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

Experimentelle Untersuchungen zur Photodynamischen Diagnostik und Therapie anhand eines humanen anaplastischen Meningeomzellmodells *in vitro* 

Dissertation

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

Alexander Giannakis

2016

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Jakob Steiger

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

"Darum, meine geliebten Brüder, sei jeder Mensch schnell zum Hören, langsam zum Reden, langsam zum Zorn" (Jakobus 1, 19)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht: Journal of Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2014 Mar;11(1):1-6

## Zusammenfassung

Photodynamische Methoden sind neuartige, experimentelle Verfahren in der neurochirurgischen Tumorbehandlung. Basierend auf dem peroral verabreichten Häm-Metaboliten, 5-Aminolävulinsäure (ALA), kann die tumorselektive Akkumulation des photochemisch aktiven Protoporphyrin IX (PPIX) intraoperativ ausgenutzt werden. Blaues Exzitationslicht führt dabei zu PPIX-assoziierter Tumorfluoreszenz, mit der sich Tumorgewebe leichter erkennen und resezieren lässt (Photodynamische Diagnostik, PDD). Mit rotem Laserlicht ist eine PPIX-induzierte Sauerstoffradikalbildung in Tumorzellen möglich (Photodynamische Therapie, PDT). In der Neurochirurgie wurde die PDT bisher nur im Rahmen von Studien bei therapierefraktären Glioblastomen eingesetzt. Die Übertragung auf Meningeome scheiterte immer wieder daran, dass sich diese als relativ widerstandsfähig gegenüber PDT erwiesen.

Kürzlich konnte experimentell eine deutliche Verstärkung der PDT-Effektivität durch Fluorochinolone und verlängerte ALA-Einwirkzeiten an einer Zervixkarzinom-Zelllinie gezeigt werden.

Das Hauptziel der vorgelegten Arbeit war es, zu untersuchen, ob sich ein gesteigerter PDT-Effekt auch an der humanen anaplastischen Meningeom-Zelllinie KT21-MG, unter Einfluss von Ciprofloxacin und verlängerten ALA-Inkubationszeiten hervorrufen lässt. Dafür wurden in einem *In-vitro*-PDT-Modell kurze (vier Stunden) gegen lange (24 Stunden) ALA-Einwirkzeiten verglichen. Ebenfalls wurde der Effekt einer zusätzlichen Gabe von Ciprofloxacin untersucht. Zusammenfassend zeigte sich, dass Ciprofloxacin und verlängerte ALA-Einwirkzeiten, in Abhängigkeit von der ALA-Konzentration, den PDT-Effekt signifikant verstärkten.

Diese Ergebnisse lassen sich grundsätzlich im Rahmen von Phase-I- und Phase-II-Studien in die Klinik übertragen. Die Methodik der PDT ist von den Gliomen her bekannt und Ciprofloxacin ist ein verbreitetes Medikament mit bekanntem und günstigem Nebenwirkungsprofil. Es sind dieselben pharmakologischen Mechanismen, die eine Übertragung der Resultate auf PDD-Modelle ebenfalls ermöglichen.

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALA/ 5-ALA	5-Aminolävulinsäure
AOS	Average over Spectra (Spektren-Mittelwert)
AT	Österreich
a.u.	arbitrary units (Willküreinheiten)
CAS	Chemical Abstracts Society (-Nummer)
СН	Schweiz
D	Deutschland
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
(D)PBS	(Dulbecco's) Phosphate Buffered Saline
EC	Enzyme Commission (-Nummer)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EZR	Extrazellulärraum
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
FECH	Ferrochelatase
FL	Bundesstaat Florida
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazinyl-Ethanolsulfonsäure
KG	Körpergewicht
KT21-MG	Zelllinie eines humanen anaplastischen Meningeoms

LDH	Laktat-Dehydrogenase	
NY	Bundesstaat New York	
PBG	Porphobilinogen	
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase	
PDD	Photodynamische Diagnostik	
PDT	Photodynamische Therapie	
ΡΡΙΧ	Protoporphyrin IX	
ROS	Reactive Oxygen Species (Sauerstoffradikale)	
U/min	Umdrehungen pro Minute	
UK	Vereinigtes Königreich	
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf	
WA	Bundesstaat Washington	
WST-1	Water Soluble Tetrazolium Salt-1	
7110		

## Inhaltsverzeichnis

Z	usamn	nenfa	ssung	I	
A	bkürz	ungsv	/erzeichnis	II	
In	InhaltsverzeichnisIV				
1	l Einleitung			1	
	1.1	Pho	todynamische Ansätze in der Neurochirurgie	1	
	1.1	.1	Photodynamische Therapie	1	
	1.1	.2	Photodynamische Diagnostik	2	
	1.1	.3	Photodynamik an Meningeomen	2	
	1.2	Pha	rmakologie 5-ALA-basierter Photodynamik	3	
	1.2	.1	Der Häm-Biosyntheseweg	3	
	1.2	.2	Pharmakokinetik von ALA	4	
	1.2	.3	Eisenchelatoren als PDT-Verstärker	5	
	1.3	Kol	orimetrie zum Nachweis des PDT-Effektes	5	
	1.4	Zie	e der Arbeit	6	
2	Ma	teria	l und Methoden	7	
	2.1				
	2.1	Ver	suchsvorbereitung	7	
	2.1	Ver .1	suchsvorbereitung Zellkultur	7 7	
	2.1 2.1 2.1	Ver .1 .2	suchsvorbereitung Zellkultur Medium	7 7 7	
	2.1 2.1 2.1 2.1	Ver .1 .2 .3	suchsvorbereitung Zellkultur Medium Zellpassagierung	7 7 7 8	
	2.1 2.1 2.1 2.1 2.1 2.1	Ver .1 .2 .3 .4	suchsvorbereitung Zellkultur Medium Zellpassagierung Zell-Verteilung in 96- <i>Well</i> -Platten: "Aussäen"	7 7 8 9	
	2.1 2.1 2.1 2.1 2.1 2.2	Ver .1 .2 .3 .4 Ver	suchsvorbereitung Zellkultur Medium Zellpassagierung Zell-Verteilung in 96- <i>Well</i> -Platten: "Aussäen" suchsdurchführung	7 7 8 9 . 12	
	2.1 2.1 2.1 2.1 2.1 2.1 2.2 2.2	Ver .1 .2 .3 .4 Ver .1	suchsvorbereitung Zellkultur Medium Zellpassagierung Zell-Verteilung in 96- <i>Well</i> -Platten: "Aussäen" suchsdurchführung Quantifizierung der PDT-Effektivität	7 7 8 9 . 12 . 12	
	2.1 2.1 2.1 2.1 2.1 2.1 2.2 2.2 2.2	Ver .1 .2 .3 .4 Ver .1 .2	suchsvorbereitung Zellkultur Medium Zellpassagierung Zell-Verteilung in 96- <i>Well</i> -Platten: "Aussäen" suchsdurchführung Quantifizierung der PDT-Effektivität Spektrometrie von PPIX-Verdünnungsreihen	7 7 8 9 .12 .12 .25	
	2.1 2.1 2.1 2.1 2.1 2.2 2.2 2.2 2.2 2.3	Ver .1 .2 .3 .4 Ver .1 .2 Ver	suchsvorbereitung Zellkultur Medium Zellpassagierung Zell-Verteilung in 96- <i>Well</i> -Platten: "Aussäen" suchsdurchführung Quantifizierung der PDT-Effektivität Spektrometrie von PPIX-Verdünnungsreihen suchsauswertung	7 7 8 9 .12 .12 .25 .31	
3	2.1 2.1 2.1 2.1 2.1 2.2 2.2 2.2 2.2 2.3 Erg	Ver .1 .2 .3 .4 Ver .1 .2 Ver gebni	suchsvorbereitung Zellkultur Medium Zellpassagierung Zell-Verteilung in 96- <i>Well</i> -Platten: "Aussäen" suchsdurchführung Quantifizierung der PDT-Effektivität Spektrometrie von PPIX-Verdünnungsreihen suchsauswertung	7 7 8 9 .12 .12 .25 .31 .32	

	3.1	.1	PDT-Verstärkung bei längerer ALA-Inkubation	32
	3.1	.2	PDT-Verstärkung durch Ciprofloxacin	35
	3.1	.3	Etablierung des LDH-Assay im Labor	37
	3.1	.4	Vergleich zwischen LDH- und WST-1-Test	39
	3.2	Spe	ektrometrie von PPIX-Verdünnungsreihen	42
	3.3	Ve	rsuche in der Zusammenschau	45
4	Di	skus	sion	47
	4.1	Zui	r Quantifizierung der PDT-Effektivität	47
	4.1	.1	Versuchsdurchführung	47
	4.1	.2	PDT-Verstärkung bei längerer ALA-Inkubation	51
	4.1	.3	Etablierung des LDH-Tests	55
	4.1	.4	Vergleich zwischen WST-1- und LDH-Test	56
	4.1	.5	PDT-Verstärkung durch Ciprofloxacin	58
	4.2	Spe	ektrometrie von PPIX-Verdünnungsreihen	60
	4.3	Zul	kunftsperspektiven	62
5	Sc	hluss	sfolgerungen	63
	5.1	Zui	r Effektivitätssteigerung der PDT	63
	5.2	Zui	r Etablierung fiberoptischer Spektrometrie	63
6	Ve	rzeic	chnisse	64
	6.1	Lit	eraturverzeichnis	64
	6.2	Tał	bellenverzeichnis	73
	6.3	Ab	bildungsverzeichnis	74
	6.4	Ma	terialienverzeichnis	76

## 1 Einleitung

## 1.1 Photodynamische Ansätze in der Neurochirurgie

## 1.1.1 Photodynamische Therapie

Das Grundprinzip der Photodynamischen Therapie (PDT) wurde erstmals im Jahre 1900 von O. Raab entdeckt, als er feststellte, dass Acridin Pantoffeltierchen photochemisch schadete [1, 2]. In den folgenden neun Jahrzehnten entdeckte man die besonders starke Photosensibilisierung durch Porphyrine, deren Fähigkeit zur selektiven Tumormarkierung und deren endogen gesteigerte Synthese durch exogene Zufuhr des, *in vivo* besser vertragenen, Vorläufers von Protoporphyrin IX (PPIX): 5-Aminolävulinsäure (5-ALA, ALA) [2-6]. In den 90er-Jahren kam es vor allem in der Dermatologie zur klinischen Anwendung der PDT, weitere Disziplinen folgten. Mehr als zwanzig Jahre nach Pionierarbeiten zur PDT an Hirntumorpatienten im Jahre 1980 etabliert sich das Wirkprinzip der ALA-PDT in der klinischen Neurochirurgie [2, 7-9].

Aktuell werden in der neurochirurgischen ALA-PDT peroral meist 20mg 5-ALA/kg Körpergewicht (KG) dem Tumorpatienten drei bis vier Stunden präoperativ verabreicht [8, 10]. Jener Häm-*Precursor* wird dabei grundsätzlich von allen kernhaltigen Zellen aufgenommen, wobei in Malignomen, aufgrund mehrerer diskutierter Mechanismen [11-17], besonders viel PPIX akkumuliert (s. Kapitel 1.2.1). PPIX kann mit rotem Laserlicht von 635nm Wellenlänge zur Induktion von Sauerstoffradikalen (ROS) angeregt werden [18]. Direkt vermag die PDT dadurch Apoptose und Nekrose hervorzurufen; indirekt trägt sie vermutlich zu Autophagozytose, Immunstimulation und Verschlechterung der Tumorvaskularisation bei [19-22].

Die Rolle der neurochirurgischen PDT soll sein, nach Tumorresektion eine möglichst effektive Abtötung von Tumorzellen an den Rändern der Resektionshöhle zu erwirken. Dieses Prinzip lässt sich gut anhand der Glioblastome veranschaulichen: maligne Gliome rezidivieren in 80% der Fälle innerhalb eines Abstandes von zwei Zentimetern zur Resektionsgrenze [10, 23]. Das bedeutet, dass in diesen Fällen zum Zeitpunkt der Resektion Tumorzellen in den Randbereichen nicht entfernt wurden.

## 1.1.2 Photodynamische Diagnostik

Die Photodynamische Diagnostik (PDD) in der Neurochirurgie bedient sich ebenfalls der PPIX-Akkumulation in Tumorzellen. Anders als bei der PDT, wird jedoch hierbei das PPIX mittels Blaulicht zur Fluoreszenz angeregt. Unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops, mit einer Exzitationswellenlänge von 405nm, demarkiert sich der Tumor intraoperativ. Dies macht die Neoplasie leichter und oft umfassender der Fluoreszenz-gesteuerten Resektion (FGR) zugänglich [24].

Die PDD offenbart jedoch auch Schwierigkeiten bei der Identifizierung von Tumorgewebe. So fluoresziert nicht jede Tumorentität deutlich oder homogen. Histologisch inhomogene und teilnekrotische Tumore können mitunter keine gleichmäßige Fluoreszenz zeigen [25-28]. Ob Tumorfluoreszenz mit dem Malignitätsgrad korreliert ist dabei nicht eindeutig [29-32], ein Zusammenhang mit der Stoffwechselaktivität wurde aber nahegelegt [33, 34]. Außerdem reichert sich der Fluorophor bisweilen auch im perifokalen Hirnödem und im gesunden Hirngewebe an [28, 35, 36]. Daher wird seit einigen Jahren die Etablierung einer Methode zur objektiven Quantifizierung von Tumorfluoreszenz versucht [37]. In diesem Bestreben entwickelten *Kim et al.* 2010 eine Methode fiberoptischer Spektrometrie, mit der die optische Signalbeeinträchtigung durch Gewebe nivelliert wurde [38]. Das Universitätsklinikum Düsseldorf (UKD) mit seinen hohen Zahlen an Hirntumorpatienten liefert die Möglichkeit zur Etablierung eines solchen PDD-Ansatzes. Jedoch war zunächst die Integration jenes fiberoptischen Modells in die hiesigen Gegebenheiten als Grundvoraussetzung dahingehender wissenschaftlicher Bemühung anzusehen.

### 1.1.3 Photodynamik an Meningeomen

Mit einem Anteil von etwa 30% an allen primären Hirntumoren und einer, meist subklinischen, Prävalenz im niedrig-einstelligen Prozentbereich sind Meningeome die häufigsten Vertreter jener Neoplasien. Dabei sind nur etwa 10% von atypischer oder gar anaplastischer Differenzierung [39-42]. In diesen Fällen wird die zum Teil schwer zugängliche Tumorlokalisation der Meningeome von aggressivem Wachstum begleitet. Die vollständige Exzision ist meist die Therapie der Wahl von symptomatischen oder wachsenden Tumoren. Angesichts einer mittleren Rezidivfreiheit bei Meningeomen des WHO °II bzw. °III von etwa elf bzw. knapp drei Jahren [43], ist zu überprüfen, ob die PDT nicht einen Beitrag zur nachhaltigen Meningeom-Entfernung leisten kann. In bisherigen Publikationen wurde ein, im Vergleich zu Gliomen, schwächeres Ansprechen von Meningeomen auf die PDT konstatiert [44, 45]. Es zeigte sich jedoch, dass auch Meningeome zu Fluoreszenz angeregt werden können [29, 31]. In einer klinischen Serie wurden bei 25% der gutartigen und 75% der höhergradigen Meningeome bessere Resektionsergebnisse als unter Weißlicht erzielt [32]. Zusammenschauend stehen der breiten Erforschung und Anwendung der Photodynamik in der Gliom-Chirurgie jedoch noch immer die relativ spärlichen Erfahrungen mit Meningeomen gegenüber [46, 47].

## **1.2 Pharmakologie 5-ALA-basierter Photodynamik**

### 1.2.1 Der Häm-Biosyntheseweg

In der onkologischen Neurochirurgie finden PDD und PDT vor allem auf Grundlage von 5-ALA Verwendung (s. Kapitel 1.1.1). Die exogene Zufuhr, dieses Vorläufer-Substrates der Häm-Biosynthese, umgeht negative Feedback-Mechanismen und die Schrittmacherreaktion durch die 5-ALA-Synthase. Dies gewährleistet eine rasche zelluläre ALA-Akkumulation, wenngleich eine Sättigungsdynamik vorliegt [16, 48]. Dabei wird vermutlich die Arbeit der nächstlangsameren Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) zur schrittmachenden Reaktion [49, 50].

Von den acht an der Häm-Biosynthese beteiligten Enzymen ist die Sonderrolle der Ferrochelatase (FECH) hervorzuheben. Durch ihre Aktivität wird die Umwandlung von photochemisch aktivem PPIX in das inaktive Endprodukt Häm vollzogen. Dazu benötigt das Enzym freie Eisenionen. Folglich dienen aufgebrauchte Eisenspeicher und eine relative Aktivitätssteigerung von PPIX-synthetisierenden Enzymen gegenüber der FECH als Erklärungsansätze für die PPIX-Akkumulation in Tumorzellen [12, 14, 15].

Porphyrin-Metabolite können durch zelluläre Exportproteine der PPIX-Synthese entzogen werden [13, 16, 17, 51].

Abb. 1 schematisiert wichtige Schritte der Häm-Biosynthese mit den genannten Enzymen und der Kompartiment-Verteilung zugehöriger Vorläufermoleküle unter Darstellung exogener ALA-Zufuhr.



