrolle (nur Laserbehandlung) gleichartig starben.

Als ursächlich dafür stellte sich die beschriebene Inkubation der Zellen auf Eis dar. Zweck dieses Vorgehens ist es, eine Sedimentation der Zellen, sowie eine Gleichschaltung des Stoffwechsels bis zur Brutschrank-Inkubation möglichst schnell zu erreichen. Dies schien den empfindlichen Zellen jedoch vielmehr einen

irreversiblen Schock bereitet zu haben, woraufhin diese in nicht unerheblicher Zahl schon ohne 5-ALA- oder Laserbehandlung zugrunde gingen.

So eliminierten wir die Lagerung auf Eis aus dem Versuchsaufbau und erhöhten dafür die Bestrahlungsdauer und 5-ALA-Konzentration bei weiteren Versuchen, die weiterhin wenig verwertbare Ergebnisse brachten.

Ansatz für neue Überlegungen zur Lösung dieses systemischen Problems bot hier die Diskussion, ob das für die Zellkultur verwendete FCS selbst nach Entfärbung noch in irgendeiner bisher unbekanntem Form colorimetrisch erfasst wurde.

Diese These wurde im Versuch bestätigt, was die Bewertung aller Parameter unseres Versuchsaufbaus erneut auf den Status eines Neuanfangs brachte. Daher wurde zunächst nach der Waschung kein FCS mehr in der 5-ALA-Verdünnung verwendet. Zum Aussäen der Zellen auf der Platte musste es jedoch im Versuchsaufbau verbleiben, da ansonsten die Zellen noch vor der Behandlung verhungerten.

Um besser zu reproduzierende Ergebnisse zu bekommen, behandelten wir fortan außerdem alle 4 Behandlungsgruppen gleich (Block 1 = „Hell-Standard“ = nur Bestrahlung) und machten auf einer einzelnen 96-Well-Mikrotiterplatte keine gleichzeitigen Vergleichsversuche mehr (Abb. 8.7).

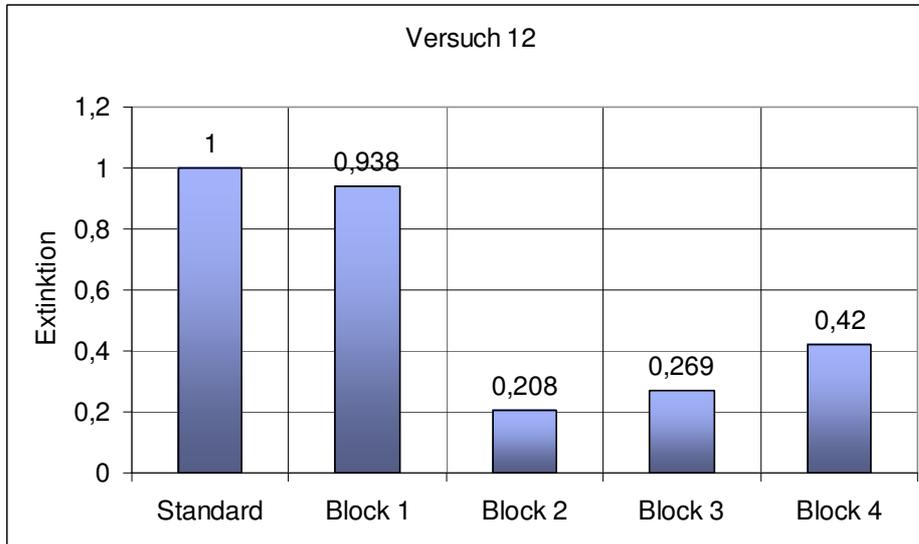


Abbildung 8.7:

Ergebnis bei Parametern:

5-ALA 100µg/ml (Block 2,3,4), Bestrahlung 625 Sekunden (alle Blöcke)

Ab diesem Zeitpunkt erkannten wir einen Erfolg der Behandlung, jedoch ebenfalls die Tendenz, dass Block 2 im Vergleich zu Block 3 einen scheinbar größeren Erfolg, belegt durch eine niedrigere Extinktion, aufwies. Block 4 zeigte bei diesen Versuchen durchweg die höchste Extinktion der Behandlungsblöcke.

Wir erhöhten die Inkubationszeit nach Bestrahlung von 1 auf 3 und mehr Stunden und erkannten, dass die Blöcke sich jeweils stärker anglichen und dann gleichartig weiter abfielen.

Um einen Beweis anzutreten, dass der Unterschied zwischen den Blöcken aus dem Behandlungsschema Block 1 → 2 → 3 → 4 zustande gekommen sein musste, kehrten wir bei den folgenden Versuchen die Richtung der Laserbehandlung um. Die Tendenz der weiteren Versuche bestätigte unseren Verdacht.

Daher wurde eine maximale Inkubationszeit von mindestens 2 und höchstens 3 Stunden Inkubation nach Bestrahlung in den Versuchsaufbau integriert. Alles darunter erschwerte die Bewertung, da die Zelle offenbar noch Zeit brauchte, um die apoptotischen Wege einzuleiten oder vollständig nekrotisch zu werden. Alles darüber machte eine Bewertung ebenfalls schwierig, da nach Angleichung des Extinktionsergebnisses der Blöcke ein Verhungern der Zellen als ursächlich für das weitere Abfallen diskutiert werden musste.

Nach weiteren Variationen der Parameter, bei denen immer vorhersagbarere Ergebnisse zustande kamen, wiederholten wir einen Versuch insgesamt 4 Mal bei gleichen Bedingungen, so dass wir das Ergebnis (Abb. 8.8) als signifikant reproduzierbar bewerteten.

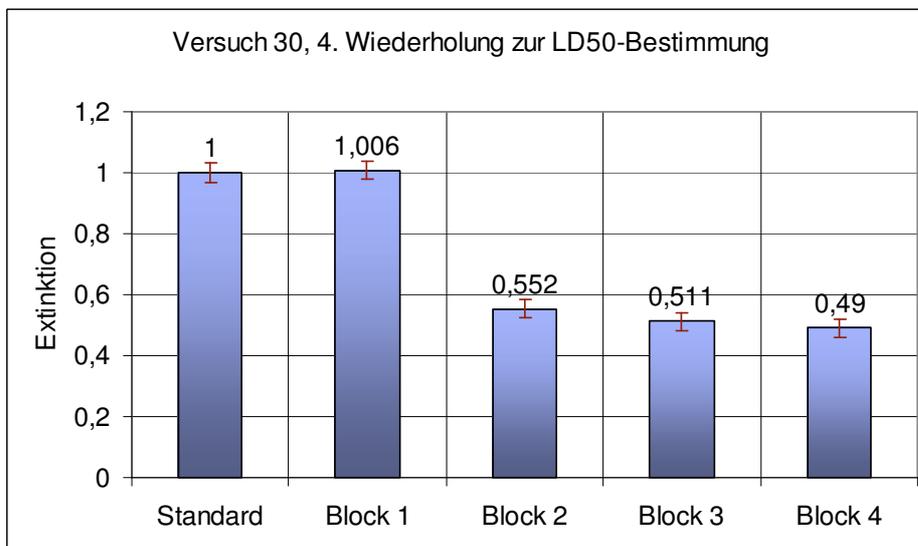


Abbildung 8.8:

Vierte Wiederholung mit gleichen Parametern zur LD50. Standardabweichung betrug 0,03. Die Differenz der Mittelwerte ist mit $p < 0.05$ signifikant.

Nach 2 Stunden Inkubation lebten noch 50% der Zellen. Beim Versuch zuvor ließ sich dieses Ergebnis auch bei viel höheren Variablen nicht erreichen.

Als Fehlerquelle wurde ein zuvor unbemerkter Schattenwurf innerhalb der Bestrahlungskammer identifiziert, der zu einer inhomogenen Belichtung der Wells geführt hatte, was jedoch bei Betrachtung der Extinktionswerte der einzelnen Wells innerhalb eines Blockes erkannt werden konnte (Tabelle 2). Nachfolgend wurden die Einflussgrößen auf das Setting dieses Versuchsaufbaus weiter untersucht.

