

Aus der Neurochirurgischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Jakob Steiger

In vitro-Anwendung der 5- δ -Aminolävulinsäure basierten
photodynamischen Therapie an
primären Meningeom-Zellkulturen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Carolin Tepe
2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Jakob Steiger
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Rüdiger Sorg

Meiner Familie gewidmet.

Zusammenfassung

***In vitro*-Anwendung der 5- δ -Aminolävulinsäure basierten photodynamischen Therapie an primären Meningeom-Zellkulturen**

Carolin Tepe

Meningeome machen 20-34% der intrakraniellen Tumoren aus und sind in einem großen Anteil gutartig (WHO °I). Eine operative Entfernung ist die Methode der Wahl. Für kleinere oder operativ schwer zugängliche Meningeome ist die Radiochirurgie die wichtigste Therapiealternative. Für nur unvollständig resezierte und höhergradige Meningeome sind weitere adjuvante Therapieverfahren notwendig.

Die 5- δ -Aminolävulinsäure (5-ALA) basierte photodynamische Therapie (PDT) wird unter anderem in der Dermatologie erfolgreich zur Behandlung von benignen und malignen Hautläsionen verwendet. In der Neurochirurgie findet die PDT bei rezidivierenden Glioblastomen Anwendung. Zuletzt folgten Berichte über den Nachweis einer 5-ALA induzierten Fluoreszenz von Meningeomen, welche aktuell bereits zur fluoreszenzgestützten Resektion genutzt wird.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst eine Methode zur Primärkultivierung von Meningeomen zu entwickeln. Im Anschluss daran sollte der zytotoxische Effekt durch die 5- δ -Aminolävulinsäure basierte photodynamische PDT auf primäre Meningeomzellen getestet werden.

Dazu wurde ein zuvor von Hardy et. al. beschriebenes Protokoll zur Primärkultivierung modifiziert und im Verlauf sicher reproduziert. Die gewonnenen Primärzellen konnten nach der ersten Passage für die nachfolgenden Versuche verwendet werden. Zum Nachweis der meningealen Herkunft der Zellen wurde eine immunhistochemische Färbung des epithelialen Membranantigens (EMA) durchgeführt.

Im Folgenden wurden primäre Meningeomzellen für die 5-ALA basierte PDT auf einer Wellplatte mit unterschiedlichen Dosen von 5-ALA versetzt (12,5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml und 100 μ g/ml). Ein Versuchsblock wurde nur mit 50 μ g/ml inkubiert und nicht bestrahlt; ein weiterer Versuchsblock wurde ohne vorhergehende Inkubation mit 5-ALA mit der PDT behandelt (Negativkontrollen). Nach einer vierstündigen Inkubation wurde eine PDT mit rotem Licht der Wellenlänge 635 nm (1 Watt Leistung) für 625 Sekunden durchgeführt. Der zytotoxische Effekt wurde mittels eines WST-1 Vitalitätsassay analysiert.

Zur Primärkultivierung wurden 42 Meningeompräparate verwendet. 36 Präparaten wurde nach dem von uns etablierten Protokoll weiterverarbeitet und 32 erfolgreich angezüchtet. An 11 primären Meningeomzelllinien konnte ein dosisabhängiger zytotoxischer Effekt der 5-ALA basierten PDT gezeigt werden. Mittels der Negativkontrollen konnte gezeigt werden, dass sowohl eine alleinige Inkubation der Zellen mit 5-ALA, als auch eine isolierte PDT keinen zytotoxischen Effekt auf die primären Meningeomzellen haben. Der zytotoxische Effekt auf die unterschiedlichen Zelllinien war jeweils unterschiedlich.

Die Verwendung von Primärkulturen birgt auf Grund des Risikos einer Überwucherung durch Fibroblasten eine große Fehlerquelle. Die Ursache der großen Spannweite des erreichten zytotoxischen Effekts bleibt bisher unklar. Daher sind zur weiteren Beurteilung der klinischen Wertigkeit der erzielten Ergebnisse weiterführende Studien *in vitro* und *in vivo* notwendig.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	V
Abbildungen.....	VI
Tabellen	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Meningeome.....	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 WHO Klassifikation.....	1
1.1.3 Klinische Präsentation.....	2
1.1.4 Diagnostik	3
1.1.5 Aktuelle Therapiekonzepte.....	4
1.1.6 Prognose	7
1.2 Die 5- δ -Aminolävulinsäure basierte photodynamische Therapie.....	8
1.2.1 Grundlagen der photodynamischen Therapie und die verschiedenen Photosensibilisatoren	8
1.2.2 5-ALA, der Photosensibilisator Protoporphyrin IX und die Anwendung in der Medizin	9
1.2.3 Anwendung von 5-ALA in der Neurochirurgie	11
1.2.3.1 Gliome	11
1.2.3.2 Meningeome	12
1.2.4 PDT in der Neurochirurgie.....	12
1.3 Ziele dieser Arbeit.....	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1 Material	14
2.1.1 Chemikalien.....	14
2.1.2 Verbrauchsmaterial	15
2.1.3 Geräte	15
2.2 Methoden.....	16

2.2.1 Anlegen einer Primärkultur	16
2.2.2 Beschichtung der Zellkulturflaschen mit Kollagen Typ 1 0,01%	17
2.2.3 Kultivierung der Primärzellen als Monolayer	17
2.2.4 Passagierung der Zellen.....	17
2.2.5 Einfrieren und Auftauen.....	18
2.2.6 Gewinnung und Fixierung von Zellmaterial für die Immunhistologie	18
2.2.7 Immunhistochemischer Nachweis der EMA-Expression.....	19
2.2.8 Immunhistochemische Färbung mit dem EnVision™ System	20
2.2.9 Versuchsanordnung und Aussähen der Zellen auf eine 96-Wellplatte	21
2.2.10 Inkubation der Zellen mit 5-ALA	22
2.2.12 Durchführung der PDT	23
2.2.13 WST-1 Cell Proliferation Assay.....	24
2.2.14 Durchführung WST-1 Assay.....	24
2.2.15 Auswertung	25
3. Ergebnisse.....	26
3.1 Primärkultivierung von Meningeomen	26
3.1.1 Klinische Daten	26
3.1.2 Entwicklung der Methode	26
3.1.3 Versorgung der Primärkultur.....	30
3.1.4 Einflussfaktoren auf die Dauer bis zur ersten Passage.....	33
3.1.5 Immunhistochemischer Nachweis der EMA-Expression.....	35
3.1.6 Einfrieren und Auftauen der Primärzellen	37
3.2 Anwendung der 5-ALA basierten PDT an primären Meningeom-Zellen.....	38
3.2.1 Modifizierung des Versuchsaufbaus für Meningeom-Primärzellen.....	38
3.2.2 Ermittlung geeigneter 5-ALA-Dosierungen.....	39
3.2.3 Einfluss eines Mediumwechsels vor PDT	43
3.2.4 Zellvitalität nach Durchführung der PDT ohne 5-ALA	46
3.2.5 Zellvitalität nach Inkubation mit 5-ALA ohne nachfolgende PDT	46

3.2.6 Zellvitalität nach Inkubation mit unterschiedlichen 5-ALA-Konzentrationen und nachfolgender PDT.....	47
4. Diskussion.....	50
4.1 Material und Methoden.....	50
4.1.1 Materialgewinnung, Verarbeitung und Anzucht einer Primärzellkultur	50
4.1.2 Optimierung des Protokolls zur Primärkultivierung.....	52
4.1.3 Immunhistochemischer Nachweis der EMA-Expression.....	53
4.1.4 Inkubation mit 5-ALA und PDT.....	54
4.2 Ergebnisse.....	55
4.2.1 Primärkultivierung.....	55
4.2.2 5-ALA-basierte PDT und Meningeome.....	56
5. Schlussfolgerungen.....	64
6. Literaturverzeichnis.....	65
7. Anhang.....	73
Danksagung.....	80
Eidesstattliche Versicherung.....	81

Abkürzungen

5-δ-ALA/5-ALA	5-delta-Aminolävulinsäure
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EMA	epithelial membrane antigen (engl.: epitheliales Membranantigen)
FC	Ferrochelatase
FCS	fetal calf serum (engl.: fetales Kälberserum)
FGR	fluoreszenzgestützte Resektion
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HpD	Hämatoporphyrin-Derivat
i.v.	intravenös
LD 50	mittlere letale Dosis
LOH	loss of heterozygosity (engl.: Verlust der Heterozygotität)
M(x)	chronologische Benennung der Meningeompräparate
MRT	Magnetresonanztomographie
NEAA	non-essential amino acids (engl.: nicht-essentielle Aminosäuren)
NF-2	Neurofibromatose 2
OAS	over all survival (engl.: Gesamtüberlebensrate)
OP	Operation
PBGD	Porphobilinogendesaminase
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction (engl.: Polymerasekettenreaktion)
PDT	Photodynamische Therapie
PFS	progression free survival (engl.: progressionsfreies Überleben)
PPIX	Protoporphyrin IX
RC	Radiochirurgie
RPM	rounds per minute (engl.: Umdrehungen pro Minute)
SD	Standard deviation (engl.: Standardabweichung)
SFRT	stereotactic fractionated radiotherapy (engl.: stereotaktische, fraktionierte Strahlentherapie)
WHO	World Health Organization (engl.: Weltgesundheitsorganisation)
WST-1	water-soluble tetrazolium salt (engl.: wasserlösliches Tetrazoliumsalz)

Abbildungen

Abbildung 1	Häm-Biosynthese
Abbildung 2	EnVision™ Methode
Abbildung 3	Versuchsanordnung auf der 96-Well-Platte
Abbildung 4	Bestrahlungseinrichtung
Abbildung 5	Umwandlung von WST-1 zu Formazan
Abbildung 6	Mikroskopische Wachstumsbeispiele für Primärzellen
Abbildung 7	Darstellung von Zellinseln am dritten Tag nach Präparation des gleichen Tumors (M13)
Abbildung 8	Beispiele für die Ergebnisse der immunhistochemischen Anfärbung der EMA-Expression und deren semiquantitative Einteilung in (-) negativ, (+) einfach-, (++) zweifach- und (+++) dreifach-positiv
Abbildung 9	Häufigkeitsverteilung der immunhistochemischen Ergebnisse nach Ausmaß der EMA-Expression
Abbildung 10	Immunhistochemische EMA-Färbung vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen der Zellen
Abbildung 11	Zellvitalität der M15-Zellen nach PDT unter folgenden Versuchsbedingungen: 1 Nacht Inkubation der Zellen in der 96-Well-Platte; 450 Sekunden Bestrahlungszeit; Leistung 1 Watt; 1 Stunde Inkubation zwischen PDT und WST-1-Assay
Abbildung 12	Zellvitalität der M15-Zellen nach PDT unter folgenden Versuchsbedingungen: 2 Nächte Inkubation der Zellen in der 96-Well-Platte; 625 Sekunden Bestrahlungszeit; Leistung 1 Watt; 1,5 Stunden Inkubation zwischen PDT und WST-1-Assay
Abbildung 13	Exemplarische Darstellung des Einflusses unterschiedlicher 5-ALA Konzentrationen auf die Zellvitalität der M 19-Zellen nach PDT im WST-1-Assay
Abbildung 14	Einfluss der PDT auf die Zellvitalität unter der Verwendung von 25µg/ml sowie 50µg/ml 5-ALA an M20-, M21- und M23-Zellen
Abbildung 15	Zellvitalität der M25- und M26-Zellen nach PDT unter Verwendung von 12,5µg/ml, 25µg/ml sowie 50µg/ml 5-ALA
Abbildung 16	Zellvitalität der M27- und M28-Zellen nach PDT unter der Verwendung von 25µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml und 100µg/ml 5-ALA
Abbildung 17	Zellvitalität der M29- und M30-Zellen nach PDT unter der Verwendung von 25µg/ml, 50µg/ml und 100µg/ml 5-ALA

- Abbildung 18 Zellvitalität der Zellen im WST-1-Assay nach PDT-Behandlung ohne vorherige Inkubation der Zellen mit 5-ALA.
- Abbildung 19 Zellvitalität der Zellen im WST-1-Assay nach Inkubation der Zellen mit 50 µg/ml 5-ALA ohne nachfolgende PDT-Behandlung
- Abbildung 20 Darstellung des prozentualen Anteils überlebender Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen 5-ALA-Konzentrationen (12,5µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml und 100µg/ml) und nachfolgender PDT-Bestrahlung
- Abbildung 21 Boxplot-Diagramm zur Darstellung der Spannweite der Zellvitalität der Zellen aus elf Versuchen nach ALA-Inkubation und PDT-Bestrahlung
- Abbildung 22 Anlegen einer Primärkultur und Definition der daraus entstehenden Zelllinien

Tabellen

Tabelle 1	WHO-Grade von Meningeomen
Tabelle 2	Klinische Syndrome von intrakraniellen Meningeomen
Tabelle 3	Lokalisationen von Meningeomen
Tabelle 4	Simpson-Grade der Tumorresektion
Tabelle 5	Histologische Subtypen der verwendeten Meningeome
Tabelle 6	Zusammenfassung des Etablierungs- und Optimierungsverlaufs
Tabelle 7	Einfluss der Lagerungstemperatur auf den Kultivierungserfolg (exemplarischer Einzelversuch an M6)
Tabelle 8	Einfluss der Lagerungsdauer auf den Kultivierungserfolg (exemplarischer Einzelversuch an M5)
Tabelle 9	Einfluss der Kollagenbeschichtung auf den Kultivierungserfolg (exemplarischer Einzelversuch an M13)
Tabelle 10	WHO-Grad, histologischer Subtyp und Zeitpunkt der 1. Passage nach erfolgreicher Anzucht der einzelnen Meningeome

1. Einleitung

1.1 Meningeome

Meningeome sind in der Regel langsam wachsende Tumoren, die von den arachnoidalen Deckzellen der Meningen ausgehen. Sie können sowohl intrakraniell als auch spinal vorkommen und sind durch ein verdrängendes Wachstumsverhalten gekennzeichnet. Sie bilden die mit Abstand größte Gruppe der meningealen Tumoren. (19)

1.1.1 Epidemiologie

Meningeome haben einen Anteil von 20-34% an allen intrakraniellen Tumoren. Sie sind die am häufigsten vorkommenden primär nicht-hirneigenen intrakraniellen Tumoren. (10, 73) Die Inzidenz liegt bei ungefähr 6 Krankheitsfällen pro 100.000 Einwohner, wobei Frauen häufiger betroffen sind als Männer. Das Geschlechterverhältnis zwischen Frauen und Männern liegt bei 2:1. (50) Mit dem Alter nimmt die Inzidenz deutlich zu und steigt von 0,12/100.000 bei Kindern auf 14,9/100.000 bei den 60-84-jährigen. (13) Die Pathogenese von Meningeomen ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. Ionisierende Strahlung, der Einfluss von weiblichen Geschlechtshormonen und Schädel-Hirn-Traumen werden bei der Entstehung von Meningeomen diskutiert. (13, 50) Als anerkannter Risikofaktor gilt die Neurofibromatose Typ 2, die mit dem Vorkommen von multiplen Meningeomen einhergeht. (93)

1.1.2 WHO Klassifikation

In der WHO Klassifikation für Tumoren des Nervensystems aus dem Jahr 2000 wurde die zuvor gültige Einteilung der Meningeome grundlegend überarbeitet. Die Klassifikation erfolgt nun nicht nur nach histologischen Subtypen, sondern auch nach Malignitätsgrad, der unterschiedlichen Rezidivneigung und der Wachstumsaggressivität. Dieses System führte zu einer höheren Korrelation zwischen neuropathologischem Befund und klinischem Erscheinungsbild. (39, 71)

So gibt es nach der WHO Klassifikation drei Gruppen von Meningeomen, welche nach Malignitätsgraden eingeteilt werden. (siehe Tabelle 1)

Tabelle 1: WHO-Grade von Meningeomen

Histologischer Subtyp	WHO-Grad
<i>Meningeome mit einem niedrigen Rezidivrisiko und/oder aggressivem Wachstum</i>	
Meningotheliales Meningeom	I
Fibröses (fibroblastisches) Meningeom	I
Transitionelles (gemischtes) Meningeom	I
Psammomatöses Meningeom	I
Angiomatöses Meningeom	I
Mikrozystisches Meningeom	I
Sekretorisches Meningeom	I
Lymphoplasmazell-reiches Meningeom	I
Metaplastisches Meningeom	I
<i>Meningeome mit einem höheren Rezidivrisiko und/oder aggressivem Wachstum</i>	
Atypisches Meningeom	II
Klarzelliges Meningeom	II
Chordoides Meningeom	II
Anaplastisches (malignes) Meningeom	III
Rhabdoides Meningeom	III
Papilläres Meningeom	III
Meningeome jedes Subtyps mit einem hohen Proliferationsindex und/ oder Gehirninvasion	III

Im Jahr 2007 gab es eine Neuauflage der WHO Klassifikation ohne relevante Änderung für die Klassifizierung von Meningeomen. (51)

1.1.3 Klinische Präsentation

Aufgrund ihres langsamen Wachstumsverhaltens bleiben Meningeome häufig lange Zeit asymptomatisch. Durch den vermehrten Einsatz von CT und MRT werden sie häufig als Zufallsbefunde diagnostiziert. (45)

Durch Kompression oder Infiltration angrenzender Strukturen, die Erhöhung des intrakraniellen Drucks sowie durch die Obstruktion von Liquorwegen, kortikaler Venen und der venösen Sinus können Meningeome symptomatisch werden.

In 20-50% sind epileptische Anfälle das erste Symptom von intrakraniellen Meningeomen. Diese können fokal, komplex-fokal, primär und sekundär generalisiert auftreten. (47)

Fokale neurologische Defizite entstehen vor allem durch die lokale Kompression bzw. Verdrängung eloquenter Regionen oder Hirnnerven. So kann man einigen Lokalisationen bestimmte Symptomenkomplexe zuordnen. (siehe Tabelle 2)

Tabelle 2: Klinische Syndrome von intrakraniellen Meningeomen (73)

Lokalisation	Symptomkomplex
Parasagittal	Einfach fokale Anfälle, Paraparese
Posterior parasagittal	Homonyme Hemianopsie
Anterior parasagittal	Persönlichkeitsveränderungen
Keilbeinflügel	Sehstörungen, Trigeminusdysfunktion, Augenmuskellähmungen
Olfaktoriusrinne	Anosmie, Demenz
Suprasellär	Bitemporale Hemianopsie
Infratentoriell	Kopfschmerz, Hirndruckerhöhung, Schwindel, Ataxie, Hirnnervendysfunktionen

1.1.4 Diagnostik

Neben der Anamnese und den neurologischen Befunden, stehen bei der Diagnostik von Meningeomen bildgebende Verfahren im Vordergrund. Sowohl die Computertomographie (CT), als auch die Magnetresonanztomographie (MRT) können für die Diagnose und Verlaufskontrolle verwendet werden.

In der CT stellen sich Meningeome isodens bis schwach hyperdens zum normalen Hirngewebe dar. Nach intravenöser (i.v.) Kontrastmittelapplikation ist eine homogene Anreicherung im Tumorgewebe zu sehen. Der Vorteil der CT gegenüber der MRT ist die bessere Darstellung von verkalkten Tumorarealen, sekundär veränderten Knochen (zum Beispiel Hyperostosen) und einer eventuell vorhandenen Knocheninvasion. (20, 73)

Seit Einführung der MRT ist diese das Mittel der Wahl in der Diagnostik von Meningeomen. Sie bietet eine höhere Auflösung und eine bessere Darstellung der angrenzenden Strukturen (zum Beispiel Hirnnerven, Gefäße, Sinus und funktionelle Hirnareale). (93) Meningeome erscheinen in der T1-Wichtung iso- oder hypointens und in T2-gewichteten Bildern iso- bis hyperintens. Genau wie in der CT, zeigt sich auch in der MRT eine deutliche, homogene Kontrastmittelanreicherung. Häufig ist in der MRT auch das „*dural tail sign*“ sichtbar. Dies kommt durch eine Verdickung der randständigen Dura und deren Kontrastmittelaufnahme zustande. In der MRT ist desweiteren auch die Darstellung von perifokalen Ödemen und Substanzveränderungen der weißen Substanz möglich. (20, 93, 95)

Bevor die CT und MRT nahezu überall verfügbar waren, konnte als diagnostisches Mittel außerdem eine Angiographie durchgeführt werden. Diese Technik wird heutzutage kaum noch angewendet, außer die Gefäßversorgung des Tumors soll

präoperativ genau abgeklärt werden, um den chirurgischen Zugang besser planen zu können. (20, 93) Darüber hinaus bietet die Angiographie die Möglichkeit einer präoperativen Embolisation tumorversorgender Gefäße.

In der folgenden Tabelle (Tabelle 3) sind die Prädilektionsstellen von intrakraniellen Meningeomen in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit dargestellt.

Tabelle 3: Lokalisationen von Meningeomen (73)

-
- Konvexität
 - Parasagittal/Falx cerebri
 - Keilbeinflügel
 - Seitenventrikel
 - Tentorium
 - Hintere Schädelgrube
 - Tuberculum sellae
 - Schädelbasis
 - Olfaktoriusrinne
-

1.1.5 Aktuelle Therapiekonzepte

Das therapeutische Management der Meningeome hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie zum Beispiel dem Patientenalter, den Begleiterkrankungen, der Symptomatik und dem klinischem Verlauf, der Tumorlokalisierung, der Größe des Meningeoms und des perifokalen Ödems. (73)

Bei asymptomatischen kleinen Meningeomen besteht häufig keine absolute Operationsindikation. Regelmäßige neurologische Untersuchungen und eine engmaschige Kontrolle mittels MRT wird empfohlen. Kommt es zu einem Wachstumsprogress, sollte eine Behandlung diskutiert werden. Dieses abwartende Verhalten ist vor allem bei älteren Patienten mit Begleiterkrankungen sinnvoll. Bei Patienten unter 70 Jahren und ohne relevante Komorbiditäten, kann eine Operation (OP) in Erwägung gezogen werden, da eine Progression innerhalb der restlichen Lebenszeit zu erwarten ist. (45, 60)

Bei Patienten mit symptomatischen und operativ zugänglichen Meningeomen ist die operative vollständige Resektion des Tumors die Therapie der Wahl.

Simpson gelang es 1957 einen Zusammenhang zwischen dem Resektionsgrad und der Rezidivrate von Meningeomen nachzuweisen. Darauf basierend entwickelte er eine Klassifikation für das Ausmaß der Resektion in fünf Graden. (siehe Tabelle 4) (78)

Tabelle 4: Simpson-Grade der Tumorresektion

Grad	Ausmaß der Resektion	5-Jahres-Rezidivrate
I	Makroskopisch vollständige Tumorentfernung mit Exzision der Dura, verändertem Knochen und Sinus	9%
II	Makroskopisch vollständige Tumorentfernung mit Koagulation der duralen Anheftungsstelle	19%
III	Makroskopisch vollständige Tumorentfernung ohne Koagulation bzw. Resektion der duralen Anheftungsstelle oder der extraduralen Ausbreitung	29%
IV	Teilresektion mit Belassen von Tumorgewebe in situ	44%
V	Dekompression mit oder ohne Biopsie	

Die Rezidivrate innerhalb von fünf Jahren belief sich bei Grad I Resektion auf 9%, bei Grad II auf 19%, bei Grad III auf 29% und bei Grad IV auf 44%. Weitere folgende Studien reproduzierten die Ergebnisse von Simpson et al., sodass die Simpson-Klassifikation für das Ausmaß der Resektion weiterhin eine wichtige Rolle in der Behandlung von Meningeomen einnimmt. (80) Miramanoff et al. (56) zeigten, dass bei einer längeren Beobachtungszeit die Rezidivrate weiter ansteigt. So haben vollständig resezierte Meningeome (Simpson Grad I-III) nach 15 Jahren ein Rezidivrisiko von 32% und subtotal resezierte Tumoren (Simpson Grad IV und V) sogar eine Progressionswahrscheinlichkeit von 91%.

In individuellen Fällen ist es bei Meningeomen mit ausgeprägter Gefäßversorgung im Rahmen einer präoperativen Angiographie möglich, die versorgenden Gefäße zu embolisieren. Aufgrund moderner Operationstechniken, der Einführung verbesserter Mikroskoptechniken und dadurch vermeidbarer Komplikationen wie Ischämie, Blutungen und Nekrosen der Kopfhaut findet die Angiographie zwecks Embolisation versorgender Arterien heutzutage nur noch selten Anwendung. (17, 20)

Als adjuvante Therapien stehen sowohl die konventionelle Bestrahlung als auch die Radiochirurgie und die stereotaktische fraktionierte Strahlentherapie zu Verfügung. Diese sollten im Falle einer inkompletten Resektion, bei einem Rezidiv oder bei malignen Meningeomen (WHO °II und WHO °III) in Betracht gezogen werden. (93)

Bei einer konventionellen Bestrahlung muss der Benefit einer Behandlung gegen die potentiellen Risiken abgewogen werden. So kann es infolge von Strahlenschäden zu einer Leukencephalopathie, kognitiven Einschränkungen, Nekrosen und fokalen neurologischen Defiziten kommen. Aufgrund der hohen Spätmorbidity und einer geringen Erfolgsrate als Primärtherapie, ist die Indikationsstellung bei WHO °I

Meningeomen sehr streng zu stellen und wird daher nur als adjuvantes Therapiekonzept angewendet. (73)

Die stereotaktische Bestrahlung ermöglicht eine gezielte Therapie des Tumorgewebes mit einer geringen Komplikationsrate, da mit Hilfe der stereotaktischen Koordinaten das bestrahlte Zielvolumen sehr genau definiert werden kann und ein steiler Dosisabfall zum umliegenden Gewebe besteht. Es stehen hierfür verschiedene Bestrahlungseinheiten zur Verfügung (LINAC, CyberKnife, GammaKnife). (41)

Stereotaktische Bestrahlung kann auf zwei Arten und Weisen erfolgen, einmal in Form einer einmaligen Hochdosiskonvergenzbestrahlung, wie es bei der Radiochirurgie (RC) der Fall ist oder als stereotaktische, fraktionierte Strahlentherapie (SFRT) mit Erhöhung der einzelnen effektiven Dosisfraktionen.

Stafford et al. (81) berichteten über 5-Jahres-Tumorkontrollraten von 93% bei benignen und 68% bei atypischen Meningeomen in einer Fallserie von 206 behandelten Meningeomen. Bei inoperablen Meningeomen, zum Beispiel durch deren Lokalisation und fehlende operative Zugänglichkeit oder Komorbiditäten und hohem Alter der Patienten, stellt die RC eine Alternative zur mikrochirurgischen Resektion dar.