Abb. 1: Schema der Häm-Synthese in Zellkompartimenten (gekürzt). Vertikale Pfeile: Wechsel der Kompartimente durch die Substrate. Horizontale Pfeile: Enzyme der Häm-Biosynthese. Abkürzungen wie im Fließtext verwendet: ALA (5-Aminolävulinsäure), PBGD (Porphobilinogen-Desaminase), PPIX (Protoporphyrin IX), FECH (Ferrochelatase).

## 1.2.2 Pharmakokinetik von ALA

Es besteht Unklarheit bezüglich des Zeitpunktes der maximalen PPIX-Akkumulation in Hirntumoren. Einerseits haben Gliome etwa vier Stunden nach peroraler ALA-Aufnahme hohe Fluoreszenzen gezeigt [24]. Andererseits scheint Tumorfluoreszenz bis zu 16 Stunden nach ALA-Gabe qualitativ nicht vermindert zu sein [52]. Für einige Tumorzellen wurde eine erhöhte PPIX-Bildung nach 24 statt nach vier Stunden beschrieben [2, 16, 53-56]. *In vivo* wird exogen zugeführtes ALA im Allgemeinen nach ein bis zwei Tagen hepatisch und renal vollständig eliminiert. Kenntnis des Zeitraumes möglichst hoher PPIX-Konzentration im Tumorgewebe ist maßgeblich für den Erfolg von PDD, FGR und PDT.

## 1.2.3 Eisenchelatoren als PDT-Verstärker

Bereits in den frühen 1990er-Jahren wurden mehrere Nachweise gesteigerter Effektivität der ALA-PDT beziehungsweise gesteigerter PPIX-Synthese durch Eisen-Chelatoren wie EDTA und Desferrioxamin erbracht [53, 57, 58].

Kürzlich demonstrierten *Ohgari et al.* dass auch Chinolone - wie z.B. Ciprofloxacin - ebenfalls die Effektivität der PDT mittels Eisen-Komplexierung erhöhen. Der zelluläre Eisenmangel verlangsamte den FECH-katalysierten Reaktionsschritt von PPIX zu Häm und resultierte somit in einer vermehrten Akkumulation von PPIX (s. Kapitel 1.2.1) [59]. Ciprofloxacin zeigte dabei im Vergleich zu anderen Chinolonen die höchste Effektivität, überdies erscheint es aufgrund seiner breiten klinischen Anwendung und des recht günstigen Nebenwirkungsprofils als ein sehr geeignetes Fluorochinolon zur Erforschung der PDT-Verstärkung [60].

## 1.3 Kolorimetrie zum Nachweis des PDT-Effektes

Die Quantifizierung der PDT-Effektivität an Tumorzellen *in vitro*, hängt entscheidend von der Güte angewandter Nachweisverfahren ab. Der WST-1-*Assay* ist in den Biowissenschaften, aufgrund seiner geringen Kosten und einfachen Durchführung, ein weit verbreiteter Enzym-basierter Test zur Messung von Zellvitalität. Dabei gewährleisten vitale Zellen einen Farbumsatz, dessen Extinktion kolorimetrisch ausgewertet wird. Lädierte Zellorganellen können diesen Umsatz nicht, oder nur vermindert, leisten [20, 61]. Jenem im Neurochirurgischen Labor des UKD etablierten *Assay* steht konzeptionell der Test zum Nachweis von Laktat-Dehydrogenase (LDH) gegenüber. Zwar erfolgt bei ihm die Auswertung ebenfalls kolorimetrisch, allerdings dient er dem Nachweis toter, insbesondere nekrotischer, membrandurchlässiger Zellen. Die Membrandurchlässigkeit bemisst sich am Austritt der, in Hirntumoren stärker vorhandenen, LDH [62]. Da beim PDT-induzierten Zelltod Apoptose und Nekrose vorkommen, kann bei einer prädominanten Zelltodform, sich ein *Assay* als sensitiver als der andere erweisen [63-65]. Im Vergleich beider Verfahren war dabei zu prüfen, ob für beide Tests zeitlich analoge Versuchsaufbauten zulässig sein konnten.

## **1.4 Ziele der Arbeit**

Der Wissensstand um die PDT-Effektivität an Meningeomen sollte durch Experimente an einer immortalisierten anaplastischen Meningeom-Zelllinie bereichert werden.

Auf der Grundlage der Erkenntnisse über die PDT-Optimierung durch Chinolone an nicht-zerebralen Tumorzelllinien [59], sollten ähnliche Effekte bei malignen Meningeomzellen untersucht werden.

Das Ausmaß einer Veränderung der PDT-Effektivität bei unterschiedlichen ALA-Einwirkzeiten war ebenfalls Gegenstand dieser Dissertation.

Die konzeptionell unterschiedlichen kolorimetrischen WST-1- und LDH-*Assays* sollten sich in der Aussage über Qualität und Quantität der PDT-induzierten Zytotoxizität, an der verwendeten anaplastischen Meningeom-Zelllinie KT-21MG, ergänzen. Es war zu prüfen, ob für beide Tests zeitlich analoge Versuchsaufbauten zulässig sein konnten.

Zusätzlich zu den Untersuchungen zur PDT, galt es eine fiberoptischspektrometrische Methode zur Fluoreszenzquantifizierung im Rahmen der PDD in unserem Labor zu etablieren.

## 2 Material und Methoden

Alle Experimente wurden im Neurochirurgischen Labor der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt. Eine tabellarische Übersicht der verwendeten Materialien findet sich in Kapitel 6.4.

## 2.1 Versuchsvorbereitung

### 2.1.1 Zellkultur

Für die Experimente wurde KT21-MG, eine immortalisierte humane anaplastische Meningeom-Zelllinie (freundliche Gabe von Prof. Dr. Riemenschneider, Universität Regensburg), verwendet [66]. In T75-Zellkulturflaschen (Greiner bio-one, Frickenhausen, D) wurde sie aufbewahrt und gepflegt. Versuchszellen wurden, bis zum Zeitpunkt der PDT, ausschließlich in keimarmer Umgebung versorgt (Sterilwerkbank Laminair® HA 2448, Heraeus, Hanau, D) und in 96-*Well*-Mikrotiterplatten (im Folgenden auch Zellkulturplatten genannt) (Cellstar® F-Bottom, Greiner bio-one, Frickenhausen, D) untersucht.

### 2.1.2 Medium

Die Zellkultivierung erfolgte mit *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) in 500ml-Flaschen (gibco® DMEM, Life Technologies, Grand Island, NY/USA) mit den Hersteller-Zusätzen D-Glucose (4,5g/L) und L-Glutamin. Im hiesigen Labor wurden zu den oben genannten DMEM-Flaschen manuell als Zusätze 50ml Fetales Kälberserum (FCS) (Fetal Bovine Serum Gold, PAA Laboratories, Pasching, AT), 5ml Penicillin-Streptomycin (Life Technologies, Grand Island, NY/USA) und 5ml Natrium-Pyruvat (Sodium Pyruvate, Biochrom, Berlin, D) hinzugegeben – im weiteren Text als "DMEM mit Zusätzen" bezeichnet. Zur Kultivierung wurde DMEM mit Phenolrot bevorzugt, da es über Gelbfärbung eine Säuerung des Zellmediums und damit die Notwendigkeit eines Mediumwechsels anzeigte.

Zur Versuchsdurchführung wurde, um eine kolorimetrische Eigenextinktion des Mediums zu vermeiden, DMEM ohne Phenolrot verwendet, welches zusätzlich über 25mM des Puffers HEPES (Hydroxyethyl-Piperazinyl-Ethanolsulfonsäure) verfügte [67]. Das Auswaschen von Phenolrot-Resten erfolgte bereits beim Ansetzen eines Versuches (s. Kapitel 2.1.4: Zell-Verteilung in 96-*Well*-Platten: "Aussäen"). Serum verfügt aufgrund seines farbgebenden Proteinanteils ebenfalls über eine Eigenextinktion und zieht intrazelluläre Porphyrine zu sich in den Extrazellulärraum [57]. Daher wurde ab dem Zeitpunkt des Mediumwechsels vor Durchführung der PDT ("Waschen", s. Kapitel 2.2.1) in DMEM mit nur 1% statt 10% FCS kultiviert. In den Versuchen zur Untersuchung des Ciprofloxacin-Effektes betrug jener Zeitraum bis zur Versuchsauswertung nur etwa 150 Minuten, so dass dort Medium ohne Zusatz von FCS verwendet werden konnte. Da (Natrium-)Pyruvat den Reaktionsweg des LDH-Tests inhibiert, war es – wie auch Penicillin-Streptomycin – ebenfalls nicht Bestandteil des Versuchsmediums.

### 2.1.3 Zellpassagierung

Bei der Zellpassagierung, auch *Splitten* bzw. Teilen genannt, handelte es sich um den etwa zehnminütigen Arbeitsprozess zur Verringerung der Zelldichte innerhalb einer Zellkulturflasche. In der Regel war dies mit dem Verwerfen der meisten Zellen verbunden, bei gleichzeitigem Ansetzen einer neuen Zellkulturflasche. Mit jedem Teilen stieg definitionsgemäß die Passagenzahl der kultivierten Zellen. KT21-MG zeigte sich, mit einer Zellverdoppelung innerhalb eines Tages, ausgesprochen proliferationsfreudig und musste, bereits drei bis vier Tage nach dem letzten *Splitten*, im Sinne einer Verdünnung von 1:50 in einer T75-Zellkulturflache (s. unten), erneut passagiert werden [66].

Das Splitten wurde wie folgt durchgeführt:

- 1. Vollständiges Absaugen des zuletzt verwendeten Mediums der Zellkulturflasche mit Pasteurpipetten aus Glas (Brand, Wertheim,D).
- Versetzen der Zellkulturflasche mit 10ml Phosphate Buffered Saline (PBS) (gibco® DPBS, Life Technologies, Grand Island, NY/USA) mittels Elektrischem Pipettiergerät (accu-jet® pro, Brand, Wertheim, D)

und entsprechender Pipette (costar® Stripette®, Corning, Corning, NY/USA). Anschließendes manuelles Schwenken.

- Exposition der am Flaschenboden befindlichen Zellschicht mit 3ml Trypsin (Trypsin-EDTA, PAA Laboratories, Pasching, AT) f
  ür drei Minuten im CO<sub>2</sub>-Inkubator (CB 150l, Binder, Tuttlingen, D). Dieses trennte die Zellen proteolytisch von Flaschenboden und Zellverband.
- Beendigung der Trypsin-Reaktion mittels durchmischender Zugabe von 7ml farblosem DMEM mit Zusätzen.
- 5. Aufziehen des zellhaltigen Mediums mit dem elektrischen Pipettiergerät. Restlos ließ sich das Medium hiermit nicht aus der T75-Zellkulturflasche entfernen, sodass etwa 0,2ml bis 0,4ml in der ursprünglichen Zellkulturflasche verblieben. Beispielsweise wurde, im Sinne einer 1:50-Verdünnung, in eine neue Zellkulturflasche 0,2ml pipettiert. Das restliche zellhaltige Medium wurde verworfen.
- 6. Gabe von jeweils 20ml farblosem DMEM mit Zusätzen in die ursprüngliche und in die neu befüllte Zellkulturflasche.

## 2.1.4 Zell-Verteilung in 96-Well-Platten: "Aussäen"

Die gleichmäßige manuelle Verteilung von je 10.000 Tumorzellen in die einzelnen Näpfchen (*Wells*) einer 96-*Well*-Mikrotiterplatte erforderte, aufgrund mehrerer komplexer Prozessschritte (s.u.), einen Zeitaufwand von etwa einer Stunde. Korrektes Pipettieren im Rahmen dieses, in der weiteren Schrift als "Aussäen" bezeichneten, Prozessbausteins war wegweisende Grundvoraussetzung für den späteren Versuchserfolg.

Das "Aussäen" ließ sich in drei Prozessstufen unterteilen: Vorbereiten der Zellzählung, Zellzählung und Zellverteilung.

Es glich dem Splitten bis zum fünften Schritt (s. Kapitel 2.1.3). Statt den Großteil des zellhaltigen Mediums an dieser Stelle zu verwerfen, wurde es vollständig in ein *Fal*-

*con* pipettiert. Danach waren sofort 50µl aus demselben Falcon in ein "Eppendorf-Hütchen" (Biopur *Safe-Lock Tube*, Eppendorf, Hamburg, D) hineinzugeben.

Zur weiteren Vorbereitung der Zellzählung wurden, zum Zweck der differenzierten Färbung intakter bzw. lädierter und toter Meningeomzellen, anschließend 150µl Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) in das *Safe-Lock Tube* durchmischend befüllt. Umgehend wurden daraufhin, unter Ausnutzung der Kapillarkräfte des Deckgläschens, je etwa 6µl in das Ober- und das Unterfeld eines Hämazytometers (Neubauer Improved, Assistent Germany, Sondheim, D) pipettiert.

Unter lichtmikroskopischer Darstellung wurden die Zellen in der Neubauer-Kammer ausgezählt. Aus der erhobenen Summe vitaler Zellen errechneten sich die Volumina von Zellsuspension und DMEM mit Zusätzen an dem Gesamtvolumen einer "Definierten Zellsuspension". Diese hatte bei allen unseren Versuchen eine Zielkonzentration von 10.000 Zellen/100µl.

Nach Erstellen der "Definierten Zellsuspension" konnten der *Standard* (unbehandelte Kontroll-*Wells*) und die "Bestrahlungsblöcke" (der PDT auszusetzende *Wells*) jeweils mit 100µl aus der "Definierten Zellsuspension" mittels der mechanischen *Multipette* (Eppendorf, Hamburg, D) befüllt werden. Dieser Schritt stellte das eigentliche "Aussäen" dar.



Abb. 2: "Ausgesäte" 96-Well-Platte für Kolorimetrie mit dem WST-1-Test. Vertikal markierte Wells: Blank (links) und Standard (rechts). Wells der vier "Bestrahlungsblöcke" in blumenartiger Konfiguration (vgl. Abb. 6).

Ebenfalls mit der mechanischen *Multipette* wurden die sechs *Wells* des "*Blank*" mit 100µl DMEM mit Zusätzen befüllt. In die 36 *Wells* des äußersten Rings der 96-*Well*-Platte wurden je 200µl DPBS zum Schutz vor Verdunstung pipettiert. Abb. 2 zeigt die Anordnung von für die Versuchsauswertung notwendigen *Wells* auf einer Mikro-titerplatte.

Abschließend wurde mit einem Lichtmikroskop (CK2, Olympus Europa, Hamburg) stichprobenartig überprüft, ob die Zellen in den *Wells* gleichmäßig verteilt waren. Wenn dies der Fall war, konnten die Zellkulturplatten inkubieren; der Versuchstag war vorbereitet.

## 2.2 Versuchsdurchführung

## 2.2.1 Quantifizierung der PDT-Effektivität

36 Stunden nach Ablage der ausgesäten Zellkulturplatte in den CO<sub>2</sub>-Inkubator (CB 150l, Binder, Tuttlingen, D), wurde 5-ALA-Hydrochlorid [CAS: 5451-09-2] (Merck, Darmstadt, D) in diejenigen Wells pipettiert, die einer PDT ausgesetzt werden sollten. Bevor ALA allerdings hinzugegeben werden konnte, waren mehrere vorbereitende Maßnahmen nötig.

Zunächst wurde das in kleinen lichtundurchlässigen braunen Glasflaschen aufbewahrte ALA-Pulver aus dem Kühlschrank entnommen. Mittels der 10ml-Pipette (Eppendorf Research Plus, Eppendorf, Hamburg, D), wurden 10ml Wasser (Aqua ad iniectabilia, Braun, Melsungen, D) aufgezogen und in das ALA-Fläschchen pipettiert. Danach wurde selbiges mehrmals geschwenkt und abgestellt, das ALA-Pulver löste sich dabei rasch auf. Zeitnah dazu waren, der Anzahl verschiedener gewünschter ALA-Konzentrationen entsprechend, Zentrifugen-Röhrchen (Cellstar® Tubes, Greiner bio-one, Frickenhausen, D) mit 50ml DMEM ohne Zusätzen befüllt worden. Dies geschah am präzisesten und einfachsten mit einem elektronischen *Handdispenser* (Multipette Stream, Eppendorf, Hamburg, D). Die für die definierten ALA-Konzentrationen vorgesehenen Röhrchen wurden mit handelsüblicher Aluminium-Folie umwickelt, um das später in DMEM gelöste 5-ALA vor zerfallsbeschleunigender Lichtenergie zu schützen [54]. Nun wurden die eingewickelten Zentrifugen-Röhrchen gemäß ihrer ALA-Zielkonzentration behandelt. Am Beispiel einer Zielkonzentration von 50µg ALA/ml seien die einzelnen Verdünnungsschritte erläutert:

 500mg ALA-Pulver aufgelöst in 10ml destilliertem Wasser ergab eine ALA-Konzentration im braunen ALA-Fläschchen von 5 \* 10<sup>4</sup>µg/ml.

 $\circ$  500mg / 10ml = 5 \* 10<sup>4</sup>µg/ml.

 Zur Erstellung eines ALA-Falcons mit der Konzentration 150µg ALA/ml DMEM wurden, nach Entfernung von 150µl DMEM aus dem Gefäß, 150µl von der ALA-Verdünnung des braunen Fläschchens in ein mit 50ml DMEM befülltes *Falcon* pipettiert. Nach mehrmaligem Überkopf-Schwenken, war eine ausreichende Durchmischung im Behältnis erreicht.