Fortschritt der Versuche	Identifizierung der Störfaktoren	Erforderliche Maßnahmen
Versuch 1-3	Verzerrung der Ergebnisse durch Eigenextinktion von 5-ALA in Verbindung mit FCS	Waschvorgang nach Inkubation zur Eliminierung von 5-ALA und FCS
Versuch 1-5	Inhomogenes Sterben der Zellen auch bei niedriger Parameter-Dosis aufgrund Inkubation auf Eis	Eliminierung der Eis-Inkubation
Versuch 6-12	Annäherung an sinnvolle Kautele, jedoch ungleichmäßige Wirkung in den Blöcken	Sicherung des gleichförmigen Lichtwegs, Umkehrung der Behandlungsrichtung
Versuch 12-30	Weitere Annäherung an optimale Dosis bei unklaren Werten für Inkubationsdauer, Ablesezeitpunkt, etc.	alleinige Variierung der Kautele 5-ALA und Belichtungsdosis
Versuch 26-30	Insgesamt sinnvolle Werte, jedoch Diskrepanz innerhalb der Wells durch Schattenbildungen in der Behandlungskammer	Korrekturarbeiten zum Lichtweg und zur Glasfaser-Fixierung in der Behandlungskammer

Tabelle 2:

Zusammenfassende Übersicht über die Fortschritte bei der experimentellen Suche der geeigneten Methoden zur Bestimmung der LD50

3.2 Physikalische Einflussgrößen auf die Wirksamkeit

Nach Eliminierung, Variierung und Schaffung neuer Versuchsparameter gelang es, einen endgültigen Versuchsaufbau zu finden, an dem sich künftige ähnliche Versuche orientieren können. Besonders die Identifizierung systemischer Fehler stellte eine große Herausforderung dar. Letztendlich war es jedoch möglich, für die weiterführenden Versuche eine Methode zu finden, die eine Bewertung hinsichtlich eines zusätzlichen Nutzens über die LD50 hinaus im direkten Vergleich erlaubte.

3.2.1 Lichtmenge und 5-ALA-Dosis zur letalen Dosis 50

Nach 4 Wiederholungen des Versuches zur LD50 (Abb. 8.8, Abb. 8.9) und Mittelung der Behandlungsblöcke 2, 3 und 4 legten wir die Parameter für das Erreichen der LD50 bei den folgenden Werten fest:

25µg 5-ALA /ml Medium

450 Sekunden Bestrahlung durch den Laser

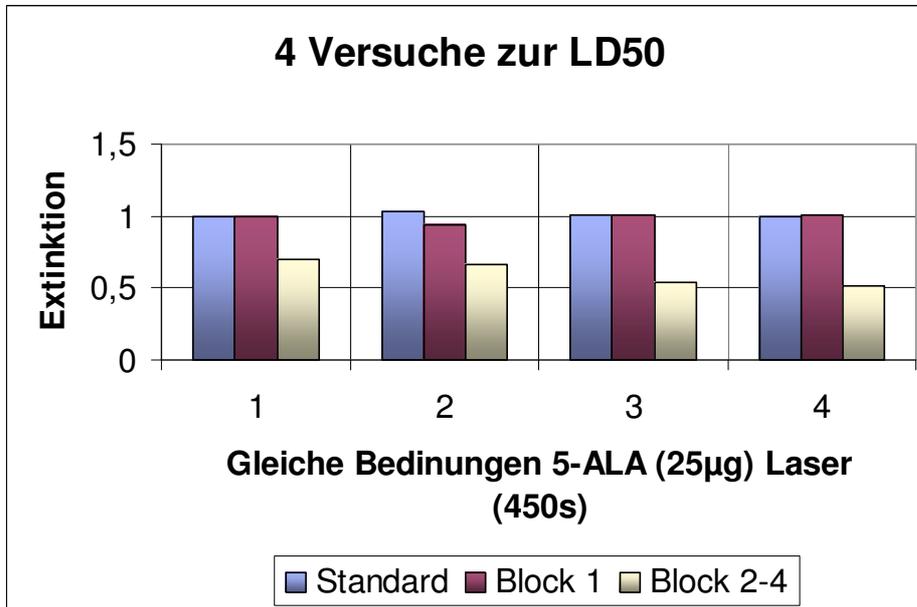


Abbildung 8.9:

Zusammenfassung der Versuche zur LD50 mit mittlerem Ergebnis der Behandlungsblöcke.

3.2.2 Sauerstoffüberangebot vor Belichtung

Unter der Vorstellung, dass die Gegenwart von Sauerstoff bei der Radikalbildung eine logische Rolle spielt, stellten wir uns die Frage, ob eine zusätzliche Substitution mit resultierendem Überangebot von O₂ vor der Bestrahlung eine additive Wirkung bei der Elimination der Tumorzellen haben könnte.

Daher brachten wir bereits im Voraus in der Behandlungskammer einen Einlass für eine Sauerstoffleitung an, so dass die Zellen im Medium unter Schutz vor Licht dem Sauerstoff ausgesetzt werden konnten. Die Zufuhr wurde vor Bestrahlung abgeschaltet. Wir verwendeten als Referenz die reproduzierten Parameter der LD50-Dosierung.

Das Ergebnis zeigte im direkten Vergleich eine signifikante Erniedrigung der Überlebensrate der Zellen, bei einer Sauerstoffzufuhr von 2 Litern pro Minute und 15 Minuten Einwirkzeit, was 100% O₂ über 15 Minuten Zeitspanne bedeutete (Abb.9.1).

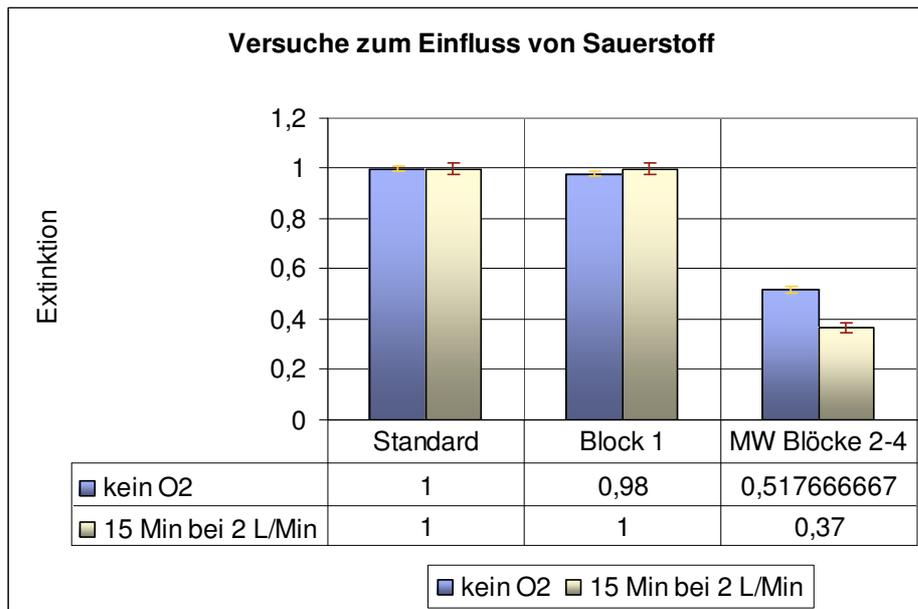


Abbildung 9.1:

Darstellung des Einflusses von Sauerstoffangebot vor Beginn der geplanten Bestrahlung im Vergleich zum Versuch LD50 ohne Sauerstoff. Die Differenz der Behandlungsgruppe O₂ ist gegenüber seiner Standards, sowie die Behandlungsblöcke „O₂“ zu „LD50 ohne O₂“ untereinander signifikant.

Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerten wir einen Zusammenhang zwischen Sauerstoffangebot der Zellen und Wirksamkeit der photodynamischen Therapie. Je höher die Sauerstoffkonzentration intrazellulär durch äußere Einflüsse gebracht werden konnte, umso effektiver schien die PDT zu wirken, offenbar durch die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, die zum Untergang der Zelle führten. Hierzu war im Versuch jedoch eine sehr hohe Konzentration an exogen angebotenen Sauerstoff notwendig (100%, 15 Minuten Einwirkzeit).