Vorteile der RC sind eine hohe Effektivität im Sinne einer hohen Tumorkontrollrate bei geringer Morbidität und therapieassoziierter Mortalität. (41) Kondziolka et al. und Stafford et al. (41, 81) legen auch bei kleinen, tief gelegenen Meningeomen und bei komplikationsträchtigen Meningeomen die primäre Behandlung mittels RC nahe. Bei großen Meningeomen mit Masseneffekt und Involvierung bzw. Infiltration kritischer Strukturen wie zum Beispiel eloquenter Hirnareale, Hirnnerven und wichtigen Gefäßen mit zu erwartender hoher Morbidität im Falle einer radikalen OP sollte primär ein kombiniertes Vorgehen aus Tumorsektion und adjuvanter Bestrahlung des Resttumors mittels RC geplant werden. Zu den Komplikationen der Radiochirurgie gehören Hirnnervendefizite (vor allem N. opticus und N. trigeminus), Hydrocephalus, Kopfschmerzen, Krampfanfälle und sowohl motorische, als auch sensorische Defizite. (40, 41)

Im Gegensatz zur RC handelt es sich bei der stereotaktisch, fraktionierten Strahlentherapie (SFRT) um eine hypofraktionierte Bestrahlung mit wenigen, aber erhöhten Einzeldosen im Vergleich zur konventionellen Bestrahlung. Gondi et al. (22) berichten, dass die SFRT im Vergleich zur RC ähnlich gute Ergebnisse bezogen auf das progressionsfreie Überleben (PFS) erzielt. Die RC kann vor allen Dingen bei Meningeomen mit einem Durchmesser unter 3-4cm angewendet werden, wenn diese

scharf begrenzt sind, kaum perifokales Ödem vorliegt und eine ausreichende Entfernung zu wichtigen Strukturen besteht. Sind diese Kriterien nicht erfüllt, stellt die SFRT eine gute Alternative zur RC dar. Mit der SFRT werden vielversprechende Ergebnisse erzielt, da sie einen Mittelweg zwischen konventioneller Strahlentherapie und Radiochirurgie bietet. Große prospektive randomisierte Studien fehlen aber noch. (22)

Kommt es nach Resektion und Radiotherapie dennoch zu Rezidiven, welche inoperabel sind, können weitere adjuvante Therapien, wie zum Beispiel eine Chemotherapie mit Hydroxyurea (76), angewendet werden. Neuere Studien zeigen bezüglich Hydroxyurea aber noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse, sodass der Stellenwert weiterhin unklar bleibt. (58) Desweiteren finden eine Immuntherapie mit Interferon-alpha, eine antihormonelle Therapie und Kalzium-Kanal-Blocker alternative Anwendungsmöglichkeiten in der Behandlung von therapieresistenten Meningeomen. (79)

1.1.6 Prognose

Im Durchschnitt können 80% der Meningeompatienten chirurgisch kurativ behandelt werden. Die wichtigsten prognostisch relevanten Faktoren stellen das Ausmaß der Resektion (Simpson-Grade), die Lokalisation und der WHO-Grad dar. So kommt es nach vollständiger Resektion bei WHO °I in 3%, bei WHO °II in 38% und bei WHO °III in 78% der Fälle zu einem Rezidiv. (54)

Wie zuvor bereits beschrieben, ist das Resektionsausmaß nach Simpson ein weiterer wichtiger Prognosefaktor. (78) Das Ausmaß der Resektion wird unter anderem durch die Lokalisation limitiert. Sind kritische Strukturen wie Hirnnerven, Gefäße oder Sinus involviert, so ist eine radikale OP im Sinne einer ausgedehnten Resektion nach Simpson mit einer hohen postoperativen Morbidität verbunden. (93)

Auch bei der Anwendung der RC ist der Malignitätsgrad ein wichtiger Prognosefaktor. Benigne Meningeome haben eine 5-Jahres-Kontrollrate von 93%, atypische Meningeome hingegen nur eine von 68%. (81)

Aus den schlechteren Kontrollraten für nicht vollständig resezierte und höhergradige Meningeome ergibt sich die Notwendigkeit für neue und schonende adjuvante Therapiekonzepte, da mittels Chemo- und Hormontherapie bisher keine richtungsweisenden Ergebnisse erzielt werden konnten.

1.2 Die 5- δ -Aminolävulinsäure basierte photodynamische Therapie

1.2.1 Grundlagen der photodynamischen Therapie und die verschiedenen Photosensibilisatoren

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts beschrieben Tappeiner und Raab (38) erstmalig die phototoxische Reaktion in Wimperntierchen, nachdem diese mit Acridin-Orange angefärbt und zusätzlich mit Licht bestrahlt wurden. In diesem Zusammenhang wurde erstmalig der Begriff Photodynamik geprägt.

Die photodynamische Therapie (PDT) basiert auf der lokalen oder systemischen Applikation eines Photosensibilisators. Nach einer Inkubationszeit wird das Zielgewebe mit sichtbarem rotem Licht (Wellenlänge zwischen 620-690 nm) bestrahlt. Hierdurch bilden sich in Gegenwart von Sauerstoff unterschiedliche reaktive Spezies, die zytotoxisch wirken und den Zelltod herbeiführen. (72)

Castano et al. (9) postulierten zwei mögliche Reaktionsmechanismen zur Erklärung des zytotoxischen Effekts der PDT. Bei der Typ 1 Reaktion kommt es durch die Bestrahlung zu einem Protonen- oder Elektronentransfer von dem erregten Photosensibilisator, der erst zu einer Radikalbildung anderer Moleküle und dann zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt. In der Typ 2 Reaktion reagiert der erregte Photosensibilisator direkt mit Sauerstoff. Dies führt zur Bildung von Singulett-Sauerstoff. Sowohl die reaktiven Sauerstoffspezies, als auch der Singulett-Sauerstoff reagieren mit den umliegenden Strukturen (DNA, Zellorganellen, Strukturproteine) und schädigen diese in ihrer Funktion und führen so zum Zelltod.

Das Ausmaß des Zelltodes infolge der PDT wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst: die Dauer der Inkubation mit dem Photosensibilisator, die intrazelluläre Lokalisation und Konzentration des Photosensibilisators, die Sauerstoffkonzentration, die Verwendung der richtigen Wellenlänge, die Bestrahlungszeit und durch den Zelltyp. Je nach verwendeter PDT-Dosis kann der Zelltod sowohl durch Apoptose, als auch durch Nekrose hervorgerufen werden. (8) Darüber hinaus werden auch noch vaskuläre und immunologische Effekte der PDT bei der Tumordestruktion diskutiert. (7)

Nach Tappeiner und Raab entdeckte man die photosensibilisierenden und fluoreszierenden Eigenschaften von Hämatoporphyrin. 1942 konnten Auler und Banzer (3) eine Aufnahme von Hämatoporphyrin in Tumorzellen nachweisen. Aufgrund der

massiven generalisierten Photosensibilisierung und einer geringen Spezifität wurde Hämatoporphyrin weiterentwickelt zu Hämatoporphyrin-Derivat (HpD), welches bessere photodynamische Eigenschaften hat und in höherem Ausmaß in Tumorzellen akkumuliert. HpD wurde ab den 1960er Jahren vermehrt in der Tumordiagnostik eingesetzt und im Verlauf dann auch als Photosensibilisator für die PDT verwendet. Neuere Photosensibilisatoren, wie z. B. Porphimer-Natrium (Photofrin®) (eine weitere Modifizierung von HpD), wurden entwickelt und zunehmend eingesetzt. Problem bei der Anwendung dieser Photosensibilisatoren ist deren ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil mit einer starken generalisierten Photosensibilisierung über mehrere Wochen und einer phototoxischen Reaktion der umliegenden Gewebe. Als neuerer Photosensibilisator stellt 5- δ - Aminolävulinsäure (5-ALA) eine Alternative dar, da es sowohl topisch als auch systemisch angewendet werden kann, eine geringe oder keine Anreicherung im gesunden Gewebe zeigt und ein überschaubares Nebenwirkungsprofil hat. (15, 16, 38)

Die 5-ALA-basierte PDT findet mittlerweile erfolgreich in verschiedenen Fachgebieten der Medizin Anwendung, zum Beispiel in der Dermatologie und bei der Behandlung bestimmter Tumoren im Ösophagus, in den Atemwegen und in der Blase. (15)

1.2.2 5-ALA, der Photosensibilisator Protoporphyrin IX und die Anwendung in der Medizin

5-ALA ist ein Vorläufermolekül der Häm-Biosynthese und hat selbst kein photoaktives Potential. Durch die Enzyme des Hämstoffwechsels, die in allen eukaryoten Zellen vorhanden sind, wird 5-ALA zum fluoreszierenden und phototoxischen Protoporphyrin IX (PPIX) umgewandelt (siehe Abbildung 1). (43) Das daraus entstehende Häm bewirkt über einen negativen Feedback-Mechanismus die Hemmung der 5-ALA-Synthetase und verhindert so im Normalfall die Akkumulation von Häm-Vorläufermolekülen und somit die Photosensibilisierung der Zellen. Durch die externe Applikation von 5-ALA kann diese Rückkopplung umgangen werden. (37)

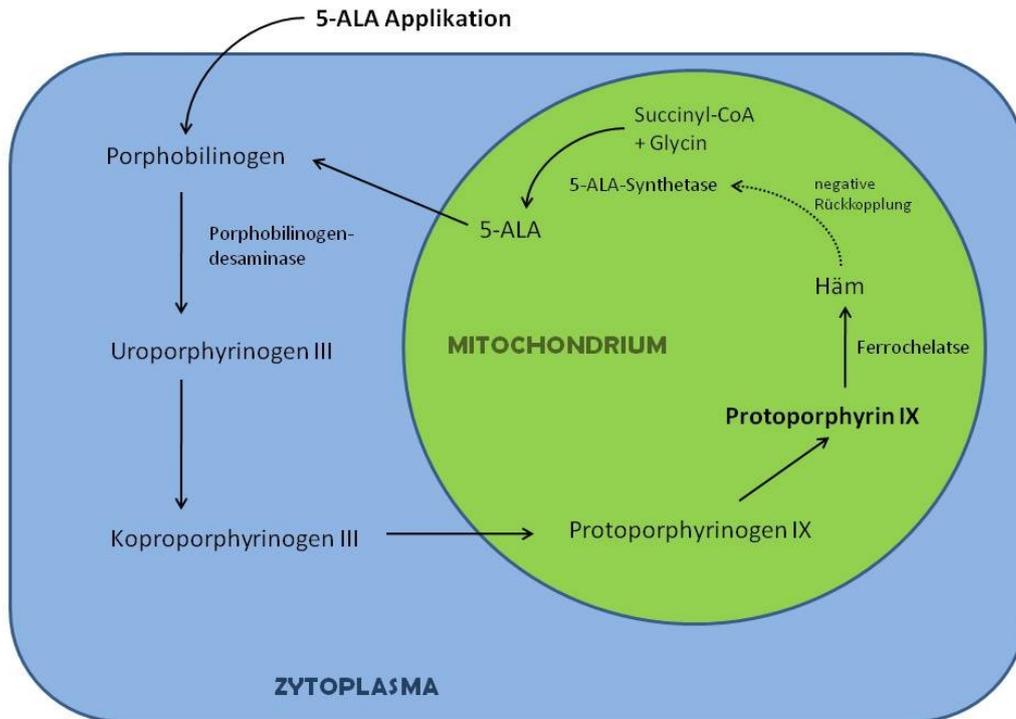


Abbildung 1: Häm-Biosynthese

Die Akkumulation von PPIX ist nicht in allen Geweben gleich ausgeprägt. Dies basiert wahrscheinlich auf einer unterschiedlichen Aufnahmefähigkeit der Zellen für 5-ALA, auf unterschiedlich ausgeprägten Enzymkapazitäten der Häm-Biosynthese und auf unterschiedlichen Feedbackmechanismen. (36)

Der letzte Schritt der Häm-Biosynthese, der Einbau von Fe^{2+} , erfolgt durch das Enzym Ferrochelatase. Da das Enzym kapazitätslimitiert ist, kommt es nach externer 5-ALA-Applikation zu einer intrazellulären PPIX-Akkumulation. In einigen Tumoren konnte man zum einen eine erniedrigte Aktivität der Ferrochelatase und zum anderen eine erhöhte Aktivität der Porphobilinogendesaminase nachweisen, woraus sich eine selektiv erhöhte Anreicherung von PPIX in den Tumoren ergibt. (62)

Nach ausreichender Akkumulation von PPIX im Zielgewebe, kann es in medizinischen Bereichen vor allen Dingen für die folgenden zwei Indikationen genutzt werden: Zum einen fluoresziert PPIX unter blauem Licht (Wellenlänge 400nm) und kann so zur Diagnostik und fluoreszenzgestützten Resektion (FGR) verwendet werden. Zum anderen ist PPIX ein potenter Photosensibilisator, was man sich für die Anwendung der photodynamischen Therapie zu Nutze machen kann. (43)

5-ALA kann sowohl lokal, als auch systemisch appliziert werden. Das Nebenwirkungsprofil ist im Vergleich zu früher verwendeten Photosensibilisatoren deutlich kleiner. So kann es nach systemischer Gabe zu leichter Übelkeit und Erbrechen sowie einem milden Anstieg der Leberenzyme kommen. Eine Photosensibilität der Haut kann für 48 Stunden bestehen (zum Vergleich liegt die Photosensibilität bei Porphyrmer-Natrium im Bereich von 2-6 Wochen). (15)

1.2.3 Anwendung von 5-ALA in der Neurochirurgie

5-ALA findet in vielen medizinischen Bereichen Anwendung. Es wird sowohl zur Photodiagnostik, als auch zur Therapie angewendet. So wird es zum Beispiel für die Fluorendiagnostik bei Tumoren der Haut, der Blase, des Gastrointestinaltrakts und der Lunge genutzt. Für therapeutische Zwecke im Rahmen der PDT wird es vor allem bei der Behandlung von Hauterkrankungen (z.B. Basalzellkarzinom) verwendet. (63)

1.2.3.1 Gliome

Stummer et al. (84) führten 2000 die Anwendung von 5-ALA zur Visualisierung und Behandlung maligner Gliome ein. Das Resektionsausmaß ist unter anderem entscheidend und korreliert sowohl mit dem progressionsfreien Überleben als auch mit der Gesamtüberlebensrate (OAS) bei hochgradigen Gliomen (WHO °III und °IV). Je mehr Tumorgewebe entfernt werden kann, desto länger ist die Überlebenszeit. (28, 46)

5-ALA stellte sich in der Arbeit durch Stummer et al. (87) als geeigneter Photosensibilisator nach systemischer peroraler Applikation in der Photodiagnostik von malignen Gliomen heraus. Es reicherte sich nicht im perifokalen Ödem der Tumoren an, wie es die älteren Sensibilisatoren (HpD, Porphyrmer-Natrium) taten. Somit ist eine ausgedehntere Resektion möglich, ohne gesunde Strukturen zu schädigen. Auf diese Art und Weise ist es möglich geworden, durch fluoreszenzgestützte Resektion das Ausmaß der Tumorresektion zu erhöhen und somit die Überlebenszeit der Patienten zu verlängern und auch ein besseres Ansprechen auf adjuvante Therapien zu ermöglichen. (85)

1.2.3.2 Meningeome

Kajimoto et al. (34) beschreiben, dass nicht nur Gliome, sondern auch fast alle Meningeome eine Fluoreszenz von PPIX nach systemischer Gabe von 5-ALA zeigen. Deshalb schlagen sie die Möglichkeit der fluoreszenzgestützten Resektion auch für Meningeome mit einem erhöhten Rezidivrisiko oder bei Invasion umgebender Strukturen (Venen, Dura, Knochen, Hirngewebe) vor. In dieser kleinen Studie zeigten 20 der 24 Meningeome (83%) intraoperativ eine Fluoreszenz unter blauem Licht (400nm Wellenlänge). Es konnte kein Zusammenhang zwischen vorhandener Fluoreszenz und WHO-Graden gefunden werden. Diese Ergebnisse konnten von Coluccia et al. (14) bestätigt werden. In dieser Fallserie zeigten sich 94% (31 von 33) der Meningeome intraoperativ fluoreszierend. Auch hier konnte keine Korrelation zu WHO-Graden, Proliferationsrate (MIB-1 Index) oder Mitoseindex gefunden werden. Des Weiteren scheint auch ein präoperativ vorhandenes Hirnödem, die Gabe von Dexamethason oder die präoperative Gefäßembolisation keinen Einfluss auf die Fluoreszenz zu haben.

1.2.4 PDT in der Neurochirurgie

Bereits in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden die ersten Anwendungsversuche der photodynamischen Therapie bei hirneigenen Tumoren am Menschen beschrieben. (64) Unter Verwendung von Photosensibilisatoren wie HpD und Porphyrin-Natrium kam es zu starken Nebenwirkungen (zum Beispiel eine 4-6 Wochen andauernde Phototoxizität) und zur Schädigung des gesunden Hirngewebes. Außerdem herrschte ein Mangel an geeigneten Lichtquellen. Daraus ergab sich ein Weiterentwicklungsbedarf auf diesem Gebiet, vor allem bei der Suche nach weiteren geeigneten Photosensibilisatoren. (42, 65, 88)

Nach Etablierung der 5-ALA-basierten fluoreszenzgestützten Resektion in der Gliomchirurgie, wurde in mehreren *in vitro* Experimenten der Effekt der PDT mit PPIX als Photosensibilisator an Gliomzellen untersucht. Erste Versuche an Gliomzelllinien und Spheroidmodellen konnten eine selektive zytotoxische Wirkung der 5-ALA-basierten PDT auf das Tumorgewebe, unter Protektion des umliegenden gesunden Hirngewebes, *in vitro* nachweisen. (29, 61)

Die experimentelle Anwendung *in vivo* am Patienten folgte durch Stepp et al. (82). Es wurde eine intraoperative direkte Bestrahlung mittels PDT durch eine geeignete Lichtquelle und einen entsprechenden Applikator oder die stereotaktische PDT, zum Beispiel bei inoperablen Tumoren, durchgeführt. Eine deutliche Reduktion der initialen PPIX Fluoreszenz von unter 5% nach Durchführung der PDT mit 200 J/cm^2 wurde beschrieben. Ein Einfluss auf die Überlebensrate kann möglicherweise sowohl auf die direkte Tumorreduktion durch die PDT, als auch durch die Entstehung einer besseren Grundlage für weitere adjuvante Therapien zurückgeführt werden. Der Einfluss auf die Überlebensdauer wird in aktuellen prospektiven Studien untersucht, erste Ergebnisse sind vielversprechend. (4, 18) In einem Case-Report konnte eine deutliche Verlängerung des progressionsfreien Überlebens auf 56 Monate nach Behandlung bei einer Patientin mit einem Glioblastom dargestellt werden. (83)

1.3 Ziele dieser Arbeit

Meningeome sind im Allgemeinen chirurgisch gut behandelbare Tumoren. Dennoch stellen maligne Meningeome (WHO °II und °III), rezidivierende WHO °I Meningeome mit aggressivem Wachstumsverhalten und die Beteiligung funktionell wichtiger Strukturen wie Hirnnerven und Gefäße eine therapeutische Herausforderung dar. (54) Daraus ergibt sich die Notwendigkeit neuer und schonender adjuvanter Therapieoptionen.

Die 5- δ -ALA-basierte photodynamische Therapie könnte, nach erfolgreicher Anwendung an Gliomen *in vitro* und ersten vielversprechenden Anwendungen *in vivo*, eine neue Therapiemöglichkeit für rezidivierende, invasiv wachsende und höhergradige Meningeome darstellen.

Bisher gibt es noch wenige Erfahrungen über die Anwendung und Wirkung der 5- δ -ALA-basierten PDT bei Meningeomen.

Als Voraussetzung für die experimentelle Anwendung der PDT muss zuerst eine Methode zur Primärkultivierung von Meningeomen gefunden, weiterentwickelt und etabliert werden, da bis dahin begrenzte Erfahrungen mit meningealen Zellkulturen bestanden.

Die Entwicklung einer solchen Methodik zur Primärkultivierung von Meningeomen und die Untersuchung der Wirksamkeit der 5- δ -ALA-basierten photodynamischen Therapie sind Gegenstand dieser Arbeit.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

PBS	GIBCO® invitrogen, Paisley (UK)
HBSS	GIBCO® invitrogen, Paisley (UK)
DMEM mit Phenolrot	GIBCO® invitrogen, Paisley (UK)
DMEM farblos	GIBCO® invitrogen, Paisley (UK)
FCS (fetales Kälberserum) Standard Quality	PAA Laboratories GmbH, Pausching (Austria)
Penicillin/Streptomycin	GIBCO® invitrogen, Paisley (UK)
Fungizone (Amphotericin B)	GIBCO® invitrogen, Paisley (UK)
GlutaMAX	GIBCO® invitrogen, Paisley (UK)
DMEM-NEAA	GIBCO® invitrogen, Paisley (UK)
Trypsin-EDTA 0,05%/0,02% in PBS	PAA Laboratories GmbH, Pausching (Österreich)
Trypsin-EDTA 0,05% mit Farbindikator	GIBCO® invitrogen, Paisley (UK)
Kollagen Typ 1 Lsg. 0,1%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua ad iniectabilia	DeltaSelect GmbH, Dreieich
5-ALA Pulver	Merck, Darmstadt
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Aceton Ph. Eur.	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
Fixogum Haushaltskleber	Marbu, Tamm
Waschpuffer TBST	DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg
Peroxidase Blocking Solution	Thermo Scientific, Fremont (USA)
Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Membrane Antigen (Primärantikörper)	Dako, Glostrup (Dänemark)
DakoREAL™ EnVision Detection System [= HRP Rabbit/Mouse (Sekundärantikörper), DAB+ Chromogen, Substrate Buffer]	Dako, Glostrup (Dänemark)
Hämalaun	

VE H₂O

Eukitt® Eindeckmittel

Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.2 Verbrauchsmaterial

T75 Kulturflaschen Cellstar®

Greiner Bio-One, Frickenhausen

T25 Kulturflaschen Cellstar®

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Sterile Röhrchen (15mL, 50mL)

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Tips (20µL, 200µL, 1000µL, 10mL)

Eppendorf, Hamburg

Combitips (1=10µL, 1=50µL, 1=100µL)

Eppendorf, Hamburg

Einmalpipetten (5mL, 10mL, 25mL)

[Costar® Stripette®]

Corning Inc., New York (USA)

Petrischalen Nunc®

Thermo Fisher Scientific, Roskilde
(Dänemark)

Pasteurpipetten aus Glas

Brand GmbH, Wertheim

96-Well-Platten Cellstar®

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Deckgläser

Objektträger HistoBond®

Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen

Homogenisator

Sartorius Stedim Biotech, Göttingen

2.1.3 Geräte

CO₂ Inkubator

BINDER GmbH, Tuttlingen

Sterilbank

Heraeus, Hanau

Zentrifuge (Universal 30R, Radius 145mm)

Hettich, Tuttlingen

Wasserbad

Köttermann, Uetze/Hänigsen

Thermomixer comfort

Eppendorf, Hamburg

Mikroskop Olympus CK2

Olympus, Hamburg

ELISA Reader 680XR microplate

Bio-Rad, München

PC

PDT Laser CeraLas 635

BioLitec AG, Jena

Lichtleiter „Frontal Light Distributor FD1”

MedLight S.A., Eclubens (Schweiz)

Pipettor

Hirschmann, Eberstadt

Feuchtkammer

Kühlschrank
Tiefkühlschrank

Liebherr, Bulle (Schweiz)
National Lab GmbH, Mölln

2.2 Methoden

Studiennummer 4213 der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

2.2.1 Anlegen einer Primärkultur

Die verwendeten Meningeompräparate wurden intraoperativ in der neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf der HHU gewonnen. Die Weiterverarbeitung erfolgte im neurochirurgischen Forschungslabor derselben Klinik.

Als Basis zur Präparation und Verarbeitung der Meningeome wurde die Methode von Hardy et al. (23) verwendet. Im Rahmen der Etablierung wurde diese von uns weiterentwickelt und modifiziert (siehe Ergebnisteil).

Nach chirurgischer Tumorentfernung erfolgt die Aufbewahrung und der Transport des gewonnenen Materials in einem sterilen, mit 30ml Transportmedium gefüllten, Falconröhrchen. Als Transportmedium wird das Kulturmedium [DMEM-NEAA mit folgenden Zusätzen: 10% FCS, Penicillin (100U/ml)/Streptomycin (100µg/ml), Amphotericin B (2,5µg/ml), 4mM GlutaMAX] verwendet. Bis zur Weiterverarbeitung werden die Präparate bis zu 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert.

Die Präparation erfolgt jeweils unter sterilen Bedingungen in einer Zellkulturbank. Zunächst wird das Tumorpräparat zweimal in HBSS gewaschen und danach mit chirurgischer und anatomischer Pinzette sowie einem Skalpell von makroskopisch sichtbaren Gefäßen und eventuell anhaftenden Teilen der Dura mater separiert. Nach einem erneuten Waschvorgang in HBSS wird das Gewebe mittels Skalpell in möglichst kleine Stücke zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wird in ein 50ml Falconröhrchen überführt, einmal mit 41g (500 rpm) für 4 Minuten zentrifugiert und erneut gewaschen. Im Anschluss erfolgt die Inkubation für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad mit 2ml Trypsin 0,05% mit Farbindikator. Durch Zugabe von 4ml Kulturmedium wird die Trypsinreaktion beendet und das entstandene Zellpellet für 6 Minuten mit 41g zentrifugiert. Das so gewonnene Zellsediment wird zweifach mit 20ml HBSS gewaschen und jeweils erneut zentrifugiert. Zum Schluss wird das Zellpellet in 4ml

Kulturmedium aufgefangen und in eine mit Kollagen Typ 1 0,01% beschichtete T25 Kulturflasche zur Inkubation in den CO₂ Inkubator überführt. Eine mikroskopische Kontrolle erfolgt am darauffolgenden Tag.

2.2.2 Beschichtung der Zellkulturflaschen mit Kollagen Typ 1 0,01%

Wie bei Hardy et al. beschrieben, werden die T25 Kulturflaschen, in die das frisch präparierte Zellmaterial überführt wird, mit Kollagen Typ 1 0,01% beschichtet. Dafür wird eine Kollagen Typ 1 0,1% (1mg/ml) Lösung mit PBS 1:10 verdünnt. Von dieser 0,01% (100µg/ml) Lösung werden 2-3ml in eine T25 Kulturflasche gegeben und verteilt bis der ganze Boden benetzt ist. Es folgt eine einstündige Inkubation bei 37°C im CO₂-Inkubator. Daraufhin wird die Kollagenlösung abgezogen und der Flaschenboden mit PBS gewaschen. Bis zur Verwendung werden die Flaschen mit 5 ml PBS befüllt und im Inkubator gelagert.