- $\circ$  5 \* 10<sup>4</sup>µg/ml \* 150µl = 7,5mg ALA
- $\circ$  7,5mg ALA / 50 ml = 150µg ALA/ml
- Mit einer mechanischen Multipette mit entsprechender Spitze (Combitip, Eppendorf, Hamburg, D) wurden aus dem so konzentrierten Zentrifugen-Röhrchen jeweils 50µl in die 100µl DMEM beinhaltenden Wells pipettiert. Dieser Verdünnungsschritt von 1:3 führte folglich zu einer ALA-Konzentration von 50µg/ml im Näpfchen.

Analog wurde für die anderen verwendeten ALA-Zielkonzentrationen (d.h. 12,5, 25, 100 und 200µl ALA/ml) vorgegangen.

Um vergleichbare Verhältnisse zu den "Bestrahlungsblöcken" zu schaffen, wurden in die *Wells* des *Blank* und *Standard* je 50µl "DMEM ohne Zusätze" pipettiert. Geschüttelt wurde die Zellkulturplatte anschließend für zwei Minuten bei 37°C und 650U/min in einem Misch-Temperierer (*Thermomixer*® *comfort*, Eppendorf, Hamburg, D) und daraufhin, für die definierte Einwirkzeit von 5-ALA, in den Inkubator gestellt.

15 Minuten vor Ablauf der ALA-Inkubationszeit wurde das die Zellen versorgende DMEM mit Zusätzen in den *Wells* mehrfach ausgetauscht – das so genannte "Waschen". Auf diese Weise wurde im Medium befindliches ALA entfernt. Jene 15 Minuten waren dabei als zeitlicher Puffer zu verstehen, da etwa 15 Minuten beim "Waschen" verstrichen, bevor das Medium zellhaltiger *Wells* weitgehend ausgetauscht war. Das erneuerte Medium beinhaltete für die meisten Versuche 1% FCS; für die Versuche nach Ciprofloxacin-Protokoll war das DMEM nach "Waschen" frei von FCS (s. Kapitel 2.1.2). Am Beispiel eines *Well* des *Standard* sei die mehrstufige Vorgehensweise des "Waschens" geschildert (s. Abb. 3).



Abb. 3: Prozess des Mediumwechsels ("Waschen") nach abgelaufener ALA-Einwirkzeit am Beispiel eines Näpfchens der Mikrotiterplatte. Seitansicht auf ein schematisches *Well* unterschiedlicher Befüllung in chronologischer Abfolge zu den Prozessschritten (a bis e).

Vor dem "Waschen" befanden sich 150µl DMEM (s. Abb. 3, a) in dem Näpfchen: Vom "Aussäen" stammende 100µl DMEM mit allen Zusätzen und 50µl DMEM ohne Zusätze vom vorgeschalteten Versuchsschritt der ALA-Gabe und dem damit einhergehenden kompensatorischen Auffüllen unbehandelter *Wells* mit zusatzfreiem DMEM (s. vorherige Seite). Jene 150µl wurden mittels einer 100µl-Pipette (Eppendorf *Research Plus*, Eppendorf, Hamburg, D) in zwei Schritten entfernt (s. Abb. 3, b); dies wurde für drei aufeinander folgende *Wells* getan. Diese drei *Wells* erfuhren daraufhin jeweils ein Auffüllen mit 200µl DMEM mit 1% FCS (s. Abb. 3, c) durch zweimaliges Pipettieren einer auf 100µl Pipettiervolumen eingestellten *Multipette*. Direkt im Anschluss wurden diese 200µl erneut in zwei Schritten entfernt (s. Abb. 3, d). Das "Waschen" des jeweiligen *Wells* war abgeschlossen, sobald darauffolgend 100µl DMEM mit 1% FCS pipettiert wurden (s. Abb. 3, e). Der Vorgang wurde anschließend ebenfalls für die anderen drei Näpfchen des *Standard* durchgeführt. Mit den *Wells* der "Bestrahlungsblöcke" wurde analog verfahren. Da der *Blank* nicht über Zellen verfügte, konnten seine sechs *Wells* aufeinanderfolgend gewaschen wer-

den ohne Austrocknungsgefahr des zellulären *Monolayers* zwischen den Mediumgaben (vgl. Abb. 3, b und d). Nach erfolgtem "Waschen" wurde die 96-*Well*-Platte in der von *Pannewitz et al.* für hiesige experimentelle Zwecke etablierten Bestrahlungskammer (Welabo, Düsseldorf, D und CeramOptec, Bonn, D; s. Abb. 4) platziert [68].



**Abb. 4: Entdeckelte Bestrahlungskammer.** Draufsicht von schräg. (a) Anschlussstelle der Laser-Fiber an den Laser-Generator (nicht abgebildet); (b) Mündungsstelle der Laser-Fiber in die Bestrahlungseinheit mit ihrer (c) Laseraustrittsstelle; (d) mobile Plexiglas-Halterung für die Mikrotiterplatte.

Jeder "Bestrahlungsblock" wurde dann für 625 Sekunden mit Laserlicht der Wellenlänge 635nm des auf eine Leistung von einem Watt konfigurierten Lasers (CeraLas, BioLitec, Jena, D) bestrahlt. Dabei erreichte das Laserlicht über eine Fiber (*Frontal Light Diffusor*, Medlight, Ecublens, CH) den Boden der 96-*Well*-Platte in einem definierten Abstand von 93mm. Dies führte zu einer lokalen Laser-Leistung von 25mW/cm<sup>2</sup>, über die Bestrahlungsdauer insgesamt also 15,6J/cm<sup>2</sup> [68].

Nach erfolgter Bestrahlung wurde die Zellkulturplatte für 24 Stunden beziehungsweise 90 Minuten (Versuche mit Ciprofloxacin, s. Kapitel 2.1.2) in den Inkubator gestellt ("Ruhezeit"). Es wurde damit beabsichtigt, dem fortschreitenden Zelltod nach PDT ausreichend Zeit zu geben, um die Sensitivität seiner Nachweisverfahren, insbesondere des LDH-Tests (s. Kapitel 2.2.1.2 und 3.1.3) zu erhöhen.

#### 2.2.1.1 WST-1-Test

Zur indirekten Ermittlung des PDT-bedingten Zelltodes wurde dieses, im hiesigen Labor bereits etablierte, Nachweisverfahren verwendet. Der *Assay* mittels *Water Soluble Tetrazolium Salt*-1 (WST-1) (Roche Diagnostics, Heidelberg, D) stellte kolorimetrisch die Zellstoffwechselaktivität dar und erfasste damit die verbliebene Zellvitalität nach PDT [69].

Das in die zelluläre Umgebung gemeinsam mit einem elektronenkoppelnden Reagenz pipettierte WST-1 wurde, unter Katalysierung durch zelluläre Enzyme und bei Oxidierung von Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid (NADH), zu Formazan reduziert (s. Abb. 5)



Abb. 5: Reaktionsweg des WST-1-Assay. Modifiziert mit Nutzungsgenehmigung der Roche Diagnostics GmbH, © 2008. Elektronenkoppelndes Reagenz (EC), zelluläres Enzym (RS), Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid (NADH).

Im Folgenden ist die schrittweise Handhabung des WST-1-Assay dargestellt:

 Zwei Stunden vor Ende der Ruhezeit der 96-Well-Platte nach PDT, wurde das im Vorfeld in Kryoröhrchen (Cryotubes, Nunc
 Roskilde, DK) portionierte WST-1-Reagenz bei Zimmertemperatur aufgetaut. Das entsprechende Kryo röhrchen wurde, zum Schutz vor UV-Licht, mit handelsüblicher Aluminiumfolie umwickelt.

- Fünf Minuten vor Ende der Platten-Ruhezeit nach PDT wurde das nun auf Zimmertemperatur gebrachte Reagenz im Wasserbad (WNB, Memmert, Schwabach, D) für vier Minuten bei 37°C erhitzt. In dieser Zeit nahm die Viskosität des Reagenz weiter ab.
- Pünktlich nach Ablauf der definierten Ruhezeit nach PDT, wurden je 10µl WST-1-Reagenz in alle 34 DMEM-haltigen Wells pipettiert.
- Die befüllte Platte wurde anschließend f
  ür zwei Minuten im Misch-Temperierer gesch
  üttelt.
- Nach 30- bis 60-minütiger Platten-Inkubation erfolgte die erneute zweiminütige Anwendung des Misch-Temperierers.
- Der Test wurde mit der Ablesung der Zellkulturplatte im Mikrotiterplatten-Lesegerät (Microplate Reader 680 XR, Bio-Rad Laboratories, München, D) beendet; ein Farbumschlag war makroskopisch zu erkennen (s. Abb. 6).

Es sei gesondert erwähnt, dass der WST-1-Test im Neurochirurgischen Labor des UKD für eine "Nach-PDT-Ruhezeit" von 90 Minuten etabliert wurde. In diesem Rahmen fanden auch die Versuche mit Ciprofloxacin statt. Für die Untersuchungen der Effekte verlängerter ALA-Inkubationszeiten und dem gleichzeitigen Vergleich mit dem LDH-Test, wurde jene Ruhezeit nach PDT auf 24 Stunden erhöht (s. Kapitel 2.2.1). Die Auswirkung dieser Maßnahme wurde untersucht (s. Kapitel 3.1.3 und 3.1.4). Dabei wurden die relativen Extinktionen für zwei Szenarien der Inkubationszeit nach PDT verglichen. In beiden inkubierte zwar ALA über 24 Stunden in Konzentrationen von 50 und 100µg/ml, allerdings wurde untersucht, ob die 24stündige Inkubationszeit zwischen PDT und WST-1-Test die relative Extinktion gegenüber den bisher üblichen 90 Minuten signifikant beeinflusste.



Abb. 6: Versuchsplatte nach durchgeführtem WST-1-Assay. Beispiel einer Zellkulturplatte der Negativkontroll-Versuche (s. Kapitel 3.1.1). Vertikal angeordnete *Wells*: "*Blank*" und "*Standard*". *Wells* in blumenförmiger Konfiguration: "Bestrahlungsblöcke" (vgl. Abb. 2 auf S. 11).

### 2.2.1.2 LDH-Test

Im Gegensatz zum WST-1-*Assay* gibt der LDH-*Assay* (Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH), Roche Diagnostics, Heidelberg, D) direkte Auskunft über den Zelltod. Hierbei führt extrazelluläre Laktat-Dehydrogenase (LDH) zur Färbung derjenigen *Wells*, deren Zellen Membranschaden erlitten [63].

Tabelle 1 zeigt die drei Einzel-Komponenten des LDH-Assay, die verwendet wurden.

Name	Zugehörige Substanzen	Funktion
Lysis Solution	Detergens Triton X-100	Lyse aller Zellen in den Wells
		des High Control
Dye Solution	Tetrazoliumsalz INT, Natrium-	Bestandteil der Reaction Mix-
	laktat	<i>ture</i> zum Farbumschlag
Catalyst	Mischung aus Diaphorase/NAD+	Bestandteil der Reaction Mix-
	und einem Katalysator	ture zum Farbumschlag

Tabelle 1: Verwendete Bestandteile des LDH-Assay

Es sei darauf hingewiesen, dass die oben stehende Tabelle die *Stop Solution* als Bestandteil des *Kits* nicht aufführt. Diese reaktionsbeendende Lösung wurde aus praktischen Erwägungen nicht verwendet, da während ihrer Erprobung die betroffenen *Wells* überzulaufen drohten. Überdies war die Verwendung der *Stop Solution*, bei definiertem kolorimetrischen Auswertungszeitpunkt, nicht zwingend nötig (s. Kapitel 4.1.4).

Wie Abb. 7 darstellt, wird das durch die *Dye Solution* addierte Laktat durch die aus den Zellen ausgetretene LDH zu Pyruvat oxidiert. Dabei wird das aus dem *Catalyst* stammende NAD+ zu NADH reduziert. Im für den Nachweis entscheidenden Schritt reduziert der Katalysator das Tetrazoliumsalz Iodophenyl-Nitrophenyl-Phenyltetrazolium (INT) zu Formazan [70].



Abb. 7: Reaktionswege des LDH-Assay. Modifiziert mit Nutzungsgenehmigung der Roche Diagnostics GmbH, © 2008.

Der chronologische Zusammenhang der Reaktionsabläufe wird im Folgenden von der Lysierung der Zellen bis zum Moment des Ablesens im Mikrotiterplatten-Lesegerät erläutert.

Zunächst wurden die am Vortag aufgetauten Testkomponenten des LDH-Assay eine Stunde vor Beginn des Nachweises aus dem Kühlschrank entnommen, um sie Raumtemperatur annehmen zu lassen. Der erste Schritt des Nachweisverfahrens fing mit der Lysierung von Zellen des sogenannten *High Control* an. Die sechs *Wells* dieser Kontrolle dienten mit ihrer maximalen LDH-Aktivität als Referenz zur Quantifizierung der Zellletalität. Dazu wurden 5µl der *Lysis Solution* vorsichtig mit einer 10µl-Pipette (Eppendorf research plus, Eppendorf, Hamburg, D) in jedes Näpfchen des *High Control* pipettiert. Den eigentlichen *Standard* unbehandelter *Wells* stellte im LDH-*Assay* der sogenannte *Low Control* dar, dessen Zellen nicht lysiert wurden.

Auf die Lysierung folgte ein zehnsekündiges Rütteln der 96-*Well*-Platte im Misch-Temperierer. Im Anschluss inkubierte die Platte für 15 Minuten in einem dunklen Behältnis bei Raumtemperatur.

In diesen 15 Minuten wurde die *Reaction Mixture* definierter Zusammensetzung in einem Zentrifugen-Röhrchen angesetzt. Dabei betrug das Verhältnis von gelöstem *Catalyst* zur *Dye Solution* 1:45, z.B. im Sinne von 125µl *Catalyst* und 5,625ml *Dye Solution*. Eine *Reaction Mixture* dieses Volumens war für den LDH-Nachweis bei einer 96-*Well*-Mikrotiterplatte ausreichend.

Gemäß Herstellerangaben waren nach jenen 15 Minuten die Zellen der Positivkontrolle *High Control* durch das Detergens der *Stop Solution* lysiert - dies deckte sich auch mit unserer lichtmikroskopischen Kontrolluntersuchung, in der eine starke Verkleinerung verbliebener Zellformationen zu sehen war (s. Abb. 8).



**Abb. 8: Lysierung von Zellen durch die** *Lysis Solution*. Links: unbehandelte Kontrollzellen; rechts: lysierte Zellen des *High Control*. Lichtmikroskopische Aufnahmen bei 40facher Vergrößerung. Maßstab ist eingezeichnet (roter Querstrich, 100µm).

Je 100µl der gerade hergestellten *Reaction Mixture* wurden rasch mit einer *Multipette* in jede *Well* des *Low Control, High Control, Blank* und der "Bestrahlungsblöcke" pipettiert. Es begann daraufhin der rötliche Farbumschlag des *Well*-Inhaltes - insbesondere in den Näpfchen des *High Control* war jener bereits nach wenigen Sekunden makroskopisch erkennbar. Die Minuten, die ab dem Zeitpunkt des fertiggestellten Pipettierens der *Reaction Mixture* bis zur kolorimetrischen Auswertung verstrichen, waren als "Ablesezeit" definiert. Gemäß unseren Erfahrungen mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät, der Zelldichte in den *Wells* und dem Zelltyp betrug jene idealerweise fünf Minuten (s. Kapitel 4.1.2). Die intensive Rotfärbung von *Wells* mit hohem Zellsterben, nach längerer Einwirkzeit der *Reaction Mixture*, wird von Abb. 9 illustriert.



Abb. 9: 96-Well-Platte nach durchgeführtem LDH-Assay. Beispiel einer Zellkulturplatte der Negativkontroll-Versuche (s. Kapitel 3.1.1). Vertikal angeordnete Wells: Kontrollen (LC: Low Control, HC: High Control und der Blank (B). Blumenförmige Wells: "Bestrahlungsblöcke".

Damit der LDH-Test im Neurochirurgischen Labor des UKD etabliert werden konnte, wurden zunächst Vorversuche durchgeführt (s. Kapitel 3.1.3).

Zum einen wurde untersucht, wie stark die Formazan-Bildung mit der Zahl lysierter Zellen korrelierte. Hierzu wurden sechs *Well*-Quadruplikate mit definierten Zelldichten von 10<sup>3</sup> bis 4\*10<sup>4</sup> Zellen/100µl "ausgesät". Nach dem "Aussäen" inkubierten die Zellen dabei für 18 Stunden und wurden unmittelbar vor Durchführung des LDH-*Assay* "gewaschen". Daraufhin wurden alle Zellen in den *Wells* lysiert und kolorimetrisch, zur Erfassung der absoluten Extinktion, ausgewertet. Die kolorimetrische Auswertung wurde mit den Zelldichten korreliert.

In weiteren Vorversuchen zeigte sich im LDH-*Assay* eine erhöhte relative Extinktion von Versuchszellen bei zunehmender Ruhezeit nach PDT (24 Stunden statt 90 Minuten). Um zu untersuchen, ob dieser Effekt von einem nach 24 Stunden denkbaren LDH-Zerfall konterkariert werden konnte, wurden *Wells* mit je 10.000 Zellen "ausgesät" und am Folgetag allesamt zeitgleich lysiert, aber zeitlich gestaffelt abgelesen (s. Kapitel 3.1.3, Abb. 22).