3.2.3 Fraktionierte Zellbelichtung

Zweiter Ansatz, um das Ergebnis der PDT weiter zu verbessern, war die Anwendung von fraktionierter Bestrahlung, d.h. die Behandlung mit Licht in mehr als nur einer einzelnen Fraktion. Dafür verglichen wir die Parameter der LD50-Dosierung mit einer gleichen Gesamtenergiedosis, aufgeteilt in 3 Fraktionen (Abb. 9.2). Die Bestrahlung wurde mit Pausen von 10 Minuten Dauer unterbrochen, was auch in einer klinischen Umsetzung als noch realisierbar und zumutbar erschien.

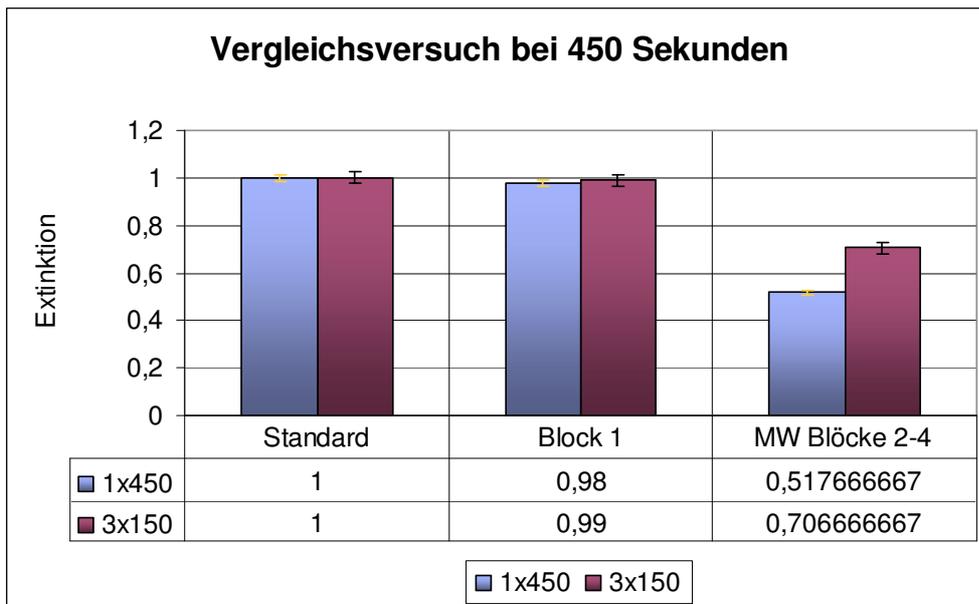


Abbildung 9.2:

Versuche zur Unterscheidung von Einzelbestrahlung und mehreren Fraktionen von Lichtenergie bei gleicher Gesamtenergiedosis und Gesamtbelichtungszeit bei 3 Fraktionen.

Die Unterbrechung der Bestrahlung, mit dem Ziel des Angebots einer längeren Stoffwechselzeit für die PPIX-Synthese, konnte keine Verbesserung des PDT-Ergebnisses erbringen. Darüber hinaus stieg die Zahl der überlebenden Zellen eher an, je mehr Bestrahlungspausen eingelegt wurden.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es ließ sich ein Zusammenhang zwischen PDT und Absterben der Tumorzellen darstellen.

Bei der Bestrahlung nahm die Zahl der überlebenden Zellen gleichmäßig zur ansteigenden Beleuchtungsdauer ab (Abb. 10.1).

Es konnte wiederholt eine Dosis-Schwelle für 5-ALA gezeigt werden. Unter dieser Schwelle konnten nur geringe Erfolge mit hoher Abweichung gemessen werden. Oberhalb der Schwelle zeigten sich schnell Erfolge in Form rasch fallender Überlebenszahlen der Zellen (Abb. 10.2).

Aus diesem Grund wählten wir für die Parameter der LD50-Versuche eine 5-ALA-Dosis die möglichst gering sein sollte, jedoch oberhalb der dargestellten Schwelle lag ($25\mu\text{g/ml}$) und konzentrierten uns verstärkt auf den leichter zu steuernden Parameter „Beleuchtungsdauer“. Dieser stellte sich für eine LD50-Messung wiederholt erfolgreich bei 450 Sekunden in einer einzelnen Bestrahlungsfraction ein (Abb.8.8, 8.9).

Durch den fraktionierten Ansatz der Bestrahlung ließ sich der Behandlungserfolg nicht verbessern.

Die Substitution von reinem Sauerstoff vor der Bestrahlung verbesserte jedoch das Ergebnis der Behandlung.

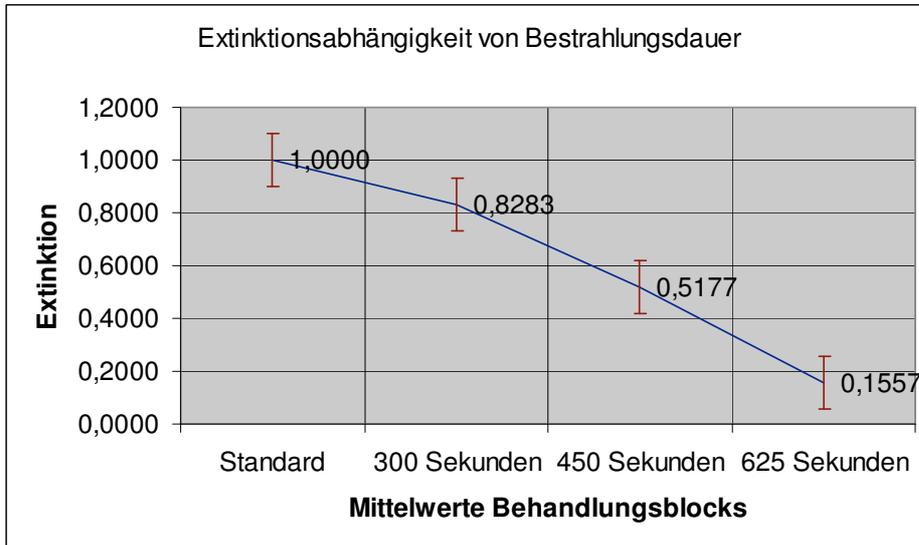


Abbildung 10.1:

Darstellung des Zusammenhanges zwischen Abnahme der Extinktion und Bestrahlungsdauer bei gleicher 5-ALA-Dosis (25µg/ml).

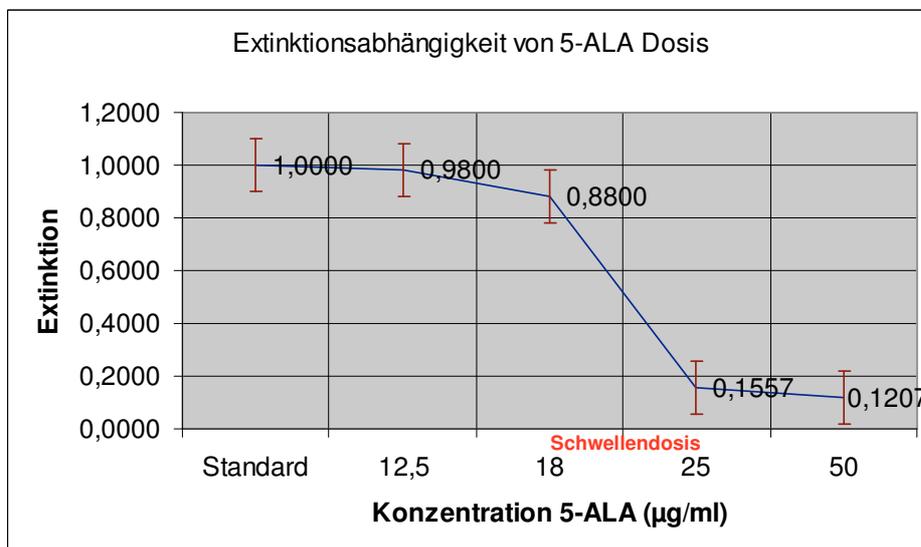


Abbildung 10.2:

Darstellung des Zusammenhanges in mehreren Vergleichsversuchen von Extinktionsabnahme, somit dem Untergang der Tumorzellen, und 5-ALA-Dosis bei gleicher Bestrahlungsdauer, hier jeweils 625 s.