2.2.3 Kultivierung der Primärzellen als Monolayer

Die primärkultivierten Meningeomzellen werden als Monolayer kultiviert. Als Kulturmedium wird DMEM [Dulbecco's modified Eagles Medium inklusive NEAA, mit Glukose, ohne Glutamin), 10% FCS (fetales Kälberserum), GlutaMAX (4mM), Penicillin (100U/ml)/Streptomycin (100µg/ml) und Fungizone (2,5µg/ml Amphotericin B)] verwendet. Das Wachstumsverhalten und der Konfluenzgrad werden täglich mikroskopisch beurteilt.

Sind in den ersten beiden Tagen nach Präparation bereits erste festgesetzte Zellen und Zellinseln sichtbar, so wird ein Teil des überschüssigen Mediums mit noch nicht angewachsenem Zellpellet in eine frische, mit Kollagen Typ 1 beschichtete, T25 Kulturflasche überführt, um mehr Zellmaterial gewinnen zu können.

Bei einer Konfluenz von 70% oder beim Vorhandensein von zu zellreichen Zellinseln bzw. -clustern werden die Zellen passagiert.

2.2.4 Passagierung der Zellen

Das Passagieren der Zellen, zum Beispiel von einer T25 in eine T75 Kulturflasche, erfolgt, indem der Zellrasen mit PBS gewaschen wird und dann mit Trypsin 0,05%

benetzt wird. Es erfolgt eine dreiminütige Inkubation im CO₂-Inkubator bei 37°C. Danach wird das Trypsin durch Zugabe von FCS-haltigem Kulturmedium inhibiert. Die verwendete Trypsinmenge richtet sich nach der Kulturflaschengröße: 1ml bei T25 und 3ml bei T75. Die gewonnene Zellsuspension kann nun in eine neue Flasche überführt werden oder in einem definierten Verhältnis gesplittet werden.

2.2.5 Einfrieren und Auftauen

Zur Vorbereitung auf das Einfrieren der Zellkulturen werden die Zellen nach dem vorbeschriebenen Verfahren trypsinisiert. Die entstandene Zellsuspension wird in ein 15ml Falconröhrchen überführt und dann für 5 Minuten mit 162g (1000 rpm) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet am Boden wird mit Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium besteht wahlweise aus anteilsweise 90% DMEM + 10% DMSO oder aus 90% FCS + 10% DMSO. Letzteres dient dem schonenderen Einfrieren der Zellen. Nun wird jeweils 1ml dieser Suspension auf vorgekühlte Kryoröhrchen verteilt. Diese werden bei -80°C eingefroren und nach 1-2 Wochen in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

Beim Auftauvorgang werden zuerst 10ml Kulturmedium in ein 15ml Falcon vorpipettiert. Danach werden die Kryoröhrchen in der Hand oder im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, bis keine Eiskristalle mehr sichtbar sind. Der Inhalt wird in das mit Medium gefüllte Falconröhrchen pipettiert, gut gemischt und dann für 5 Minuten bei 162g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 5ml vorgewärmtem Kulturmedium aufgefangen, um dann in eine mit 15ml Medium befüllte T75 Kulturflasche überführt zu werden. Es folgt die Inkubation bei 37°C im CO₂ Inkubator.

2.2.6 Gewinnung und Fixierung von Zellmaterial für die Immunhistologie

Für den immunhistochemischen Nachweis der EMA-Expression (EMA: epitheliales Membranantigen) der Primärzellen werden ein Teil der Zellen innerhalb der ersten Passagen in eine Petrischale überführt. Diese Petrischale enthält auf dem Boden ein Deckglas. Nachdem dieses Deckglas nach 1-3 Tagen mit einem Zellrasen überwachsen ist, wird es für 10 Minuten bei -20°C in Aceton fixiert und danach für 15-20 Minuten

luftgetrocknet. Das getrocknete Deckglas wird mit Fixogum auf einen Objektträger geklebt, der dann für die immunhistochemische Färbung verwendet werden kann. Wenn die Deckgläser nicht direkt gefärbt werden, können sie bei -20°C eingefroren gelagert werden.

2.2.7 Immunhistochemischer Nachweis der EMA-Expression

Problem bei der Verwendung von Primärkulturen ist gleichzeitige Anzucht und eventuelle Überwucherung der Primärzellen durch Fibroblasten. So bestand die Notwendigkeit, einen immunhistochemischen Marker zu finden, mit dessen Hilfe es möglich ist, die gewonnenen Primärzellen weitestgehend von Fibroblasten differenzieren zu können. So wird zum Beispiel das Intermediärfilament Vimentin sowohl von meningealen Zellen, als auch von Fibroblasten exprimiert und ist nicht zur Differenzierung geeignet. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Neuropathologie entschieden wir uns für den Nachweis der EMA-Expression, da dies regelmäßig von Meningeomen exprimiert wird und nicht als Expressionsmarker für Fibroblasten gilt.

Die EMA-Expression der Primärzellen wird mit Hilfe einer Polymerkonjugat-Methode (Dako REAL™ EnVision™ Detection System) immunhistochemisch nachgewiesen und visualisiert. Die Methode basiert auf einer indirekten Zweischritt-Methode. Zuerst bindet ein unkonjugierter Primärantikörper, in diesem Fall ein monoklonaler Mäuseantikörper, gegen das humane epitheliale Membran Antigen (EMA). Daraufhin bindet ein gegen Mäuseantikörper gerichteter Sekundärantikörper an den Primärantikörper. Im Falle des EnVision™ Systems handelt es sich um ein peroxidasekonjugiertes Polysaccharid-Polymer, dass auch den Sekundärantikörper enthält. (siehe Abbildung 2) Die erfolgreiche Antikörperbindung wird durch die Substrat-Chromogenlösung (Dako REAL™ DAB+ Chromogen 1:50 verdünnt mit Dako REAL™ Substrate Buffer) sichtbar gemacht.

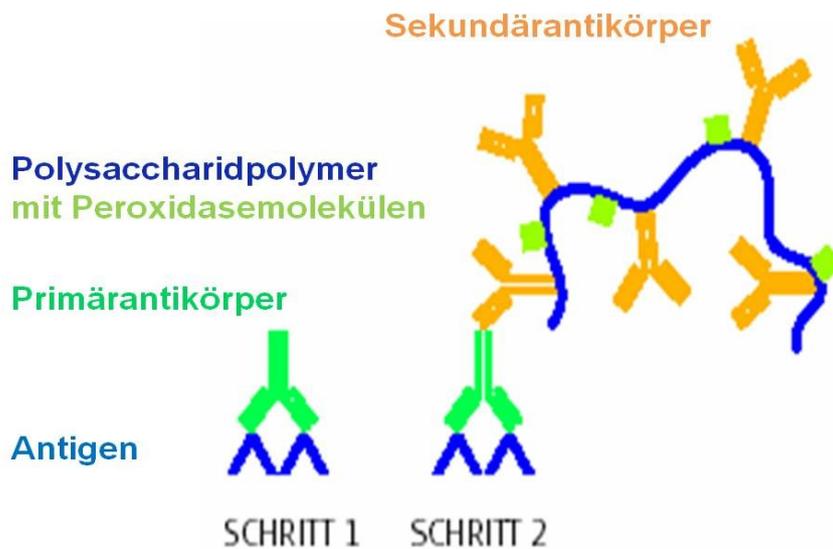


Abbildung 2: EnVision™ Methode (modifiziert nach: Boenisch T. Handbuch immunhistochemische Färbemethoden. 3. Auflage. DakoCytomation GmbH Hamburg; 2003)

2.2.8 Immunhistochemische Färbung mit dem EnVision™ System

Zunächst werden die Objektträger mit Waschpuffer (Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20 (TBST), Thermo Scientific) befeuchtet. Daraufhin wird das Präparat für 10 Minuten mit der Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Der Objektträger wird mehrmals mit Waschpuffer gewaschen. Es folgt die Inkubation mit dem Primärantikörper (EMA) über 30 Minuten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Dieser wurde zuvor 1:200 mit Dako REAL™ Antibody Diluent verdünnt. Nach erneutem Waschen mit dem Waschpuffer erfolgt die dreißigminütige Inkubation mit der EnVision™-Polymerlösung (Sekundärantikörper) bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer. Hiernach sind weitere Waschvorgänge mit Waschpuffer notwendig. Nun werden die Objektträger für 4-6 Minuten mit der Substrat-Chromogenlösung inkubiert. Daraufhin werden die Präparate mit demineralisiertem Wasser gewaschen und mit Hämalaun gegengefärbt. Danach erfolgt eine Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Ethanol). Nach Entfernen des zur Fixierung der Deckgläser verwendeten Klebers, werden diese mit Eukitt® eingedeckt.

2.2.9 Versuchsanordnung und Aussähen der Zellen auf eine 96-Wellplatte

Die 96-Wellplatten wurden für den WST-1 Assay immer nach demselben Muster ausgesäht. (siehe Abbildung 3)

Für die Zellzählung werden die Zellen trypsinisiert und in farblosem Medium, das alle Zusätze enthält, aufgefangen. Die Zählung wird mit Trypanblau (1:2 mit PBS) in einer Neubauer improved Zählkammer durchgeführt. Daraufhin wird eine Ziellösung mit 5000 Zellen in 100µl Medium angesetzt. Nun folgt die Befüllung der Wellplatte.

Die Randbefüllung beträgt 200µl PBS pro Well. Die BLANK-Spalte wird mit 100µl farblosen Medium befüllt. Sowohl in die Standard-Wells als auch in die Wells der Bestrahlungs- bzw. Versuchsblöcke werden 100µl der definierten Ziellösung gegeben. Das entspricht 5000 Zellen pro Well. Die Platte wird nun für ungefähr 48 Stunden in den CO₂ – Inkubator gegeben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	PBS
	BLANK (farbloses Medium)
	Standardzellen = Negativkontrolle (5000 Zellen/Well)
	Bestrahlungsfelder

Abbildung 3: Versuchsanordnung auf der 96-Wellplatte

2.2.10 Inkubation der Zellen mit 5-ALA

Zunächst muss eine 5-ALA Stammlösung aus 500mg 5-ALA Pulver und 10ml Aqua dest. unter sterilen Bedingungen hergestellt werden. Daraufhin werden die 5-ALA Ziellösungen mit der gewünschten 5-ALA Verdünnung angesetzt. Diese wird dreifach konzentriert, da sich bereits 100µl Medium in den Wells befinden und im weiteren 50µl der ALA-Lösung hinzugegeben werden (=150µl Gesamtvolumen pro Well). Dafür wird ein mit Alufolie umwickeltes Falconröhrchen mit 50ml farblosem DMEM, das keinerlei Zusätze enthält, befüllt. Bei einer gewünschten ALA-Konzentration von z.B. 50µg/ml werden dafür zuerst 150µl Medium herauspipettiert und durch 150µl 5-ALA-Stammlösung ersetzt.

Nun werden in die Wells der BLANK- und der Standardspalte jeweils 50µl farbloses Medium gegeben. In die Versuchsblöcke werden 50µl der jeweils verwendeten ALA-Ziellösung gegeben. Es folgt eine vierstündige Inkubation im CO₂-Inkubator. Während des Arbeitens wird die Wellplatte möglichst vor direkter Lichtexposition geschützt (Umwicklung der Wellplatten nach Befüllung mit Alufolie).

2.2.11 Prinzip und Aufbau der PDT

Die für die photodynamische Therapie (PDT) verwendete Bestrahlungsvorrichtung wurde für vorhergehende Experimente an Gliomzelllinien in unserem Forschungslabor in Zusammenarbeit mit der Firma Welabo entwickelt und bereits für mehrere Versuchsreihen verwendet. (siehe Abbildung 4 auf Seite 23)

Für die PDT wurde das Ceralas 635 Lasersystem der Firma BioLitec GmbH verwendet. Dies ist ein Diodenlaser, der Lichtenergie mit einer Wellenlänge von 635nm abgibt. Als Lichtleiter wurde eine Glasfaser mit Diffusorlinse gewählt, sodass das Licht als Kegel abgegeben wird und somit eine gleichmäßige Belichtung der Bestrahlungsfelder auf der 96-Well-Platte gewährleistet ist. Aufgrund des kegelförmigen Lichtstrahls, kann es neben den Bestrahlungsfeldern zu einer Streustrahlung kommen. Damit diese die Ergebnisse nicht verfälscht, werden bei der Versuchsanordnung auf der Well-Platte immer zwei Wellreihen zwischen den Blöcken frei gelassen.

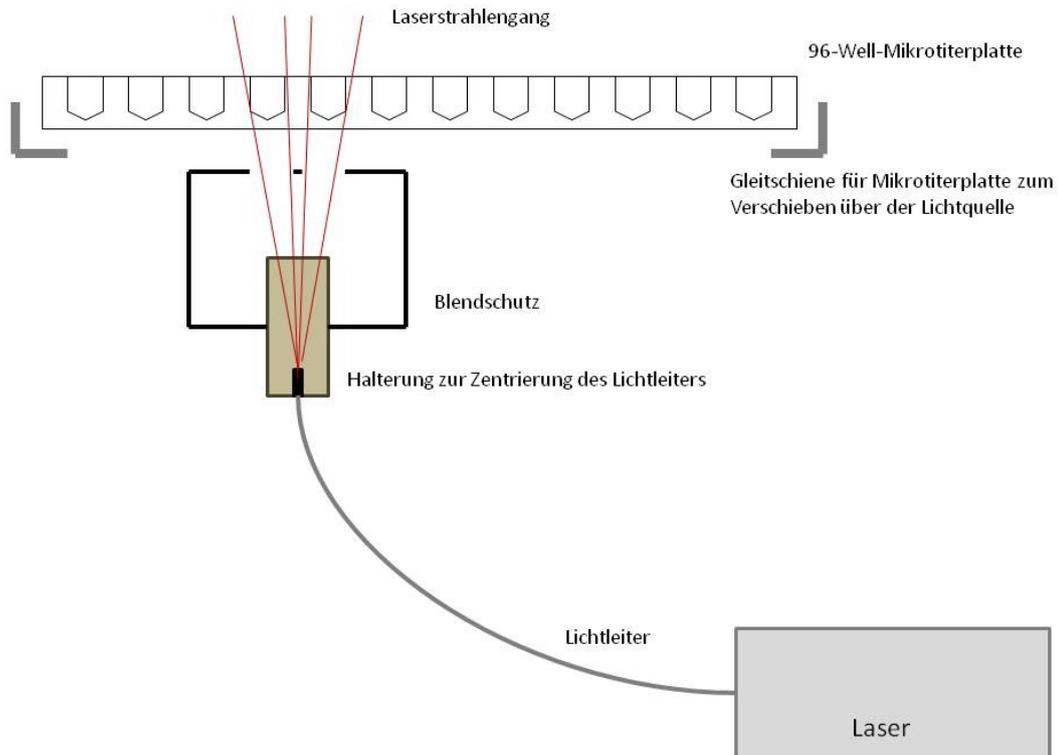


Abbildung 4: Bestrahlungseinrichtung

2.2.12 Durchführung der PDT

Für die PDT an den primären Meningeom-Zellkulturen wird ein bereits an vorhergehenden Experimenten in unserem Labor entwickeltes Protokoll verwendet. Der Laser gibt Lichtenergie mit einer Wellenlänge von 635 nm ab. Die Lichtquelle hat durch die Vorrichtung einen konstanten Abstand von 9,3 cm zu den bestrahlten Zellen in den Wells, wodurch sich ein Lichtkegel mit einer Fläche von ca. 30 cm² bildet. Die bestrahlten Wells nehmen eine Fläche von ca. 1 cm² ein. Bei einer gewählten Leistung von 1 Watt, erzielt man bei dieser Entfernung der Lichtquelle eine Bestrahlungsstärke von ca. 30 mW/cm². Als Bestrahlungsdauer werden 625 Sekunden gewählt. Daraus ergibt sich eine abgegebene Bestrahlungsdosis von 18,75 J/cm² in den Bestrahlungsblöcken.

Nachdem alle für den jeweiligen Versuch verwendeten Bestrahlungsblöcke der 96-Well-Platte bestrahlt worden sind, wird diese wieder für 90 Minuten in den CO₂-Inkubator gegeben, bevor der WST-1 Assay durchgeführt wird.

2.2.13 WST-1 Cell Proliferation Assay

Der WST-1 Assay ist ein nicht-radioaktiver, photometrisch messbarer Assay zur Beurteilung von Proliferation, Wachstum und Überleben in Zellpopulationen. Er kann zur Analyse von Zytotoxizität verwendet werden.

Der Test basiert auf der Spaltung des zartrotten Tetrazoliums Salzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolium]-1,3-benzoldisulfonat) in das dunkelrote Formazan durch zelluläre Enzyme lebender Zellen (siehe Abbildung 5).

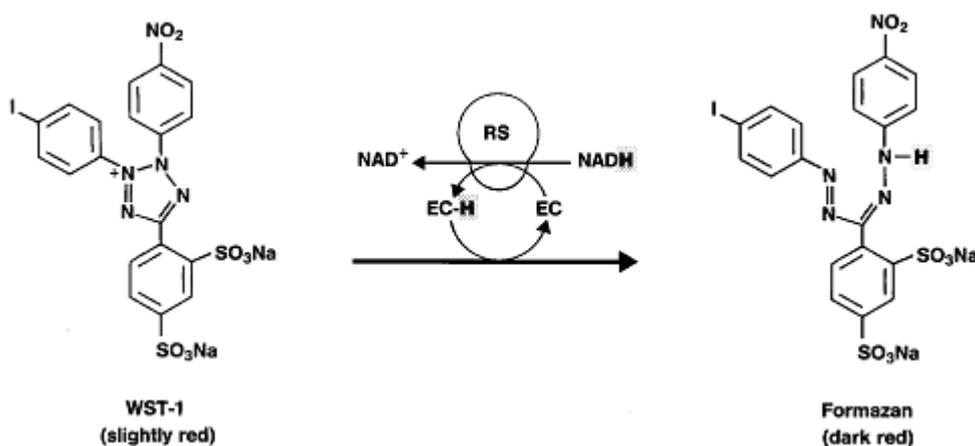


Abbildung 5: Umwandlung von WST-1 zu Formazan (aus: Cell Proliferation Reagent WST-1 Product information. Version Oktober 2007. Roche Diagnostics GmbH Mannheim, 2007)

Die zunehmende Konzentration an Formazan korreliert direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen in der Zellkultur. Eine Quantifizierung der entstandenen Formazanfärbung und somit der Menge an vorhandenen vitalen Zellen wird mit einem ELISA Reader bei entsprechenden Wellenlängen durchgeführt. (Roche Applied Science, Version Oktober 2007)

2.2.14 Durchführung WST-1 Assay

Für die Durchführung des WST-1 Assays wird die zuvor mit 5-ALA inkubierte und mit PDT behandelte 96-Wellplatte verwendet. In jedes Well der Blank-Spalte, der Standard-Spalte und in alle Wells der vier Versuchsblöcke werden jeweils 20µl WST-1 Reagenz

mit einer Multipette unter Verwendung von 1=10µL Combitips pipettiert. Daraufhin wird die Platte für 1 Minute bei 800 rpm im Thermomix gemischt.

Nach einer Inkubationszeit von 30-45 Minuten und wiederholter Mischung im Thermomix wird die Absorption des entstandenen Formazans mit Hilfe eines Microplate ELISA Readers ausgelesen. Für die Messung der Formazanabsorption wird eine Wellenlänge von 450 nm und als Referenzwert eine Wellenlänge von 655 nm verwendet.

Die Berechnung des Anteils der überlebenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen im Standard wurde mittels der erreichten Extinktion im WST-1-Assay durchgeführt.

Überlebende Zellen (in %)= $(\text{Extinktion}_{\text{Testansatz}} : \text{Extinktion}_{\text{Kontrolle}}) \times 100$

2.2.15 Auswertung

Für die Auswertung der erhobenen Daten wurde das Programm PASW Statistics 18 (IBM Corporation, Somers USA) verwendet. Die Graphiken wurden in Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond USA) erstellt.

Die statistische Auswertung wurde mittels Chi-Quadrat-Test, Student's t-Test, Kruskal-Wallis-Test und einer einfaktoriellen ANOVA durchgeführt.

Der Signifikanzwert (p-Wert) wird bei $p < 0,05$ als signifikant und bei $p < 0,01$ als hoch signifikant angesehen. Die Ergebnisse werden immer als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Primärkultivierung von Meningeomen

3.1.1 Klinische Daten

Insgesamt wurde Tumormaterial von 44 Patienten gewonnen und weiterverarbeitet. Hiervon waren 17 männlich (38,6%) und 27 weiblich (61,4%). Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der OP betrug 57,9 Jahre (Spannweite von 30-82 Jahre).

Bei den für die Primärkultivierung verwendeten Meningeomen wurden 33 als benigne (WHO ° I), 8 als atypisch (WHO ° II) und 2 als anaplastisch (WHO ° III) klassifiziert. In einem Fall handelte es sich um eine Metastase eines Adeno-Karzinoms und führte zum Ausschluss aus der Untersuchung. Tabelle 5 zeigt die Häufigkeitsverteilung der histologischen Subtypisierung der verwendeten Meningeome. Eine Tabelle mit genaueren klinischen Daten der Patienten befindet sich im Anhang. (Tabelle 1 im Anhang)

Tabelle 5: Histologische Subtypen der verwendeten Meningeome

WHO ° I (76,7%)	meningothelial	16/43
	transitionell	10/43
	fibroblastisch	3/43
	psammomatös	2/43
	angiomatös	2/43
WHO ° II (18,6%)	atypisch	8/43
WHO ° III (4,7%)	anaplastisch	2/43

Bei der Verwendung der Präparate für die Primärkultivierung wurde nicht zwischen Erstdiagnose und Rezidiv unterschieden. Bei vier Patienten wurde eine FGR durchgeführt, sodass diese bereits präoperativ 5-ALA erhalten haben.

3.1.2 Entwicklung der Methode

In der Literatur werden nur begrenzte Erfahrungen mit der Primärkultivierung von Meningeomen berichtet. Hardy et al. (23) beschrieben in ihrer Arbeit schrittweise die

Kultivierung von primären Meningeomzellen. Dieses Protokoll wurde als Grundlage für die ersten Versuche der Primärkultivierung verwendet.

Das in der Arbeit von Hardy et al. beschriebene Protokoll sah wie folgt aus:

- Modifizierung 1** 1. Aus operativ entfernten Tumoren wird Meningeomgewebe
- Modifizierung 6** gewonnen, um dies weiter zu verarbeiten.
2. Als Auffangmedium dient PBS mit 5% FCS.
3. Unter sterilen Bedingungen werden Blutgerinnsel und Gewebsreste mittels eines Skalpells entfernt.
4. Das Restgewebe wird mehrmals in HBSS gewaschen.
5. Das Tumormaterial wird in kleinste Stück von ca. 1mm³ zerkleinert.
6. Die Tumorstücke werden nun mit einem Glashomogenisator
- Modifizierung 3** vorsichtig homogenisiert.
7. Das entstandene Zellpellet wird in HBSS gewaschen und zentrifugiert.
8. Nun erfolgt eine enzymatische Digestion mit Trypsin für 30 Minuten bei 37°C.
- Modifizierung 2** 9. Die enzymatische Reaktion wird durch die Hinzugabe von
- Modifizierung 5** Kulturmedium beendet. Als Kulturmedium wurde DMEM verwendet, welches mit 20% FCS, Glutamin, Penicillin, Streptomycin und Gentamycin versetzt wurde.
10. Unverdautes Gewebe unter Schwerkraft für 3-5 Minuten sedimentieren lassen.
11. Überschüssige Lösung absaugen und das Zellpellet erneut zentrifugieren.
12. Zellpellet zweimal in HBSS waschen.
- Modifizierung 4** 13. Zellen in Kulturmedium resuspendieren und in 80cm² Kulturflaschen
- Modifizierung 7** geben, welche mit 0,01% Kollagen Typ 1 beschichtet sind.

In den ersten Versuchen wurde auf die Beschichtung mit Kollagen verzichtet. Das übrige Protokoll wurde wie oben beschrieben übernommen. Im Rahmen der ersten Anwendungen wurde diese Methodik schrittweise geringfügig modifiziert, um das Zellwachstum zu optimieren. Nachfolgend werden die einzelnen Modifizierungen (1-7) in chronologischer Reihenfolge erläutert.

Zum Erhalt der Vitalität der Proben nach operativer Entnahme bis zur Aufbereitung verwendeten wir initial DMEM versetzt mit 5% FCS als Transportmedium (Modifizierung 1). Als Kulturmedium diente DMEM mit 10% FCS, Penicillin (100U/ml)/ Streptomycin (100µg/ml) und 2mM Glutamin. Auf Grund der ausgeprägten Toxizität verzichteten wir im weiteren Verlauf auf die Verwendung von Gentamycin als Antibiotikum (Modifizierung 2). In den ersten Versuchen verwendeten wir analog zu Hardys Protokoll einen Glashomogenisator zur Auftrennung des Tumormaterials. Dabei zeigte sich ein nur mäßiger Erfolg, da es durch die Homogenisierung zu einer ausgeprägten Schädigung der Zellen kam. In den Folgeversuchen wurde auf die Verwendung des Homogenisators verzichtet (Modifizierung 3).

In den nächsten Präparationen haben wir schrittweise die Verarbeitung modifiziert. So wurden zum Beispiel weitere Waschvorgänge hinzugefügt und die Zentrifugationsparameter variiert. Des Weiteren haben wir ab dem vierten Präparat die Kulturflaschen mit 0,01% Kollagen Typ 1 beschichtet, um dem Zellpellet eine bessere Adhärenz zu ermöglichen (Modifizierung 4), da sich in den ersten Versuchen kein oder nur ein geringes Anheften der Zellen an den Boden der Kulturflaschen gezeigt hatte. Auf diesen Schritt hatten wir wegen der unklaren Bedeutung zuvor verzichtet. Die Beschichtung führte dazu, dass dieser vierte Ansatz zum ersten Mal erfolgreich war und es uns möglich war, die Zellen soweit zu züchten, damit diese passagiert werden konnten (siehe auch 3.1.3).

Gemeinsam mit dem Institut für Neuropathologie der Uniklinik Düsseldorf wurden nun von jedem erfolgreichen Ansatz Zellen für eine immunhistochemische Färbung des epithelialen Membranantigens (EMA) gewonnen, als Nachweis für die meningeale Herkunft der in Kultur gewachsenen Zellen (siehe 3.1.4).