#### 2.2.1.3 Ermittlung des Einflusses verschiedener ALA-Einwirkzeiten

Um den Effekt der Einwirkzeit von 5-ALA auf die PDT nachzuweisen wurde neben einer 96-*Well*-Zellkulturplatte, mit konventioneller vierstündiger ALA-Inkubationsdauer, eine weitere Mikrotiterplatte behandelt. Die ALA-Einwirkzeit der zweiten Gruppe betrug 24 Stunden, ansonsten wurde mit dieser gleich verfahren. Der kolorimetrische Nachweis erfolgte mit dem WST-1- bzw. LDH-*Assay*. Verglichen wurde der Effekt verlängerter Einwirkzeiten auf die Zellen der "Bestrahlungsblöcke" mit ALA-Konzentrationen von 50, 100 bzw. 200µg/ml.

#### 2.2.1.4 Ermittlung des Einflusses von Ciprofloxacin

Der Aufbau unserer Versuche mit Ciprofloxacin-Lösung [CAS: 93107-08-5] (Apotheke des UKD) unterschied sich von den bisher dargestellten Versuchen mit WST-1 in wenigen Punkten. So waren neben der Gabe von Ciprofloxacin zu den Versuchszellen vor allem die Inkubationszeiten zwischen den Prozessschritten angepasst. Als Kontrollgruppe wurden, zeitlich um eine Stunde versetzt, außerdem Zellkulturplatten mit dem einfachen Schema der ALA-PDT behandelt. Im folgenden Textabschnitt werden Unterschiede in der Handhabung der Ciprofloxacin-Versuche dargestellt.

Nach Distribution von 10.000 Zellen in ein Well mit 100µl DMEM (s. Kapitel 2.1.4), ruhte die für Ciprofloxacin-Versuche vorgesehene Zellkulturplatte für 19 Stunden im Inkubator. Anschließend waren 50µl einer 75µg/ml Ciprofloxacin-Konzentration in jede Well der "Bestrahlungsblöcke" zu pipettieren (s. Abb. 10, a). Somit befanden sich 25µg Ciprofloxacin/ml im betreffenden Well. Nach zweiminütiger Durchmischung der Mikrotiterplatte auf einem Misch-Temperierer, inkubierten die Zellen daraufhin für 24 Stunden bis zur Hinzugabe von 5-ALA in Konzentrationen von 12,5, 25, 50 und 100µg/ml. Es folgte das bereits dargelegte "Waschen" (s. Kapitel 2.2.1), jedoch mit dem Unterschied, dass zuletzt jeweils 50µl für die Zielkonzentrationen von Ciprofloxacin und 5-ALA in die betreffenden Wells pipettiert wurden (s. Abb. 10, b). Auf diese Weise konnte die bisherige Ciprofloxacin-Konzentration in den Wells, bis kurz vor PDT, aufrechterhalten werden. Das letztmalige "Waschen vor PDT" entsprach der oben beschriebenen Vorgehensweise, wurde jedoch - aufgrund der weit kürzeren Anschlusszeit bis zur Versuchsauswertung - mit DMEM ohne FCS durchgeführt (s. Kapitel 2.1.2). Nach erfolgter PDT ruhte die Ciprofloxacin-Platte für weitere anderthalb Stunden. Danach wurde der Versuch mit dem WST-1-Assav (s. Kapitel 2.2.1.1) abgeschlossen.



Abb. 10: Umgang mit Ciprofloxacin und ALA vor PDT. Seitansicht eines einzelnen behandelten *Wells* chronologisch (von links nach rechts) nach dem jeweiligen Prozessschritt (buchstabierte Zeile) geordnet. Der Füllungsstand ist illustriert. Zeile a: vor und nach Hinzugabe von Ciprofloxacin, 19 Stunden nach Zelldistribution; Zeile b: Vorgang des "Waschens" mit Verbleib eines Ciprofloxacin-ALA-Gemisches, 43 Stunden nach Zelldistribution; Zeile c: "Waschen" vor PDT gemäß Kapitel 2.2.1, 47 Stunden nach Zelldistribution.

### 2.2.1.5 Durchführung von Negativkontrollen

Für alle Versuche, die zur Quantifizierung der PDT-Effektivität beitrugen, wurden Negativkontrollen durchgeführt.

Bei den Versuchen zur ALA-Einwirkzeit wurde kontrolliert, wie stark der separate Einfluss von jeweils 15,6J Laserenergie und 50µg ALA/ml auf die Vitalität bzw. Letalität der Meningeomzellen war.

Die Negativkontrollen für die Ciprofloxacin-Versuche ermittelten zusätzlich den separaten Einfluss von 25µg Ciprofloxacin/ml. Auch wurde überprüft, inwieweit diese Ciprofloxacin-Konzentration in Kombination mit der o.g. Laserleistung bzw.

ALA-Konzentration die Zellvitalität herabsetzte.

Alle zu untersuchenden Zellen der Negativkontrollen wurden in "Bestrahlungsblöcken" behandelt.

## 2.2.2 Spektrometrie von PPIX-Verdünnungsreihen

Im folgenden Textabschnitt werden die spektrometrischen Versuchsschritte dargestellt. Die sechs, je etwa zweistündigen, Versuche wurden streng nach Protokoll durchgeführt.

Nach Vorbereitung eines adäquaten Versuchsaufbaus, wurde als erstes ein mit handelsüblicher Aluminiumfolie umwickeltes 50ml-Becherglas (Schott, Mainz, D) auf eine elektronische Präzisionswaage (Kern 410, PK Elektronik, Velten, D) gestellt. In das Becherglas wurde bereits im Vorfeld ein Magnetrührstab (VWR, Darmstadt, D) eingelegt. Dann wurde das Taragewicht ermittelt. Daraufhin erfolgte das Abwiegen von 50mg PPIX [CAS: 553-12-8] (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D) mittels Spatel-Löffel (Welabo, Düsseldorf, D), wobei eine Abweichung vom Zielgewicht von bis zu einem Prozent toleriert wurde.

Anschließend wurde das abgewogene PPIX im Becherglas mittels entsprechender Pipette mit 10ml Dimethylsulfoxid [CAS: 67-68-5] (DMSO) (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) versetzt. Direkt im Anschluss erfolgte die einstündige Durchmischung dieser Lösung auf einem Heiz-Magnetrührer (RETbasic, IKA Labortechnik, Staufen, D) bei 50°C und 200U/min.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde überprüft, ob sich sämtliches PPIX am Boden des Becherglases aufgelöst hatte. Die gesamte Lösung mit einer Konzentration von folglich 5000µg PPIX/ml war dunkelbraun gefärbt. Diese Stammlösung konnte nun für die Herstellung einer Verdünnungsreihe genutzt werden. Die dafür benötigten elf *Safe-Lock Tubes* waren bereits, mit Aluminium-Folie umwickelt, in einem Reaktionsgefäßständer (*Micro Test Tube Rack*, Brand, Wertheim, D) sortiert. Beschriftet wurden diese Röhrchen mit den Kürzeln "ZL" (Zwischenlösung), "NK0" (Negativkontrolle 1600µl PBS) und "NK20" (Negativkontrolle 1568µl PBS und 32µl DMSO), sowie den Zahlenwerten gewünschter PPIX-Konzentration in µg/ml - "20", "10", "5", "2.5", "1.25", "0.625", "0.3125" und "0.15625" (s. Abb. 11). Die Zusammensetzung der "NK0" und der "NK20" entsprachen der Füllung des *Safe-Lock Tube* mit der entsprechenden PPIX-Verdünnung, aber - im Sinne der Negativkontrollen - ohne den Fluorophor. Vor Zugabe entsprechender Mengen von PPIX-Konzentrationen waren bereits, in die Gefäße "ZL" bzw. "20" und "10", Volumina von 800µl DMSO bzw. 768µl und 784µl PBS pipettiert worden.

Zunächst wurde das *Safe-Lock Tube* für die Zwischenlösung mit 200µl der Stammlösung auf 1000µl aufgefüllt - dies entsprach einer 1:5-Verdünnung der Stammlösung. Die PPIX-Konzentration in der Zwischenlösung betrug folglich 1000µg/ml. Wie nach jedem Verdünnungsschritt in diesem Versuch, wurde jenes Röhrchen unmittelbar vor dem Pipettieren weiterer PPIX-Konzentrationen auf dem Reagenzglasschüttler (REAX 2000, Heidolph, Schwabach, D) fünf Sekunden lang geschüttelt.

Aus dem Gefäß der Zwischenlösung wurden im weiteren Verlauf 32 bzw. 16µl entnommen, um die *Safe-Lock Tubes* "20" bzw. "10" auf 800µl aufzufüllen (s. o.). Diese Gefäße wurden anschließend mit PBS 1:2 verdünnt und stellten mit ihren 1600µl Flüssigkeitsvolumen die beiden Ausgangspunkte für die weitere Viertelung der PPIX-Konzentrationen dar: Aus einer Ausgangskonzentration wurden 400µl entnommen und in das *Safe-Lock Tube* zur geviertelten Konzentrierung pipettiert. Es folgte das Auffüllen des so gefüllten Röhrchens mit weiteren 1200µl PBS. So ließen sich in zwei Reihen die PPIX-Zielkonzentrationen von 20, 5, 1,25, 0,3125µg/ml und 10, 2,5, 0,625, 0,15625µg/ml pipettieren. Die Negativkontrollen wurden bereits angesetzt, als das PPIX der Stammlösung auf dem Heiz-Magnetrührer in Lösung begriffen war.

Abb. 11 zeigt die makrokopisch erkennbare Abblassung in den mit absteigenden PPIX-Konzentrationen befüllten *Safe-Lock Tubes*, die zu Abbildungszwecken nicht mit Aluminiumfolie umwickelt sind.



**Abb. 11: PPIX-Verdünnungsreihe.** Halbierend absteigende PPIX-Konzentrationen ab dem zweiten Gefäß von links (beginnend mit 20µg PPIX/ml). Ganz links befindet sich ein mit der Zwischenlösung (1000µg PPIX/ml) gefülltes *Safe-Lock Tube*.

Die in den letzten Schritten erstellten PPIX-Verdünnungen wurden umgehend auf dem Reaktionsgefäßständer in die Dunkelkammer gebracht. Dort befand sich der bereits vorbereitete Versuchsaufbau zur Fluoreszenzmessung, dessen Funktionstüchtigkeit mittels vorangegangener Ausmessung der Negativkontrollen für den Versuchstag überprüft worden war.

Eine Quarz-Küvette (Suprasil 104-QS, VWR, Darmstadt, D) (s. Abb. 12, c) wurde in ihre Öffnung auf der Halterungsplatte der Fiberoptik (s. Abb. 13, a) eingesetzt. Aus einem entsprechenden *Safe-Lock Tube* wurden 1000µl der zu untersuchenden Flüssigkeit in die Quarz-Küvette pipettiert. Eine schraubengesicherte Fixierung der Sondenspitze (s. Abb. 12, a) und ihr Halterungsblock (s. Abb. 12, d) hielten die Sonden-Eindringtiefe (s. Abb. 12, b) in die Flüssigkeit bei drei Millimeter.


Abb. 12: Detailansicht der Fiberoptik-Halterung (vgl. Abb. 13, a). Seitansicht. (a) Schraubengesicherte Sondenfixierung; (b) Sondenspitze; (c) Quarz-Küvette; (d) Halterungsblock zur Abstandssicherung.



Abb. 13: Aufbau der Versuchsgegenstände zur PPIX-Fluoreszenzspektrometrie. Draufsicht. (a) Halterungsplatte; (b) *Notebook* mit Spektrometriesoftware; (c) Mehrkanal-Lichtquelle; (d) Fiberoptik; (e) Spektrometer.

Zur Fluoreszenz-Quantifizierung wurde stets mit der niedrigsten PPIX-Konzentration begonnen. Nach jeder Messung einer Konzentration wurde die Quarz-Küvette durch ruckartiges Ausgießen ihres Inhaltes und viermaliges Spülen mit 99,9%iger Isopropanol-Lösung [CAS: 67-63-0] (Zentralapotheke der UKD, Düsseldorf, D) gereinigt. Beide Maßnahmen hatten den Zweck kein PPIX in den nächsten Messdurchgang zu verschleppen.

Alle fiberoptisch-spektrometrischen Messungen wurden unter einheitlichen Bedingungen durchgeführt. Das Raumlicht in der Dunkelkammer wurde ausgeschaltet; diese Maßnahme reduzierte wiederholbar die allgemeinen Lichtsignale, bei der Spektrometrie über dem PPIX-relevanten Lichtspektrum, um etwa ein Viertel. Zusätzlich wurde der Bildschirm des *Notebook* (Targa Traveller XTR, Actebis, Soest, D) abgedunkelt und von der Versuchsoberfläche weggeneigt.

Die benutzerspezifische Spektrometrie-Software (Dr. Igor Fischer, EDV der Neurochirurgischen Klinik des UKD) erlaubte die Modulierung dreier Mess-Parameter – der Sequenz-Pausen (*LED Lead Time*) zwischen dem Leuchten einzelner LED (Ocean Optics, Dunedin, FL/USA), der LED-Beleuchtungsdauer in der Messsequenz (*Integration Time*) und der Mittelung der Ergebnisse aus einer definierten Anzahl von Einzelmessungen (*Average Over Spectra*). Es erwies sich als nötig die *LED Lead Time* und die *Integration Time* gleichermaßen auf 50ms zu setzen, damit insbesondere der 405nm-Gipfel, ohne nennenswerte Schwankungen seiner Signalintensität, darstellbar blieb. Schwankungen wurden mit Einzelmessungen, zu Beginn jedes Messdurchganges, ausgeschlossen; die für die jeweilige Negativkontrolle bzw. PPIX-Verdünnung zu speichernden Versuchsergebnisse hatten allerdings ein *Average Over Spectra* von 100.

Bei jeder Messung wurde die gesamte *Hardware* von der benutzerspezifischen Spektrometrie-*Software* auf dem *Notebook* (s. Abb. 13, b) angesteuert. So wurde bei den oben genannten definierten Messparametern eine Mehrkanal-Lichtquelle (s. Abb. 13, c) (*Multi-Channel Light Source*, Ocean Optics, Dunedin, FL/USA) dazu

angehalten das Licht entsprechend sequenziell anzuschalten. Die benutzerspezifische Fiberoptik (Ocean Optics, Dunedin, FL/USA) (s. Abb. 13, d) führte die einzelnen lichtleitenden Fasern in definierter Anordnung in der Sondenspitze zusammen (s. Abb. 14).



Abb. 14: Schematischer Querschnitt durch die Sondenspitze der Fiberoptik. Aufgaben der vier integrierten Glasfasern von links nach rechts: Abgabe von Blaulicht, Signalaufnahme, Abgabe von Weißlicht aus zwei Fibern; Aufbau analog zu *Kim et al.* [38].

Zwischen der Blaulicht-Quelle auf der einen und den beiden Weißlichtquellen auf der anderen Seite, befand sich die Ablese-Fiber, die das evozierte Signal an das Spektrometer (s. Abb. 13, e) (USB 2000+, Ocean Optics, Dunedin, FL/USA) weiter-leitete.

Die fiberoptisch-spektrometrische Quantifizierung der Lichtintensität wurde für die Anregungswellenlänge auf 406nm und für die Fluoreszenzwellenlänge auf 620nm durchgeführt. Dabei wurde die Höhe der Signalgipfel in willkürlichen Einheiten (*arbitrary units, a.u.*) sowohl getrennt, als auch in Relation zueinander, im Sinne eines "Blau-Rot-Quotienten" (B/R), betrachtet. Als Referenz für den B/R diente der Signalgipfel der blauen Wellenlänge. Für eine definierte Leistung der zugehörigen LED wurden diese an jedem Versuchstag über das MCLS auf ihre Maximalleistung kalibriert. Nach abschließender Fluoreszenz-Quantifizierung der Konzentration von 20µg PPIX/ml, wurde die Quarz-Küvette mehrfach mit Isopropanol ausgespült. Zuletzt wurde der Erfolg der Reinigung, im Sinne des Fehlens eines Fluoreszenz-Gipfels bei etwa 620nm, spektrometrisch überprüft ("Reinigungskontrollen", s. Kapitel 4.2).

#### 2.3 Versuchsauswertung

Zur Errechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen wurde Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA) und SPSS Statistics 22 (IBM, Armonk, NY/USA) verwendet. Letzteres diente auch der Erfassung statistischer Signifikanzen. Zur Widerlegung der Nullhypothese kam der T-Test für Stichproben zur Anwendung, da bei den Kontroll- bzw. Versuchsgruppen der Zellen von einer Normalverteilung ausgegangen wurde. Die Daten wurden ab einem Konfidenzintervall von 95% als signifikant betrachtet.

SPSS Statistics 22, Microsoft Excel 2010, Microsoft Paint 2010, Microsoft Word 2010, Microsoft Powerpoint 2010 und GIMP2 (The GIMP Team, Berkeley, CA/USA), wurden zum Erstellen und Bearbeiten von Graphiken verwendet.

# 3 Ergebnisse

### 3.1 Modifikation der PDT-Effektivität

#### 3.1.1 PDT-Verstärkung bei längerer ALA-Inkubation

In der Versuchsreihe mit LDH-*Assay* ergab sich für die beiden höheren ALA-Konzentrationen (100 bzw. 200 $\mu$ g/ml) bei einer 24stündigen ALA-Einwirkzeit (n=8) gegenüber der vierstündigen ALA-Inkubationsdauer (n=7) eine verstärkte PDT-Effektivität (p<0,001), wie

Abb. 15 zeigt.