4 Diskussion

4.1 In vitro vs. in vivo

Der Anspruch einen Versuchsaufbau zu etablieren war in dieser experimentellen Versuchsreihe immer von der Vorgabe beeinflusst, möglichst nahe an der klinischer Anwendung zu arbeiten.

Aus diesem Grund konnten eskalierende Dosen sämtlicher Variablen nicht ohne Weiteres eingesetzt werden.

Effekte wie der Bestrahlungsverlust durch Gewebetiefe, Diffusion und biologische Verfügbarkeit des Photosensibilisators und die Auswirkungen natürlicher Membranen wie die Blut-Hirn-Schranke bei intravenöser oder oraler Gabe von 5-ALA konnten nicht untersucht werden. Daher fehlen in den bisherigen Untersuchungen Daten darüber, welche effektiven Konzentrationen an 5-ALA in verschiedenen Tumortiefen bei welchen Serum-5-ALA-Konzentrationen zu erreichen sind.

Eine eindeutig quantitative Korrelation unserer Experimente im Vergleich zum klinischen Nutzen ist daher nicht ohne weitere Untersuchungen bestimmbar.

Hirschberg et al. verglichen 2002 die Eignung von 5-ALA mit veresterten, lipophilen Derivaten der Substanz und deren Auswirkung auf die Wirksamkeit der PDT. Sie stellten fest, dass sich mit Esterderivaten wie Benzyl-ALA oder Hexyl-ALA äquivalente Wirksamkeiten nachweisen ließen und der Umgang mit den Substanzen keinen direkten in-vitro-Vorteil zu erbringen schien. Ihnen fiel dabei auf, dass bei gleichartiger Wirkung die Konzentration von 5-ALA-Esterderivaten um bis zu 10 bis 20 Mal geringer dosiert werden musste. Eine Erklärung dazu schlussfolgerten die Autoren in der höheren Gewebe- bzw. Membranpenetration der Esterderivate

(Hirschberg et al. 2002). Der klinische Nutzen davon könnte nach weiteren Untersuchungen das Erreichen einer ähnlichen Dosis im Tumorgewebe in vivo wie im Zellmodell in vitro sein. Abschließende Untersuchungen dazu fehlen noch.

Auch der nachgewiesene zusätzliche Nutzen eines höheren Sauerstoffangebotes ist klinisch quantitativ und damit auch qualitativ vermutlich nicht direkt vergleichbar darstellbar. So könnte man durch Methoden der operativen Anästhesie die Sauerstoffsättigung des Patientenblutes möglicherweise maximieren oder mit Zugabe von externem Sauerstoff, der direkt in das Operationsfeld auf die Tumorränder insuffliert wird, die Gewebekonzentration des Luftgases steigern. Eine genaue Messung gestaltet sich jedoch besonders unter sterilen OP-Verhältnissen im Vergleich zum in-vitro-Experiment vermutlich als sehr schwer realisierbar, sollte aber verfolgt werden.

Die Vorgabe, die Behandlung auf eine möglichst geringe Zeitspanne auszudehnen, während eine gleichzeitig möglichst geringe Konzentration des 5-ALA angestrebt wurde, konnte erreicht werden. Es ist offensichtlich, dass dem Patienten intraoperativ keine Bestrahlungszeiten von 60 Minuten, 2 Stunden oder gar noch länger zumutbar gemacht werden können, um das Behandlungsergebnis zu verbessern, ohne das Operations- und Narkoserisiko in mindestens gleichem Maße zu erhöhen.

4.1.1 Spezifizierungen der Methode

Die Prinzipien der PDT beim Glioblastoma multiforme des Menschen sind bisher unzureichend untersucht. Es existieren nur wenige Publikationen von Autoren, die sich zumeist in ihrer Methodik, Zelllinien-Auswahl und Zielsetzung grundlegend unterscheiden.

Unser Versuchsaufbau und die Einrichtung der Bestrahlungskammer sollten möglichst viele Fehlerquellen bei der Laserbehandlung lebender Zellen vermeiden. So erschien es sinnvoll, eine Bestrahlungsform von unten zu entwickeln, um den Weg des Lichts so wenig wie möglich zu streuen. Unsere Behandlungskammer stellte dafür eine innovative Möglichkeit dar, die sogar das Einbringen von Sauerstoff ermöglichte.

Hierfür war es notwendig, die Zellen mit einer Plexiglashaube abzuschirmen, die über die Fixationseinheit gesetzt wurde, um die eine möglichst gleich bleibende Lieferung und Konzentration von 100% O₂ zu gewährleisten (Abb. 5.2).

Um die Voraussetzungen der Versuche nicht zu verfälschen, benutzten wir diese Haube auch bei Versuchen ohne Sauerstoffeinfluss.

Nach erfolgreich durchgeführten Versuchen bemerkten wir innerhalb der Plexiglashaube eine wechselnd starke Ansammlung von Kondensationswasser, was darauf schließen ließ, dass die Bestrahlung mit Laserlicht den nicht überraschenden Effekt der Wärmebildung hatte. Es ist zu klären, welche Beeinflussung des Ergebnis durch Wärmeentwicklung innerhalb der Zellsuspension zustande kommt.

Durch gleiche Volumina innerhalb der Behandlungs-Wells und gleichen Bestrahlungszeiten innerhalb der verschiedenen experimentellen Reihen konnten

wir davon ausgehen, dass dieser Effekt sich gleichartig und übertragbar verhalten würde. Die Frage nach der Existenz eines Temperatureffekts ist interessant und sollte in weiteren Studien aufgegriffen werden.

Hirschberg et al. untersuchten hierzu bereits 2004 den Effekt von Temperaturschwankungen und setzen ihn in Beziehung zum Effekt der Therapie der PDT. Sie stellten fest, dass eine Temperaturerhöhung weit über Zimmertemperatur hinaus (bis teilweise 49 C°) keinen alleinigen Effekt auf das Wachstum oder den Untergang der von Ihnen verwendeten Sphäroidmodelle hatte. Jedoch bestand ein nachweisbarer Synergismus der Parameter hohe Temperatur und alleiniger Effekt der PDT, so dass man davon ausgehen konnte, dass eine hohe Temperatur innerhalb der Wells nicht allein schädigend wirkte, die Auswirkungen der PDT jedoch verstärkte. Ein Zelluntergangsmodell, das vom Apoptoseweg der niedriger temperierten PDT abwich, konnte nicht gefunden werden (Hirschberg et al. 2004).

Wir konnten darstellen, dass sich ein lokales Überangebot von Sauerstoff positiv auf die Wirksamkeit der Behandlung auswirkt. Der Nachweis der Wirkungssteigerung der speziellen PDT an humanen Zellen ist ein weiterer Entwicklungsschritt und nicht vorbeschrieben. Das Verfahren der fraktionierten Bestrahlung, wie sie zum Beispiel bei topischen Anwendungen in der Dermatologie Anwendung findet und deshalb den Verdacht auf ein besseres Ergebnis auch hier nahe legte, stellte sich als weniger effektiv heraus, als eine vergleichbare Einzelbehandlung. Wir konnten ebenfalls aufzeigen, dass die Aufteilung in 2 oder gar 3 Fraktionen ein schlechteres Ergebnis zeigte, bei gleicher Gesamtdosis der Belichtung.

Madsen et al. veröffentlichten 2001 eine Studie über die Entwicklung eines Ballon-Systems, mit dem man einen homogenen und niedrig dosierten Lichtfluss, klinisch

vor allem als intrakavitäres Element zur vollen Ausleuchtung des Behandlungsgebietes, erreichen konnte. Diese Studie verglich die Wirksamkeit von hoher Lichtfluss-Dosis mit der Gesamtwirksamkeit eines langen, multifraktionierten Versuchsaufbaus mit niedriger Lichtfluss-Dosis bei Sphäroiden. Sie stellten fest, dass eine fraktionierte Behandlung mit niedrigen Energiedosen die effektivsten Ergebnisse für nachweisbare zytotoxische Effekte lieferte.