Da sich die beiden nach dem ersten Erfolg folgenden Ansätze als EMA-negativ darstellten, wurden weitere Modifizierungen im Protokoll notwendig. So wechselten wir das Grundmedium, welches nun zusätzlich nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA) enthielt. Desweiteren ersetzten wir Glutamin durch GlutaMax[®], da dieses ein stabilerer Glutaminlieferant ist und beim Abbau keine Ammoniumverbindungen entstehen, welche eventuell toxisch auf die Zellen wirken könnten. (11) Außerdem ergänzten wir das Kulturmedium für eine antimykotische Abdeckung um Amphotericin B (Modifizierung 5). Von nun an wurde das neue Kulturmedium auch als Transportmedium verwendet (Modifizierung 6). Bei der Primärkultivierung änderten wir die verwendete Kulturflaschengröße (25cm²) und die Mediummenge, die zum

frischen Ansatz in die Kulturflaschen gegeben wurde. Diese wurde von 7ml auf 4ml reduziert. Wir erhofften uns durch den größeren Kontakt zum Flaschenboden eine erleichterte Adhärenz für die Zellen (Modifizierung 7).

Infolge dieser Modifikationen gelang im neunten Versuch (M7) die erste erfolgreiche Anzuchtung einer Primärkultur. In den nächsten Reproduktionen zeigten sich ähnlich gute Ergebnisse, sodass wir dieses Protokoll (beschrieben in 2.2.1) als Standard festlegten. Ab dem siebzehnten Ansatz (M15) erfolgten die ersten 5-ALA-PDT-Versuche (siehe 3.2).

In Tabelle 6 ist der Etablierungs- und Optimierungsverlauf bzw. die einzelnen Schritte noch einmal tabellarisch gegenübergestellt.

Tabelle 6: Zusammenfassung des Etablierungs- und Optimierungsverlaufs

Modifizierung	Protokoll von Hardy et al.	Vorläufiges Protokoll	Endgültiges Protokoll
Transportmedium	PBS + 5% FCS	DMEM + 5% FCS	Transportmedium = Kulturmedium (s. u.)
Kulturmedium	DMEM + 20% FCS + Glutamin	DMEM + 10% FCS + Glutamin	DMEM + 10% FCS + GlutaMax + NEAA
Antimikrobielle Zusätze	Penicillin Streptomycin Gentamycin	Penicillin Streptomycin	Penicillin Streptomycin Amphotericin B
Kollagenbeschichtung	Typ I 0,01%	Keine	Typ I 0,01%
Aufbereitung des Tumors	Zerkleinerung mit Glashomogenisator	Zerkleinerung mit Glashomogenisator	Keine Homogenisierung
Größe der Kulturflaschen	80cm ²	75cm ²	25cm ²

Insgesamt wurde das Protokoll an 36 Präparaten (M7-M42) angewendet. Von diesen Ansätzen waren 33 erfolgreich und 3 scheiterten. Als Ursache für diese Misserfolge in der Anzuchtung konnten wir verschiedene Gründe identifizieren: Im ersten Fall, war das OP-Präparat sehr stark koaguliert worden und enthielt große Anteile der Dura mater. Im zweiten Fall mussten wir den Ansatz wegen bakterieller Kontamination verwerfen. Nur im dritten Fall konnten wir keine mögliche Ursache erkennen.

Abbildung 6 demonstriert einige mikroskopische Beispiele für das Wachstumsverhalten und die Zellmorphologie bei erfolgreicher Anzuchtung.

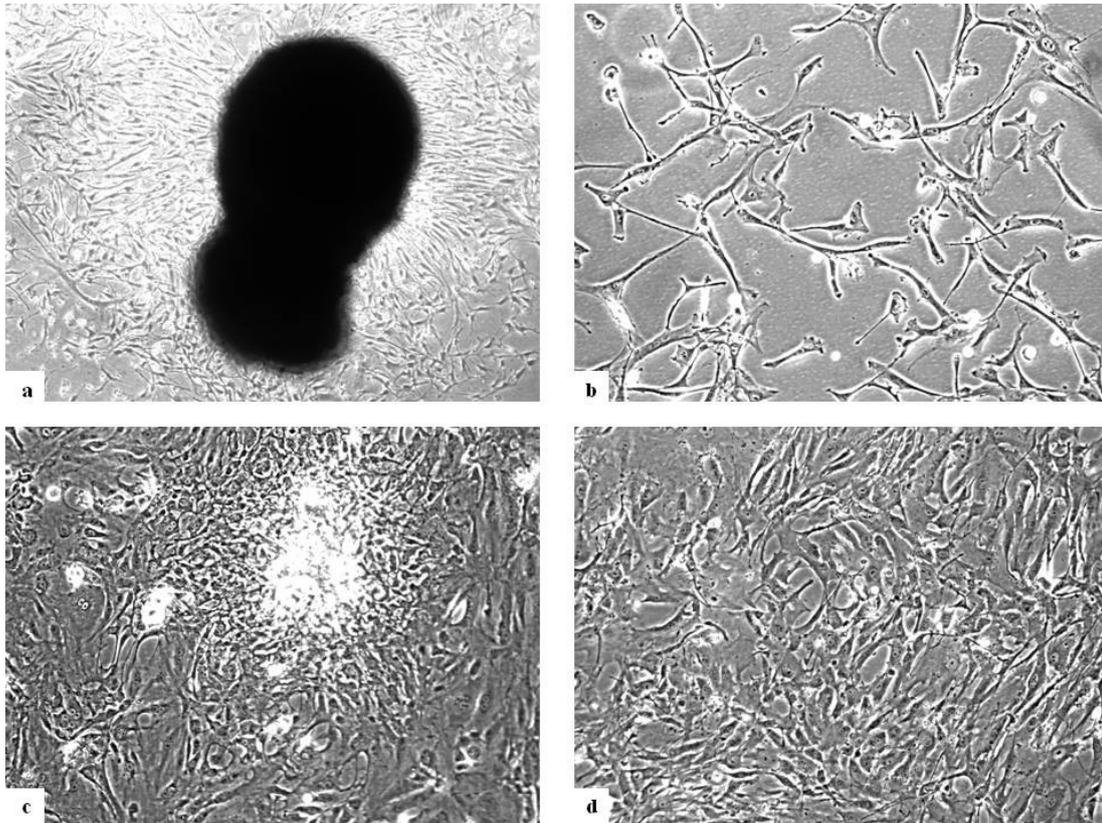


Abbildung 6: Mikroskopische Wachstumsbeispiele für Primärzellen: (a) festgesetztes Tumorstück mit auswandernden Zellen 5 Tage nach Präparation (Vergrößerung 3x); (b) vereinzelte Zellen einen Tag nach P1 (Vergrößerung 20x); (c) dicht gewachsene Zellinsel kurz vor P1 (Vergrößerung 10x); (d) Zellrasen zwei Tage nach P2 (Vergrößerung 10x)

3.1.3 Versorgung der Primärkultur

Nach erfolgter Präparation wurden die T25 Kulturflaschen mit dem enthaltenen Zellpellet über Nacht in den Brutschrank gegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt. Wenn am ersten oder zweiten Tag bereits festgesetzte Zellen zu erkennen waren, wurde das überschüssige Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert und dieses in weitere T25 Flaschen gegeben, um die Zellausbeute zu erhöhen. Bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens oder bei Entstehung von dichten Zellinseln konnte die erste Passage durchgeführt werden. Hierbei wurden die Zellen in eine T75 Kulturflasche überführt. Bei zu dicht wachsenden Zellclustern wurde eine verminderte Zellvermehrung beobachtet. Sobald die Zellen auch in der T75 Flasche konfluent wuchsen, konnten diese für Versuche (siehe 3.2) verwendet werden. Weiterhin beobachteten wir die Vitalität und Qualität der Zellen über mehrere Passagen in Abhängigkeit von der Zeit.

Parallel zu den Hauptversuchen wurden einige Einzelversuche durchgeführt, um systematische Einflussfaktoren auf den Erfolg der Primärkultivierung und den Zeitpunkt der ersten Passage zu identifizieren. Hierzu zählten die Lagerungstemperatur, die Lagerungsdauer und die Kollagenbeschichtung der Kulturflaschen. Diese Versuche hatten rein exemplarischen Charakter und die Ergebnisse sind nicht repräsentativ.

A) Lagerungstemperatur des OP-Präparats

Zu klären war, ob die während der OP entnommenen Präparate bei 4°C im Kühlschrank oder bei 20°C Raumtemperatur gelagert werden sollten. Dies wurde relevant, nachdem zwei der ersten Präparate (M2 und M4) im Kühlschrank gelagert wurden und die darauf folgende Anzuchtung nicht erfolgreich war.

Daraufhin wurde im Rahmen eines Einzelversuchs ein Teil des OP Präparats bei 20°C Raumtemperatur (M6 A) und ein Teil bei 4°C im Kühlschrank (M6 B) gelagert. Im Anschluss erfolgte die identische Verarbeitung nach dem aktuellen Protokoll. Es zeigte sich, dass die Kultivierung bei dem im Kühlschrank gelagerten Material nicht erfolgreich war, wobei es nach Lagerung bei Raumtemperatur zu einem ausreichenden Zellwachstum kam. Eine Übersicht der Daten liefert Tabelle 7.

Folgend wurden alle weiteren Präparate bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 7: Einfluss der Lagerungstemperatur auf den Kultivierungserfolg (Einzelversuch an M6)

	M6	
	A (20°C)	B (4°C)
Sichtbar adhärenente Zellen	Tag 3	-
erste Passage	Tag 17	-

B) Lagerungsdauer des OP-Präparats

Die Frage nach der möglichen Lagerung über Nacht wurde ebenfalls durch einen Parallelversuch (M5) untersucht. Die eine Hälfte des gewonnenen Tumormaterials wurde direkt postoperativ weiterverarbeitet (M5a) und die andere Hälfte 24 Stunden später (Lagerung bei Raumtemperatur) (M5b). Die Kultivierung zeigte, dass es keinen gravierenden Unterschied im Anwachsen zwischen beiden Präparaten gab. In beiden Flaschen waren nach drei bzw. vier Tagen die ersten Zellen sichtbar. Die erste Passage

konnte bei M5a nach zwölf Tagen und bei M5b nach elf Tagen durchgeführt werden. (siehe Tabelle 8)

In 16 von 36 Fällen erfolgte die Präparation am OP-Tag, 19 wurden am ersten postoperativen Tag verarbeitet und ein Präparat sogar erst am zweiten postoperativen Tag. Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich, dass die Lagerungsdauer keinen signifikanten Einfluss auf den Zeitpunkt der ersten Passage hatte ($p=0,398$).

Tabelle 8: Einfluss der Lagerungsdauer auf den Kultivierungserfolg (Einzelversuch an M5)

	M5	
	A (OP-Tag)	B (1. Tag post-OP)
Sichtbar adhärente Zellen	Tag 3	Tag 4
erste Passage	Tag 12	Tag 11

C) Beschichtung der Kulturflaschen mit Kollagen

Hardy et al. verwendeten kollagenbeschichtete Kulturflaschen. In den ersten Versuchen benutzten wir unbeschichtete Kulturflaschen und beobachteten eine verzögerte Adhärenz und Anwachsen der Zellen im Vergleich zu den Angaben von Hardy et al..

Exemplarisch erfolgte in zwei Parallelversuchen die Untersuchung des Einflusses der Verwendung von kollagenbeschichteten Kulturflaschen auf den Zeitpunkt der ersten Passage. Endpunkte waren das erste Festsetzen von Zellen und der Zeitraum bis zur ersten Passage. Tabelle 9 zeigt das Ergebnis dieser Parallelversuche mit M13. In Abbildung 7 ist der mikroskopische Unterschied der Zelldichte dargestellt.

Tabelle 9: Einfluss der Kollagenbeschichtung auf den Kultivierungserfolg (Einzelversuch an M13) [(+): einige Zellen adhären; (++): viele Zellen adhären]

	M13	
	mit Kollagen	ohne Kollagen
Sichtbar adhärente Zellen	Tag 2 (++)	Tag 2 (+)
erste Passage	Tag 7	Tag 13

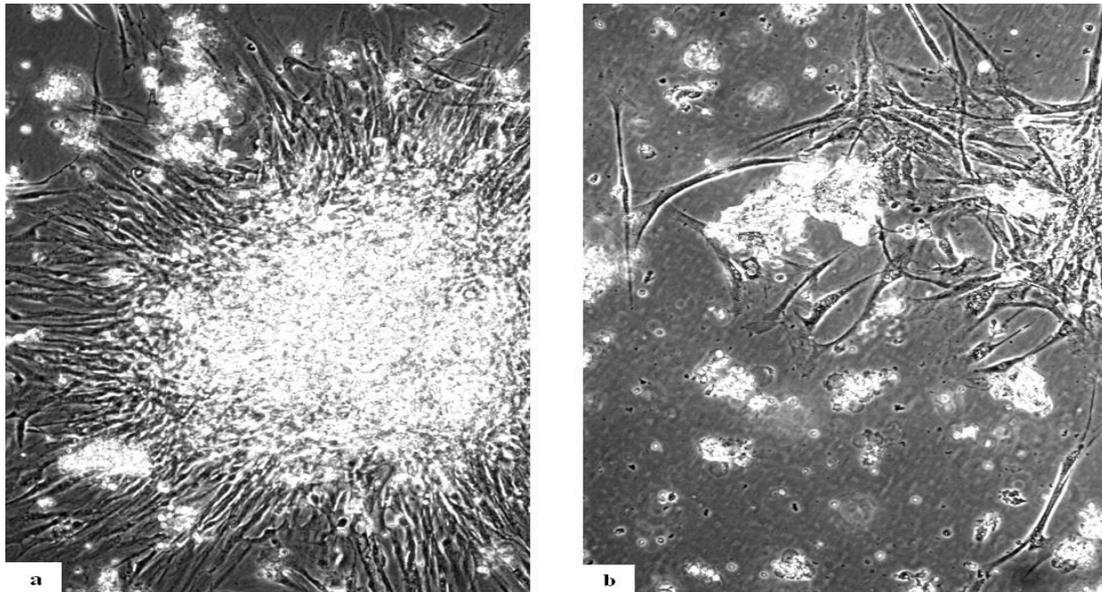


Abbildung 7: Darstellung von Zellinseln am dritten Tag nach Präparation des gleichen Tumors (M13) (Vergrößerung 10x): **(a)** Kulturflosche mit Kollagen beschichtet: zellreiche, große Insel; **(b)** Kulturflosche ohne weitere Beschichtung: zellarme, kleine Insel

Anhand dieses exemplarischen Ergebnisses entschlossen wir uns, die von Hardy et al. vorgeschlagene Beschichtung der Kulturfloschen mit Kollagen Typ 1 zu übernehmen.

In der deskriptiven Analyse der 36 erfolgreichen Ansätze mit gleichbleibendem Protokoll ergaben sich folgende Eckdaten bei der Versorgung der Primärzellen: Die postoperative Lagerungszeit betrug durchschnittlich 13,22 Stunden (1-44 Stunden). Nach der Präparation waren die ersten angewachsenen Zellen im Mittel nach 2 Tagen sichtbar (1-4 Tage). Bei erfolgreicher Kultivierung war die erste Passage im Mittel nach ca. 6 Tagen möglich (2-13 Tage).

3.1.4 Einflussfaktoren auf die Dauer bis zur ersten Passage

Nach Etablierung der Methode erfolgte zunächst die Beobachtung und Dokumentation des Wachstumsverhaltens und der EMA-Expression (siehe 3.1.5). In den Versuchsreihen zeigte sich während der Beobachtung eine zunehmende Zeitspanne zwischen den einzelnen Passagen. Es wurde auch beobachtet, dass die Intensivität der EMA-Expression von Passage zu Passage abnimmt.

Daher wurden die ALA-PDT-Versuche an Zellen der ersten, maximal der zweiten Passage durchgeführt.

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Dauer bis zur ersten Passage und dem WHO-Grad ($p=0,04$). Je höher der WHO-Grad, desto kürzer war der Zeitraum bis zur ersten Passage (P1). Der histologische Subtyp hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Dauer bis zur ersten Passage ($p=0,066$).

Eine Übersicht der zugrunde liegenden Daten ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: WHO-Grad, histologischer Subtyp und Zeitpunkt der 1. Passage nach erfolgreicher Anzucht der einzelnen Meningeome

Meningeom	WHO Grad	histologischer Subtyp	Zeitpunkt P1 (in Tagen)
M7	I	meningothelial	6
M8	II	atypisch	10
M9	II	atypisch	13
M10	II	atypisch	12
M11	I	meningothelial	5
M12	I	angiomatös	13
M13	II	atypisch	7
M14	I	transitionell	7
M15	I	transitionell	6
M16	III	anaplastisch	3
M17	I	meningothelial	4
M18	I	meningothelial	6
M19	I	transitionell	5
M20	I	meningothelial	5
M21	I	meningothelial	6
M23	I	meningothelial	5
M25	I	meningothelial	4
M26	I	transitionell	3
M27	I	transitionell	2
M28	I	meningothelial	4
M29	I	meningothelial	3
M30	I	meningothelial	7
M31	I	meningothelial	4
M32	II	atypisch	4
M33	I	fibroblastisch	4
M34	I	psammomatös	7
M35	I	transitionell	3
M36	I	psammomatös	6
M37	I	meningothelial	4
M39	III	anaplastisch	6
M40	I	transitionell	6
M41	I	fibroblastisch	5
M42	I	transitionell	8

Der fehlende Zusammenhang mit der Lagerungsdauer wurde bereits in 3.1.3 beschrieben. Der Einfluss der Ausprägung der EMA-Expression wird im Folgenden (3.1.5) näher erläutert.

3.1.5 Immunhistochemischer Nachweis der EMA-Expression

Die semiquantitative Auswertung der EMA-Expression erfolgte mikroskopisch anhand der fixierten Zellpräparate in (-) negativ, (+) einfach-, (++) zweifach- und (+++) dreifach-positiv. Abbildung 8 illustriert diese Einteilung.

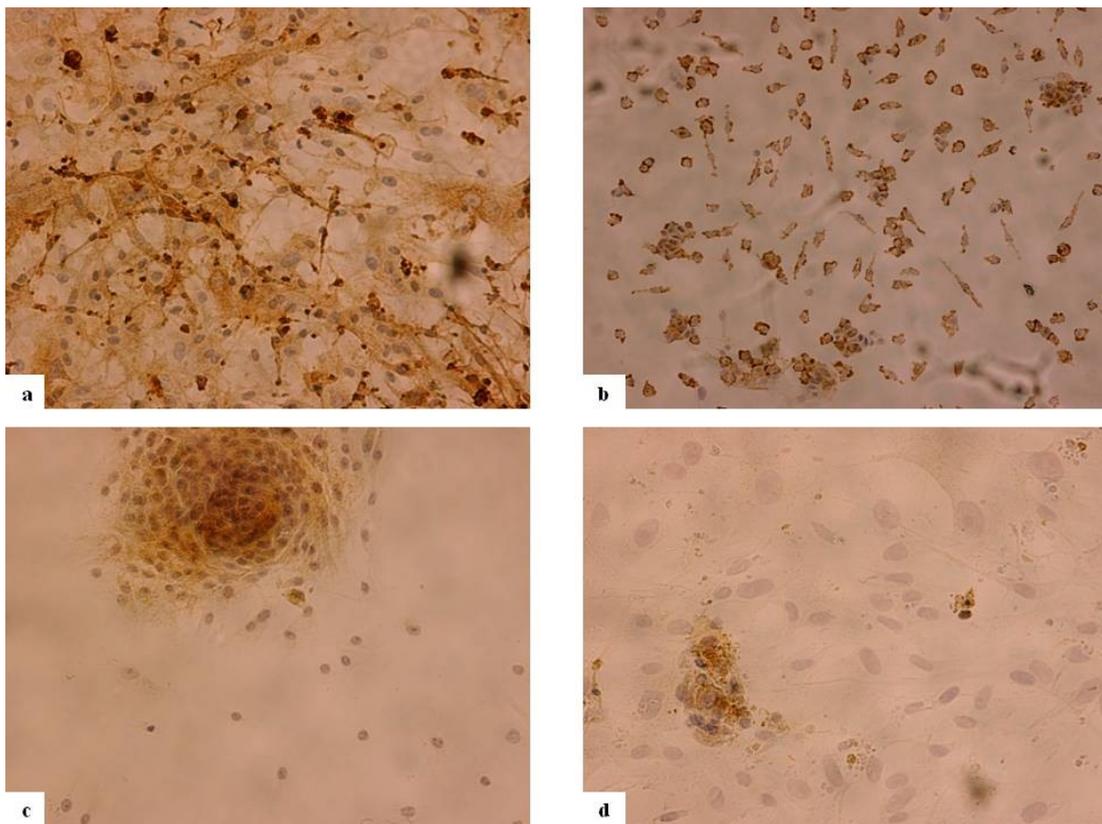


Abbildung 8: Beispiele für die Ergebnisse der immunhistochemischen Anfärbung der EMA-Expression und deren semiquantitative Einteilung in (-) negativ, (+) einfach-, (++) zweifach- und (+++) dreifach-positiv (Vergrößerung 20x): (a) deutliche EMA Expression am gesamten Zellrasen erkennbar (+++); (b) vereinzelte polygonale Zellen, die eine deutliche Expression vorweisen (++); (c) positiv angefärbte Zellinsel mit negativen Zellen in der Peripherie (+); (d) negative Zellen überwiegen (-)

In 36 Ansätzen erfolgte die Anfertigung eines fixierten Zellpräparats zur immunhistochemischen Auswertung. Eine EMA-Färbung konnte in 32/36 Fällen erfolgreich durchgeführt werden (3 Ansätze nicht erfolgreich; 1 Färbung wegen technischem Fehler nicht auswertbar). Die für diese Färbung verwendeten zellbedeckten

Deckgläser konnten im Mittel am 10. Tag nach Tumorpräparation (Median: 9 Tage; Range: 3-32 Tage) fixiert werden. Die Fixierung erfolgte zeitgleich zur Durchführung der 5-ALA-PDT Versuche, um gewährleisten zu können, dass die Versuchszellen ähnliche Eigenschaften wie die gefärbten Zellen haben.

In den daraufhin durchgeführten Färbungen stellten sich 26/32 (81,2%) Präparate EMA-positiv und 6/32 (18,8%) EMA-negativ dar. In der unten stehenden Abbildung (Abbildung 9) ist eine detailliertere Darstellung der Ergebnisse zu finden.

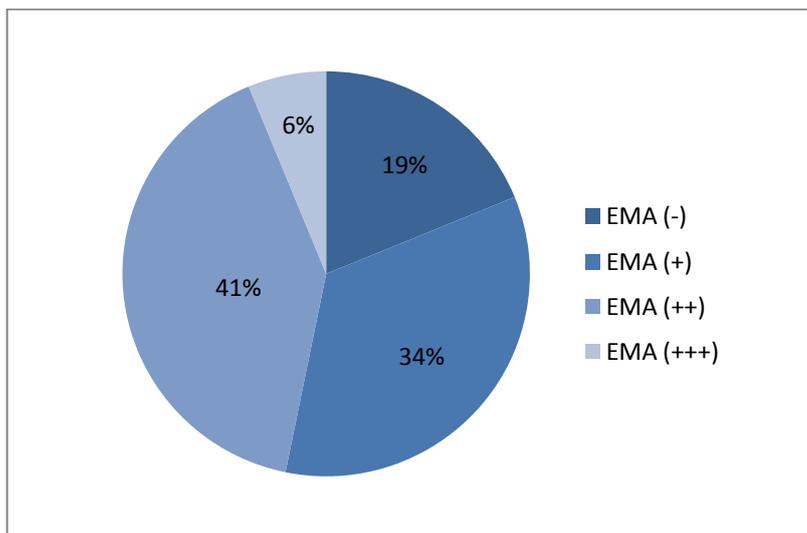


Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der immunohistochemischen Ergebnisse nach Ausmaß der EMA-Expression [(-) negativ, (+) einfach-, (++) zweifach- und (+++) dreifach-positiv] (n=32)

Die Erfahrung, dass die von älteren Zellen angefertigten Färbungen meist negativ ausfielen, führte dazu, dass für die ALA-PDT Versuche die Zellen so früh wie möglich verwendet wurden und auch nur ein Versuch pro Meningeom durchgeführt wurde.

Aufgrund dessen wurde untersucht, ob das Ausmaß der EMA-Expression einen Einfluss auf den Zeitpunkt der ersten Passage hat. In einer einfaktorischen ANOVA zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Graden der EMA-Expression (wobei ++ und +++ als stark EMA-positiv zusammengefasst wurden) mit einem p-Wert von 0,002. In der post-hoc Analyse zeigte sich, dass der zeitliche Unterschied bis zur ersten Passage vor allem zwischen den einfach positiven und den stark positiven Präparaten hoch signifikant ($p=0,006$) ausgeprägt ist. Eine stärkere EMA-Expression ist somit mit einer früheren ersten Passage verbunden.

Im Chi-Quadrat-Test konnte kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der EMA-Expression und des WHO-Grades ($p=0,494$) gesehen werden. Gleiches gilt auch für den histologischen Subtyp ($p=0,438$).

Eine Übersicht der zugrunde liegenden Daten ist in Tabelle 3 im Anhang dargestellt.

3.1.6 Einfrieren und Auftauen der Primärzellen

Nach den ersten erfolgreichen Ansätzen wurden die Zellen nach P2 oder P3 eingefroren. Hintergrund war die Vorstellung, auf diese Weise Zellen für spätere Versuche konservieren zu können. Voraussetzung für die weitere Verwendung war die nach dem Auftauen fortbestehende Expression des epithelialen Membranantigens. Dies wurde an vier vor dem Einfrieren EMA-positiven Präparaten exemplarisch durchgeführt. Die Morphologie der Zellen erschien mikroskopisch ähnlich zu den ursprünglichen Zellen. Doch in der immunhistochemischen Färbung stellten sich alle vier Präparate als EMA-negativ dar, sodass im weiteren Verlauf keine Zellen mehr eingefroren wurden und die bis dahin eingefrorenen Zellen auch nicht für Versuche verwendet wurden. (siehe Abbildung 10)

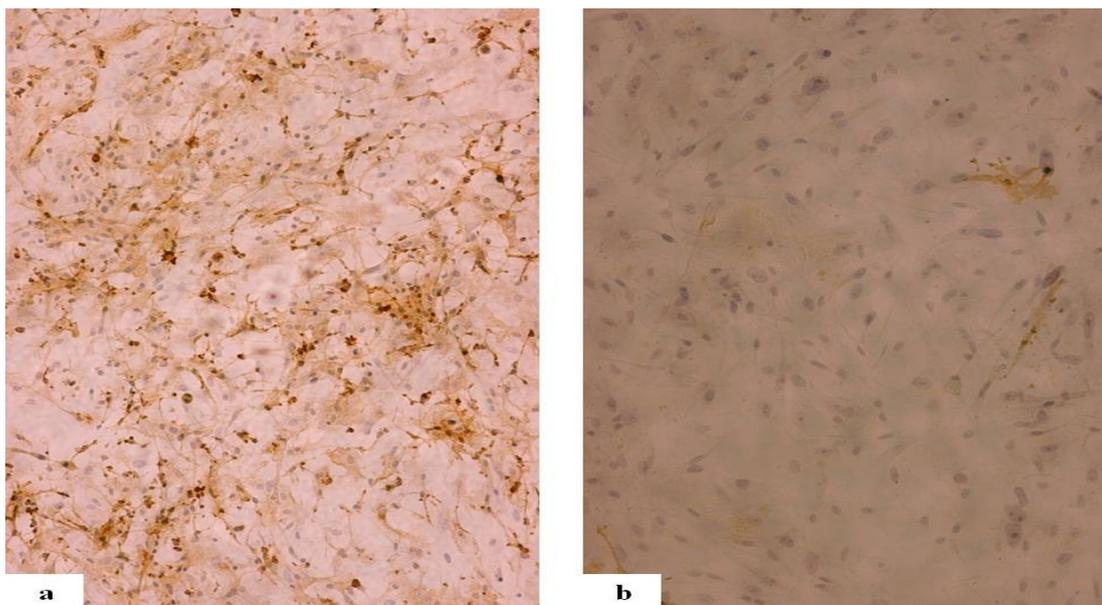


Abbildung 10: Immunhistochemische EMA-Färbung vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen der Zellen: (a) M11 vor dem Einfrieren deutlich positiv (Vergrößerung 10x); (b) M11 zeigt nach dem Auftauen keine EMA-Expression mehr (Vergrößerung 20x)

3.2 Anwendung der 5-ALA basierten PDT an primären Meningeom-Zellen

3.2.1 Modifizierung des Versuchsaufbaus für Meningeom-Primärzellen

Da bisher keine Erfahrungen über die notwendigen 5-ALA-Dosierungen vorlagen, wurden die ersten Einzelversuche unter folgenden Versuchsbedingungen durchgeführt:

- Inkubationzeit zwischen Aussähen auf die 96-Wellplatte und Inkubation mit 5-ALA: 1 Nacht
- 5-ALA: 0 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml
- PDT: 1 Watt, 450 Sekunden Bestrahlungszeit
- Inkubationszeit zwischen PDT und WST-1-Assay: 1 Stunde

Mit diesen Versuchsparametern konnte kein zytotoxischer Effekt auf die Zellen beobachtet werden, wie in Abbildung 11 dargestellt.