**Abb. 15: Zellletalität nach PDT in Abhängigkeit von der ALA-Einwirkzeit.** Markierte Signifikanzen (p<0,001, \*) gesteigerter PDT-Effektivität bei verlängerter Einwirkzeit von 100µg ALA/ml bzw. 200µg ALA/ml. Höhere extrazelluläre LDH-Aktivitäten nach Einwirken von 200 $\mu$ g ALA/ml gegenüber 100 $\mu$ g ALA/ml wurden zwar stets nachgewiesen, die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant (p>0,25). Keine Signifikanz ergab ebenfalls der Unterschied bei 50 $\mu$ g ALA/ml im zeitlichen Vergleich (p=0,194).

Der Nachweis der Zellvitalität im WST-1-*Assay* (je n=6) stützte die Befunde des LDH-Tests (s. Abb. 16). Für eine ALA-Konzentration von 100µg ALA/ml bewirkte eine Verlängerung der ALA-Inkubationsdauer eine erhöhte PDT-Effektivität (p=0,002). Zusätzlich zeigte sich jedoch für eine Konzentration von 50µg ALA/ml eine höchst signifikante Abnahme der PDT-Effektivität bei verlängerter Einwirkzeit (p<0,001). Die ALA-Konzentration von 200µg/ml wurde, wegen eines im Vorfeld sondierten Messartefaktes, nicht mittels WST-1-Test untersucht (s. Kapitel 4.1.2 und Kapitel 4.1.4)



**Abb. 16: Zellvitalität nach PDT in Abhängigkeit von der ALA-Einwirkzeit.** Markierte Signifikanzen (p<0,001, \*) steigender bzw. sinkender Zellvitalität bei längerer Einwirkzeit von 50µg ALA/ml bzw. 100µg ALA/ml.

Die, gemäß Kapitel 2.2.1.5 durchgeführten, Negativkontroll-Versuche zum LDHund WST-1-*Assay* zeigten, unter separatem Einfluss von  $50\mu g$  ALA/ml bzw.  $15,6J/cm^2$  Laserenergie, keine signifikante Beeinträchtigung der Zellvitalität (je n=4). Dies galt für beide Einwirkzeiten von 5-ALA (s. Abb. 17).



Abb. 17: Mittelwerte relativer Extinktionen der Negativkontrollen im LDH-Test (oberes Diagramm) und WST-1-Test (unteres Diagramm). Kein signifikanter Einfluss von alleiniger 5-ALA bzw. von alleinigem Laserlicht auf Zellletalität (oben) bzw. Zellvitalität (unten).

#### 3.1.2 PDT-Verstärkung durch Ciprofloxacin

Tabelle 2 und Abb. 18 fassen zusammen, dass die ALA-PDT in Kombination mit  $25\mu g/ml$  Ciprofloxacin, im WST-1-*Assay* (je ALA-Konzentration n=6), die Zellvitalität stärker herabsetzte als die ALA-PDT allein. Dies galt insbesondere für 5-ALA-Konzentrationen von 50 bzw. 100 $\mu g/ml$  (p<0,001). Bei den beiden niedrigeren ALA-Konzentrationen zeigte die obige Aussage lediglich einen Trend zu statistischer Signifikanz (p=0,1289 bei 12,5 $\mu g/ml$ ; p=0,1168 bei 25 $\mu g/ml$ ).

 Tabelle 2: PDT-Verstärkung durch Ciprofloxacin in Kombination mit verschiedenen ALA-Konzentrationen. Mittelwerte relativer Extinktionen; Standardabweichungen sind eingeklammert.

	ALA	ALA	ALA	ALA
	(12,5µg/ml)	(25µg/ml)	(50µg/ml)	(100µg/ml)
Ohne Cipro- floxacin	0,870 (0,041)	0,816 (0,066)	0,621 (0,113)	0,374 (0,057)
Mit Cipro- floxacin	0,765 (0,143)	0,665 (0,196)	0,037 (0,020)	0,009 (0,008)



**Abb. 18: PDT-Verstärkung durch Ciprofloxacin.** Mittelwerte und Standardabweichungen gemäß Tabelle 2. Markierte Signifikanzen (p<0,001, \*) erhöhter PDT-Effektivität bei Kombination von 25µg Ciprofloxacin/ml mit 50µg ALA/ml bzw. 100µg ALA/ml.

Abb. 19 zeigt, dass die Negativkontrollen zu den Ciprofloxacin-Versuchen (je n=4), keine signifikante Reduktion der Zellvitalität unter alleinigem Ciprofloxacin-Einfluss ergaben; gleiches galt auch für die Kombination von Ciprofloxacin mit 50 $\mu$ g/ml 5-ALA. Ebenfalls wurde in jenen Negativkontrollen keine signifikante Minderung der Vitalität derjenigen Zellen festgestellt, die nur der definierten Laserleistung ausgesetzt waren bzw. sich als *Standard* in der Position des "Bestrahlungsblockes" (s. Kapitel 2.1.4) befanden. Es fiel jedoch die signifikant geringere Zellvitalität in denjenigen *Wells* auf, die ausschließlich 50 $\mu$ g/ml ALA inkubiert hatten (p<0,02). Im Kontext der unauffälligen Negativkontrollen zu den Versuchen mit variabler Inkubationszeit von 5-ALA (s. Kapitel 3.1.1) werden diese Ergebnisse in Kapitel 4.1.5 diskutiert.



Abb. 19: Ciprofloxacin-ALA-PDT Versuche: Mittelwerte der relativen Extinktionen der Negativkontrollen in Relation zum *Standard*, gemäß WST-1-Test. Bei den Negativkontrollen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den unbehandelten Referenzzellen. Lediglich eine Konzentration von 50 $\mu$ g ALA/ml zeigte eine erniedrigte Zellvitalität im Vergleich zur Referenz (p<0,02, \*).

#### 3.1.3 Etablierung des LDH-Assay im Labor

Bevor ab Kapitel 3.1.4 die Ergebnisse des LDH- und WST-1-*Assay* vergleichend dargestellt werden, seien vorbereitende Versuchsergebnisse zur Etablierung des LDH-Tests im Neurochirurgischen Labor des UKD dargestellt (s. Kapitel 2.2.1.2). Diese Vorversuche zeigten, wie in Abb. 20 dargestellt, eine positive Korrelation zwischen der Zahl lysierter Zellen und den daraus resultierenden absoluten Extinktionen in der 18 Stunden nach "Aussäen" erfolgten Kolorimetrie, sechs Minuten nach Pipettieren der *Reaction Mixture* (n=4). Allerdings geht eine Linearität dieser Korrelation, im Sinne eines zunehmend asymptotischen Verlaufes, ab Zellzahlen von etwa 2\*10<sup>4</sup> zum Zeitpunkt der Zelldistribution, offenbar verloren (s. Kapitel 4.1.3). Der Aufbau einer 96-*Well*-Zellkulturplatte zu einem solchen Versuch ist in Abb. 21 dargestellt.



Abb. 20: Extinktion im LDH-Assay in Korrelation zur Zahl lysierter Zellen von KT21-MG. Die absolute Extinktion korreliert positiv mit der Zahl der 18 Stunden vorher "ausgesäten" Zellen; zunehmend asymptotisch anmutender Verlauf bei höheren Zellzahlen.



Abb. 21: Versuchsplatte zu Abb. 20 nach Kolorimetrie. Die qualitative optische Dichte korreliert mit der Dichte "ausgesäter" Zellen in den *Well*-Quadruplikaten. Linke Spalte: 1000/µl (A) bzw. 2000/µl (B); mittlere Spalte: 5000/µl (C) bzw. 10000/µl (D); rechte Spalte: 20000/µl (E) bzw. 40000/µl (F).

Auch konnte gezeigt werden (n=4), dass die LDH selbst 24 Stunden nach ihrem Austritt in den EZR in unseren Versuchen keinem objektivierbaren Zerfall unterlag (s. Abb. 22, gemäß Kapitel 2.2.1.2).



Abb. 22: Extinktion im LDH-Test im Zeitverlauf nach Lysierung von KT21-MG. Ein Nachweis des LDH-Zerfalls konnte nicht erbracht werden.

Wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, wurde beim LDH-Test die Extinktion der "Bestrahlungsblöcke" in Relation zum *High Control* gesetzt. Dessen Zellen wurden erst zum Zeitpunkt der Versuchsauswertung lysiert und starben folglich nicht schon zum Zeitpunkt der PDT. Abb. 23 illustriert den daraus resultierenden Messirrtum bei vierstündiger Inkubationszeit von 5-ALA (n=5; p<0,005), der in der Diskussion (Kapitel 4.1.3) weiter ausgeführt wird.



**Abb. 23: Relative Extinktion von zum Zeitpunkt der PDT lysierten Kontrollzellen in Relation zu den relativen Extinktionen des gewöhnlichen High Control im LDH-Test.** Vergleich im Rahmen des PDT-Schemas mit vierstündiger und 24stündiger Einwirkzeit von 5-ALA. Signifikant geringere relative Extinktion des High Control, der zum Zeitpunkt der PDT lysiert wurde (p<0,005, \*).

#### 3.1.4 Vergleich zwischen LDH- und WST-1-Test

Vor dem Vergleich beider Nachweisverfahren musste geprüft werden, ob für den WST-1-Test, wie es für den LDH-Test nötig war (s. Kapitel 3.1.3), eine Ruhezeit nach PDT von 24 Stunden statt 90 Minuten praktikabel war (s. Abb. 24). Ein signifikanter Unterschied der relativen Extinktion zwischen 90minütiger und 24stündiger

Ruhezeit nach PDT mit vierstündig eingewirkten 50µg ALA/ml zeigte sich dabei (n=8; p=0,431) nicht. Die Differenz relativer Extinktionen von 100µg ALA/ml im Zeitvergleich war jedoch signifikant (n=8; p=0,02, s. Kapitel 4.1.4). Wie in Kapitel 4.1.4 diskutiert wird, wurde darin - aufgrund dieser Analogie zum LDH-Test - kein Hindernis für die vergleichende Durchführung beider *Assays* gesehen.



Abb. 24: Relative Extinktionen im WST-1-Test verschiedener ALA-Konzentrationen nach unterschiedlicher Ruhezeit nach PDT. Die Abnahme der relativen Extinktion bei 24stündiger statt 90minütiger Ruhezeit nach PDT mit 100µg ALA/ml ist signifikant (p=0,02, \*).

In der tabellarischen Gegenüberstellung der in Kapitel 3.1.1 dargestellten Ergebnisse beider Nachweisverfahren zeigt sich, gemäß der Test-Logik (s. Kapitel 2.2.1.1 und Kapitel 2.2.1.2), ein tendenziell zueinander inverses Verhältnis relativer Extinktionen (s. Tabelle 3 und Abb. 25).

**Tabelle 3: Gegenüberstellung der Ergebnisse des LDH- und WST-1-***Assay.* Mittelwerte relativer Extinktionen zu verschiedenen Szenarien der PDT gemäß den Konzentrationen von 5-ALA und ihren Einwirkzeiten in Stunden (h); Standardabweichungen (SD) sind eingeklammert.

A coor Dringin	<u>LDH</u>	WST-1
Assay-Prinzip	Relative Extinktion	Relative Extinktion
ALA-Konz. u. Inkubationszeit	(SD)	(SD)
50µg/ml über 4h	0,130 (0,039)	0,569 (0,019)
50µg/ml über 24h	0,076 (0,045)	0,941 (0,007)
100µg/ml über 4h	0,272 (0,062)	0,289 (0,097)
100µg/ml über 24h	0,510 (0,044)	0,090 (0,060)
200µg/ml über 4h	0,296 (0,059)	-
200µg/ml über 24h	0,527 (0,047)	-



Abb. 25: Gegenüberstellung von LDH- und WST-1-Test. Mittelwerte relativer Extinktionen (Ordinate) gemäß LDH- (rot) und WST-1-*Assay* (blau); Abszisse: verschiedene Konzentrationen (dimensionslos dargestellt, jedoch in  $\mu$ g/ml) und Inkubationszeiten (in Stunden, h) von 5-ALA; gleichfarbige Amplitudenpfeile; Trendlinien (schwarz).

Es ist zu betonen, dass bei den einzelnen Versuchen und vorgeschalteten Sondierungsversuchen der LDH-*Assay* auch unter der Kombination von höchsten ALA-Konzentrationen und 24-stündigen ALA-Inkubationszeiten keine relative Extinktion von mehr als 59% erreichte. Unter den gleichen Bedingungen befand sich die relative Extinktion im WST-1-*Assay* im einstelligen Prozentbereich, zeigte folglich eine deutlich höhere kolorimetrische Amplitude (s. Blockpfeile in Abb. 25).

### 3.2 Spektrometrie von PPIX-Verdünnungsreihen

Für die Wellenlängen  $\lambda$ = 406nm bzw. 620nm wurde bei allen Messungen stets die höchste Fluoreszenzintensität (in Willküreinheiten, a.u.) angezeigt, wenngleich mit einer 405nm-LED angeregt wurde und sich das stärkste PPIX-Fluoreszenzsignal bekanntermaßen bei 635nm befindet (s. Kapitel 2.2.2 und Kapitel 4.2). Die Ergebnisse (n=6) in Tabelle 4 zeigen in der Zusammenschau eine stetige, moderate Zunahme der Rotfluoreszenz bei Verdoppelung der PPIX-Konzentration. Diese

Korrelation ist jedoch nicht linear, wie auch Abb. 26 zeigt.

**Tabelle 4: Spektrometrische Ergebnisse der PPIX-Verdünnungsreihe.** Fett: PPIX-Konzentrationen in  $\mu$ g/ml; "Rot" bzw. "Blau": Mittlere Fluoreszenzintensitäten in 100a.u. bei  $\lambda$ =620nm bzw.  $\lambda$ =406nm; B/R: "Blau-Rot-Quotient" (s. Kapitel 2.2.2); Standardabweichungen sind eingeklammert.

	0	0,1563	0,3125	0,625	1,25	2,5	5	10	20
Dat	11,54	12,39	13,00	13,26	13,95	14,99	17,69	21,75	24,59
κοι	(0,77)	(0,53)	(0,92)	(0,67)	(0,90)	(1,18)	(1,13)	(3,32)	(4,05)
Dlau	615,2	607,2	572,9	523,1	438,9	281,7	192,1	203,6	222,5
ыau	(18,9)	(35,2)	(24,4)	(28,4)	(42,3)	(33,0)	(57,4)	(72,4)	(93,8)
D/D	53,31	49,01	44,07	39,45	31,46	18,79	10,86	9,36	9,05
D/K	(3,75)	(2,65)	(3,83)	(3,26)	(3,40)	(3,19)	(1,85)	(3,05)	(2,38)



Abb. 26: Spektrometrische Ergebnisse der PPIX-Verdünnungsreihe. Abszisse: Steigende PPIX-Konzentrationen (0,15625µg/ml; 0,3125µg/ml; 0,625µg/ml; 1,25µg/ml; 2,5µg/ml; 5µg/ml; 10µg/ml; 20µg/ml). Ordinate: Mittlere Signalintensitäten (in 100a.u.) über definierten Wellenlängen (rot:  $\lambda$ =620nm; blau:  $\lambda$ =406nm). Violett: "Blau-Rot-Quotient"; grau: Negativkontrollen ohne PPIX.

Auch konnte festgestellt werden, dass eine Zunahme der Rotfluoreszenz bei den PPIX-Verdünnungen bis einschließlich  $5\mu$ g/ml mit einer Abnahme der Signalintensität auf der blauen Exzitationswellenlänge einherging. Dies führte zum Abfallen des "Blau-Rot-Quotienten" (B/R), welches allerdings bei den drei höchsten PPIX-Konzentrationen stagnierte - mit steigender Rotlicht-Intensität nahm die Blaulicht-Intensität nicht mehr signifikant ab (s. Kapitel 4.2).

Bereits das Rotlicht-Signal bzw. der "Blau-Rot-Quotient" der geringsten PPIX-Konzentration von 0,15625 $\mu$ g/ml war höher bzw. geringer als die entsprechenden Werte der Negativkontrollen (p<0,025). Die Abnahme des Blaulicht-Signals war allerdings erst ab 0,3125 $\mu$ g PPIX/ml signifikant (p<0,005).

Tabelle 5 zeigt anhand spektrometrischer Graphen eines Versuches, dass das untersuchte PBS keine PPIX-Fluoreszenz zeigte, obwohl die Fluoreszenz kleinster PPIX-Konzentrationen spektrometrisch erfasst werden konnte. Oft war nach mehrfachem Ausspülen der Quarz-Küvette, während der sogenannten "Reinigungskontrollen" (s. Kapitel 2.2.2), ein – zumindest kaum sichtbarer – PPIX-Signalgipfel zu erkennen. Tabelle 5: Graphen zur PPIX-Fluoreszenz gemäß Spektrometrie. Die Skalierung der Graphen ist in den entsprechenden Spalten dargestellt.

	Spektrometrische Übersicht (x: <b>350-800nm</b> ; y: 0 <b>-70000a.u.</b> )	★ <u>Vergrößerter Ausschnitt</u> (x: <b>575-725nm</b> ; y: 0 <b>-2500a.u.</b> )		
<u>PBS</u> - Negativ- <b>Kontrolle</b>	*			
<u>0,15625µg</u> <b>РРІХ</b> /ml				
<u>2,5µg</u> <b>РРІХ</b> /ml				
<u>20μg</u> PPIX/ml				

In allen Versuchen zeigte sich auch bei den kleinsten gemessenen PPIX-Konzentrationen eine mit bloßem Auge sichtbare Fluoreszenz. Abb. 27 zeigt fotographische Aufnahmen, außerhalb der Versuchsreihe, die dies dokumentieren.