Dieses Ergebnis widerspricht unserer experimentellen Studie am Monolayer-Zellmodell. Davon abgesehen, dass die klinisch-therapeutische Umsetzbarkeit einer Langzeitbelichtung durch viele Fraktionen in Frage gestellt werden muss, sind die Ursachen dieser Diskrepanz womöglich in unterschiedlichen Zelllinien zu suchen, sowie im Unterschied der Reaktionen des einfachen Zellmodell gegenüber des 3-dimensionalen Sphäroidmodells. Außerdem war eine Zielsetzung dieser Arbeitsgruppe auch die Darstellung der Wachstumsinhibierung (Madsen et al. 2001), wohingegen wir allein die zum Zelltod führende Toxizität untersuchten.

Die verwendete Zellkultur versetzte uns erstmalig in die Lage, Versuchsreihen mit humanen Zellen durchzuführen, anstatt auf entartete Zellen des Rattenhirns oder darin implantierte Tumorzellen ausweichen zu müssen.

Die Zelllinie G112 stellte eine leicht zu erhaltende und bei adäquater Sorgfalt recht widerstandsfähige Zellpopulation dar. Diese zeigte sich von einem Faktor jedoch am empfindlichsten beeinflussbar: Dem Angebot an Stoffwechselfaktor in Form von fetalen Kälberserum. So mussten wir sicherstellen, dass das Zeitfenster, in dem die Zellen sich ohne FCS befanden, nicht zu groß wurde. Dann nämlich starben die Zellen sehr schnell ab, ohne jemals behandelt worden zu sein. Dies stellte den limitierenden Faktor innerhalb der Zeitspanne von Inkubation mit 5-ALA und Inkubation nach Bestrahlung dar. Daher empfiehlt es sich für spätere Studien, den

Zellen nicht länger als 2 Stunden Zeit zum Absterben zu geben, nachdem sie mit dem Laser behandelt worden sind. Alle nachfolgenden Effekte können nicht mehr sicher vom Hungertod der Zellen abgrenzbar gemacht werden.

Wir entschieden uns für die G112 Zelllinie, da sie auch leicht als Sphäroid anzüchtbar ist und entsprechende Studien sich bereits auf diese Art von Zellkultur spezialisierten und somit direkt von unseren Ergebnissen profitieren konnten.

Die Anzucht von Sphäroiden als 3-dimensionale Modelle in vitro oder sogar für Implantationen in vitale Gehirne im Tierversuch könnte die Zukunft der Untersuchungen zur PDT darstellen. Leistungsfähige Simulationsprogramme nutzen bereits jetzt die Daten aus Sphäroidmodellen zur Abschätzung von realistisch zu erwartenden Auswirkungen in vivo (Madsen et al. 2006). Jedoch werden erwartete klinische Ergebnisse und die Schlussfolgerungen verschiedenster Modelle immer auf basisnahe Untersuchungen im Zellmodell in vitro zur Verifizierung der Voraussagungen zurückgreifen müssen.

4.1.2 Eignung des MTT Assays

Der MTT-Assay, der zur Vitalitätsbestimmung von Zellen eingesetzt wird, wurde bereits von vielen Arbeitsgruppen als valides Instrument etabliert. Beispiele hierfür sind die Arbeiten von Mosmann et al. 1983 zu Nachweisen von Überlebenszahlen von Zellen mit Hilfe von Assays und Wilson et al. im Jahr 2000. Dabei hat sich die genaue Zusammensetzung und Dynamik des von vielen Herstellern angebotenen Assays über viele Jahre hinweg immer wieder Veränderungen unterziehen müssen, das Wirkprinzip blieb jedoch gleich.

Wie in den Methoden bereits angesprochen, erlaubt der colorimetrische Assay eine Aussage über den Vitalitätsgrad einer Zellpopulation. Verantwortlich hierfür sind die mitochondrialen Reduktaseenzyme, die nur bei vitalen Zellen nachweislich aktiv sind. Somit wird bei vitalen Zellen Dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) Bromid zu dem Salz Formazan umgewandelt.

Unsere Versuchsreihen wiesen eine Auswertungsinterferenz zwischen MTT und 5-ALA nach, die zuvor nicht in der Literatur beschrieben gefunden werden konnte. Dies zwang uns zu der Maßnahme, 5-ALA und FCS aus den Zellen zu entfernen, bevor diese behandelt und mittels MTT angefärbt werden konnten (Abb. 8.6).

5-ALA schien offenbar eine Eigenextinktion bei Verwendung des MTT-Assays zu besitzen, wohingegen diese nicht mehr mit synthetisiertem PPIX nachweisbar gemacht werden konnte.

De Siervi et al. untersuchten 2002 die zytotoxischen Effekte von 5-ALA durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies im Rahmen der akuten intermittierenden Porphyrie an Leberzellreihen. Auch dabei wurde ein MTT-Assay verwendet.

Die Autoren stellten eine zytoxische Wirkung auf Leberzellen fest, konnten jedoch das Auswertungsergebnis des MTT bei verschiedenen Konzentrationen nicht restlos erklären.

So blieb die hohe Überlebenszahl der Zellen bei 2-3mM ungeklärt. (Abb. 11)

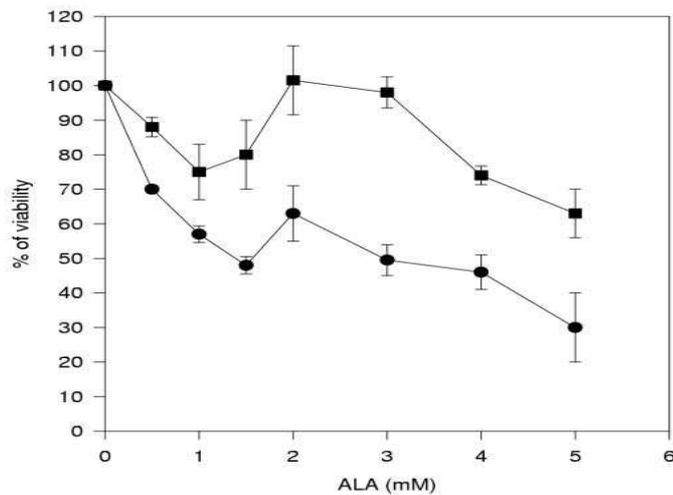


Abbildung 11:

Studie zur Zytotoxizität von 5-ALA an Leberzellreihen, De Siervi et al. 2002

Zum Einen besteht die Möglichkeit, dass die Aminolävulinsäure hier nicht vollständig und restlos ausgewaschen worden sein könnte. Wie wir darstellen konnten, besitzt 5-ALA eine vom Hersteller nicht aufgeführte Eigenextinktion bei Anfärbung mittels MTT. Zum Anderen konnten wir darstellen, dass eine Dosischwelle für die Wirkung von 5-ALA existiert, über welcher erst eine wirksame PPIX-Synthese nachweisbar ist und ab welcher erst die Überlebenszahlen der Zellen (zumindest bei Behandlung per PDT) kontinuierlich sanken. Die stark sinkenden Überlebenszahlen im oben genannten Beispiel von 0,5-1,5 mM müssten in diesem Falle artifiziell oder als Auswertungsfehler gewertet werden.

Wir haben mit der Etablierung unserer Methode eine Basis geschaffen, an der sich künftig orientiert werden kann. Eine wichtige Kernaussage besteht darin, weiterführende Projekte nicht mehr mittels MTT durchzuführen, um eine Fehlerquelle schon von Anfang zu vermeiden. Andererseits haben wir gezeigt, dass der MTT-Assay sich grundsätzlich für die entsprechenden Fragestellungen eignet, sobald man den Fehler in Verbindung mit 5-ALA kennt. Des Weiteren haben wir mit der Dosis-

Schwelle des 5-ALA eine wichtige Information schaffen können, die Forschung im Sinne der PDT mittels 5-ALA und Diodenlaser unterhalb dieser Schwelle in Zukunft obsolet machen könnte.

4.2 Integration in ein Gesamtmodell: Therapie des Glioblastoms mittels Photodynamischer Therapie

Aus unseren Ergebnissen stellen wir schlussfolgernd fest, dass die PDT nach der Methode, die wir mit unserer Versuchreihe etablieren wollten, eine interessante Option zur adjuvanten Therapie des Glioblastoms beim Menschen darstellt.

Die PDT nach unserer Methodik birgt keine Störung anderer adjuvanter Therapien, wie Strahlen- und Chemotherapie.

Sie sollte klinisch durchführbar sein, mit auch in einer OP-Situation verfügbarem Material, ohne den Patienten einer Gefahr auszusetzen und nachweislich zum selektiven Untergang von Tumorzellen führen.