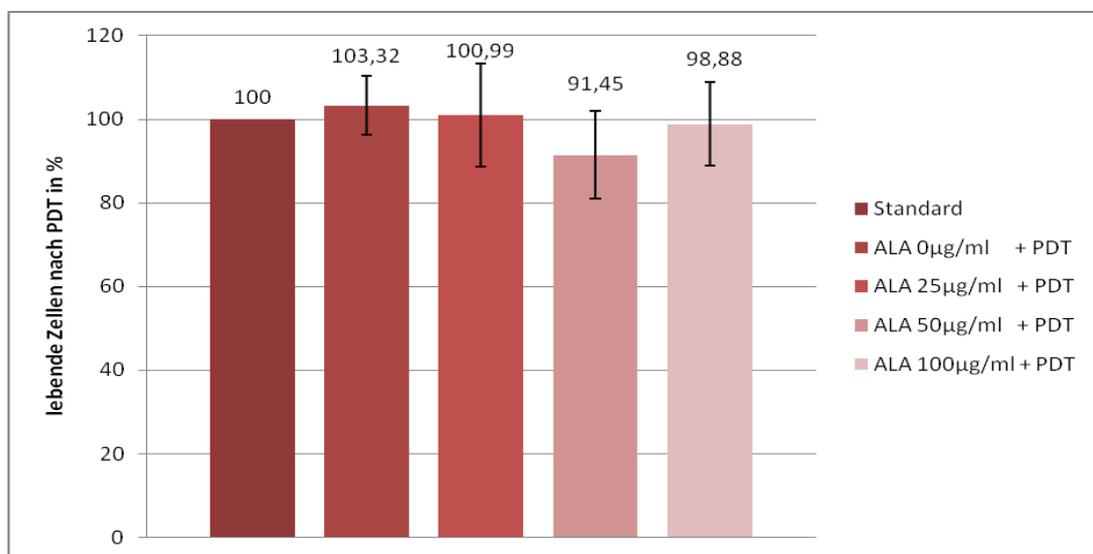


Abbildung 11: Zellvitalität der M15-Zellen nach PDT unter folgenden Versuchsbedingungen: 1 Nacht Inkubation der Zellen in der 96-Well-Platte; 450 Sekunden Bestrahlungszeit; Leistung 1 Watt; 1 Stunde Inkubation zwischen PDT und WST-1-Assay

Dieses Ergebnis führte zu einigen Veränderungen in dem von den Gliom-Versuchen übernommenen Protokoll, um dieses auf die Meningeomzellen anpassen zu können. Die Bestrahlungszeit wurde von 450 Sekunden auf 625 Sekunden verlängert. Außerdem wurde die Inkubationszeit nach dem Aussähen der Zellen auf die 96-Well-Platten von einer Nacht auf zwei Nächte verlängert. Als letzter Schritt wurde die Inkubationszeit

zwischen PDT und dem WST-1-Assay von 1 Stunde auf 1,5 Stunden verlängert, um den Zellen einen größeren Zeitraum zur Einleitung der Apoptose zu geben.

Das neue Bestrahlungsprotokoll wurde ebenfalls exemplarisch an M15 (siehe erster Versuch) mit 100 µg/ml ALA angewandt. Das Ergebnis ist in Abbildung 12 dargestellt.

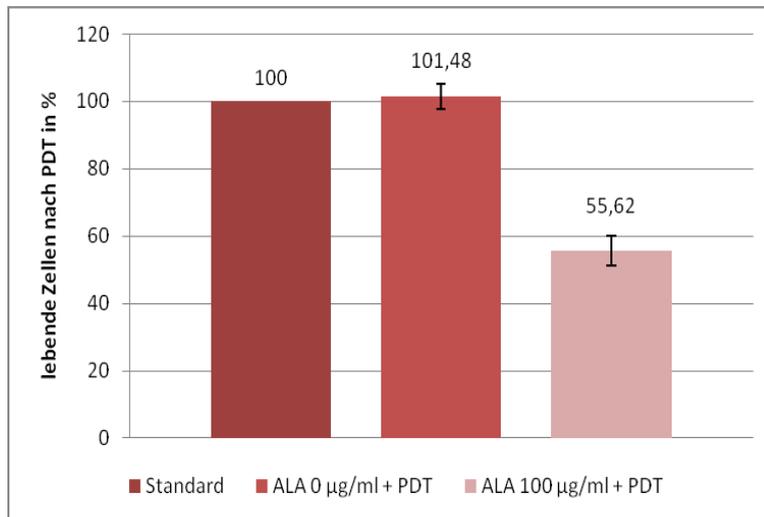


Abbildung 12: Zellvitalität der M15-Zellen nach PDT unter folgenden Versuchsbedingungen: 2 Nächte Inkubation der Zellen in der 96-Well-Platte; 625 Sekunden Bestrahlungszeit; Leistung 1 Watt; 1,5 Stunden Inkubation zwischen PDT und WST-1-Assay

Dieses Bestrahlungsprotokoll wurde im Folgenden als Standard für die kommenden Versuche verwendet.

3.2.2 Ermittlung geeigneter 5-ALA-Dosierungen

Um das Ausmaß der Zytotoxizität der 5-ALA-basierten PDT auf Meningeomzellen weiter differenzieren zu können, bestand zum Einen die Möglichkeit unterschiedliche Energiedosen bei der Bestrahlung zu verwenden oder zum Anderen die verwendete Dosierung von 5-ALA bei gleichbleibenden Bestrahlungsparametern zu variieren. In der laufenden Versuchsreihe sollte evaluiert werden, welche 5-ALA-Dosierungen geeignet sind, um die primären Meningeomzellen durch die PDT in ihrer Vitalität zu beeinflussen.

In den folgenden Einzelversuchen mit M17 bis M19 (M16 konnte nicht erfolgreich kultiviert werden) wurden die Zellen mit unterschiedlichen Dosen von 5-ALA inkubiert und im Anschluss mit der photodynamischen Therapie behandelt. Exemplarisch ist in

Abbildung 13 das Ergebnis von M19 unter der Verwendung von 25 µg/ml, 40 µg/ml und 50 µg/ml 5-ALA dargestellt.

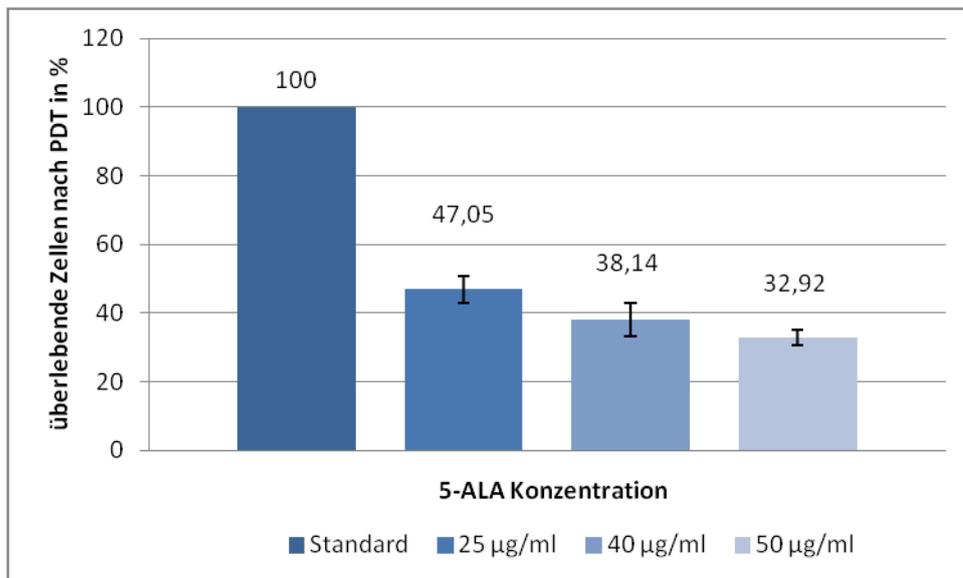


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung des Einflusses unterschiedlicher 5-ALA Konzentrationen auf die Zellvitalität der M 19-Zellen nach PDT im WST-1-Assay

Die Ergebnisse sollten mit 25 µg/ml und 50 µg/ml 5-ALA an den Primärzellen der Kulturen M20, M21 und M23 (M22 und M24 konnten nicht erfolgreich kultiviert werden) reproduziert werden. Abbildung 14 zeigt die erzielten Ergebnisse.

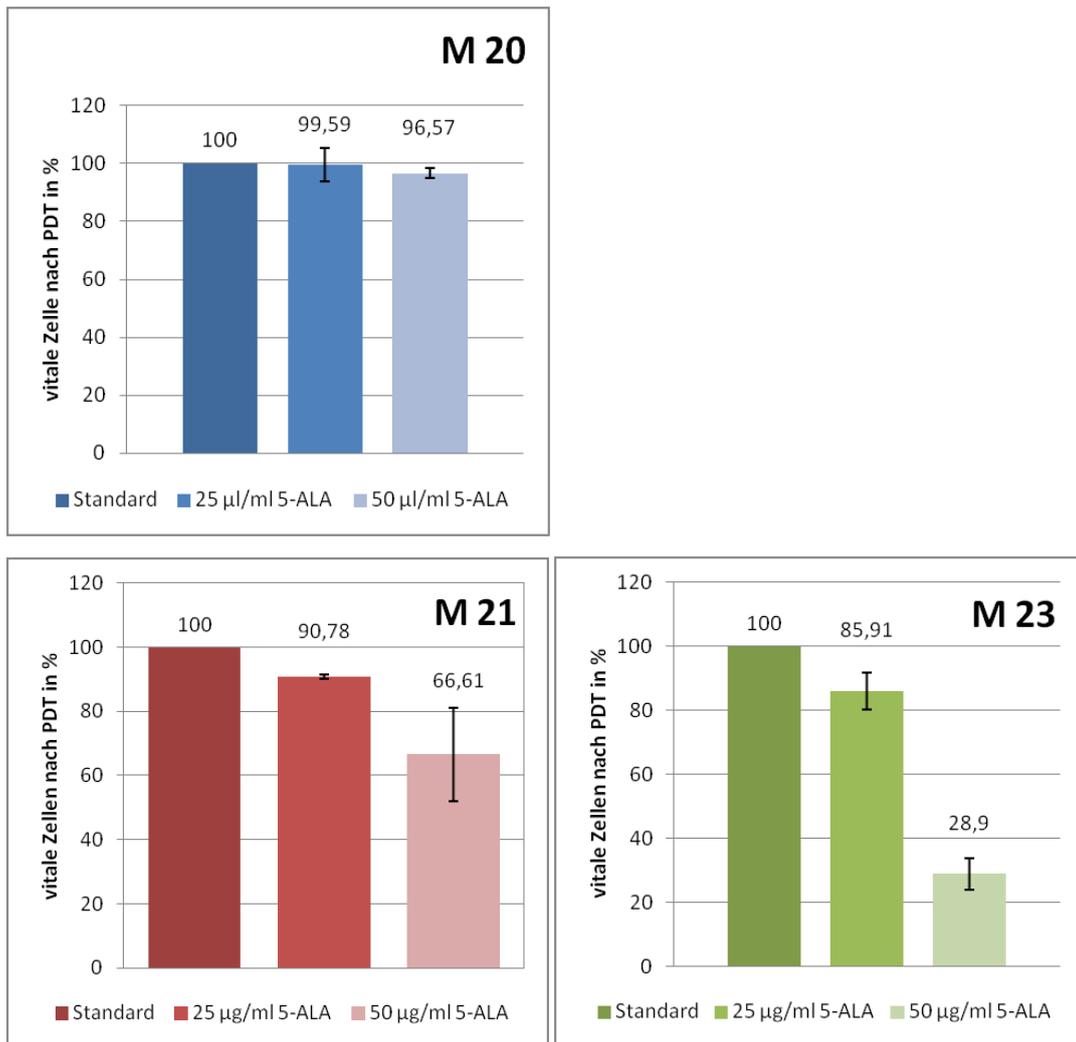


Abbildung 14: Einfluss der PDT auf die Zellvitalität unter der Verwendung von 25µg/ml sowie 50µg/ml 5-ALA an M20-, M21- und M23-Zellen

M20, M21 und M23 zeigten eine unterschiedliche zytotoxische Reaktion auf die PDT-Behandlung. Während bei M23 ein gutes Ergebnis erzielt werden konnte und bei M21 ein zytotoxischer Effekt zu erkennen ist, überlebten alle Zellen der Reihe M20. Hierbei muss erwähnt werden, dass die immunhistochemische Untersuchung von M20 keine EMA-Expression nachwies.

Um ein differenzierteres Abfallen der vitalen Zellen nach PDT darstellen zu können, verwendeten wir in den beiden darauffolgenden Einzelversuchen mit den Zellen M25 und M26 die 5-ALA-Konzentrationen 12,5 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml. (siehe Abbildung 15)

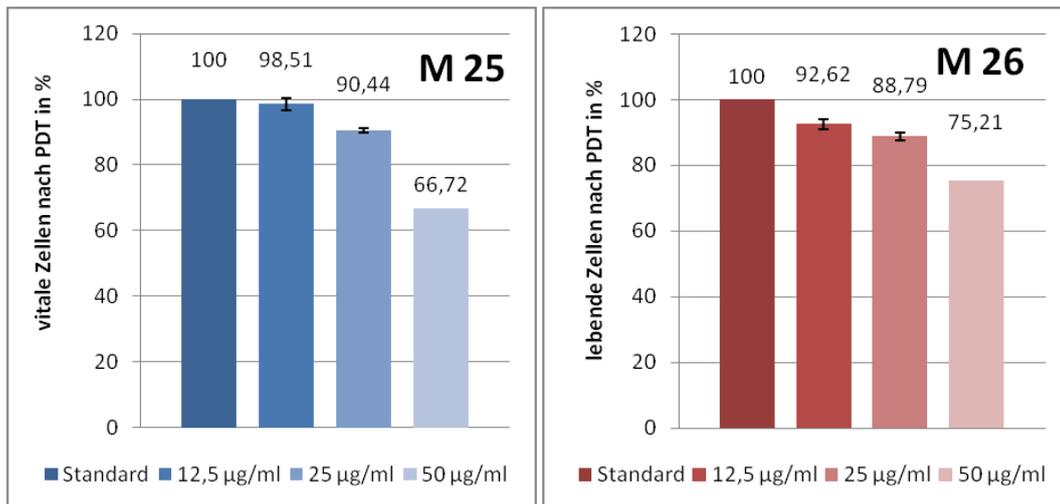


Abbildung 15: Zellvitalität der M25- und M26-Zellen nach PDT unter Verwendung von 12,5µg/ml, 25µg/ml und 50µg/ml 5-ALA

Die Versuche mit den Zellkulturen M25 und M26 zeigten einen reproduzierbaren zytotoxischen Effekt, ähnlich M21. Mit 66-75% lebender Zellen nach erfolgter PDT mit max. 50µg/ml 5-ALA, konnte die LD 50 bisher noch nicht erreicht werden. Daher wurden in den folgenden Einzelversuchen mit M27 und M28 höhere 5-ALA Dosen (75µg/ml und 100µg/ml) verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt. Es zeigte sich ein paradoxes Resultat bezüglich des Anteils überlebender Zellen bei höherer Dosierung. Bei einer 5-ALA-Dosis von 100µg/ml überlebten mehr Zellen als nach einer Inkubation mit 50µg/ml bei gleichen Bestrahlungsparametern.

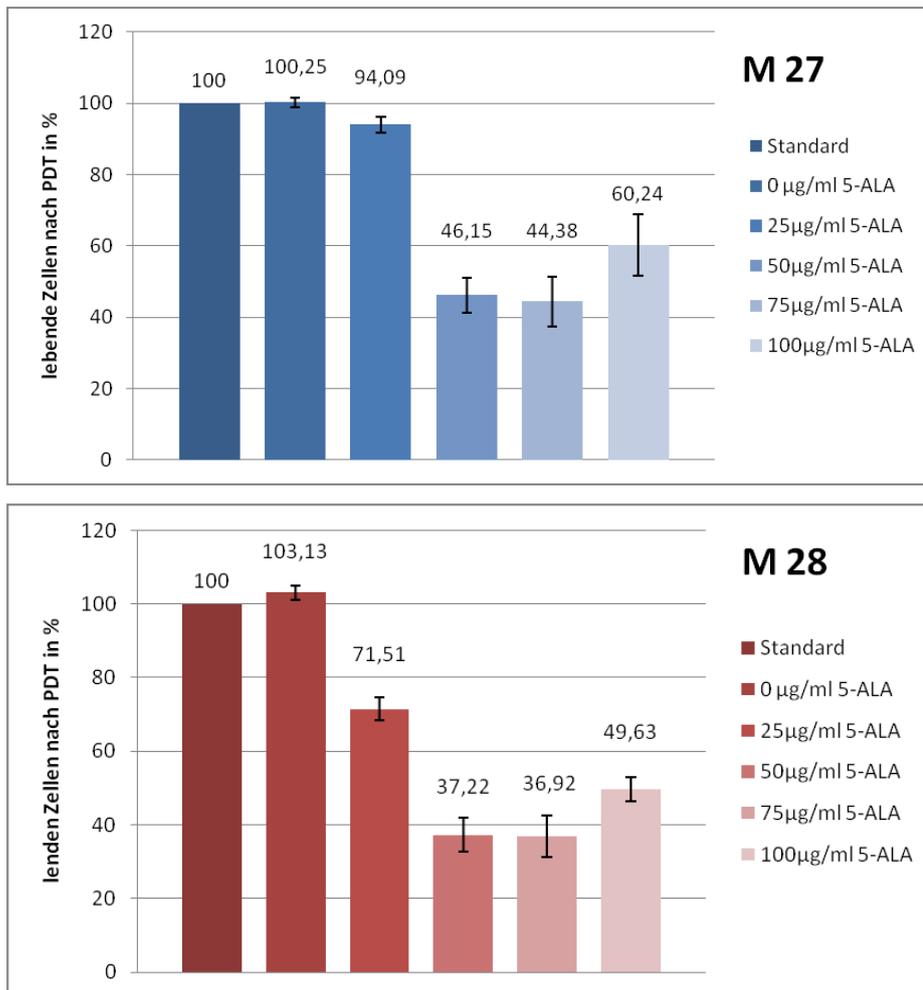


Abbildung 16: Zellvitalität der M27- und M28-Zellen nach PDT unter der Verwendung von 25µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml und 100µg/ml 5-ALA

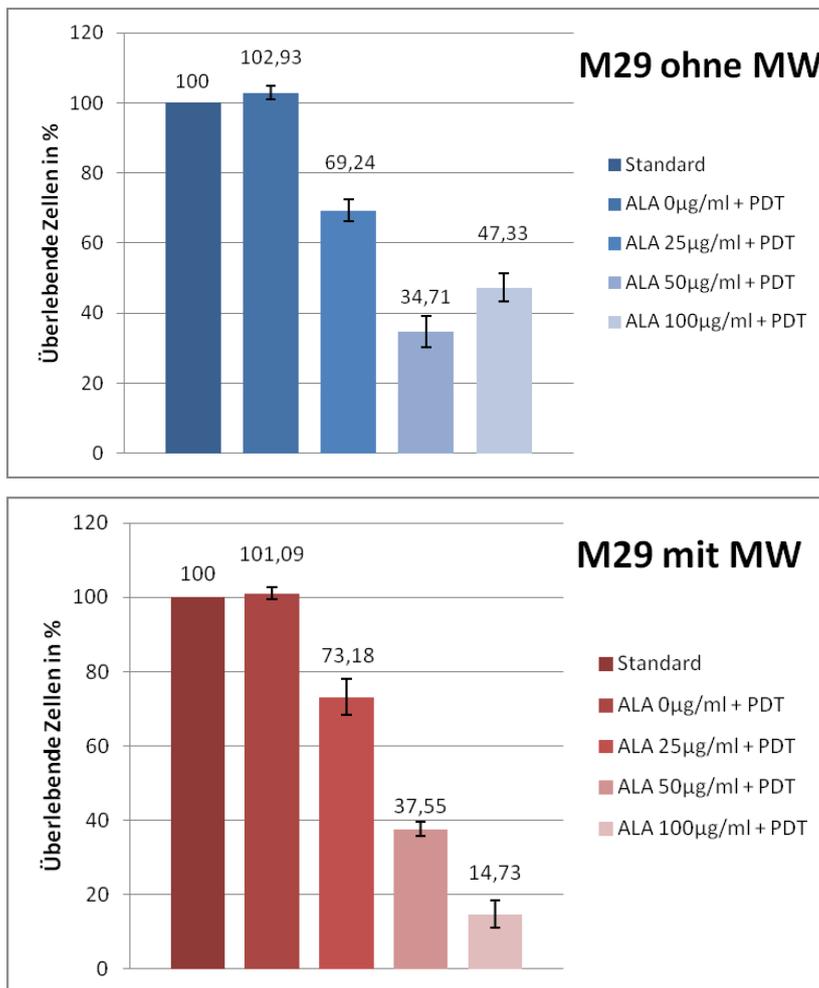
Wir waren von der Hypothese ausgegangen, dass bei steigender ALA-Konzentration die Anzahl der überlebenden Zellen entweder weiter sinke und sich irgendwann 0 annähert oder dass sich ein Plateau einstellt. Dies konnte in diesen Versuchen jedoch nicht nachvollzogen werden.

3.2.3 Einfluss eines Mediumwechsels vor PDT

Unter der Annahme, dass das dem Kulturmedium zugesetzte FCS und vor allen Dingen die darin enthaltenen Proteine und Enzyme, die Synthese des PPIX aus 5-ALA und die folgende Reaktion auf die PDT irgendwie beeinflussen könnten, fügten wir in das Protokoll einen Mediumwechsel (MW) unmittelbar vor Durchführung der PDT ein. Im Rahmen dieses Mediumwechsels wurde das FCS-haltige Kulturmedium abgezogen und serumfreies Medium hinzugegeben. Auf diese Weise war auch eine weitere Interferenz

zwischen dem noch nicht in die Zellen aufgenommenen 5-ALA mit der PDT ausgeschlossen.

In Abbildung 17 sind zwei exemplarische Parallelversuche mit M29 und M30 dargestellt, in denen die Zellen sowohl ohne Mediumwechsel als auch mit Mediumwechsel vor PDT behandelt wurden. Es ist deutlich zu erkennen, dass nach Durchführung des Mediumwechsels der Anstieg der überlebenden Zellen bei hohen ALA-Dosierungen ausbleibt.



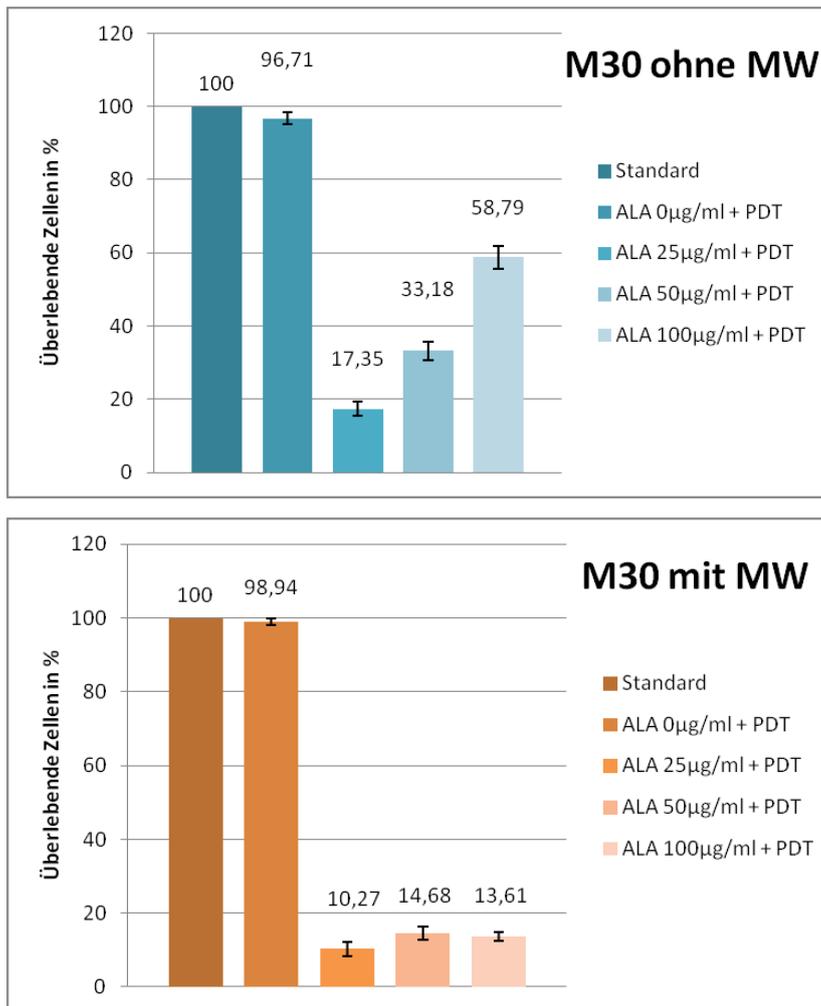


Abbildung 17: Zellvitalität der M29- und M30-Zellen nach PDT unter der Verwendung von 25µg/ml, 50µg/ml und 100µg/ml 5-ALA: Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den unterschiedlichen Versuchsansätzen mit und ohne Mediumwechsel vor Durchführung der PDT

Nach diesen Versuchen führten wir den Mediumwechsel unmittelbar vor der PDT standardmäßig ein.