Abb. 27: Makroskopisch wahrnehmbare qualitativ konzentrationsabhängige PPIX-Fluoreszenz unter Blaulichtbestrahlung. Links: 0,15625µg PPIX/ml; rechts: 5µg PPIX/ml. Manuelle Spektrometrie in *Safe-Lock Tubes*.

### 3.3 Versuche in der Zusammenschau

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit ihren Fragestellungen werden in

Abb. 28 schematisch zusammengefasst.



Abb. 28: Alle Versuche im Flussdiagramm. Die wesentlichen Inhalte des Ergebnisteils sind fettgedruckt hervorgehoben.

# 4 Diskussion

### 4.1 Zur Quantifizierung der PDT-Effektivität

Die Versuchsmethodik wird hinsichtlich ihrer Spannungsfelder bezüglich Zellzahl, Umwelteinflüsse, Pipettier-Vorgang, Materialien und der Vergleichbarkeit mit einem *In-vivo*-Modell kritisch beleuchtet.

### 4.1.1 Versuchsdurchführung

#### 4.1.1.1 Zellzahlen

Die tatsächliche Zahl der Zellen in den unterschiedlichen *Wells* blieb zum Zeitpunkt der Versuchsauswertung unklar. Zum einen war dies bedingt durch das naturgemäß weniger präzise manuelle Verfahren bei der Zelldistribution (s. Kapitel 2.1.4). Schätzungen über die Zellzahl wurden, auf der anderen Seite, durch proliferationsbremsende Umweltfaktoren erschwert. Hierzu zählt die, wenn auch geringe, Reduktion der Proliferationsrate jener Meningeomzellen in eiweißreduziertem Nährmedium (DMEM) (s. Kapitel 2.1.2) [66]. Der abnehmende Platz für KT21-MG im zellulären *Monolayer* des *Well* hat sich mit zunehmender Versuchsdauer vermutlich ebenfalls bremsend auf Zellproliferation und -metabolismus ausgewirkt (s. Kapitel 4.1.2 und 4.1.3). Abb. 29 zeigt lichtmikroskopisch die das *Well* füllende Dichte von Kontroll-Zellen 66 Stunden nach Zelldistribution. Im Falle der 24stündigen ALA-Einwirkzeit inkubierten diese Zellen weitere 20 Stunden.



Abb. 29: Zelldichte im *Well* 66 Stunden nach Zelldistribution von 10<sup>4</sup> Zellen/Well. Lichtmikroskopie, 40fache Vergrößerung. Eingezeichneter Maßstab (roter Querbalken) beträgt 100µm. Der Boden des *Well* ist vollständig mit dem Zellrasen bedeckt. Herstellungsartefakte am Boden der Mikrotiterplatte sind rechts im Bild als vertikale Linien zu sehen.

Ein theoretisches Modell zu ungebremster Zellzahlentwicklung lässt sich aus den Versuchsergebnissen des WST-1-*Assay* ableiten (s. Abb. 30). Angesichts der Resultate zur Etablierung des LDH-Tests (s. Kapitel 4.1.3) und des lichtmikroskopisch dokumentieren Raummangels (s. Abb. 29) ist allerdings mit einer Deckelung der maximalen Zahl von KT21-MG im *Well* bei deutlich weniger als 10<sup>5</sup> Zellen zu rechnen.



Abb. 30: Theoretisches Modell ungebremster Entwicklung der Zellzahl im *Well* bei KT21-MG im Versuchsablauf verschiedener PDT-Szenarien. Zelluntergang gemäß den relativen Extinktionen im WST-1-*Assay*.

Für Zellen widrige und schwankende Umweltbedingungen, hinsichtlich Temperatur und Gas-Partialdrücken, bestanden zwischen dem "Waschen" und dem Ende der Laser-Bestrahlung. Im Inkubator betrug die Temperatur 37°C und der CO<sub>2</sub>-Anteil 5%. Während der Versuchsschritte außerhalb des Inkubators glichen sich die 96-*Well*-Platten rasch der Zimmerluft an. Durch Sauerstoffangebot, Glucose-Gehalt, Temperatur und pH-Wert wird nicht nur die Zellproliferation, sondern vermutlich auch die PDT selbst beeinflusst [71-74]. Manuelles Pipettieren vermag ebenfalls die Zellkultur zu beeinträchtigen. Abb. 31 zeigt den, wiederholt objektivierten, fokalen Schaden am zellulären *Monolayer*, der durch das "Waschen" verursacht wurde (s. Kapitel 2.2.1). An dieser Stelle war die Spitze der Pipette nahe am Boden des *Well* und konnte möglicherweise durch ihren Sog mehrere Zellen aus ihrem *Monolayer* lösen.



Abb. 31: Fokal lädiertes zelluläres *Monolayer* nach Pipettieren im *Well*. Läsionen sind mit Sternen markiert. Lichtmikroskopische Aufnahme, 40fache Vergrößerung. Eingezeichneter Maßstab (roter Querbalken) beträgt 100µm.

#### 4.1.1.2 Vergleichbarkeit mit einem In-vivo-Modell

Die Vergleichbarkeit unserer Versuche mit einem *In-vivo*-Modell soll, neben den o.g. Umweltfaktoren, auch hinsichtlich klinischer, pharmakologischer und neoplastischer Aspekte diskutiert werden.

Die Pharmakokinetik und -dynamik eines präoperativen oralen ALA-Bolus im menschlichen Körper lässt sich im *In-vitro*-Modell nicht imitieren. Im Gegensatz zu einer stetigen Elimination des Pharmakons *in vivo* ist man *in vitro* gezwungen, für die Dauer einer definierten Einwirkzeit, eine fixe ALA-Konzentration zu verwenden. Jene ALA-Konzentration ist als relativ feststehend zu betrachten, da sie nur durch den Metabolismus der Meningeomzellen, oder durch den fortschreitenden physikalisch-chemischen Verfall im Nährmedium abnehmen konnte [75]. Die menschliche Blut-Hirn-Schranke wurde in unseren Versuchen ebenfalls nicht imitiert. Sie kann die Aufnahme des lipophoben Moleküls 5-ALA begrenzen [76], wenngleich in Tumoren ihre Permeabilität typischerweise erhöht ist [77, 78]. Überdies konnte die der PPIX-Akkumulation möglicherweise abträgliche und variable Tumorperfusion *in vitro* nicht nachgeahmt werden [57, 79]. Auf die vermutlich niedrigeren Gewebekonzentrationen von 5-ALA bzw. PPIX *in vivo* wird bei der Diskussion der Versuche mit längerer ALA-Einwirkzeit weiter eingegangen (s. Kapitel 4.1.2).

Mit Blick auf einen Tumor, ist der Sonderstatus von Tumorzelllinien zu betonen. Häufig verfügt Hirntumorgewebe über eine zytologisch-histologische Vielfalt. Diese Pluralität, über die eine Tumorzelllinie nicht verfügt, ist mitunter Grund ungleicher PPIX-Akkumulation in der selben Neoplasie [25]. Außerdem ist hervorzuheben, dass ein zelluläres *Monolayer* in seiner Zweidimensionalität der dreidimensionalen Tumormasse *in vivo* nicht gerecht wird [80]. Einerseits erhöhen die vielen Zell-Zell-Kontakte des dreidimensionalen Tumors vermutlich dessen Porphyrin-Metabolismus [81]. Andererseits lassen einschichtig gewachsene Tumorzellen den Laser im Rahmen der PDT weit umfassender durchdringen. *In vivo* erreicht Laserlicht von 630nm Wellenlänge eine Reichweite von wenigen Millimetern, bevor seine Intensität auf etwa 37% fällt [82]. Dem wurde in der hiesigen Arbeit dadurch Rechnung getragen, dass - im Verhältnis zur klinischen PDT - die angewandte Laserenergie, mit 15,6J/cm<sup>2</sup> und einem Fluss von 25mW/cm<sup>2</sup> niedriger angesetzt wurde (s. Kapitel 2.2.1) [83, 84].

#### 4.1.2 PDT-Verstärkung bei längerer ALA-Inkubation

Die von der 5-ALA-Konzentration abhängige Beeinflussung der PDT-Effektivität durch Inkubationszeitverlängerung (s. Kapitel 3.1.1) lässt sich mit dem Verhalten der Häm-Biosynthese und den zellulären Transportvorgängen und Zerfallsprozessen der Porphyrin-Metaboliten erklären.

Bekanntermaßen wird durch die exogene Zufuhr von 5-ALA die Schrittmacherreaktion der 5-ALA-Synthase umgangen. Dadurch wird die vermutlich nächst langsamere Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) zum Schrittmacherenzym [49, 50] (s. Kapitel 1.2.1). In der Häm-Biosynthese formen sich zwei Moleküle 5-ALA zu Porphobilinogen. Experimentelle 5-ALA-Konzentrationen von 100µg/ml entsprechen 763µM 5-ALA und resultieren somit theoretisch in 381,5µM Porphobilinogen (PBG). Für die PBGD menschlicher Erythrozyten wurde eine Michaelis-Konstante (Km) von 6,2µM bei pH 8,2 beschrieben (s. Abb. 32) [85]. Andererseits wurde an einer humanen Kolonkarzinom-Zelllinie und an Kleinhirngewebe der Ratte eine Kinetik der PPIX-Synthese demonstriert, die ihr Plateau teilweise erst nach vierstündiger Inkubationszeit von 5-ALA-Konzentrationen von 1,0mM bis 1,5mM erreichte [86, 87] (s. Abb. 33). Es sei zunächst angenommen, dass die PBGD der verwendeten Meningeomzellen einer ähnlichen Enzymkinetik wie in menschlichen Erythrozyten unterliegt. Demnach wäre in vitro mit einer nahezu maximalen PBGD-Reaktionsgeschwindigkeit zu rechnen.



Abb. 32: Michaelis-Kinetik der PBGD in menschlichen Erythrozyten. Modifiziert nach [85].



Abb. 33: PPIX-Synthese nach vierstündiger Einwirkzeit von 5-ALA unterschiedlicher Konzentrationen am Beispiel der Kolon-Karzinom-Zelllinie WiDr. Modifiziert nach [85].

Selbst bei experimentell niedrigeren Konzentrationen von 5-ALA, liefe die PPIX-Synthese zunächst mit sehr hoher Geschwindigkeit. Erst mit zunehmendem Substratverbrauch würde sie allmählich gebremst werden. Logischerweise tritt ein Substratverbrauch bei geringeren ALA-Konzentrationen früher als bei höheren Konzentrationen auf. Die folglich für die submaximale PBGD-Reaktionsgeschwindigkeit relativ unerheblichen ALA-Konzentrationsunterschiede zwischen 100 bzw. 200µg/ml könnten somit deren nicht signifikanten Unterschied der Zytoletalität erklären (s. Kapitel 3.1.1).

Unter der Annahme einer Plateaubildung der PPIX-Synthese bei noch höheren ALA-Konzentrationen ist nicht der Substratverbrauch als entschleunigend anzusehen, sondern vielmehr die nicht die Reaktionswege sättigenden ALA-Konzentrationen (s. Abb. 33). Dadurch würde sich ebenfalls die Zunahme der PDT-Effektivität bei möglichst hohen ALA-Konzentrationen erklären. Die Grenzkonzentration zur Sättigung liege dabei, angesichts der im LDH-Test geringen Differenzen zwischen 100µg A-LA/ml und 200µg ALA/ml, vermutlich niedriger.

Die sehr hohe ALA-Konzentration von 200µg/ml wurde mittels WST-1-Test nicht untersucht. Im WST-1-*Assay* zeigte sich nämlich in vorläufigen Versuchen eine paradoxe Zunahme der Kolorimetrie bei dieser Konzentration. Ein ähnliches Phänomen unter hohen Dosierungen des zytotoxischen Chloroquin wurde bereits in der Vergangenheit als Messartefakt des mit dem WST-1-Test stark verwandten MTT-Tests eingeschätzt ohne dabei eine Ursache gefunden zu haben [63].

Export und physikalisch-chemischer Zerfall von Häm-Metaboliten mindert die zelluläre Akkumulation von Porphyrinen [13, 17, 75]. Modellhaft unterstellt Abb. 34 in der Summe ein Überwiegen hebender bzw. senkender Einflüsse auf die intrazelluläre PPIX-Konzentration. Dabei wird von einem dynamischen Ungleichgewicht der gleichzeitig auftretenden, oben genannten, Faktoren ausgegangen.



Abb. 34: Theoretisches Modell zum Einfluss der Inkubationsdauer auf die PPIX-Konzentration bei unterschiedlichen ALA-Konzentrationen. Ordinate: Intrazelluläre PPIX-Konzentration in Abhängigkeit von der pipettierten 5-ALA-Gabe. Blitz-Symbole: Zeitpunkte der PDT, vier bzw. 24 Stunden nach Zusatz von 5-ALA.

Ob die *in vitro* nachgewiesene Erhöhung der PDT-Effektivität so auch *in vivo* in Meningeomgewebe zu erreichen ist, hängt vom Zusammenspiel komplexer pharmakologischer Prozesse ab. Das genaue Wirken dieser Faktoren ist in künftigen Studien weiter zu untersuchen. Hierbei wird man auf einige klinische Daten, die bereits im Zusammenhang mit der sicheren Anwendung der klinischen PDT an Gliomen gesammelt wurden, zurückgreifen können [30, 88, 89]. Zur Maximierung zerebraler PPIX-Konzentrationen ist, neben der Erhöhung der Dosis von 5-ALA, die Rolle alternativer *Photosensitizer* zu eruieren. Beispielsweise wurde die Bedeutung der Lipophilität von Estern, wie beispielsweise Hexyl-ALA, zur Überwindung von Zellmembranen mit folglich gesteigerter zerebraler PPIX-Synthese herausgestellt [90-92]. Die neurochirurgisch übliche Dosierung von 20mg ALA/kg KG hat ein bekanntermaßen geringes Aufkommen unerwünschter Arzneimittelwirkungen [89]. Der potenziellen Phototoxizität von ALA kann, durch Vermeidung einer direkten Sonnenlichtexposition in den ersten 24 bis 48 Stunden nach Verabreichung, effektiv begegnet werden [93]. Um ein Mehrfaches höhere gewichtsadaptierte Dosen von ALA fanden in anderen Disziplinen der PDT, mit insgesamt günstigem Nebenwirkungsprofil, Verwendung [55]. Als gelegentliche bis häufige Nebenwirkungen wurden dabei Übelkeit, Erbrechen, mäßiger Blutdruckabfall und klinisch inapparente, reversible Hepatotoxizität beschrieben [55, 94, 95]. Neurotoxizität konnte nur bei Patienten mit bekannter akuter intermittierender Porphyrie objektiviert werden [96]. Auch mögliche lokale Nebenwirkungen sind zu berücksichtigen. So wird nahegelegt, dass mit steigender Gewebekonzentration von PPIX die PDT-induzierte Zytotoxizität an gesunden Neuronen steigen könnte [56, 95, 97].

Dennoch ermutigt das insgesamt günstige Nebenwirkungsprofil größerer ALA-Dosierungen zum Test höherkonzentrierter präoperativer ALA-Boli in neurochirurgischen Studien.

#### 4.1.3 Etablierung des LDH-Tests

Der LDH-Test zeigte im Vergleich zum WST-1-Test geringere Amplitudenveränderungen nach PDT (s. Kapitel 3.1.4, Abb. 25). Für allgemeine Aussagen zum PDTinduzierten Schaden war der LDH-Test also weniger sensitiv als der WST-1-*Assay*. Ein möglicher Schluss ist, dass in unseren Versuchen die PDT der allgemeinen Zellvitalität stärker als der Zellmembran schadete (s. Kapitel 1.3).

Es konnte für den LDH-Test ein konzeptioneller Fehler objektiviert werden. So ergab sich beim Versuchsaufbau bei vierstündiger ALA-Inkubationszeit eine Extinktionsdifferenz zwischen den zum PDT-Zeitpunkt und den erst am Versuchsende lysierten Zellen des *High Control* (s. Kapitel 3.1.3, Abb. 23). Dies lässt sich mit der verbleibenden räumlichen und zeitlichen Kapazität zur Zellproliferation erklären [66]. Mit dem Proliferationsverhalten ist ebenfalls die kolorimetrische Sättigungstendenz erklärt. Bei höheren Zellzahlen schwächte sich der lineare Zusammenhang zur Optischen Dichte zunehmend ab (vgl. Kapitel 3.1.3, Abb. 20). Eine weitere Sättigungserscheinung wird im folgenden Kapitel diskutiert.

#### 4.1.4 Vergleich zwischen WST-1- und LDH-Test

Nachdem in Kapitel 4.1.3 das Verhalten des LDH-Tests in unseren Versuchen diskutiert wurde, sollen nun Unterschiede und Gemeinsamkeiten mit dem WST-1-*Assay* analysiert werden.

In der Ergebnisauswertung wurde festgestellt, dass der LDH-*Assay* unter definierten Voraussetzungen der PDT eine Zytoletalität von durchschnittlich 51% auswies. Der WST-1-Test belegte jedoch nach PDT unter den gleichen Bedingungen eine verbleibende Zytovitalität von 6,6% (s. Kapitel 3.1.4). Dies gibt Grund zur Annahme, dass der WST-1-Assay den PDT-Erfolg in unseren Versuchen sensitiver nachgewiesen hat. Analog zum LDH-Test zeigte auch der WST-*Assay*, wenn auch in geringerer Ausprägung, eine mit längerer Ruhezeit nach PDT verstärkte Abnahme der Zytovita-lität (s. Kapitel 3.1.4).