Weiterführende Untersuchungen der Tiefenwirkung von Laserbehandlung und 5-ALA im Zellverband, wie zum Beispiel bei Sphäroiden, sind notwendig, um abschließende Aussagen über die zu erwartende Wirkung in der Infiltrationszone nach Resektion des Tumors treffen zu können.

5 Zusammenfassung

Die photodynamische Therapie beim Menschen ist für Tumoren des Gehirns wenig erforscht. Das schwere, infauste Krankheitsbild des Glioblastoms bedarf jedoch weiterer Therapieoptionen. Bisherige Therapien, radikale Operation und adjuvante Radiochemotherapie dienen lediglich der Verlängerung des rezidivfreien Intervalls und sind damit nicht kurativ.

Aus diesem Grund stellt die PDT eine viel versprechende und weiter zu erforschende Zusatztherapie dar.

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit beweisen, dass die PDT an humanen Gliomzellen wirksam ist.

Dabei konnte eine Dosis-Wirkungs-Kurve für die hauptsächlichlichen beiden Kautelen 5-ALA-Konzentration und Bestrahlungsdauer durch den Laser bei fester Lichtdosis dargestellt werden, während ausschließliche Behandlung mit 5-ALA, sowie ausschließliche Behandlung durch Laserlicht keinen nachweisbaren Effekt auf die Zellen ausübten.

Des Weiteren wurde eine Methode entwickelt, die gleichartige Aussagen bei gleichen Versuchsbedingungen ermöglichte und zu deren Entwicklung viele Störfaktoren eliminiert werden mussten, die bei der Etablierung der Methode anfänglich und aufgrund des eingeschränkten Vorwissens bestanden. So konnte eine zuvor nicht beschriebene Eigenextinktion von 5-ALA bei Anfärbung mittels MTT-Assay aufgezeigt werden und eine Lösung dieses Problems erarbeitet werden. Es gelang nach Eliminierung weiterer Störfaktoren, aus mehreren Versuchsreihen eine LD 50 zu bestimmen.

Darauf aufbauend wurde eine signifikante Wirkungsverstärkung der PDT durch ein Überangebot von Sauerstoff bewiesen, wohingegen eine Abschwächung der Wirkung bei Anwendung fragmentierter Laserbehandlung demonstriert wurde.

6 Literaturverzeichnis

Ackermann G, Abels C, Bäuml W, Langer S, Landthaler M, Lang EW, Szeimies RM: Simulations on the selectivity of 5-aminolaevulinic acid-induced fluorescence in vivo. *J Photochem Photobiol B* 47:121-128, 1998

Albert FK, Forsting M, Sartor K, Adams HP, Kunze S: Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis. *Neurosurgery* 34:45-60, 1994

Ammirati M, Vick N, Liao Y, Ciric I, Mikhael M: Effect of the extent of surgical resection on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastomas and anaplastic astrocytomas. *Neurosurgery* 21:201-206, 1987

Barker FG III, Prados MD, Chang SM, Gutin PH, Lamborn KR, Larson DA, Malec MK, McDermott MW, Sneed PK, Wara WM, Wilson CB: Radiation response and survival time in patients with glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 84:442-448, 1996

Becker DM, Cayanis E, Kramer S: The effect of Delta-Aminolevulinic Acid on the Synthesis and Metabolism of GABA in Rabbit Brain Homogenates. *S Afr Med J*, 57(12):458-460, 1980

Berne RM, Levy MN: *Physiology*, 3. Edition, Mosby Year Book, St. Louis, Baltimore, Boston, 1993

Bertram s, Bonitz D, Gassen G, Papandrikopoulou A, Weber M, Weiler H, Wollny E:
Die Blut-Hirn-Schranke – eine Organ-Barriere. Kontakte (Darmstadt) 1, 17, 1988

Blasberg RG, Gazendam J, Patlak CS, Fenstermacher JD: Quantitative autoradiographic studies of brain edema and a comparison of multiisotope autoradiographic techniques. Adv. Neurol. 28:255-270, 1980

Bucher O, Wartenberg H: Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 11.Auflage, Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Toronto, p 227, 1989

Cheeks C, Wedeen RP: Renal Tubular Transport of Aminolevulinic Acid in Rat. Proc Soc. Exp. Biol. Med. 181(4):596-601, 1986

Criscuolo FR, Lelkes PI, Rotrosen D, Oldfield EH: Cytosolic calcium changes in endothelial cells induced by a protein product of human gliomas containing vascular permeability factor activity. J. Neurosurg. 71:884-891, 1989

Dailey HA, Smith A: Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase. Biochem. J. 223/2:441-445, 1984

De Siervi, Vazquez, Rezaval, Rossetti, Del Battle: δ -Aminolevulinic acid cytotoxic effects on human hepatocarcinoma cell lines. BMC Cancer 2:6, 2002

Del C Battle AM: Porphyrins, porphyries, cancer and photodynamic therapy – a model of carcinogenesis. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 20:5-20, 1993

Devaux BC, O'Fallon JR, Kelly PJ: Resection, biopsy and survival in malignant glial neoplasms. A retrospective study of clinical parameters, therapy and outcome. *J Neurosurg* 78:767-775, 1993

Doring F, Walter J, Will J, Focking M, Boll M, Amasheh S, Clauss W, Daniel H: Delta-Aminolevulinic Acid Transport by Intestinal and Renal Peptide Transporters and its Physiological and Clinical Implications. *J Clin. Invest.* 101(12):2761-2767, 1998

Eastwood JD, Provenzale JM: Cerebral blood flow, blood volume, and vascular permeability of cerebral glioma assessed with dynamic CT perfusion imaging. *Neuroradiology* 45:373-376, 2003

Eisenberg HM, Barlow CF, Lorenzo AB: Effect of dexamethasone on altered brain vascular permeability. *Arch. Neurol.* 23, 18-22, 1970

El-Sharabasy MM, El-Waseef AM, Hafez MM, Salim SA: Porphyrin metabolism in some malignant diseases. *Br J Cancer* 65/3:409-412, 1992

Ennis SR, Novotny A, Xiang J, Shakui P, Masada T, Stummer W, Smith DE, Keep RF: Transport of 5-Aminolevulinic Acid between Blood and Brain. *Brain Res.* 959(2):226-234, 2003

Fonchy E, Lahrech H, Francois-Joubert A, Dupeyre R, Benderbous S, Corot C, Farion R, Rubin C, Decorps M, Remy C: A new Gadolinium-based contrast agent for magnetic resonance imaging of brain tumors: kinetic study on a C6 rat glioma model. *Journal of magnetic resonance imaging* 14:97-105, 2001

Fritsch C, Becker-Wegerich PM, Schulte KW, Lehmann P, Ruzicka T, Goerz G: Treatment of a large superficial basal cell carcinoma of the breast. Combination of photodynamic therapy and surgery controlled by photodynamic diagnosis. *Hautarzt* 47:438-444, 1996

Gade GF, Becker DP, Miller JD: Pathology and pathophysiology of head injury, In: Youmans J (eds), *Neurological surgery*. Philadelphia, W.B. Saunders, pp196-216, 1990

Gaullier JM, Berg K, Peng Q, Anholt H, Selbo PK, Ma LW, Moan J: Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture. *Cancer Res* 57:1481-1486, 1997

Go KG, Gazendam J, Van Zanten: Influence of hypoxia on the composition of isolated edema fluid in cold-induced brain edema. *J. Neurosurg.* 51:78-84, 1979

Goetz C, Reulen H-J: Status und Perspektiven der Therapie maligner Gliome. *Praktische Onkologie IX, Aktuelle Onkologie*. Zuckschwerdt-Verlag, München. 106: pp14-25, 1999

Grant WE, Hopper C, MacRobert AJ, Speight M, Brown SG: Photodynamic therapy of oral cancer: photosensitization with systemic aminolevulinic acid. *Lancet* 342:147-148, 1993

Hirschberg H, Sun CH, Tromberg BJ, Krasieva T, Madsen SJ: Effects of ALA-mediated photodynamic therapy on the invasiveness of human glioma cells. *Lasers Surg Med.*; 38(10):939-45, 2006