Die nun folgende Versuchsreihe sollte alle unter denselben Bedingungen und unter Verwendung eines immer gleichen Protokolls stattfinden. Als Kontrollgruppe bestanden bis dahin nur die „Standard-Zellen“ und der Versuchsblock „ALA 0 µg/ml + PDT“. Das Protokoll wurde nun um eine weitere Kontrollgruppe ergänzt, die dem Ausschluss einer zytotoxischen Wirkung der 5-ALA allein dienen sollte („ALA 50 µg/ml ohne PDT“).

Dieses Protokoll wurde daraufhin an den Primärzellen von elf weiteren Meningeomen getestet. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe (n=11) werden in 3.2.4, 3.2.5 und 3.2.6 dargestellt.

3.2.4 Zellvitalität nach Durchführung der PDT ohne 5-ALA

Als eine Kontrollgruppe (Negativkontrolle) zu den mit 5-ALA und PDT behandelten Zellen diente in jedem Versuchsansatz ein Versuchsblock, der mit Licht der Wellenlänge 635nm und einer Leistung von 1 Watt für 625 Sekunden bestrahlt wurde, ohne dass die Zellen zuvor mit 5-ALA behandelt wurden.

Auch an diesen Zellen wurde ein WST-1-Vitalitätsassay durchgeführt, um den Einfluss beurteilen zu können. Hierfür wurde die erreichte Extinktion in ein prozentuales Verhältnis zu den vollkommen unbehandelten Standardzellen gesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung allein keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Zellen hat ($p=0,292$).

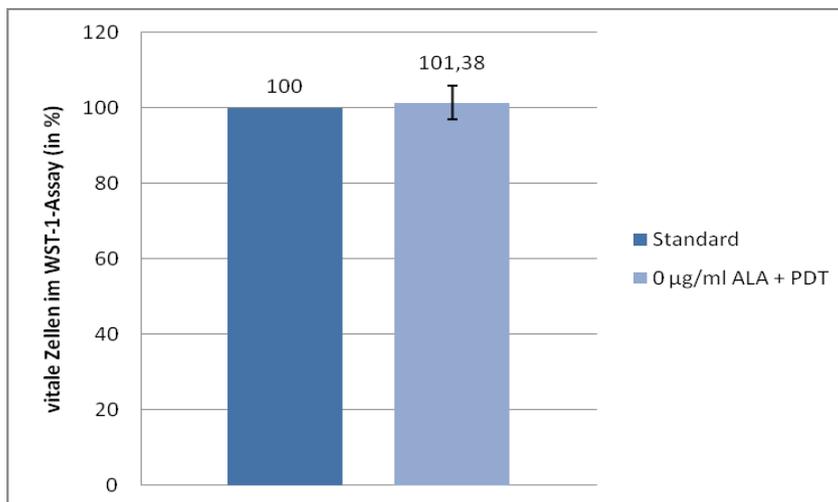


Abbildung 18: Zellvitalität der Zellen im WST-1-Assay nach PDT-Behandlung ohne vorherige Inkubation der Zellen mit 5-ALA.

3.2.5 Zellvitalität nach Inkubation mit 5-ALA ohne nachfolgende PDT

Als weitere Kontrollgruppe diente in den letzten elf Versuchen ein Versuchsblock, der mit 50µg/ml 5-ALA inkubiert wurde und im Anschluss an diese Inkubation aber nicht mit der PDT behandelt wurde. Dies diente dem Ausschluss einer Wirkung der 5-ALA allein auf die Zellvitalität. Als Dosis wurden 50µg/ml ausgewählt, da sich in den vorhergegangenen Versuchen gezeigt hatte, dass unter dieser Dosierung und nachfolgender PDT immer ein deutlicher Zelluntergang einstellte, sodass diese Konzentration für die Kontrollgruppe als geeignet angesehen wurde.

Auch hier wurde daraufhin ein WST-1-Assay zur Beurteilung der Vitalität durchgeführt. Es zeigte sich in allen Versuchen kein signifikantes Absterben der Zellen nach alleiniger Inkubation mit 5-ALA ($p=0,699$).

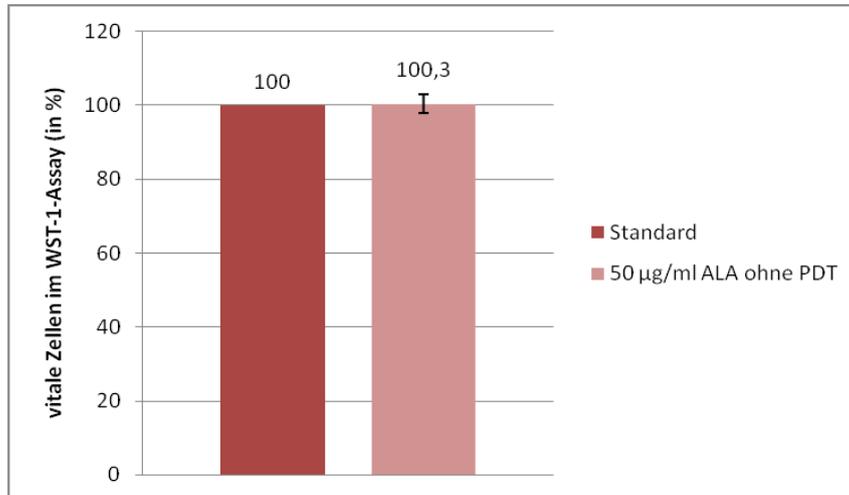


Abbildung 19: Zellvitalität der Zellen im WST-1-Assay nach Inkubation der Zellen mit 50 µg/ml 5-ALA ohne nachfolgende PDT-Behandlung

3.2.6 Zellvitalität nach Inkubation mit unterschiedlichen 5-ALA-Konzentrationen und nachfolgender PDT

Um das Ansprechen der Zellen auf die PDT zu untersuchen, wurden diese für vier Stunden mit unterschiedlichen Dosen 5-ALA inkubiert und daraufhin mit Licht einer Wellenlänge von 625 nm und einer Bestrahlungsstärke von 30 mW/cm² bestrahlt. Daraus resultierte eine gleichbleibende Bestrahlungsdosis von 18,75 J/cm².

Tabelle 2 im Anhang (siehe Anhang) ist eine genaue Aufstellung der erzielten Ergebnisse der Versuchsreihe von M19 bis M42 zu entnehmen. In der dortigen Darstellung sind auch die jeweiligen EMA-Ergebnisse gezeigt.

Es konnte ein dosisabhängiger photodynamischer Effekt auf die primären Meningeomzellen nachgewiesen werden. In Abbildung 19 sind die dosisabhängigen Überlebenskurven der verwendeten Zellen dargestellt. Man erkennt einen Abfall des Anteils überlebender Zellen in allen Zellreihen. Auffallend ist allerdings, dass das Ausmaß des zytotoxischen Effekts nicht einheitlich ist. Die verschiedenen Primärkulturen zeigten trotz zum Teil vergleichbarer Dignität (WHO Grade) ein unterschiedliches Ansprechen auf die PDT.

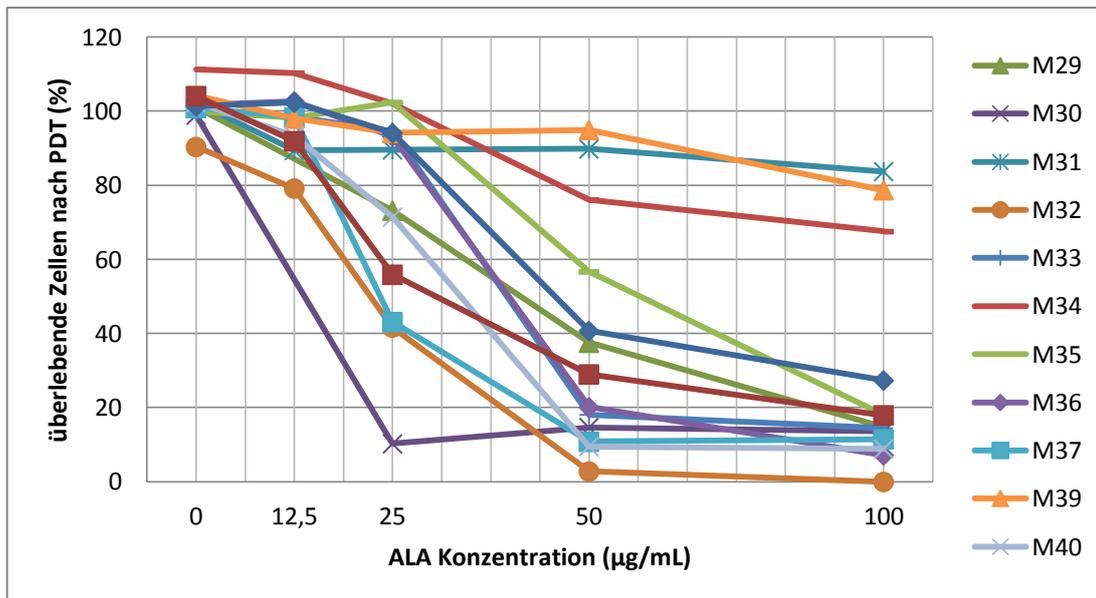


Abbildung 20: Darstellung des prozentualen Anteils überlebender Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen 5-ALA-Konzentrationen (12,5µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml und 100µg/ml) und nachfolgender PDT-Bestrahlung

Betrachtet man den photodynamischen Effekt auf alle verwendeten Zellen dieser Versuchsreihe in Bezug auf die unbehandelten Standardzellen, so ergeben sich die folgenden deskriptiven Ergebnisse: Bei einer verwendeten 5-ALA-Dosis von 12,5µg/ml überlebten durchschnittlich 96,55% ($s=8,1\%$). Inkubiert man die Zellen mit einer 5-ALA-Dosis von 25µg/ml, so überleben im Mittel 80,19% ($s=23,12\%$). Bei 50µg/ml ergibt sich eine Zellvitalität nach PDT von 40,79% ($s=33,51\%$) und bei 100µg/ml von 30,49% ($s=30,67\%$). Unter Berücksichtigung der großen Spannweite ist die LD 50 somit annähernd bei 50µg/ml 5-ALA erreicht.

In Abbildung 20 ist noch einmal dargestellt, dass die erzielten Ergebnisse innerhalb der unterschiedlichen verwendeten Meningeomzellen eine große Spannweite haben.

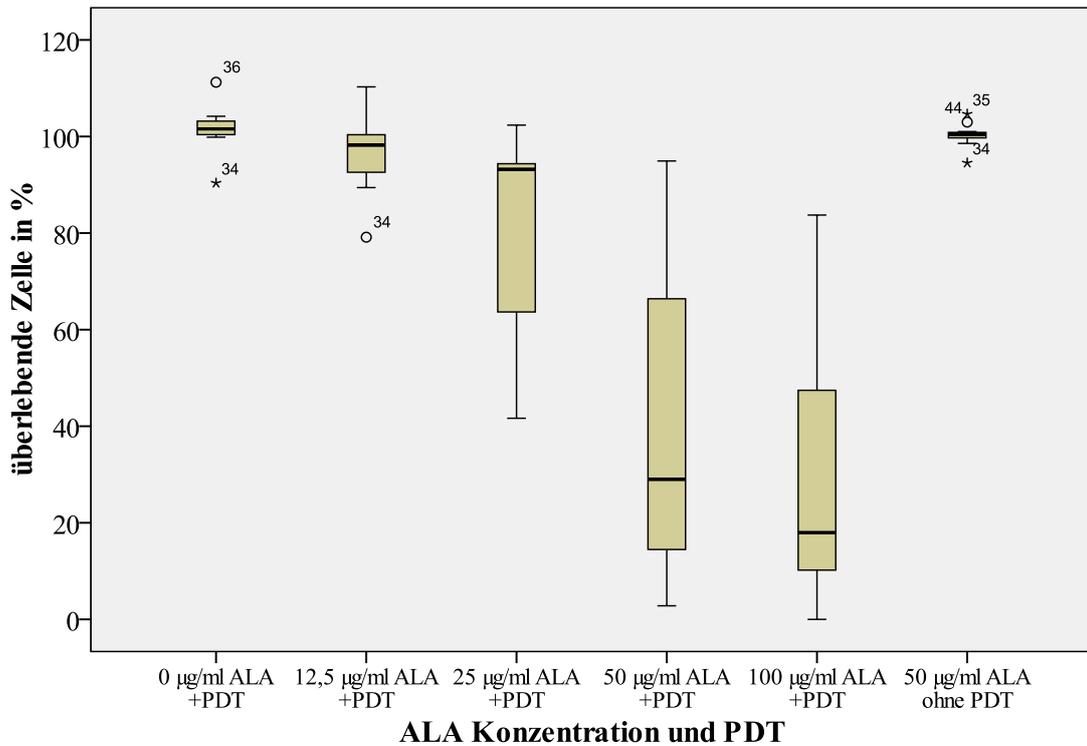


Abbildung 21: Boxplot-Diagramm zur Darstellung der Spannweite der Zellvitalität der Zellen aus elf Versuchen nach ALA-Inkubation und PDT-Bestrahlung

Das auf den photodynamischen Effekt folgende Absinken der Zellvitalität bei einer 5-ALA-Dosis von 12,5µg/ml zeigt sich im t-Test als nicht signifikant ($p=0,188$). Bei einer verwendeten Dosis von 25µg/ml hingegen erzielt man bereits ein hoch signifikantes Absterben der Zellen nach PDT-Behandlung ($p=0,007$). Gleiches gilt auch für die Inkubation der Zellen mit einer 5-ALA-Dosis von 50µg/ml ($p=0,000$) und 100µg/ml ($p=0,000$), bezogen auf ein Konfidenzintervall von 95%.

Des Weiteren wurde untersucht, ob es Einflussfaktoren auf das Ausmaß des PDT-Erfolges gibt. Hierfür wurden die einzelnen WHO-Grade und die Stärke der EMA-Expression als Parameter verwendet. Für die statistische Testung wurden immer die Ergebnisse des photodynamischen Effektes bei einer 5-ALA-Dosis von 50µg/ml verwendet.

Betrachtet man die Verteilung der PDT-Ergebnisse in Bezug auf die die WHO-Grade, so ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,093$). Ähnliches gilt auch für die unterschiedliche Ausprägung der EMA-Expression. Auch hier sieht man keinen signifikanten Unterschied unter den Gruppen ($p=0,124$).

4. Diskussion

4.1 Material und Methoden

In den oben dargestellten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es gelungen ist, eine Methode zur Primärkultivierung von Meningeomzellen zu entwickeln. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die 5-ALA-basierte photodynamische Therapie einen zytotoxischen Effekt auf Meningeomzellen in Primärkultur hat.

4.1.1 Materialgewinnung, Verarbeitung und Anzüchtung einer Primärzellkultur

Insgesamt zeigt die Literaturrecherche bezüglich primärer Meningeomzellkulturen ein ernüchterndes Ergebnis. Offensichtlich gibt es nur wenige Arbeitsgruppen, die sich mit der Primärkultivierung von Meningeomen bisher beschäftigt haben.

Die von Hardy et al. (23) beschriebene Methode wurde von derselben Arbeitsgruppe nachfolgend weiter erfolgreich angewendet (12). Aufgrund der detaillierten Beschreibung der Methode wurde diese als gute Grundlage für die Entwicklung eines eigenen Protokolls zur Primärkultivierung verwendet. Das beschriebene Verfahren musste im Verlauf abgeändert und weiterentwickelt werden, um den Ansprüchen für die folgenden Versuche mit PDT zu genügen.

Unter einer Primärkultur versteht man eine in-vitro-Züchtung von Zellen, Geweben und Organen, welche direkt dem Organismus entnommen wurden. Die aus einer Primärkultur subkultivierten Zellen nennt man Zelllinie. (48) (siehe Abb. 22)

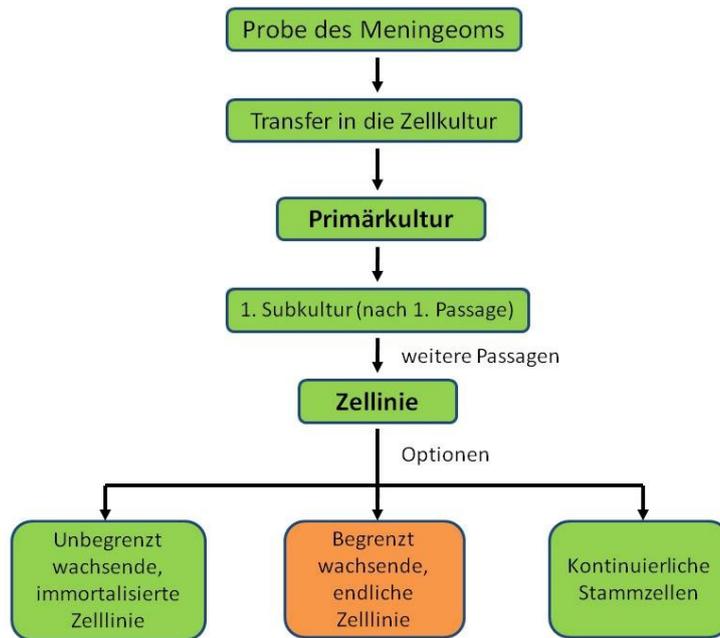


Abbildung 22: Anlegen einer Primärkultur und Definition der daraus entstehenden Zelllinien (modifiziert nach (48))

Bei der Gewinnung einer Primärkultur muss auf die strikte Einhaltung aseptischer Bedingungen geachtet werden, um eine Kontamination der Zellkulturen zu verhindern. Dazu gehört die aseptische Entnahme der Gewebeprobe und eine Versetzung der Transport- und Kulturmedien mit antibakteriell und antimykotisch wirksamen Substanzen. Darüber hinaus sind eine Verarbeitung unter der Sterilbank und eine möglichst feine Zerkleinerung der Proben erforderlich. Die Konzentration der in die Primärkultur ausgesäten Zellen muss deutlich über der normalen Konzentration für Subkulturen bestehen, da ein großer Anteil der primär ausgesäten Zellen direkt abstirbt. Desweiteren ist eine engmaschige Kontrolle der Zellen wichtig, um schnell auf eventuelle Veränderungen reagieren zu können. (90)

Bei der Durchführung der intraoperativen Präparatgewinnung und der darauffolgenden Weiterverarbeitung haben wir auf die strikte Einhaltung der aseptischen Bedingungen und auch der sonstigen oben genannten Voraussetzungen geachtet.

Eine Problematik der Subkultivierung einer Primärkultur ist die eintretende Seneszenz der Zellen. Dies bedeutet, dass die Proliferationsrate der Zellen mit zunehmender Anzahl der Passagen abnimmt und dazu führt, dass die Kultur abstirbt. (48) Als Ursachen hierfür kommen die Verkürzung der Chromosomenenden, oxidativer Stress oder inadäquate Nährstoffversorgung in Frage. Außerdem kommt es im Normalfall zu

einer spontanen Transformation einiger Zellen, welche die nicht-transformierten Ursprungszellen überwuchern können und somit das Zellbild verändern können. Diese transformierten Zellen haben einen veränderten Phänotyp und andere Wachstumseigenschaften. (48) Daher ist die Kultivierung der primären Zellen und die Anzahl der Passagen zeitlich begrenzt, sodass die Versuche an der ersten Subkultur durchgeführt wurden. Auf diese Weise kann die Gefahr der Überwucherung der Kultur durch transformierte Zellen soweit wie möglich reduziert werden.

Neben transformierten, dedifferenzierten Zellen besteht auch die Möglichkeit einer Überwucherung der Zellkultur durch Fibroblasten. Dies ist eines der Hauptprobleme bei der Primärkultivierung, da nahezu alle zu kultivierenden Gewebe teils aus bindegewebigen Strukturen bestehen, die Fibroblasten enthalten. Diese überwuchern dann die höher spezialisierten Zellen, da sie ein höheres Proliferationsvermögen haben als die eigentlich gewünschten Zellen. Durch noch nicht vollständig geklärte Ursachen kommt es zu einer Wachstumsselektion der Fibroblasten und somit zu einer Veränderung des Zellbildes. (49) Eine durch Fibroblasten überwucherte Kultur kann nicht für Experimente verwendet werden, da das gemischte Zellbild die Aussagekraft herabsetzen würde. Daher wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt, um die meningealen Zellen von den Fibroblasten differenzieren zu können. (siehe 4.1.2) (48, 49, 74)

Eine engmaschige mikroskopische Kontrolle der Zellen ist wichtig, weil die Möglichkeit der Kontakthemmung in Monolayer-Kulturen besteht, welche die Zellen in ihrer Zellteilung arretiert. Dadurch wird die Apoptose der Zellen eingeleitet und es kommt zum Zelltod. (1) Diese abgestorbenen Zellen werden durch Zellteilung ersetzt. Eine erhöhte Zellteilungsrate führt aber auch zu einer erhöhten Rate von transformierten und dedifferenzierten Zellen. (66)

4.1.2 Optimierung des Protokolls zur Primärkultivierung

Für die weitere Anpassung des von Hardy et al. beschriebenen Protokolls wurden einige Veränderungen (Nährmedium, Inkubationszeiten, Verarbeitung des Tumormaterials) vorgenommen. Es wurden Parallelversuche (Lagerung, Kollagenbeschichtung) durchgeführt, welche aber rein exemplarischen Charakter behielten.

Zur weiteren Festigung des Protokolls für weitere Versuchsreihen sollten erneute, kontrollierte Versuche zu Austestung der optimalen Kultivierungsbedingungen durchgeführt werden.

4.1.3 Immunhistochemischer Nachweis der EMA-Expression

Zur Durchführung von Experimenten mit den hergestellten Primärkulturen und den daraus abgeleiteten Subkulturen ist eine Verifizierung der meningealen Herkunft der Zellen notwendig, um aus den Versuchsergebnissen Aussagen treffen zu können. Bei der Anzucht von Primärzellen ist eine mögliche Überwucherung mit Fibroblasten ein generelles Problem. (49) Die Abgrenzung der angezüchteten Zellen von Fibroblasten ist somit ein sehr wichtiger Faktor für die Aussagekraft der folgenden Experimente.

Meningeomzellen exprimieren an ihrer Zelloberfläche verschiedene Oberflächenantigene. Als häufigster immunhistochemischer Marker wird in der Diagnostik das epitheliale Membran Antigen (EMA) verwendet. (55, 71) Darüber hinaus können auch die Marker Vimentin und S-100 verwendet werden, welche aber keine genaue Differenzierung zu Fibroblasten zulassen, da diese ein ähnliches Expressionsmuster haben.

In der zuvor dargestellten Versuchsreihe konnte bei 81,2% eine EMA-Expression nachgewiesen werden. Sowohl die Quantität als auch die Qualität des immunhistochemischen EMA-Nachweises waren inhomogen. Es konnte gezeigt werden, dass eine stärkere EMA-Expression mit einem früheren Zeitpunkt der ersten Passage der Primärzellen einhergeht. Kein Zusammenhang bestand zwischen dem WHO-Grad und der Ausprägung der EMA-Expression.

In den durchgeführten Färbungen konnten nicht immer positive Ergebnisse erzielt werden. Zum Einen zeigten sich in einigen Präparaten gar keine EMA-positiven Zellen und zum Anderen waren in manchen Färbungen EMA-positive Zell-Cluster zu sehen, wohingegen die umliegenden Zellen sich als EMA-negativ darstellten. Als Ursache für die negative EMA-Expression kommen zwei Möglichkeiten in Frage: 1. Die EMA-negativen Zellen sind nicht meningealer Herkunft, sondern Fibroblasten, die die Primärkultur überwuchert haben. 2. Die primären Meningeomzellen werden in der Kultur seneszent und verlieren dadurch die Fähigkeit zur EMA-Expression. Dieses Problem weist darauf hin, dass die Durchführung einer immunhistochemischen Färbung

allein nicht ausreicht, um die meningeale Herkunft der kultivierten Zellen sicher zu bestätigen. Zur genaueren Herkunftsdiagnostik müsste eine genetische Analyse der kultivierten Zellen nach Meningeom-typischen Veränderungen durchgeführt werden.

Die häufigsten genetischen Veränderungen in Meningeomen findet man auf dem langen Arm von Chromosom 22 (22q). Dabei kommt es in den meisten Fällen durch Allelverlust, einem Verlust der Heterozygotität (LOH) entsprechend, zu einer inaktivierenden Mutation in Tumorsuppressorgenen. Das häufigste betroffene Gen auf 22q ist das NF-2-Gen, welches das Protein Merlin, einen Tumorsuppressor, codiert. Veränderungen im NF-2-Gen finden sich in ca. 50% der sporadischen Meningeome und in allen Neurofibromatose-assoziierten Meningeomen. Die Mutationen sind in allen Meningeomen (WHO °I-III) gleichermaßen zu finden, sodass dies ein Hinweis für die Beteiligung an der Tumorgenese dieser Mutation ist. Da aber auch andere 22q-Mutationen in Meningeomen ohne begleitende NF-2-Mutation gefunden wurden, geht man in der Tumorentstehung von mehreren ursächlichen Gen-Loci aus. Darüber hinaus existieren in Meningeomen weitere typische genetische Veränderungen, wie zum Beispiel der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1. Diese 1p-Verluste sind vor allem in atypischen und anaplastischen Meningeomen zu finden. Daher wird angenommen, dass diese Veränderung nicht mit der Tumorentstehung, sondern mit der Tumorentstehung zusammenhängt. (55, 69, 71)

Methodisch könnte man die genetischen Veränderungen, vor allem der Nachweis von 22q-Veränderungen, mittels einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nachweisen. Als Material müsste man die DNA aus dem intraoperativ gewonnenem Tumormaterial (Positiv-Kontrolle), aus Leukozyten des Patienten (Negativ-Kontrolle) und aus den kultivierten Zellen gewinnen und jeweils eine PCR bezüglich LOH der 22q-Region durchführen.