Da der WST-1-*Assay,* als indirekter PDT-Effektivitätsnachweis, Auskunft über die verbliebene Zellvitalität gibt (s. Kapitel 1.3), scheint diese stärker durch die PDT betroffen zu sein als die Zellmembranintegrität, die eher mit dem LDH-Test geprüft wird.

Messartefakte ließen sich in der Anwendung beider *Assays* ausmachen. Im WST-1-*Assay* war es vermutlich ein paradoxes, dem Test innewohnendes, Messartefakt (s. Kapitel 4.1.2). Das Artefakt des LDH-Tests erwuchs aus dem Versuchskonzept (s. Kapitel 4.1.3). Ein gemeinsames Artefakt, in der Anwendung beider kolorimetrischer Tests, war die nicht lineare Zunahme des Farbumsatzes im Zeitverlauf (s. Abb. 35). Dieser Umstand mündete, mit zunehmend maximaler Extinktion von *Standard* (im WST-1-Test) bzw. *High Control* (im LDH-*Assay*), in einer artifiziellen Erhöhung der relativen Extinktionen in den geringer extingierenden *Wells*. Daher wurde stets angestrebt die experimentellen Daten dann zu erheben, wenn die Extinktion des *Standard* bzw. *High Control* bei einem absoluten Zahlenwert von 1,0 bis 1,8 lag. In diesem Sinne wurde grundsätzlich die kolorimetrische Ablesung nach fünf Minuten durchgeführt. Der dargestellte Fehler wurde dadurch stark limitiert. Diese zeitliche Standardisierung erlaubte auch den Verzicht auf die reaktionsbeendende *Stop Solution* des LDH-*Assay* (s. Kapitel 2.2.1.2).



**Abb. 35: Sättigung der Zunahme der Optischen Dichte im Zeitverlauf.** Extinktion in einem LDH-Test (Ordinate) zu verschiedenen Ablesezeitpunkten (Abszisse), am Beispiel eines, 36 Stunden nach Aussäen von 10<sup>4</sup> Zellen, lysierten *High Control* (blaue Kurve). Fiktive Extinktionsentwicklung des *High Control* ohne Sättigungsverhalten (schwarze Gerade) und beispielhafte Extinktionen von *Wells* des "Bestrahlungsblockes" (rote Rauten), mit den dazugehörigen relativen Extinktionen, sind eingezeichnet (Fiktives Soll: schwarze Prozentangaben; Ist: blaue Prozentangaben).

Tabelle 6 zeigt gegenüberstellend die wichtigsten Merkmale beider Tests bei Anwendung in unserem Modell.

	WST-1-Assay	LDH-Assay		
Konzept	Indirekter Zelltodnachweis durch Erfassung von Schäden an Zellorganellen; theoretisch be- sonders geeignet zum Apoptose- Nachweis [69]	Direkter Zelltodnachweis durch Erfassung von Zellmembranper- meabilität; theoretisch besonders geeignet zum Nekrose-Nachweis [63]		
Sensitivität	Hoch, bei fortgeschrittenem Zelltod im hiesigen PDT-Modell	Mäßig, bei fortgeschrittenem Zell- tod im hiesigen PDT-Modell		
Nachteile	Am ehesten technisches Messar- tefakt nach Verwendung sehr hoher ALA-Konzentrationen	Konzeptionelles Messartefakt (s. Kapitel 3.1.3); aufwendigere Durchführung, notwendiger Ver- zicht auf <i>Stop Solution</i> (s. Kapitel 2.2.1.2)		

Tabelle 6: Reflektierende Gegenüberstellung vom LDH- und WST-1-Test.

#### 4.1.5 PDT-Verstärkung durch Ciprofloxacin

Wie in anderen wissenschaftlichen Arbeiten, zeigte sich in unseren Versuchen eine Verstärkung der PDT-Effektivität durch den Eisen-Chelator Ciprofloxacin [58, 59], der in dieser Funktion die Akkumulation von PPIX fördert (s. Kapitel 1.2.3). Die Kombination von Ciprofloxacin mit ALA war singulärem ALA in Konzentration von 50µg/ml und 100µg/ml hinsichtlich der PDT-Effektivität deutlich überlegen (s. Kapitel 3.1.2, Abb. 18).

Überdies legen die Ergebnisse nahe, dass insbesondere im Bereich zwischen 25µg/ml bis 50µg/ml schon kleinere Erhöhungen der mit Ciprofloxacin kombinierten 5-ALA-Konzentration eine weit überproportionale Steigerung der PDT-Effektivität bewirkten. So führten 50µg 5-ALA/ml statt 25µg 5-ALA/ml in Kombination mit Ciprofloxacin zu einem drastischen Rückgang der relativen Tumorzellvitalität: im Mittel von 66,5% auf 3,7%. Bei 100µg 5-ALA/ml wurde die Zytovitalität gar auf 0.9% gesenkt.

In der Auswertung der Negativkontrollen gemäß Protokoll der Ciprofloxacin-Versuche war die signifikant verminderte Extinktion, unter ausschließlicher Einwirkung von 50µg ALA/ml, auffällig. Dies wurde in keiner anderen ALA-Negativkontrolle festgestellt (s. Kapitel 3.1.1). Als ursächlich für dieses alleinstehende Ergebnis werden praktische Fehler in der Versuchsdurchführung der Negativkontrollen angesehen. Aus der Literatur ist zwar bekannt, dass 5-ALA in höheren Dosen über Zytotoxizität verfügt [58, 98-101], allerdings zeigt ALA bei Konzentrationen von bis zu 1mM keine kolorimetrisch fassbare Minderung der Zellvitalität [59]. Eine solche war auch in keinem weiteren Versuchsprotokoll dieser Arbeit detektiert worden.

Bei Überlegungen zur Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse auf ein *In-vivo*-Modell bzw. in die Klinik seien, neben der allgemeinen Methodenkritik (Kapitel 4.1), pharmakologische Aspekte von Ciprofloxacin hervorgehoben.



Abb. 36: PPIX-Synthese in Abhängigkeit der Koinkubation von ALA und Fluorochinolonen. 16stündige Koinkubation von 1mM ALA mit verschiedenen Fluorochinolon-Konzentrationen. Modifiziert nach [59].

Ohgari et al. dokumentierten in Ihren Untersuchungen ein Plateau der maximalen PPIX-Synthese unter 50-100µM Ciprofloxacin, das mit ALA koinkubierte. Höhere Ciprofloxacin-Konzentrationen vermochten aufgrund ihrer Zytotoxizität [59], die Bildung von PPIX nicht zu steigern (s. Abb. 36). Analog wurden 25µg Ciprofloxacinhydrochlorid/ml, entsprechend 68µM Ciprofloxacinhydrochlorid, in der hiesigen Arbeit verwendet. Gleichzeitig liegt diese Konzentration unter dem Serumgipfelspiegel von 43µg Ciprofloxacin/ml, der nach einer zweiwöchigen Hochdosis-Therapie bei einem Menschen beschrieben wurde [102]. In klinisch üblicher Dosierung bleibt jedoch, auch nach repetitiven und intravenösen Dosen, die maximale Serumkonzentration von Ciprofloxacin in µg/ml im niedrigen bis mittleren einstelligen Bereich [103-106]. Da allerdings die Hirngewebskonzentration von Ciprofloxacin seinen Serumspiegel zu übertreffen vermag [107], Hirntumore eine Störung der Blut-Hirn-Schranke aufweisen, auch kleinere Ciprofloxacin-Konzentrationen bei ausreichender ALA-Konzentration für eine erhebliche PPIX-Synthesesteigerung reichen [59] (s. Kapitel 4.1.2), Retardpräparate des Fluorochinolons eine für die Photodynamik günstigere Pharmakokinetik bergen [108] und ein präoperativ hochdosiertes Ciprofloxacin-Regime in der zu erprobenden Ciprofloxacin-gestützten ALA-PDT/PDD vertretbar erscheint [102], ist eine zufriedenstellende Übertragbarkeit auf ein In-vivo-Modell zu erwarten.

#### 4.2 Spektrometrie von PPIX-Verdünnungsreihen

In Teil-Analogie der, für die hiesige Etablierung des *Settings* maßgeblichen, Publikation von *Kim et al.* gelang eine Bestimmung des spektrometrisch erfassten Signals in willkürlichen Einheiten (*arbitrary units*, a.u.) [38]. Dies ermöglichte eine relative Fluoreszenz-Quantifizierung. An optisch streuenden Lipid-Oberflächen mit gleicher PPIX-Konzentration, sogenannten "Phantomen", zeigte sich in den Untersuchungen von *Kim et al.* eine Schwankungsbreite um mehr als das Vierfache. Im Gegensatz dazu wird die geringere Standardabweichung der hier dargestellten Versuche auf die hiesigen Maßnahmen zur mechanischen Fixierung der Sonde, auf die Mittelung aus je 100 Einzelmessungen pro Messvorgang und auf das Nicht-Abschalten des Systems zwischen den Messungen zurückgeführt. Die in Kapitel 3.2 dargestellten, dennoch recht großen Standardabweichungen, resultieren wahrscheinlich aus dem Abschalten des Systems zwischen den einzelnen Versuchstagen und ebenfalls dem manuellen Ansetzen neuer PPIX-Konzentrationen am jeweiligen Versuchstag, mit den einschlägigen Ungenauigkeiten.

Ziel war es ebenfalls über einen zusätzlichen Parameter zur relativen Aussagekraft der Signalintensitäten zu verfügen. Dafür verwendeten wir den Blau-Rot-Quotienten (B/Q) [37], berechnet aus den Signalgipfeln in a.u. bei 406nm und 620nm (s. Kapitel 3.2). Die Standardabweichungen des B/Q zeigten bei allen PPIX-Konzentrationen eine ähnliche Größenordnung – anders als bei der Gesamtbetrachtung isolierter Signalintensitäten bei 406nm bzw. 620nm. Folglich vermochte die definierte Blaulicht-Intensität die, durch die System-Kalibrierung beim Neustart entstandenen Änderungen des Rotlichtsignals, zu relativieren (vgl. Kapitel 2.2.2).

Im Gegensatz zu *Kim et al.* wurden in den hiesigen Messungen auch PPIX-Konzentrationen von  $10\mu$ g/ml und  $20\mu$ g/ml untersucht. Bei deren Auswertung fiel auf, dass bei steigender Rotfluoreszenz der Blaulicht-Gipfel nicht mehr abfiel, sondern stagnierte (s. Kapitel 3.2, Abb. 26). Möglicherweise ist dies mit der Verdichtung des gelösten PPIX in Lösung zu erklären, welches das Anregungslicht nicht nur weiter zu absorbieren, sondern zunehmend zu reflektieren vermochte.

Die Kontrolle des Isopropanol-Reinigungserfolges der fiberoptischen Sondenspitze nach Abschluss der Messreihe erwies sich als notwendig und offenbarte nicht nur die hohe Sensitivität des Verfahrens, sondern auch eine stetige methodische Herausforderung: Die Hartnäckigkeit von gelöstem PPIX, insbesondere in einer Konzentration von 20µg/ml, zwang zu mehrfacher gründlicher Reinigung an den Oberflächen von Sonde und Quarz-Küvette, bevor ein Signalgipfel bei 620nm nach Anregung mit Blaulicht spektrometrisch nicht mehr erfassbar war.

### 4.3 Zukunftsperspektiven

Die Effektivitätssteigerung der Photodynamik durch Ciprofloxacin und möglichst hohe ALA-Konzentrationen wurde in dieser Arbeit an Meningeomzellen demonstriert. Durch die nun mehrjährige klinische Erfahrung mit ALA und die breite medizinische Anwendung von Ciprofloxacin erscheinen beide Substanzen als tauglich für künftige Phase-II-Studien an Meningeom-Patienten [8]. Dabei könnte in den Interventionsarmen einer Studie die für Gliome etablierte Photodynamik verglichen werden mit dem photodynamischen Effekt nach präoperativem Hochdosis-ALA-Bolus bzw. nach Ciprofloxacin-Behandlung; ein weiterer Studienarm, der beide Pharmaka kombiniert, erscheint ebenfalls sinnvoll. Gemäß dem aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstand ergeben sich somit Perspektiven die Prognose von Hirntumorpatienten mit den Möglichkeiten der PDD und PDT weiter zu verbessern.

## 5 Schlussfolgerungen

### 5.1 Zur Effektivitätssteigerung der PDT

Die Effektivität der PDT ließ sich in unserem Versuchsaufbau mit einer immortalisierten Zelllinie eines humanen anaplastischen Meningeoms verändern. Experimentell modulierte Einflussgrößen waren dabei die Konzentration von 5-ALA, die Einwirkzeit von 5-ALA vor PDT und die simultane Inkubation mit Ciprofloxacin. Eine höchst signifikante PDT-Verstärkung ließ sich durch eine um 20 Stunden verlängerte 5-ALA-Inkubationszeit bzw. unter Einfluss von Ciprofloxacin bei ALA-Konzentrationen ab 100µg/ml bzw. 50µg/ml nachweisen. Eine höhere Inkubationsdauer vermochte jedoch auch den PDT-Effekt bei niedrigen ALA-Konzentrationen (50µg/ml) zu reduzieren. Der Nachweis der PDT-Effektivität gelang über Nachweisverfahren von Zytoletalität (LDH-*Assay*) bzw. Zytovitalität (WST-1-*Assay*). Der WST-1-Test erwies sich in unserem Versuchsprotokoll als sensitiver.

Die grundsätzlichen Erkenntnisse dieser *In-vitro*-Arbeit sind, mit Einschränkungen, auf ein *In-vivo*-Modell übertragbar. Zukünftige Tumorforschung möge zeigen, welchen tatsächlichen Einfluss insbesondere die genannten pharmakologischen Herausforderungen *in vivo* haben.

### 5.2 Zur Etablierung fiberoptischer Spektrometrie

Unsere Versuche haben gezeigt, dass eine gute Einordnung relativer PPIX-Fluoreszenz mit hoher Sensitivität mittels willkürlicher Software-Maßeinheiten *in vitro* möglich ist. Die zusätzliche Berechnung eines "Blau-Rot-Quotienten" erschien hilfreich. Insgesamt ist auf standardisierte Bedingungen und die hartnäckige Materialhaftung von PPIX, gerade in seinen höheren Konzentrationen, zu achten. Die fiberoptische Spektrometrie birgt ein großes Potenzial zur Objektivierung von Tumorfluoreszenz im Rahmen der PDD. Eine Reifung dieser Methode, nach den Maßgaben weiterer Studien, verspricht eine Bereicherung der Tumorbehandlung.
## 6 Verzeichnisse

#### 6.1 Literaturverzeichnis

- Raab, O., Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. Z. Biol., 1900. 39: p. 524–546.
- 2. Juzeniene, A., Q. Peng, and J. Moan, *Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis.* Photochem Photobiol Sci, 2007. **6**(12): p. 1234-45.
- 3. Meyer-Betz, F., Untersuchung über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hamatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs. Dtsch. Arch.Klin.Med., 1913. **112**: p. 476–503.
- 4. Figge, F.H., G.S. Weiland, and L.O. Manganiello, *Cancer* detection and therapy; affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. Proc Soc Exp Biol Med, 1948. **68**(3): p. 640.
- 5. Berlin, N.I., A. Neuberger, and J.J. Scott, *The metabolism of delta -aminolaevulic acid. 2. Normal pathways, studied with the aid of 14C.* Biochem J, 1956. **64**(1): p. 90-100.
- 6. Malik, Z. and H. Lugaci, *Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins*. British Journal of Cancer, 1987. **56**(5): p. 589-595.
- 7. Kennedy, J.C., R.H. Pottier, and D.C. Pross, *Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience.* J Photochem Photobiol B, 1990. **6**(1-2): p. 143-8.
- 8. Stummer, W., et al., *Fluorescence-guided surgery with 5aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial.* Lancet Oncol, 2006. 7(5): p. 392-401.
- 9. Perria, C., et al., *Fast attempts at the photodynamic treatment of human gliomas*. J Neurosurg Sci, 1980. **24**(3-4): p. 119-29.

- 10. Eljamel, M.S., Brain photodiagnosis (PD), fluorescence guided resection (FGR) and photodynamic therapy (PDT): past, present and future. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2008. 5(1): p. 29-35.
- 11. Ishikawa, T., et al., *Transporter-Mediated Drug Interaction* Strategy for 5-Aminolevulinic Acid (ALA)-Based Photodynamic Diagnosis of Malignant Brain Tumor: Molecular Design of ABCG2 Inhibitors. Pharmaceutics, 2011. **3**(3): p. 615-35.
- 12. Kemmner, W., et al., Silencing of human ferrochelatase causes abundant protoporphyrin-IX accumulation in colon cancer. FASEB J, 2008. 22(2): p. 500-9.
- 13. Robey, R.W., et al., *ABCG2-mediated transport of photosensitizers: potential impact on photodynamic therapy.* Cancer Biol Ther, 2005. **4**(2): p. 187-94.
- 14. Takahashi, K., et al., *Enhanced expression of coproporphyrinogen* oxidase in malignant brain tumors: CPOX expression and 5-ALA-induced fluorescence. Neuro Oncol, 2011. **13**(11): p. 1234-43.
- 15. Teng, L., et al., Silencing of ferrochelatase enhances 5aminolevulinic acid-based fluorescence and photodynamic therapy efficacy. Br J Cancer, 2011. **104**(5): p. 798-807.
- 16. van den Boogert, J., et al., 5-Aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in tissues: pharmacokinetics after oral or intravenous administration. J Photochem Photobiol B, 1998. 44(1): p. 29-38.
- Zimmermann, M. and A.C. Stan, PepT2 transporter protein expression in human neoplastic glial cells and mediation of fluorescently tagged dipeptide derivative beta-Ala-Lys-Nepsilon-7-amino-4-methyl-coumarin-3-acetic acid accumulation. J Neurosurg, 2010. 112(5): p. 1005-14.
- 18. Foote, C.S., Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. Science, 1968. **162**(3857): p. 963-70.
- 19. Canti, G., A. De Simone, and M. Korbelik, *Photodynamic therapy* and the immune system in experimental oncology. Photochem Photobiol Sci, 2002. 1(1): p. 79-80.