Hirschberg H, Sun CH, Tromberg BJ, Yeh AT, Madsen SJ: Enhanced cytotoxic effects of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy by concurrent hyperthermia in glioma spheroids. *J Neurooncol.*; 70(3):289-99, 2004

Hirschberg H, Sun CH, Tromberg BJ, Yeh AT, Madsen SJ: ALA- and ALA-ester-mediated photodynamic therapy of human glioma spheroids. *J Neurooncol.* Mar ; 57(1):1-7, 2002

Inuma S, Farshi SS, Ortel B, Hasan T: A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. *Br J Cancer* 70:21-28, 1994

Jocham, Dieter; Ell, Christian; Baumgartner, Reinhold; Gossner, Liebwin; Häußinger, Karl; Iro, Heiner; Szeimies, Rolf-Markus: *Photodynamische Therapie.* Dtsch Arztebl; 97(49): A-3337 / B-2804 / C-2489, 2000

Jordan et al.: The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *J Neurooncol.*; 78: pp7–14, 2006

Kabuto M, Kabuto T, Kobayashi H, Nakagawa T, Ishii H, Takeuchi H, Kitai R, Koderu T: Experimental and clinical study of glioma surgery using fluorescent imaging by a surgical microscope after fluorescein administration. *Neurol Res* 19:9-16, 1997

A Kasche, S Luderschmidt, J Ring, R Hein: Vergleich der Schmerzhaftigkeit bei Anwendung von Methyl-ALA und ALA bei der photodynamischen Therapie. *Akt Dermatol*; 30 DOI: 10.1055/s-2004-832512, 2004

Keep RF: The blood-brain barrier. In: Walz W: *The Neuronal Environment: Brain Homeostasis in Health and Disease*. Totowa: Humana Press Inc.,pp 277-307, 2001

Keles GE, Anderson B, Berger MS: The effect of extent of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforme of the cerebral hemisphere. *Surg Neurol* 52:371-379, 1999

Kelly PJ, Rappaport ZH, Bhagwati SN, Ushio Y, Vapalahti M, de Tribolet N: Reoperation for recurrent malignant gliomas: what are your indications? *Surg Neurol* 47:39-42, 1987

Kennedy JC, Pottier RH: Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol* 14:275-292, 1992

Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC: Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B* 6:143-148, 1990

Klatzo I, Piraux A, Laskowski EJ: The relationship between edema, blood-brain barrier and tissue elements in a local brain injury. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 17:548-564, 1958

Klatzo I: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 26: 1-4, 1967

Kloek J, Akkermans W, Beijersbergen van Henegouwen GMJ: Derivates of 5-Aminolevulinic Acid for Photodynamic Therapy: enzymatic Conversion into Protoporphyrin. *Photochem. Photobiol.* 67(1): 150-154, 1998

Kowalczyk A, MacDonald RL, Amidei C, Dohrmann III F, Erickson RK, Hekmatpanah J, Krauss S, Krishnasamy S, Masters G, Mullan SF, Mundt AJ, Sweeney P, Vokes EE, Weir BKA, Wollmann RL: Quantitative imaging study of extent of surgical resection and prognosis of malignant astrocytomas. *Neurosurgery* 41:1028-1038, 1997

Kriegmair M, Baumgartner R, Knüchel R, Stepp H, Hofstädter F, Hofstetter A: Detection of early bladder cancer by 5-aminolaevulinic acid induced porphyrin fluorescence. *J Urol* 155:105-109, 1996

Leonhardt H: *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*, 8. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, pp243-244, 1990

M. Löning, H. Diddens, M. Friedrich, C. Altgassen, K. Diedrich, G. Hüttmann: Fluorescence Diagnosis and Photodynamic Therapy with 5-Aminolevulinic Acid Induced Protoporphyrin IX in Gynecology: An Overview. *Zentralbl Gynäkol*; 128: pp311-317, 2006

Loh CS, MacRobert AJ, Bedwell J, Regula J, Krasner N, Bown SG: Oral versus intravenous administration of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy. *Br J Cancer* 68:41-51, 1993a

Loh CS, Vernon DI, MacRobert AJ, Bedwell J, Brown SG, Brown SB: Endogenous porphyrin distribution induced by 5-aminolaevulinic acid in the tissue layers of the gastrointestinal tract. *J Photochem Photobiol B* 20:47-54, 1993

Love JA, Friden H, Ekstedt H: Effect of corticosteroids at the Level of the arachnoid villi. In: K.G. Go und A. Baethmann (eds): *Recent progress in the study and therapy of brain edema*. New York, Plenum Press, pp589-595, 1984

Madsen S, Hirschberg H.: Photodynamic therapy and detection of high-grade gliomas. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.*;25(1-2):453-66, 2006

Madsen SJ, Sun CH, Tromberg BJ, Cristini V, De Magalhães N, Hirschberg H.: Multicell tumor spheroids in photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.*; Jun;38(5):555-64, 2006

Madsen SJ, Sun CH, Tromberg BJ, Hirschberg H.: Development of a novel indwelling balloon applicator for optimizing light delivery in photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.*;29(5):406-12., 2001

Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, Gneveckow U, Wust P, Thiesen B, Feussner A, von Deimling A, Waldoefner N, Felix R, Jordan A: Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a

feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*; 81:53–60, 2007

Mayman CI: Inhibitory effect of dexamethasone on sodium-potassium activated adenosine triphosphatase of choroids plexus in cat and rabbit. *Fed. Proc.* 31:591, 1972

McLoughlin JL, Cantrill RC: The Effect of Delta-Aminolevulinic Acid on the High Affinity Uptake of Aspartic Acid by Rat Brain Synaptosomes. *Gen. Pharmacol.* 15(6):553-555, 1984

Mosmann, T: Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Meth.*, 65, 55-63., 1983

Newman S, Saito M, Yu RK: Biochemistry of myelin proteins and enzymes. In *Neuroglia*, Oxford University Press 535-554, 1995

Nitta T, Sato K: Prognostic implications of the extent of surgical resection in patients with intracranial malignant gliomas. *Cancer* 75:2727-2731, 1995

Ohgaki H et al.: Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 64:6892-9, 2004

Pappius HM, Wolfe L: Effect of drugs on local cerebral glucose utilization in traumatized brain; mechanisms of action of steroids revisited. In: K.G. Go und A.

Baethmann (eds): Recent progress in the study and therapy of brain edema. New York, Plenum Press, 11-26, 1984

Peng Q, Moan J, Warloe T, Iani V, Steen HB, Bjørseth A, Nesland JM: Build-up esterified aminolevulinic-acid-derivative-induced porphyrin fluorescence in normal mouse skin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 34:95-96, 1996

Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM: 5-Aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy: Principles and experimental research. *Photochem Photobiol* 65:235-251, 1997

Poon WS, Schomaker KT, Deutsch TF, Martuza RL: Laser-induced fluorescence: experimental delineation of tumor resection margins. *J Neurosurg* 76:679-686, 1992

Reulen HJ, Kreysch HG: Measurement of brain tissue pressure in cold induced cerebral oedema. *Acta Neurochir (Wien)*, 29(1):29-40, 1973

Rickert CH et al.: *Pediatric high-grade astrocytomas show chromosomal imbalances distinct from adult cases*. *Am J Pathol.*;158:1525-1532, 2001

Riede UN, Schaefer HE: Allgemeine und spezielle Pathologie 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, pp1047-1048, pp1075-1078, 1995

Rostomily RC, Spence AM, Duong D, McCormick K, Bland M, Berger MS: Multimodality management of recurrent adult malignant glioma: results of a phase II

multiagent chemotherapy study and analysis of cytoreductive surgery. *Neurosurgery* 35:378-388, 1994

Samdani AF, Tamargo RJ, Long DM: Brain tumor edema and the role of the blood-brain barrier. *Handbook of Clinical Neurology* 23:71-102, 1997

Schoenfeld N, Mamet R, Epstein O, Lahav M, Lurie Y, Atsmon A: The heme biosynthetic pathway in the regenerating rat liver. The relation between enzymes of heme synthesis and growth. *Eur J Biochem* 166:663-666, 1987

Simpson JR, Horton J, Scott C, Curran WJ, Rubin P, Fishbach J, Isaacson S, Rotamn M, Asbell SO, Nelson JS, Weinstein AS, Nelson DF: Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26:239-249, 1993