4.1.4 Inkubation mit 5-ALA und PDT

Die Methodik von Stummer et al. (61, 86, 94) stellte die Grundlage für die Inkubation der Zellen mit 5-ALA und der anschließenden PDT dar. Die Zellen wurden für vier Stunden mit 5-ALA im CO₂-Inkubator inkubiert und bei der Verarbeitung wurde auf ausreichenden Lichtschutz geachtet. Die Inkubationszeit von vier Stunden leitete sich aus der Anwendung der PDT an Gliomzelllinien her. (24) Um optimale Ergebnisse der PDT zu erzielen, sollte diese durchgeführt werden, wenn die PPIX-Akkumulation in

den Zellen am höchsten ist. Dies hätte man vor Beginn der Versuchsreihe photometrisch bestimmen müssen, um das Protokoll dahingehend anzupassen.

Die Methodik der PDT wurde anhand eines in unserem Labor etablierten Protokolls übernommen (bisher unveröffentlichte Ergebnisse) und nur minimal modifiziert.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Primärkultivierung

Um eine statistisch wertvolle Aussage über spätere Versuchsergebnisse geben zu können, ist eine konstante Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter gleichbleibenden Bedingungen eine wichtige Voraussetzung. Dies ist bei der Verwendung von Primärzellen und deren Subkulturen schwer möglich. Zum einen ist es uns nicht gelungen, eine stabile Zelllinie zu züchten, welche über eine längere Versuchsreihe verwendet werden konnte, zum anderen bedeutete die Verwendung von Tumormaterial von verschiedenen Patienten, dass die daraus entstehenden Zellkulturen niemals identisch waren. Es entstand eine Vielfalt von unterschiedlichen kultivierten Zellen, sodass eine direkte Reproduzierbarkeit unter konstanten Bedingungen nicht gegeben war. Dies wäre nur bei der Verwendung von immortalisierten Zelllinien möglich gewesen.

Es ist schwierig, die von uns entwickelte Methode zur Primärkultivierung von Meningeomzellen in den wissenschaftlichen Kontext einzuordnen, da es wenig Literatur zum Vergleich gibt. Orientierend kann man sagen, dass die von uns erreichten Kultivierungszeiten bis zur nächsten Passage und die Abstände des Mediumwechsels ungefähr dem Verfahren anderer Arbeitsgruppen mit Meningeom-Primärzellkulturen entsprechen. Auch die Tatsache, dass nur frühe Passagen für die Versuche verwendet wurden, wurde mehrfach in der Literatur beschrieben. Meist wurden für die jeweiligen Experimente Zellen der Passagen 1-4 verwendet (in der vorliegenden Studie Passage 1-2). (6, 52, 70, 91)

4.2.2 5-ALA-basierte PDT und Meningeome

In den zuvor dargestellten Ergebnissen der Untersuchung konnte die Wirksamkeit der 5-ALA-basierten PDT gezeigt werden. Ab einer ALA-Dosis von 25µg/ml zeigte sich ein signifikanter Einfluss auf das Überleben der Zellen ($p=0,007$).

Eine direkte zytotoxische Wirkung durch 5-ALA und dessen Derivate oder durch die alleinige Bestrahlung konnte anhand der dargestellten Negativkontrollen ausgeschlossen werden. Sowohl die Inkubation mit 5-ALA ($p=0,292$) als auch die isolierte Bestrahlung der Zellen ($p=0,699$) zeigten keinen signifikanten Effekt auf die Vitalität der Zellen. Somit kann indirekt auf die Wirksamkeit einer Kombination aus 5-ALA Inkubation und PDT geschlossen werden.

Insgesamt gibt es bisher wenige Erfahrungen über die Anwendung der 5-ALA basierten PDT an Meningeomen. Die Tatsache, dass die meisten Meningeome benigne und gut resezierbar sind, ist sicherlich ursächlich daran beteiligt. Darüber hinaus wird die PDT vor allen Dingen für maligne Tumoren verwendet (77).

Bereits in den neunziger Jahren gab es erste Versuche die photodynamische Therapie an Meningeomen *in vitro* zu testen. (53, 89)

Marks et al. (53) untersuchten die zytotoxische Aktivität der PDT an verschiedenen Meningeomen unter Verwendung von Hämatoporphyrin Derivat (HpD) als Photosensibilisator. Die für die Versuche verwendeten Zellen waren Primärzellen, welche aus intraoperativ gewonnenem Material gezüchtet wurden. Die Zellen wurden in eine 96-Well-Platte ausgesät, darin eine Nacht inkubiert und am folgenden Tag für vier Stunden mit unterschiedlichen Dosen HpD inkubiert und daraufhin mit 40 mW/cm² bestrahlt. Die Vitalität der Zellen bzw. die Zytotoxizität der PDT wurde im Anschluss mittels eines MTT-Assays bestimmt. Diese Methodik entspricht in groben Zügen des von uns verwendeten Versuchsaufbaus. Wichtigster Unterschied ist die Verwendung eines anderen Photosensibilisators an Stelle von 5-ALA. In den Ergebnissen zeigte sich ein dosisabhängiges Überleben der Zellen nach PDT-Behandlung. In den Kontrollgruppen zeigte sich kein Effekt durch HpD allein oder durch die PDT ohne Hinzugabe eines Photosensibilisators.

Diese Ergebnisse sind mit unseren Resultaten zu vereinbaren. Bereits damals wurde die PDT als mögliche adjuvante Therapie für unvollständig resezierte Meningeome angesehen, fand allerdings keine klinische Anwendung. Wichtig bei der Bewertung ist aber die Tatsache, dass Marks et al. nur eine sehr kleine Fallzahl von fünf

Meningeomen bearbeitet haben, sodass weitere Studien empfohlen wurden. Darüber hinaus wird auf Grund des ungünstigen Nebenwirkungsprofils von HpD (2) bereits die Verwendung eines anderen Photosensibilisators diskutiert.

Sieben Jahre später veröffentlichten Tsai et al. (89) eine vergleichende Studie über den photodynamischen Effekt auf Gliom- und Meningeomzellen unter Verwendung von 5-ALA als Photosensibilisator. Tsai et al. verwendeten dafür aber keine Primärzellen, sondern die immortalisierten Zelllinien U-105MG (Gliome) und CH-157MG (Meningeome). Hier unterschied sich der Versuchsaufbau zu unserer Methodik dahingehend, dass die Zellen für 24 Stunden mit 5-ALA inkubiert wurden und eine geringere Bestrahlungsstärke von $12,4 \text{ mW/cm}^2$ verwendet wurde.

In dieser Versuchsreihe zeigte sich sowohl eine stärkere Fluoreszenz nach 5-ALA Applikation, als auch eine deutlich höhere Empfindlichkeit für die PDT bei den Gliomzellen im Vergleich zu den Meningeomzellen. Unter Verwendung von $100 \mu\text{g/ml}$ 5-ALA und einer Bestrahlungsenergie von 35 J/cm^2 konnte eine Zytotoxizität von 25% für Meningeome erreicht werden. Unter Steigerung der 5-ALA-Konzentration und der Bestrahlungsenergie konnte keine weitere Steigerung der Zytotoxizität erzielt werden.

Als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse wird ein unterschiedliches Ausmaß des 5-ALA-Uptakes und der PPIX-Synthese diskutiert. Meningeome scheinen hiernach kein ideales Ziel für die Verwendung der PDT zu sein. Dennoch wird eine mögliche Nützlichkeit in vivo zur Diskussion gestellt.

Voraussetzung für den Erfolg der Behandlung ist demnach die Akkumulation von PPIX in den Meningeomzellen. Der direkte PPIX-Nachweis mittels Fluoreszenzuntersuchung der Primärzellen wurde in unserer Untersuchung nicht erbracht.

In letzter Zeit konnten einige Arbeitsgruppen eine intraoperative Fluoreszenz von Meningeomen nachweisen und somit einen Hinweis für die ausreichende Akkumulation von PPIX nach externer 5-ALA-Applikation geben. (5, 14, 34, 57) Hierbei wurde die Fluoreszenz von PPIX unter blauem Licht zur fluoreszenzgestützten Resektion (FGR) der Meningeome verwendet.

Kajimoto et al. (34) beschrieben eine kleine Fallserie in welcher 20 von 24 Meningeomen intraoperativ fluoreszierten. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen Fluoreszenz und WHO-Grad gefunden werden. Außerdem fanden sie keine Fluoreszenz außerhalb des Tumorgebietes. Dies wurde als Zeichen für eine selektive Aufnahme von 5-ALA und Umwandlung in PPIX durch die Meningeomzellen gewertet.

Auch Morofujii et al. (57) berichteten in ihrem Case-Report über eine ausgeprägte Fluoreszenz des Tumorgewebes *in situ*. In der histologischen Aufarbeitung zeigte sich auch, dass die nicht-fluoreszierenden Ränder des Resektionsgebietes frei von Meningeomzellen waren.

Eine ähnliche Aussage wie Kajimoto et al. konnten auch Coluccia et al. (14) treffen. In dieser Studie zur FGR konnte in 31 von 33 Fällen eine 5-ALA-induzierte Fluoreszenz nachgewiesen werden. 32 von 33 waren WHO °I und °II Meningeome. Ähnlich wie bei Kajimoto et al. konnte auch hier keine Korrelation zwischen den WHO-Graden und dem Ausmaß der Fluoreszenz gefunden werden. Durch die FGR war in 25 von 33 Fällen eine Simpson Grad I oder II Resektion möglich. Auf histologischer Ebene zeigte sich außerdem keine Korrelation zwischen nachgewiesener Fluoreszenz und MIB-1-Index (Proliferationsindex) und Mitoserate.

In den oben geschilderten Arbeiten konnte *in vivo* gezeigt werden, dass Meningeome 5-ALA selektiv anreichern und PPIX synthetisieren. Diese Tatsache ist eine wichtige Grundlage für die Anwendung der PDT *in vitro*, da ohne gesicherte PPIX Akkumulation keine zytotoxische Wirkung der PDT zu erwarten wäre. Die nicht vorhandene Korrelation zwischen WHO-Grad und Ausmaß der Fluoreszenz ist mit unseren Ergebnissen zu vereinbaren. Der Erfolg der durchgeführten PDT zeigte keinen Zusammenhang mit dem Malignitätsgrad nach WHO ($p=0,093$).

Wie zuvor bereits erläutert, konnte die Wirksamkeit der 5-ALA-basierten PDT für Meningeome in der Untersuchung *in vitro* gezeigt werden. Darüber hinaus zeigte sich aber auch eine Dosisabhängigkeit des Therapieerfolgs. Bei steigender 5-ALA-Dosis war der PDT-induzierte zytotoxische Effekt stärker. Wie in Abbildung 20 und 21 des Ergebnisteils dargestellt, kam es bei allen untersuchten Meningeomzellen zu einem dosisabhängigen Absterben der Zellen. Es zeigte sich eine ausgedehnte Spannweite der überlebenden Zellen nach PDT bezogen auf die 5-ALA-Dosis. So überlebten bei einer Dosis von 50µg/ml ALA 2,81% bis 94,93% der Zellen. Dies ist am ehesten auf die Verwendung unterschiedlicher Meningeome zurückzuführen.

In Abbildung 20 ist zu sehen, dass eine sichere mittlere letale Dosis (LD 50) nicht zu reproduzieren war. In 7 von 11 Fällen waren bei der Verwendung von 50µg/ml ALA 50% oder mehr der ursprünglichen Zellen gestorben, sodass wir dies als Annäherungswert an die LD 50 ansehen.

Für die große Spannweite der Ergebnisse und das unterschiedliche Ansprechen der einzelnen Zelllinien gibt es verschiedene Erklärungsansätze.

Hefti (25) beschreibt in einem Kommentar bezüglich der zuvor bereits erwähnten Arbeit von Collucia et al. (14) einen Fall, bei dem intraoperativ eine deutlich inhomogene Fluoreszenz innerhalb des Meningeoms dargestellt wurde. Diese Inhomogenität der Fluoreszenz wurde bereits bei Gliomen gesehen. (27) Hefti weist darauf hin, dass die FGR für Meningeome erst sinnvoll ist, wenn die Fluoreszenzunterschiede mit der intratumoralen genetischen Inhomogenität der Meningeome in Verbindung gebracht werden konnten.

Diese intratumorale Inhomogenität auf genetischer Ebene könnte eine Ursache für die große Spannweite der erzeugten PDT-Ergebnisse sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es, bezogen auf chromosomale Aberrationen, eine ausgeprägte Heterogenität der genetischen Veränderungen innerhalb eines Tumors gibt. (67, 75) Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die Zellen sowohl innerhalb eines Meningeoms, als auch zwischen unterschiedlichen Tumoren eine unterschiedliche Enzymausstattung haben. Eine unterschiedliche Enzymexpression könnte zu einem unterschiedlich starken Uptake von 5-ALA führen und des Weiteren zu einer unterschiedlich ausgeprägten PPIX-Synthese führen. Dies würde erklären, warum einige Zelllinien deutlich besser auf die PDT angesprochen haben als andere. Auch auf mikroskopischer Ebene konnte gezeigt werden, dass Meningeome zum Teil nicht-fluoreszierende Zellen enthalten (92), was auf biologische Variationen zwischen den Tumorzellen beruhen könnte.

In der Arbeit von Whitson et al. (92) konnte aber auch erneut gezeigt werden, dass tumorfreie Areale keine Fluoreszenz zeigen, was die Annahme verstärkt, dass Meningeome selektiv 5-ALA aufnehmen und das umgebende Gewebe, und somit auch andere Zellen in der Zellkultur, nicht.

Als weiterer Erklärungsansatz für die große Spannweite der erzielten Ergebnisse kann das ALA-Uptake als Voraussetzung für die PPIX-Synthese herangezogen werden.

Der genaue Uptake-Mechanismus für 5-ALA und die intrazellulären Regulationsmechanismen bei der PPIX-Synthese sind weiterhin nicht vollständig geklärt. Eine unterschiedlich starke Akkumulation von PPIX und eine daraus resultierende erhöhte Sensibilität für die PDT der einzelnen Meningeome könnten Ursache für die große Spannweite der erzielten Ergebnisse sein.

Es konnte gezeigt werden, dass es nach exogener Applikation von 5-ALA zu einer Gewebsspezifität der PPIX-Akkumulation kommt, obwohl alle Zellen, die

Mitochondrien besitzen, theoretisch in der Lage sind Häm und somit auch PPIX zu synthetisieren. Es findet sich eine höhere PPIX-Konzentration in malignen und prämaligen Geweben als in deren Ursprungsgeweben. Grundlage dafür ist eine höhere PPIX-Syntheserate als die PPIX-Metabolismusrate. Die erhöhte intrazelluläre Konzentration von PPIX ist am ehesten auf drei Mechanismen zurückzuführen: Erhöhte Aufnahme von 5-ALA in die Zielzellen, eine erhöhte Syntheserate von 5-ALA zu PPIX und eine reduzierte Umwandlung von PPIX zu Häm. (35, 36)

Der genaue Aufnahmemechanismus für 5-ALA in die Zellen ist bisher nicht eindeutig geklärt. Man nimmt heute aber an, dass die Aufnahme von 5-ALA in die Zellen nicht der entscheidende Faktor für die selektive Akkumulation von PPIX ist. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Aufnahmerate zwischen unterschiedlichen Zelltypen gefunden werden. Daher scheint die Gewebeselektivität eher auf einem veränderten PPIX-Metabolismus zu beruhen. (44)

Als Schlüsselstellen und geschwindigkeitsbestimmende Schritte in der Häm-Synthese werden drei Enzyme angesehen: Die Bildung von 5-ALA durch die 5-ALA-Synthetase, die Umwandlung von Porphobilinogen zu Uroporphyrinogen III durch die Porphobilinogendesaminase (PBGD) und die Bildung von Häm aus PPIX mittels Ferrochelatase (FC) (vergleiche Abbildung 1 in 1.2.1). Durch die Hemmung der 5-ALA-Synthetase durch Häm existiert ein negativer Feedback-Mechanismus. Diese negative Rückkopplung wird durch die exogene 5-ALA Zufuhr umgangen, sodass die beiden durch die PBGD und die FC katalysierten Schritte entscheidend für die intrazelluläre PPIX-Akkumulation zu sein scheinen. Eine erhöhte Aktivität der PBGD und eine erniedrigte Aktivität der FC würden daher zu einer verstärkten PPIX-Akkumulation führen. (62, 68)

Nach Applikation von 5-ALA wurde *in vitro* eine Zunahme der PBGD-Aktivität gemessen, woraus man auf einen regulatorischen Einfluss der PBGD auf die PPIX-Anreicherung schließen kann. Die erhöhte Aktivität der PBGD führte dementsprechend auch zu einer Zunahme der intrazellulären PPIX Konzentration. (21)

Ohgari et al. (59) zeigten, dass eine Zunahme der Ferrochelatase-Aktivität zu einer Abnahme der PPIX-Konzentration führt. Umgekehrt führt eine Hemmung der FC, zum Beispiel durch $MnCl_2$ und NO, zu einer Erhöhung von PPIX-Konzentration. (31) Es besteht eine inverse Korrelation zwischen der Ferrochelatase-Expression und der PPIX-Akkumulation.

Nach den relativ erfolglosen Versuchen der PDT-Anwendung bei Meningeomen durch Tsai et al., führten Hefti et al. (26) weitergehende Untersuchungen bezüglich der photodynamischen Bestrahlung von Meningeomen durch. Unter Verwendung der Zelllinien BEN-MEN-1 und HBL-52 wurde in den Zellen die PPIX-Akkumulation nach 5-ALA-Exposition, die Aktivität der Ferrochelatase und ein Vergleich der FC-Aktivität mit der PPIX-Produktion und der PDT-Empfindlichkeit durchgeführt.

In den Ergebnissen zeigte sich eine signifikant höhere PPIX-Akkumulation in den BEN-MEN-1-Zellen als in den HBL-52 Zellen. Dem gegenüber stand eine im Vergleich höhere Aktivität der Ferrochelatase in den HBL-52-Zellen als in denen der BEN-MEN-1-Zelllinie. Dies stützt die These einer inversen Korrelation der Ferrochelatase-Aktivität mit der PPIX-Anreicherung.

In der schließlich angewendeten PDT zeigten die BEN-MEN-1-Zellen ein signifikantes Ansprechen auf eine photodynamische Bestrahlung. Die HBL-52-Zellen zeigten keinen relevanten photodynamischen Effekt.

Hefti et al. schlussfolgerten, dass das unterschiedliche Ansprechen der beiden verwendeten Zelllinien auf die PDT durch die unterschiedlich ausgeprägte PPIX-Konzentration bedingt ist, welche auf dem unterschiedlichen Aktivitätsgrad der Ferrochelatase beruht.

Dieser Erklärungsansatz könnte auf die von uns erzielten Ergebnisse übertragen werden. Die in unserer Versuchsreihe bestehende große Spannweite der Ansprechraten auf die PDT zwischen den einzelnen Meningeomen (vergleiche Abbildung 19 und 20 in 3.2.6), könnte auf eine unterschiedliche Aktivität der Ferrochelatase zwischen den verwendeten Tumoren basieren. Hefti et al. verwendeten bei der PDT eine konstante 5-ALA-Konzentration von 2mM, bei einer wechselnden Strahlendosis. In unseren Experimenten wurden im Gegensatz dazu variierende 5-ALA-Konzentrationen verwendet, bei gleichbleibender Strahlendosis. Der Einfluss hiervon auf die Ergebnisse bleibt unklar. Durch eine Hemmung der Ferrochelatase könnte der photodynamische Effekt der PDT auf die Meningeomzellen eventuell gesteigert werden.

Zusammenfassend kann die Ursache der großen Spannweite unserer Ergebnisse und die Bedeutung der oben geschilderten möglichen Einflussfaktoren nicht abschließend geklärt werden.

Die zuvor geschilderten Ergebnisse müssen in der Zusammenschau kritisch betrachtet werden. Die Aussagefähigkeit der Ergebnisse ist durch den geringen

Stichprobenumfang (n=11) stark eingeschränkt. Um validere Aussagen treffen zu können, müsste in einer weiteren Untersuchung der Stichprobenumfang deutlich größer sein. Im Rahmen der vorgelegten Untersuchung konnten daher keine relevanten Vorhersagewerte und Einflussfaktoren auf die Wirkung der Behandlung ausgemacht werden.

Die Verwendung von Primärzellen ist anfällig für Fehlerquellen. Die Primärkultivierung birgt das große Risiko der Verunreinigung und der Überwucherung durch Fibroblasten.

Für den klinischen Einsatz der PDT wären zuvor noch weitere *in vitro* Studien notwendig. Bei der Verwendung von primären Zellkulturen müsste besonders auf die meningeale Herkunft der Zellen geachtet werden, welche am ehesten durch einen Nachweis Meningeom-typischer Mutationen mittels PCR durchgeführt werden könnte (z. B. LOH 22q). Darüber hinaus wäre eine weitere Testung der Methode an immortalisierten Zelllinien sicherlich sinnvoll, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse darzustellen. Außerdem könnte man auf diese Weise nach Vorhersagefaktoren suchen, die ein mögliches Ansprechen der Tumoren *in vivo* einschätzen lassen. Denn auf Basis unserer Ergebnisse ist nicht abzuschätzen, in welchem Ausmaß ein Meningeom auf eine intraoperative Behandlung mit der PDT ansprechen würde.

Ein weiterer Schritt wäre die Testung und Quantifizierung der direkten 5-ALA-Aufnahme mittels photometrischer Messung der PPIX-Fluoreszenz zum Nachweis der 5-ALA-Aufnahme in die Zellen.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob es noch weitere Faktoren gibt, die das Ausmaß des Therapieerfolges der PDT beeinflussen. Völlig unklar ist bisher, inwieweit zum Beispiel eine präoperative Strahlentherapie Einfluss auf die PPIX-Anreicherung und die Empfindlichkeit der Zellen für die PDT hat. Es sollte auch eine Differenzierung zwischen Primärtherapie und Rezidivtherapie stattfinden.

Im Anschluss an eine intensivierete *in vitro* Testung müsste eine *in vivo* Testung im Tiermodell erfolgen. Eine *in vivo* Anwendung am Menschen ist daher noch ein weiter Weg.

Der entscheidende Prognose- und Rezidivfaktor bei der Therapie von Meningeomen ist die vollständige Resektion des Tumors. Dennoch treten gelegentlich sogar bei WHO ° I Tumoren durch Infiltration von Dura, Knochen und umliegenden wichtigen Strukturen

Probleme bei der Resektion auf. Die Schonung lebenswichtiger Strukturen und die bessere Differenzierung zwischen Tumorgewebe und normalem Gewebe kann teilweise durch die fluoreszenzgestützte Resektion ermöglicht werden. Ergänzend dazu könnte die Anwendung der PDT in funktionell wichtigen Hirnregionen, durch eine Verringerung der OP-Radikalität, zu einer geringeren postoperativen Morbidität führen.

Die von uns erzielten Ergebnisse geben einen Hinweis, dass die photodynamische Therapie eine mögliche adjuvante Therapie nach operativer Meningeomextirpation darstellt. Auf diese Weise könnten das Rezidivrisiko und das Operationsausmaß eventuell verringert werden. Der klinische Einsatz sollte nach einer ausreichenden präoperativen Einschätzung des Rezidiv- und OP-Risikos erfolgen.

Da trotz intraoperativ scheinbar vollständiger Tumorentfernung dennoch in 10-32% Rezidive auftreten, wurde versucht Risikofaktoren für ein Rezidiv zu identifizieren. Jääskeläinen et al. (32) beschrieben eine Knocheninvasion, weiches Tumorgewebe und ausgeprägte Duraveränderungen als solche Risikofaktoren. Bei Idlan et al. (30) fanden sich außerdem auch die ursprüngliche Tumorgroße, das Ausmaß des perifokalen Ödems und die Wachstumsform als Prognosefaktor für ein Rezidiv. Das Vorhandensein solcher Risikofaktoren sollte in die Planung des OP-Umfangs und einer möglichen adjuvanten Therapie mit einfließen.

Sowohl als primäre Therapie bei inoperablen Patienten, als auch als adjuvante Therapie bei unvollständig resezierten Meningeomen, wird eine low-dose Bestrahlung bereits erfolgreich angewendet. Dies führt bei vorhandener Infiltration der venösen Sinus oder des Tentoriums zu einer Verlängerung des progressions- bzw. rezidivfreien Intervalls mit einer niedrigen therapiebedingten Morbidität. (33)

Auch die PDT könnte eine adjuvante Therapieform mit einer geringen Nebenwirkungsrate und Morbidität darstellen. Durch die selektive Behandlung der Tumorzellen, könnten Areale wichtiger neurologischer Funktion und wichtige Strukturen, wie zum Beispiel Gefäße, geschont werden.

5. Schlussfolgerungen

Meningeome machen 20-34% aller intrakraniellen Tumoren aus und sind meist gutartig (WHO °I). Bei klinischer Symptomatik oder Wachstumsprogredienz ist die operative Entfernung die Standardtherapie. Wichtigster positiver Prognosefaktor ist eine möglichst vollständige Resektion. Dies ist bei Infiltration des Tumors in umgebende Strukturen oder engen Kontakt zu funktionell wichtigen Hirnarealen nicht immer vollständig möglich.

Es ist gelungen eine Methode zur Primärkultivierung von Meningeomen zu etablieren. Durch Modifikation eines zuvor bereits beschriebenen Protokolls war es möglich, wiederholt erfolgreich Meningeome primär zu kultivieren. Des Weiteren konnte mit der immunhistochemischen Färbung des epithelialen Membranantigens der Nachweis der meningealen Herkunft der Zellen durchgeführt werden.

In der zuvor dargestellten Studie konnte gezeigt werden, dass die photodynamische Therapie unter der Verwendung von 5- δ -Aminolävulinsäure als Photosensibilisator einen dosisabhängigen Effekt auf das Überleben von primären Meningeomzellen *in vitro* hat. Darüber hinaus zeigte sich aber auch, dass die Ansprechrate der unterschiedlichen Zellreihen aus unterschiedlichen Primärtumoren nicht einheitlich war. Die hohe Anfälligkeit von Primärkulturen für die Überwucherung durch Fibroblasten und andere Kontaminationen ist ein wichtiger einschränkender Faktor bei der Bewertung der Studie.

Um eine abschließende Einschätzung der klinischen Wertigkeit der vorgelegten Studie geben zu können, sind weitere Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* notwendig um den therapeutischen Benefit der 5- δ -Aminolävulinsäure basierten photodynamischen Therapie besser abschätzen zu können.