Smith, J.S. und Jenkins, R.B.: Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance an prognostic implications, *Front Biosci.* 5, S. D213-D231, 2000

Stummer W, Goetz C, Hassan A, Heimann DVM, Kempfski O: Kinetics of photofrin II in perifocal brain edema. *Neurosurgery* 33:1075-1082, 1993

Stummer W, Stocker S, Novotny A, Heimann A, Sauer O, Kempfski O, Plesnila N, Wietsorrek J, Reulen HJ: In vitro and in vivo porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolaevulinic acid. *J Photochem Photobiol B* 45:160-169, 1998a

Stummer W, Stocker S, Wagner S, Stepp H, Fritsch C, Goetz C, Goetz AE, Kiefmann R, Reulen HJ: Intraoperative Detection of Malignant Gliomas by 5-Aminolaevulinic Acid-induced Porphyrin Fluorescence. *Neurosurgery* 42:518-526, 1998

Stummer W, Pichlmeiner U, Meinel Th, Wiestler O, Zanella F, Reulen HJ: Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase II trial. *Lancet Oncol*; 7:392-401, 2006

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.*; 352:987-96, 2005

Tewes B, Franke H, Hoheisel D, Hellwig S, Decker S, Griesche D, Tilling T, Wegener J, Galla HJ: Preparation of endothelial cells in primary cultures obtained from 6-months old pigs. In: Boer AG, Sutanto W (eds): *Drug transport across the blood-brain barrier: in vitro and in-vivo techniques*. Harwood Academic Publishers, 91-97, 1997

Toglia A, Kittelson JM, Roemer RB, Hodak JA, Carter LP: Cerebral bloodflow in and around spontaneous malignant gliomas. *Int J Hyperthermia* 12(4):461-476, 1996

Van Hillegersberg R, van den Berg JW, Wort WJ, Terpstra OT, Wilson JH: Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats. *Gastroenterology* 103:645-651, 1992

Vecht CJ, Avezaat CJJ, Putten WLJ, Eickenboom WMH, Stefanko SZ: The influence of the extent of surgery on the neurological function and survival in malignant glioma. A retrospective analysis in 243 patients. *J Neurol Neurosurg Psych* 53:466-471, 1990

Washbrook R, Riley PA : Comparison of δ -aminolevulinic acid and its methyl ester as an inducer of porphyrin synthesis in cultured cells. *Brit. J. Can.* 75(10):1417-1420, 1997

Wilson, A. P., *Cytotoxicity and Viability Assays in Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 3rd ed. (ed. Masters, J.R.W.) Oxford University Press: Oxford, Vol. 1, 2000

Winger MJ, MacDonald DR, Cairncross JG: Supratentorial anaplastic gliomas in adults. The prognostic importance of extent of resection and prior low-grade glioma. *J Neurosurg* 71:487-493, 1989

Wisoff JH, Boyett JM, Berger MS, Brant C, Li H, Yates AJ, McGuire-Cullen P, Turski PA, Sutton LN, Allen JC, Packer RJ, Finlay JL: Current management and the impact of the extent of resection in the treatment of malignant gliomas of childhood: a report of the Children's cancer group trial No. CCG-945. *J Neurosurg* 89:52-59, 1998

Wood RJ, Green SB, Shapiro WR: The prognostic importance of tumor size in malignant gliomas: A computed tomographic scan study by the brain tumor cooperative Group. *J Clin Oncol* 6:338-343, 1988

Yoshida J, Kajita Y, Wakabayashi T, Sugita K: Long-term follow-up results of 175 patients with malignant glioma: importance of radical tumour resection and postoperative adjuvant therapy with interferon, ACNU and radiation. *Acta Neurochir* 127:55-9, 1994

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1	Verteilung der Hirntumoren
Abb. 1.2, 1.3	Bildung von PPIX aus ALA bei Häm-Biosynthese
Abb. 2.1	Fluoreszenz nach ALA-Gabe
Abb. 2.2	PDT unter OP-Bedingungen
Abb. 3.1	Lasersystem
Abb. 3.2	Aufbau in der Dunkelkammer
Abb. 4	konventionelles Beleuchtungsschema
Abb. 5.1, 5.2	Funktion der Behandlungskammer
Abb. 6	Spezifizierungen der Behandlungskammer
Abb. 7.1	Aufbau der Behandlungsplatte
Abb. 7.2	Reaktion des MTT-Assays
Abb. 8.1	Linearität zwischen Zellzahl und Extinktion des Assays
Abb. 8.2, 8.3, 8.4	Entwicklung des Versuchsaufbaus
Abb. 8.5	Nachweis der fehlenden Eigenextinktion von PPIX
Abb. 8.6	Nachweis zur Eigenextinktion von ALA mit FCS
Abb. 8.7, 8.8	Spezifizierungen des Versuchsaufbaus
Abb. 8.9	Ausgangsversuche zur LD50
Abb. 9.1	Versuche zur O ₂ -Substitution
Abb. 9.2	Versuche zur fraktionierten Beleuchtung
Abb. 10.1	Extinktionsabhängigkeit von Bestrahlungsdauer
Abb. 10.2	Extinktionsabhängigkeit von ALA-Dosis
Abb. 11	Studie zur Zelltoxizität von ALA
Tabelle 1	Methoden der Zellkultur
Tabelle 2	Entwicklungsschritte der Methode

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALA	amino-laevulanic acid
DNA	desoxy-ribonuclein acid
ELISA	enzyme linked immunosorbend assay
FCS	fetal calf serum – Nährmedium der Zellkultur
g	Gramm
G112	Gliomzelllinie 112
GBM	Glioblastom
HWZ	Halbwertszeit (physikalisch)
LD50	Letale Dosis 50 (50% Wirkungsnachweis bei def. Dosis)
mg	Milligramm
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MTT	Dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium Bromid – Assay
n	Anzahl
OP	Operation (medizinisch)
PDT	Photodynamische Therapie
PPIX	Protoporphyrin IX

7 Danksagung

In erster Linie danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. Walter Stummer, der mich diesem Thema näher brachte und mir diese Aufgabe mit ständiger Bereitschaft zur Hilfe und mit Ansporn überließ.

Zudem möchte ich Herrn Prof. Dr. Jan Vesper meinen Dank aussprechen, der mir mit medizinischem und persönlichem Rat lehrreich zur Seite stand.

Zusätzlich möchte ich auch dem Direktor der Neurochirurgischen Klinik der Universität Düsseldorf, Herrn Prof. Dr. Hans-Jakob Steiger für die Begleitung und andauernde Motivation danken, sowie für die Möglichkeit der Nutzung des Fachlabors der Neurochirurgie.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei der neurochirurgischen MTA Frau Brigitte Senger bedanken, die meinen Weg durch die Wirrungen der experimentellen Forschung mit Geduld und Hingabe erleichtert hat.

Meiner Familie gebührt an dieser Stelle besonderer Dank, da ohne sie mein Studium und der Weg der sich mir eröffnet hat nicht möglich gewesen wären. Ihr Rückhalt und ihre bedingungslose Unterstützung haben mich grundlegender geprägt, als jedes Studium, jede Forschung und jeder Beruf dies hätte schaffen können oder jemals wird.

8 Lebenslauf

Robert Pannewitz

Geburtsdatum: 26. Januar 1981
Geburtsort: Neuruppin
Eltern: Marion Pannewitz, geb. Schulze
Joachim Pannewitz

Ausbildung und beruflicher Werdegang

1987 – 1989: Theodor-Fontane-Schule Neuruppin
1989 – 1991: Grundschule Brombachtal
1991 – 1997: Realschule Bad König
1997 – 2000: Oberstufenzentrum Ostprignitz-Ruppin
2000 – 2001: Grundwehrdienst
2001 – 2008: Studium der Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität zu Düsseldorf
Juni 2008: Staatsexamen Medizin und ärztliche Approbation
Juli 2008 - März 2009: Arzt in Weiterbildung, Fach Anästhesie & Intensivmedizin, Dominikus Krankenhaus Düsseldorf
März 2009 bis dato: Arzt in Weiterbildung, Fach Neurochirurgie, Universitätsklinikum zu Düsseldorf