6. Literaturverzeichnis

1. Al-Rubeai M, Singh RP: Apoptosis in cell culture. **Curr Opin Biotechnol** 9:152-156, 1998.
2. Allison RR, Sibata CH: Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. **Photodiagnosis Photodyn Ther** 7:61-75, 2010.
3. Auler H, Banzer G: Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. **Zeitung für Krebsforschung** 53:65-68, 1942.
4. Beck TJ, Kreth FW, Beyer W, Mehrkens JH, Obermeier A, Stepp H, Stummer W, Baumgartner R: Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. **Lasers Surg Med** 39:386-393, 2007.
5. Bekelis K, Valdes PA, Erkmen K, Leblond F, Kim A, Wilson BC, Harris BT, Paulsen KD, Roberts DW: Quantitative and qualitative 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in skull base meningiomas. **Neurosurg Focus** 30:E8, 2011.
6. Black PM, Carroll R, Glowacka D, Riley K, Dashner K: Platelet-derived growth factor expression and stimulation in human meningiomas. **J Neurosurg** 81:388-393, 1994.
7. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR: Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** 2:91-106, 2005.
8. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR: Mechanisms in photodynamic therapy: Part two - cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** 2:1-23, 2005.
9. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR: Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** 1:279-293, 2004.
10. CBTRUS: CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumours Diagnosed in the United States in 2004-2007. **Central Brain Tumour Registry of the United States** 2011.
11. Christie A, Butler M: Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase. **J Biotechnol** 37:277-290, 1994.
12. Christodoulides M, Makepeace BL, Partridge KA, Kaur D, Fowler MI, Weller RO, Heckels JE: Interaction of *Neisseria meningitidis* with human meningeal

cells induces the secretion of a distinct group of chemotactic, proinflammatory, and growth-factor cytokines. **Infect Immun** 70:4035-4044, 2002.

13. Claus EB, Bondy ML, Schildkraut JM, Wiemels JL, Wrensch M, Black PM: Epidemiology of intracranial meningioma. **Neurosurgery** 57:1088-1095, 2005.
14. Coluccia D, Fandino J, Fujioka M, Cordovi S, Muroi C, Landolt H: Intraoperative 5-aminolevulinic-acid-induced fluorescence in meningiomas. **Acta Neurochir (Wien)** 2010.
15. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q: Photodynamic therapy. **J Natl Cancer Inst** 90:889-905, 1998.
16. Dougherty TJ, Marcus SL: Photodynamic therapy. **Eur J Cancer** 28A:1734-1742, 1992.
17. Dowd CF, Halbach VV, Higashida RT: Meningiomas: the role of preoperative angiography and embolization. **Neurosurg Focus** 15:E10, 2003.
18. Eljamel MS, Goodman C, Moseley H: ALA and Photofrin fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre Phase III randomised controlled trial. **Lasers Med Sci** 23:361-367, 2008.
19. Ellison DW, Perry A, Rosenblum M, Asa S, Reid R, Louis DN: Tumours: non-neuroepithelial tumours and secondary effects, in Love S, Louis DN, Ellison DW (eds): *Greenfield's Neuropathology*. London, Hodder Arnold, 2008, pp 2002-2024.
20. Engelhard HH: Progress in the diagnosis and treatment of patients with meningiomas. Part I: diagnostic imaging, preoperative embolization. **Surg Neurol** 55:89-101, 2001.
21. Gibson SL, Cupriks DJ, Havens JJ, Nguyen ML, Hilf R: A regulatory role for porphobilinogen deaminase (PBGD) in delta-aminolaevulinic acid (delta-ALA)-induced photosensitization? **Br J Cancer** 77:235-242, 1998.
22. Gondi V, Tome WA, Mehta MP: Fractionated radiotherapy for intracranial meningiomas. **J Neurooncol** 99:349-356, 2010.
23. Hardy SJ, Christodoulides M, Weller RO, Heckels JE: Interactions of Neisseria meningitidis with cells of the human meninges. **Mol Microbiol** 36:817-829, 2000.
24. Hebeda KM, Saarnak AE, Olivo M, Sterenborg HJ, Wolbers JG: 5-Aminolevulinic acid induced endogenous porphyrin fluorescence in 9L and C6 brain tumours and in the normal rat brain. **Acta Neurochir (Wien)** 140:503-512, 1998.
25. Hefti M: Comment concerning: Intraoperative 5-aminolevulinic-acid-induced fluorescence in meningiomas, *Acta Neurochir* DOI 10.1007/s00701-010-0708-4, Intratumoral heterogeneity and fluorescence intensity in meningioma after 5-ALA pretreatment. **Acta Neurochir (Wien)** 153:959-960, 2011.

26. Hefti M, Hostenstein F, Albert I, Looser H, Luginbuehl V: Susceptibility to 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in WHO I meningioma cells corresponds to ferrochelatase activity. **Photochem Photobiol** 87:235-241, 2011.
27. Hefti M, von CG, Moschopoulos M, Siegner A, Looser H, Landolt H: 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX fluorescence in high-grade glioma surgery: a one-year experience at a single institution. **Swiss Med Wkly** 138:180-185, 2008.
28. Helseth R, Helseth E, Johannesen TB, Langberg CW, Lote K, Ronning P, Scheie D, Vik A, Meling TR: Overall survival, prognostic factors, and repeated surgery in a consecutive series of 516 patients with glioblastoma multiforme. **Acta Neurol Scand** 2010.
29. Hirschberg H, Sun CH, Tromberg BJ, Madsen SJ: ALA- and ALA-ester-mediated photodynamic therapy of human glioma spheroids. **J Neurooncol** 57:1-7, 2002.
30. Ildan F, Erman T, Gocer AI, Tuna M, Bagdatoglu H, Cetinalp E, Burgut R: Predicting the probability of meningioma recurrence in the preoperative and early postoperative period: a multivariate analysis in the midterm follow-up. **Skull Base** 17:157-171, 2007.
31. Inoue K, Karashima T, Kamada M, Shuin T, Kurabayashi A, Furihata M, Fujita H, Utsumi K, Sasaki J: Regulation of 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation in human urothelial carcinomas. **Pathobiology** 76:303-314, 2009.
32. Jaaskelainen J: Seemingly complete removal of histologically benign intracranial meningioma: late recurrence rate and factors predicting recurrence in 657 patients. A multivariate analysis. **Surg Neurol** 26:461-469, 1986.
33. Johnson WD, Loredon LN, Slater JD: Surgery and radiotherapy: complementary tools in the management of benign intracranial tumors. **Neurosurg Focus** 24:E2, 2008.
34. Kajimoto Y, Kuroiwa T, Miyatake S, Ichioka T, Miyashita M, Tanaka H, Tsuji M: Use of 5-aminolevulinic acid in fluorescence-guided resection of meningioma with high risk of recurrence. Case report. **J Neurosurg** 106:1070-1074, 2007.
35. Kennedy JC, Marcus SL, Pottier RH: Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results. **J Clin Laser Med Surg** 14:289-304, 1996.
36. Kennedy JC, Pottier RH: Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol B** 14:275-292, 1992.

37. 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.
38. Kick G, Messer G, Plewig G: [Historical development of photodynamic therapy]. **Hautarzt** 47:644-649, 1996.
39. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK: The WHO classification of tumors of the nervous system. **J Neuropathol Exp Neurol** 61:215-225, 2002.
40. Kondziolka D, Lunsford LD, Coffey RJ, Flickinger JC: Stereotactic radiosurgery of meningiomas. **J Neurosurg** 74:552-559, 1991.
41. Kondziolka D, Mathieu D, Lunsford LD, Martin JJ, Madhok R, Niranjan A, Flickinger JC: Radiosurgery as definitive management of intracranial meningiomas. **Neurosurgery** 62:53-58, 2008.
42. Kostron H, Obwegeser A, Jakober R: Photodynamic therapy in neurosurgery: a review. **J Photochem Photobiol B** 36:157-168, 1996.
43. Krammer B, Plaetzer K: ALA and its clinical impact, from bench to bedside. **Photochem Photobiol Sci** 7:283-289, 2008.
44. Krieg RC, Messmann H, Rauch J, Seeger S, Knuechel R: Metabolic characterization of tumor cell-specific protoporphyrin IX accumulation after exposure to 5-aminolevulinic acid in human colonic cells. **Photochem Photobiol** 76:518-525, 2002.
45. Kuratsu J, Kochi M, Ushio Y: Incidence and clinical features of asymptomatic meningiomas. **J Neurosurg** 92:766-770, 2000.
46. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R: A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. **J Neurosurg** 95:190-198, 2001.
47. Lieu AS, Howng SL: Intracranial meningiomas and epilepsy: incidence, prognosis and influencing factors. **Epilepsy Res** 38:45-52, 2000.
48. Lindl T, Gstraunthaler G: Allgemeine Aspekte der Primärkultur, *Zell- und Gewebekultur*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, 2008, pp 175-187.
49. Linge C, Green MR, Brooks RF: A method for removal of fibroblasts from human tissue culture systems. **Exp Cell Res** 185:519-528, 1989.
50. Longstreth WT, Jr., Dennis LK, McGuire VM, Drangsholt MT, Koepsell TD: Epidemiology of intracranial meningioma. **Cancer** 72:639-648, 1993.
51. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P: The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol** 114:97-109, 2007.

52. Malham GM, Thomsen RJ, Synek BJ, Finlay G, Tumewu P, Edgar SG, Marks PV, Furneaux CE: Diagnostic markers demonstrating successful culture of human meningioma cells. **J Clin Neurosci** 2:59-63, 1995.
53. Marks PV, Furneaux C, Shivvakumar R: An in vitro study of the effect of photodynamic therapy on human meningiomas. **Br J Neurosurg** 6:327-332, 1992.
54. Marosi C, Hassler M, Roessler K, Reni M, Sant M, Mazza E, Vecht C: Meningioma. **Crit Rev Oncol Hematol** 67:153-171, 2008.
55. Mawrin C, Perry A: Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. **J Neurooncol** 99:379-391, 2010.
56. Mirimanoff RO, Dosoretz DE, Linggood RM, Ojemann RG, Martuza RL: Meningioma: analysis of recurrence and progression following neurosurgical resection. **J Neurosurg** 62:18-24, 1985.
57. Morofuji Y, Matsuo T, Hayashi Y, Suyama K, Nagata I: Usefulness of intraoperative photodynamic diagnosis using 5-aminolevulinic acid for meningiomas with cranial invasion: technical case report. **Neurosurgery** 62:102-103, 2008.
58. Newton HB: Hydroxyurea chemotherapy in the treatment of meningiomas. **Neurosurg Focus** 23:E11, 2007.
59. Ohgari Y, Nakayasu Y, Kitajima S, Sawamoto M, Mori H, Shimokawa O, Matsui H, Taketani S: Mechanisms involved in delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of tumor cells: relation of ferrochelatase and uptake of ALA to the accumulation of protoporphyrin. **Biochem Pharmacol** 71:42-49, 2005.
60. Olivero WC, Lister JR, Elwood PW: The natural history and growth rate of asymptomatic meningiomas: a review of 60 patients. **J Neurosurg** 83:222-224, 1995.
61. Olzowy B, Hundt CS, Stocker S, Bise K, Reulen HJ, Stummer W: Photoirradiation therapy of experimental malignant glioma with 5-aminolevulinic acid. **J Neurosurg** 97:970-976, 2002.
62. Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM: 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. **Photochem Photobiol** 65:235-251, 1997.
63. Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE, Nesland JM: 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. **Cancer** 79:2282-2308, 1997.
64. Perria C, Capuzzo T, Cavagnaro G, Datti R, Francaviglia N, Rivano C, Tercero VE: Fast attempts at the photodynamic treatment of human gliomas. **J Neurosurg Sci** 24:119-129, 1980.

65. Perria C, Carai M, Falzoi A, Orunesu G, Rocca A, Massarelli G, Francaviglia N, Jori G: Photodynamic therapy of malignant brain tumors: clinical results of, difficulties with, questions about, and future prospects for the neurosurgical applications. **Neurosurgery** 23:557-563, 1988.
66. Pfaller W, Gstraunthaler G, Loidl P: Morphology of the differentiation and maturation of LLC-PK1 epithelia. **J Cell Physiol** 142:247-254, 1990.
67. Pfisterer WK, Hank NC, Preul MC, Hendricks WP, Puschel J, Coons SW, Scheck AC: Diagnostic and prognostic significance of genetic regional heterogeneity in meningiomas. **Neuro Oncol** 6:290-299, 2004.
68. Pogue BW, Gibbs-Strauss S, Valdes PA, Samkoe K, Roberts DW, Paulsen KD: Review of Neurosurgical Fluorescence Imaging Methodologies. **IEEE J Sel Top Quantum Electron** 16:493-505, 2010.
69. Ragel BT, Jensen RL: Molecular genetics of meningiomas. **Neurosurg Focus** 19:E9, 2005.
70. Ragel BT, Jensen RL, Gillespie DL, Prescott SM, Couldwell WT: Ubiquitous expression of cyclooxygenase-2 in meningiomas and decrease in cell growth following in vitro treatment with the inhibitor celecoxib: potential therapeutic application. **J Neurosurg** 103:508-517, 2005.
71. Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G: Histological classification and molecular genetics of meningiomas. **Lancet Neurol** 5:1045-1054, 2006.
72. Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H: Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **J Photochem Photobiol B** 96:1-8, 2009.
73. Rockhill J, Mrugala M, Chamberlain MC: Intracranial meningiomas: an overview of diagnosis and treatment. **Neurosurg Focus** 23:E1, 2007.
74. Sato GH, Sato JD, Okamoto T, McKeehan WL, Barnes DW: Tissue culture: the unlimited potential. **In Vitro Cell Dev Biol Anim** 46:590-594, 2010.
75. Sayagues JM, Tabernero MD, Maillo A, Espinosa A, Rasillo A, Diaz P, Ciudad J, Lopez A, Merino M, Goncalves JM, Santos-Briz A, Morales F, Orfao A: Intratumoral patterns of clonal evolution in meningiomas as defined by multicolor interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): is there a relationship between histopathologically benign and atypical/anaplastic lesions? **J Mol Diagn** 6:316-325, 2004.
76. Schrell UM, Rittig MG, Anders M, Koch UH, Marschalek R, Kiesewetter F, Fahlbusch R: Hydroxyurea for treatment of unresectable and recurrent meningiomas. II. Decrease in the size of meningiomas in patients treated with hydroxyurea. **J Neurosurg** 86:840-844, 1997.
77. Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ: Photodynamic therapy in oncology. **Expert Opin Pharmacother** 2:917-927, 2001.

78. Simpson D: The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 20:22-39, 1957.
79. Sioka C, Kyritsis AP: Chemotherapy, hormonal therapy, and immunotherapy for recurrent meningiomas. **J Neurooncol** 92:1-6, 2009.
80. Stafford SL, Perry A, Suman VJ, Meyer FB, Scheithauer BW, Lohse CM, Shaw EG: Primarily resected meningiomas: outcome and prognostic factors in 581 Mayo Clinic patients, 1978 through 1988. **Mayo Clin Proc** 73:936-942, 1998.
81. Stafford SL, Pollock BE, Foote RL, Link MJ, Gorman DA, Schomberg PJ, Leavitt JA: Meningioma radiosurgery: tumor control, outcomes, and complications among 190 consecutive patients. **Neurosurgery** 49:1029-1037, 2001.
82. Stepp H, Beck T, Pongratz T, Meinel T, Kreth FW, Tonn JC, Stummer W: ALA and malignant glioma: fluorescence-guided resection and photodynamic treatment. **J Environ Pathol Toxicol Oncol** 26:157-164, 2007.
83. Stummer W, Beck T, Beyer W, Mehrkens JH, Obermeier A, Etminan N, Stepp H, Tonn JC, Baumgartner R, Herms J, Kreth FW: Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report. **J Neurooncol** 87:103-109, 2008.
84. Stummer W, Novotny A, Stepp H, Goetz C, Bise K, Reulen HJ: Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. **J Neurosurg** 93:1003-1013, 2000.
85. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ: Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. **Lancet Oncol** 7:392-401, 2006.
86. Stummer W, Stocker S, Novotny A, Heimann A, Sauer O, Kempfski O, Plesnila N, Wietzorrek J, Reulen HJ: In vitro and in vivo porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolevulinic acid. **J Photochem Photobiol B** 45:160-169, 1998.
87. 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-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. **Neurosurgery** 42:518-525, 1998.
88. Stylli SS, Kaye AH: Photodynamic therapy of cerebral glioma - a review. Part II - clinical studies. **J Clin Neurosci** 13:709-717, 2006.
89. Tsai JC, Hsiao YY, Teng LJ, Chen CT, Kao MC: Comparative study on the ALA photodynamic effects of human glioma and meningioma cells. **Lasers Surg Med** 24:296-305, 1999.

90. Vierck JL, Byrne K, Mir PS, Dodson MV: Ten commandments for preventing contamination of primary cell cultures. **Methods Cell Sci** 22:33-41, 2000.
91. Weisberg S, Ashkenazi E, Israel Z, Attia M, Shoshan Y, Umansky F, Brodie C: Anaplastic and atypical meningiomas express high levels of Fas and undergo apoptosis in response to Fas ligation. **Am J Pathol** 159:1193-1197, 2001.
92. Whitson WJ, Valdes PA, Harris BT, Paulsen KD, Roberts DW: Confocal Microscopy for the Histologic Fluorescence Pattern of a Recurrent Atypical Meningioma. **Neurosurgery** 2011.
93. Whittle IR, Smith C, Navoo P, Collie D: Meningiomas. **Lancet** 363:1535-1543, 2004.
94. Zelenkov P, Baumgartner R, Bise K, Heide M, Meier R, Stocker S, Sroka R, Goldbrunner R, Stummer W: Acute morphological sequelae of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in the C6 spheroid model. **J Neurooncol** 82:49-60, 2007.
95. Zimmer C, Dorn F: Tumoren und tumorähnliche Erkrankungen, in Forsting M, Jansen O, Sator K (eds): *Neuroradiologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2008, pp 96-98.

7. Anhang

Tabelle 1: Klinische Daten der Patienten und der verwendeten Meningeom-Präparate

Tabelle 2: Übersicht über die erzielten Ergebnisse unter Verwendung der 5-ALA-basierten PDT mit unterschiedlichen 5-ALA-Dosen

Tabelle 3: Daten der immunhistochemischen EMA-Färbung

Tabelle 1: Klinische Daten der Patienten und der verwendeten Meningeom-Präparate (w= weiblich, m= männlich, Alter in Jahren)

Fallnummer	Geschlecht	Alter	Lokalisation	WHO- Grad	Histologischer Subtyp
M 1	w	60	fronto-basal	I	transitionell
M 2	w	63	petroclival	I	meningotheliomatös-angiomatös
M 3	w	65	Falx frontal rechts	I	meningotheliomatös
M 4	m	80	keine Angabe	II	Atypisch (Rezidiv)
M 5	w	44	keine Angabe	II	atypisch
M 6	m	74	fronto-basal	I	meningotheliomatös
M 7	w	77	parasagittal	I	meningotheliomatös
M 8	w	36	Planum sphenoidale	II	atypisch
M 9	w	32	keine Angabe	II	atypisch (Rezidiv)
M 10	m	74	Konvexität frontal rechts	II	atypisch (Rezidiv)
M 11	m	52	Sinus sagittalis superior	I	meningotheliomatös
M 12	w	65	Konvexität rechts	I	angiomatös
M 13	m	46	Olfaktorius	II	atypisch
M 14	m	45	Keilbeinflügel	I	transitionell
M 15	w	60	Olfaktorius	I	transitionell
M 16	w	60	temporal rechts	III	anaplastisch (Rezidiv)
M 17	w	62	keine Angabe	I	meningotheliomatös
M 18	m	51	supratentoriell occipital links	I	meningotheliomatös
M 19	w	30	Konvexität	I	transitionell
M 20	w	73	Konvexität frontal rechts	I	meningotheliomatös
M 21	w	82	Konvexität	I	meningotheliomatös

M 22	<i>m</i>	59	Pterygoid rechts	I	transitionell
M 23	<i>m</i>	40	Olfaktorius	I	meningotheliomatös
M 24	<i>w</i>	73	keine Angabe	I	fibroblastisch (mit Knocheninvasion)
M 25	<i>m</i>	79	Planum sphenoidale	I	meningotheliomatös
M 26	<i>m</i>	60	Konvexität occipital rechts	I	transitionell
M 27	<i>w</i>	73	Konvexität frontal links	I	transitionell
M 28	<i>w</i>	59	Olfaktorius	I	meningotheliomatös
M 29	<i>w</i>	44	Planum sphenoidale	I	meningotheliomatös
M 30	<i>w</i>	61	clinoidal rechts	I	meningotheliomatös
M 31	<i>m</i>	68	Keilbeinflügel rechts	I	meningotheliomatös
M 32	<i>m</i>	46	multipel	II	atypisch (Rezidiv)
M 33	<i>w</i>	62	temporo-parietal rechts	I	fibromatös
M 34	<i>m</i>	35	Keilbeinflügel	I	psammomatös
M 35	<i>w</i>	55	Keilbeinflügel rechts	I	transitionell
M 36	<i>w</i>	37	spheno-orbital	I	psammomatös (Rezidiv)
M 37	<i>w</i>	60	Keilbeinflügel	I	meningotheliomatös
M 38	<i>w</i>	79	parietal rechts	II	atypisch (Rezidiv)
M 39	<i>m</i>	68	keine Angabe	III	anaplastisch (Rezidiv)
M 40	<i>w</i>	46	Tentorium	I	transitionell
M 41	<i>m</i>	44	keine Angabe	I	fibroblastisch
M 42	<i>w</i>	52	links frontal	I	transitionell
M 43	<i>m</i>	51	Seitenventrikel links	I	angiomatös

Tabelle 2: Übersicht über die erzielten Ergebnisse unter Verwendung der 5-ALA basierten PDT mit unterschiedlichen 5-ALA-Dosen (Angabe der überlebenden Zellen in % bezogen auf die unbehandelten Standardzellen) (n. d. = nicht durchführbar)

Fallnummer	Kultivierung erfolgreich	WHO-Grad	EMA	Waschung	0 µg/ml ALA + PDT	25 µg/ml ALA + PDT	50 µg/ml ALA + PDT	100 µg/ml ALA + PDT	50 µg/ml ALA ohne PDT
M19	ja	I	+++	nein	106,41	47,05	39,30	56,74	
M20	ja	I	-	nein	98,83	99,83	104,74		
M21	ja	I	+	nein	99,71	90,78	66,61		
M22	nein	I	n. d.	nein					
M23	ja	I	+	nein	100,26	86,61	28,86		
M24	nein	I	n. d.	nein					
M25	ja	I	++	nein	104,26	88,21	66,72		
M26	ja	I	++	nein	102,73	88,39	75,21		
M27	ja	I	++	nein	100,25	94,09	46,15	60,24	
M28	ja	I	++	nein	103,13	71,51	37,22	49,63	
M29	ja	I	-	ja	101,09	73,18	37,55	14,73	
M30	ja	I	+	ja	98,94	10,27	14,68	13,61	
M31	ja	I	++	ja	102,28	89,57	89,91	83,73	100,33
M32	ja	II	++	ja	90,36	41,65	2,81	0	94,53
M33	ja	I	+	ja	99,86	94,56	18,11	14,46	104,65
M34	ja	I	-	ja	111,24	102,00	76,10	67,53	100,43
M35	ja	I	++	ja	99,91	102,36	56,68	18,06	100,59
M36	ja	I	n. d.	ja	101,56	93,20	20,14	7,18	98,57

M37	ja	I	++	ja	100,87	43,12	10,83	11,50	99,11
M38	nein	II	n.d.	ja					
M39	ja	III	-	ja	104,19	94,16	94,93	78,71	100,46
M40	ja	I	+	ja	102,28	71,43	9,51	8,90	101,02
M41	ja	I	++	ja	101,34	94,11	40,72	27,35	100,68
M42	ja	I	++	ja	104,09	55,90	29,00	17,97	102,98

Tabelle 3: Daten der immunhistochemischen EMA-Färbung (n. d.= nicht durchführbar)

Fallnummer	Tag der Fixierung	EMA	Tag der 1. Passage	WHO Grad	Histologischer Subtyp
M 7	9	+	6	I	meningotheliomatös
M 8	13	+	10	II	atypisch
M 9	18	+	13	II	atypisch (Rezidiv)
M 10		n. d.	12	II	atypisch (Rezidiv)
M 11	11	+++	5	I	meningotheliomatös
M 12	32	-	13	I	angiomatös
M 13	13	+	7	II	atypisch
M 14	18	-	7	I	transitionell
M 15	8	+	6	I	transitionell
M 16	6	++	3	III	anaplastisch (Rezidiv)
M 17	6	++	4	I	meningotheliomatös
M 18	7	++	6	I	meningotheliomatös
M 19	7	+++	5	I	transitionell
M 20	12	-	5	I	meningotheliomatös
M 21	12	+	6	I	meningotheliomatös
M 22	15	+	6	I	transitionell
M 23	8	+	5	I	meningotheliomatös
M 24		n. d.		I	fibroblastisch (mit Knocheninvasion)
M 25	6	++	4	I	meningotheliomatös

M 26	6	++	3	I	transitionell
M 27	3	++	2	I	transitionell
M 28	5	++	4	I	meningotheliomatös
M 29	9	-	3	I	meningotheliomatös
M 30	11	+	7	I	meningotheliomatös
M 31	10	++	4	I	meningotheliomatös
M 32	9	++	4	II	atypisch (Rezidiv)
M 33	6	+	4	I	fibromatös
M 34	13	-	7	I	psammomatös
M 35	5	++	3	I	transitionell
M 36	6	n. d.	10	I	psammomatös (Rezidiv)
M 37	4	++	6	I	meningotheliomatös
M 38		n. d.		II	atypisch (Rezidiv)
M 39	18	-	6	III	anaplastisch (Rezidiv)
M 40	7	+	6	I	transitionell
M 41	7	++	5	I	fibroblastisch
M 42	12	++	8	I	transitionell

Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Hans-Jakob Steiger für die Überlassung des Themas, wodurch ich die Möglichkeit erhalten habe, einen Einblick in die experimentelle Forschung und wissenschaftliches Arbeiten zu erlangen.

Herrn Dr. med. Mustafa El-Khatib möchte ich für seine Betreuung, die inhaltliche Unterstützung und die ersten Korrekturen der Arbeit danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Brigitte Senger, ohne deren Hilfe, Geduld und unermüdlichen Einsatz für mich und meine Arbeit dieses Projekt sicherlich gescheitert wäre. Sie haben mir alles über die Arbeit im Labor und mit Zellkulturen beigebracht, waren sowohl in technischer als auch inhaltlicher Sicht immer an meiner Seite.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Markus Riemenschneider (ehem. Institut für Neuropathologie) für seine konstruktiven Ideen und Vorschläge in Bezug auf die immunhistochemischen Untersuchungen bedanken. In diesem Rahmen möchte ebenfalls den MTAs des neuropathologischen Diagnostiklabors für ihre Einführung in die Immunhistochemie und den dafür benötigten Arbeitsplatz danken.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Freund Robin Priewe bedanken, der mich über all die Jahre in allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet hat und mich immer wieder motiviert hat weiter zu machen. Meinen Eltern und meinen Schwestern möchte danken, dass sie mir das Studium ermöglicht und mich immer wieder auf unterschiedlichste Art und Weise unterstützt haben.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

19.07.2014, Carolin Tepe

Unterschrift