- 20. Oleinick, N.L., R.L. Morris, and I. Belichenko, *The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how.* Photochem Photobiol Sci, 2002. **1**(1): p. 1-21.
- 21. Fingar, V.H., Vascular effects of photodynamic therapy. J Clin Laser Med Surg, 1996. 14(5): p. 323-8.
- 22. Kessel, D., M.G. Vicente, and J.J. Reiners, Jr., *Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy*. Autophagy, 2006. **2**(4): p. 289-90.
- 23. Wallner, K.E., et al., *Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1989. **16**(6): p. 1405-9.
- 24. Stummer, W., et al., *Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients.* J Neurosurg, 2000. **93**(6): p. 1003-13.
- 25. Hefti, M., et al., 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX fluorescence in high-grade glioma surgery: a one-year experience at a single institutuion. Swiss Med Wkly, 2008. **138**(11-12): p. 180-5.
- 26. Paulus, W. and J. Peiffer, *Intratumoral histologic heterogeneity of gliomas*. *A quantitative study*. Cancer, 1989. **64**(2): p. 442-7.
- 27. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
- 28. Kamp, M.A., et al., 5-aminolevulinic acid (5-ALA)-induced fluorescence in intracerebral metastases: a retrospective study. Acta Neurochir (Wien), 2012. **154**(2): p. 223-8; discussion 228.
- 29. Coluccia, D., et al., *Intraoperative 5-aminolevulinic-acid-induced fluorescence in meningiomas*. Acta Neurochir (Wien), 2010. **152**(10): p. 1711-9.
- 30. Johansson, A., et al., 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels in tissue of human malignant brain tumors. Photochem Photobiol, 2010. **86**(6): p. 1373-8.
- 31. Kajimoto, Y., et al., *Use of 5-aminolevulinic acid in fluorescenceguided resection of meningioma with high risk of recurrence. Case report.* J Neurosurg, 2007. **106**(6): p. 1070-4.
- 32. Cornelius, J.F., et al., Impact of 5-Aminolevulinic Acid Fluorescence-guided Surgery on the Extent of Resection of

*Meningiomas-with Special Regard to High-grade Tumors.* Photodiagnosis Photodyn Ther, 2014.

- Widhalm, G., et al., 5-Aminolevulinic acid is a promising marker for detection of anaplastic foci in diffusely infiltrating gliomas with nonsignificant contrast enhancement. Cancer, 2010. 116(6): p. 1545-52.
- 34. Rebeiz, N., et al., *Photodestruction of tumor cells by induction of endogenous accumulation of protoporphyrin IX: enhancement by 1,10-phenanthroline.* Photochem Photobiol, 1992. **55**(3): p. 431-5.
- Utsuki, S., et al., Fluorescence-guided resection of metastatic brain tumors using a 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX: pathological study. Brain Tumor Pathol, 2007.
  24(2): p. 53-5.
- 36. Sanai, N., et al., Intraoperative confocal microscopy in the visualization of 5-aminolevulinic acid fluorescence in low-grade gliomas. J Neurosurg, 2011. **115**(4): p. 740-8.
- Ishihara, R., et al., Quantitative spectroscopic analysis of 5aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence intensity in diffusely infiltrating astrocytomas. Neurol Med Chir (Tokyo), 2007. 47(2): p. 53-7; discussion 57.
- 38. Kim, A., et al., *Quantification of in vivo fluorescence decoupled* from the effects of tissue optical properties using fiber-optic spectroscopy measurements. J Biomed Opt, 2010. **15**(6): p. 067006.
- 39. Krampla, W., et al., *Frequency and risk factors for meningioma in clinically healthy 75-year-old patients: results of the Transdanube Ageing Study (VITA).* Cancer, 2004. **100**(6): p. 1208-12.
- 40. Vernooij, M.W., et al., *Incidental findings on brain MRI in the general population*. N Engl J Med, 2007. **357**(18): p. 1821-8.
- 41. Wiemels, J., M. Wrensch, and E.B. Claus, *Epidemiology and etiology of meningioma*. J Neurooncol, 2010. **99**(3): p. 307-14.
- 42. Riemenschneider, M.J., A. Perry, and G. Reifenberger, *Histological classification and molecular genetics of meningiomas.* Lancet Neurol, 2006. **5**(12): p. 1045-54.
- 43. Yang, S.Y., et al., *Atypical and anaplastic meningiomas:* prognostic implications of clinicopathological features. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2008. **79**(5): p. 574-80.

- 44. Muller, P.J. and B.C. Wilson, *Photodynamic therapy of brain tumors--a work in progress*. Lasers Surg Med, 2006. **38**(5): p. 384-9.
- 45. Tsai, J.C., et al., Comparative study on the ALA photodynamic effects of human glioma and meningioma cells. Lasers Surg Med, 1999. 24(4): p. 296-305.
- 46. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system.* Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
- 47. Marks, P.V., C. Furneaux, and R. Shivvakumar, *An in vitro study* of the effect of photodynamic therapy on human meningiomas. British journal of neurosurgery, 1992. **6**(4): p. 327-332.
- 48. Popovic, E.A., A.H. Kaye, and J.S. Hill, *Photodynamic therapy of brain tumors*. Semin Surg Oncol, 1995. **11**(5): p. 335-45.
- 49. Peng, Q., et al., 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. Photochem Photobiol, 1997. 65(2): p. 235-51.
- 50. Shedlofsky, S.I., et al., *Haem synthesis from exogenous 5aminolaevulinate in cultured chick-embryo hepatocytes. Effects of inducers of cytochromes P-450.* Biochem J, 1987. **248**(1): p. 229-36.
- 51. Ishikawa, T., et al., *Key Role of Human ABC Transporter ABCG2 in Photodynamic Therapy and Photodynamic Diagnosis.* Adv Pharmacol Sci, 2010. **2010**: p. 587306.
- 52. Stummer, W., et al., *Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias.* Neurosurgery, 2008. **62**(3): p. 564-76; discussion 564-76.
- 53. Iinuma, S., et al., A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. Br J Cancer, 1994. **70**(1): p. 21-8.
- 54. Loh, C.S., et al., Oral versus intravenous administration of 5aminolaevulinic acid for photodynamic therapy. Br J Cancer, 1993. **68**(1): p. 41-51.
- 55. Regula, J., et al., *Photosensitisation and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal, and colorectal tumours using 5 aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX--a pilot study.* Gut, 1995. **36**(1): p. 67-75.

- 56. Webber, J., D. Kessel, and D. Fromm, *Plasma levels of* protoporphyrin IX in humans after oral administration of 5-aminolevulinic acid. J Photochem Photobiol B, 1997. **37**(1-2): p. 151-3.
- Hanania, J. and Z. Malik, The effect of EDTA and serum on endogenous porphyrin accumulation and photodynamic sensitization of human K562 leukemic cells. Cancer Lett, 1992. 65(2): p. 127-31.
- Ortel, B., A. Tanew, and H. Honigsmann, Lethal photosensitization by endogenous porphyrins of PAM cells--modification by desferrioxamine. J Photochem Photobiol B, 1993. 17(3): p. 273-8.
- 59. Ohgari, Y., et al., *Quinolone compounds enhance deltaaminolevulinic acid-induced accumulation of protoporphyrin IX and photosensitivity of tumour cells.* J Biochem, 2011. **149**(2): p. 153-60.
- 60. Robson, R.A., *Quinolone pharmacokinetics*. Int J Antimicrob Agents, 1992. **2**(1): p. 3-10.
- 61. Berridge, M.V. and A.S. Tan, Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Arch Biochem Biophys, 1993. **303**(2): p. 474-82.
- 62. Subhash, M.N., B.S. Rao, and S.K. Shankar, *Changes in lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in patients with tumors of the central nervous system.* Neurochem Int, 1993. **22**(2): p. 121-4.
- 63. Weyermann, J., D. Lochmann, and A. Zimmer, *A practical note on the use of cytotoxicity assays.* Int J Pharm, 2005. **288**(2): p. 369-76.
- 64. Oleinick, N.L. and H.H. Evans, *The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms*. Radiation Research, 1998. **150**(5 Suppl): p. S146-S156.
- 65. Putnam, K.P., D.W. Bombick, and D.J. Doolittle, *Evaluation of* eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. Toxicol In Vitro, 2002. **16**(5): p. 599-607.

- 66. Tanaka, K., et al., *Establishment of a human malignant meningioma cell line with amplified c-myc oncogene*. Cancer, 1989. **64**(11): p. 2243-9.
- 67. Denizot, F. and R. Lang, *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.* J Immunol Methods, 1986. **89**(2): p. 271-7.
- 68. Pannewitz, R., Etablierung einer Methode zum Nachweis der Wirksamkeit der Photodynamischen Therapie nach Gabe von 5-Aminolävulinsäure beim Glioblastom. Medizinische Fakultät der Universität Düsseldorf, 2010.
- 69. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.* J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
- 70. Decker, T. and M.L. Lohmann-Matthes, *A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity.* J Immunol Methods, 1988. **115**(1): p. 61-9.
- 71. Georgakoudi, I., P.C. Keng, and T.H. Foster, *Hypoxia* significantly reduces aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX synthesis in EMT6 cells. Br J Cancer, 1999. **79**(9-10): p. 1372-7.
- 72. Wyld, L., M.W. Reed, and N.J. Brown, *The influence of hypoxia and pH on aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy in bladder cancer cells in vitro*. Br J Cancer, 1998. **77**(10): p. 1621-7.
- 73. Wyld, L., et al., *Aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy: cellular responses to glucose starvation.* Br J Cancer, 2002. **86**(8): p. 1343-7.
- 74. Liu, Y.L., et al., *Regulation of ferrochelatase gene expression by hypoxia*. Life Sci, 2004. **75**(17): p. 2035-43.
- 75. Gadmar, O.B., et al., *The stability of 5-aminolevulinic acid in solution*. J Photochem Photobiol B, 2002. **67**(3): p. 187-93.
- 76. Ennis, S.R., et al., *Transport of 5-aminolevulinic acid between blood and brain*. Brain Res, 2003. **959**(2): p. 226-34.

- 77. Bulnes, S., J. Bilbao, and J.V. Lafuente, *Microvascular adaptive changes in experimental endogenous brain gliomas*. Histol Histopathol, 2009. **24**(6): p. 693-706.
- 78. Papadopoulos, M.C., et al., *Occludin expression in microvessels of neoplastic and non-neoplastic human brain*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2001. **27**(5): p. 384-95.
- 79. Brahimi-Horn, M.C., J. Chiche, and J. Pouyssegur, *Hypoxia* signalling controls metabolic demand. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(2): p. 223-9.
- 80. Popovic, E.A., A.H. Kaye, and J.S. Hill, *Photodynamic therapy of brain tumors*. J Clin Laser Med Surg, 1996. **14**(5): p. 251-61.
- 81. Hynes, R.O., Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
- 82. Muller, P.J. and B.C. Wilson, *An update on the penetration depth* of 630 nm light in normal and malignant human brain tissue in vivo. Phys Med Biol, 1986. **31**(11): p. 1295-7.
- 83. Slotty, P.J., *Die δ-Aminolaevulinsäure gestützte photodynamische Therapie humaner Gliome in-vitro und in-vivo.* 2010.
- 84. Peng, Q., et al., 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. Cancer, 1997. **79**(12): p. 2282-308.
- 85. Erlandsen, E.J., et al., Determination of porphobilinogen deaminase activity in human erythrocytes: pertinent factors in obtaining optimal conditions for measurements. Scand J Clin Lab Invest, 2000. **60**(7): p. 627-34.
- 86. Berg, K., et al., *The influence of iron chelators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolaevulinic acid-treated cells.* Br J Cancer, 1996. **74**(5): p. 688-97.
- 87. Princ, F.G., A.A. Juknat, and A.M. Batlle, *Porphyrinogenesis in rat cerebellum. Effect of high delta-aminolevulinic acid concentration.* Gen Pharmacol, 1994. **25**(4): p. 761-6.
- Eljamel, M.S., C. Goodman, and H. Moseley, ALA and Photofrin fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre Phase III randomised controlled trial. Lasers Med Sci, 2008. 23(4): p. 361-7.

- 89. Eljamel, S., *Photodynamic applications in brain tumors: a comprehensive review of the literature*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2010. 7(2): p. 76-85.
- 90. Hirschberg, H., et al., *ALA- and ALA-ester-mediated photodynamic therapy of human glioma spheroids*. Journal of neuro-oncology, 2002. **57**(1): p. 1-7.
- Kloek, J. and H. Beijersbergen van, *Prodrugs of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy*. Photochem Photobiol, 1996. 64(6): p. 994-1000.
- 92. Perotti, C., et al., ALA and ALA hexyl ester induction of porphyrins after their systemic administration to tumour bearing mice. Br J Cancer, 2002. 87(7): p. 790-5.
- 93. Tonn, J.C. and W. Stummer, *Fluorescence-guided resection of malignant gliomas using 5-aminolevulinic acid: practical use, risks, and pitfalls.* Clin Neurosurg, 2008. **55**: p. 20-6.
- 94. Bondad, J., et al., Oral 5-aminolevulinic acid induced Photodynamic Diagnostic Ureterorenoscopy--does the blood pressure require monitoring? Photodiagnosis Photodyn Ther, 2013. **10**(1): p. 39-41.
- 95. Webber, J., D. Kessel, and D. Fromm, *Side effects and photosensitization of human tissues after aminolevulinic acid.* J Surg Res, 1997. **68**(1): p. 31-7.
- 96. Gorchein, A. and R. Webber, delta-Aminolaevulinic acid in plasma, cerebrospinal fluid, saliva and erythrocytes: studies in normal, uraemic and porphyric subjects. Clin Sci (Lond), 1987. 72(1): p. 103-12.
- 97. Demyanenko, S.V., et al., *PDT-induced epigenetic changes in the mouse cerebral cortex: A protein microarray study.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(1): p. 262-70.
- 98. Fraga, C.G., et al., 5-Aminolevulinic acid mediates the in vivo and in vitro formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. Carcinogenesis, 1994. **15**(10): p. 2241-4.
- 99. Hermes-Lima, M., et al., *Calcium-dependent mitochondrial* oxidative damage promoted by 5-aminolevulinic acid. Biochim Biophys Acta, 1992. **1180**(2): p. 201-6.

- 100. Oteiza, P.I. and E.J. Bechara, *5-aminolevulinic acid induces lipid peroxidation in cardiolipin-rich liposomes*. Arch Biochem Biophys, 1993. **305**(2): p. 282-7.
- 101. Oteiza, P.I., et al., 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. Arch Biochem Biophys, 1995. **316**(1): p. 607-11.
- 102. Chysky, V., et al., Safety of ciprofloxacin in children: worldwide clinical experience based on compassionate use. Emphasis on joint evaluation. Infection, 1991. **19**(4): p. 289-96.
- 103. Catchpole, C., et al., *The comparative pharmacokinetics and tissue penetration of single-dose ciprofloxacin 400 mg i.v. and 750 mg po.* J Antimicrob Chemother, 1994. **33**(1): p. 103-10.
- 104. Crump, B., R. Wise, and J. Dent, *Pharmacokinetics and tissue penetration of ciprofloxacin*. Antimicrob Agents Chemother, 1983. 24(5): p. 784-6.
- 105. LeBel, M., F. Vallee, and M.G. Bergeron, *Tissue penetration of ciprofloxacin after single and multiple doses*. Antimicrob Agents Chemother, 1986. **29**(3): p. 501-5.
- 106. Wise, R., D. Griggs, and J.M. Andrews, *Pharmacokinetics of the quinolones in volunteers: a proposed dosing schedule*. Rev Infect Dis, 1988. 10 Suppl 1: p. S83-9.
- 107. Davey, P.G., et al., Ciprofloxacin and sparfloxacin penetration into human brain tissue and their activity as antagonists of GABAA receptor of rat vagus nerve. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(6): p. 1356-62.
- 108. Talan, D.A., et al., *Extended-release ciprofloxacin (Cipro XR) for treatment of urinary tract infections.* Int J Antimicrob Agents, 2004. 23 Suppl 1: p. S54-66.

#### 6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Bestandteile des LDH-Assay	18
Tabelle 2: PDT-Verstärkung durch Ciprofloxacin in Kombination mit verschied	enen
ALA-Konzentrationen	35
Tabelle 3: Gegenüberstellung von LDH- und WST-1-Assay	41

Tabelle 4: Spektrometrische Ergebnisse der PPIX-Verdünnungsreihe	42
Tabelle 5: Graphen zur PPIX-Fluoreszenz gemäß Spektrometrie	44
Tabelle 6: Reflektierende Gegenüberstellung vom LDH- und WST-1-Test	58

## 6.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema der Häm-Synthese in Zellkompartimenten (gekürzt)4
Abb. 2: "Ausgesäte" 96-Well-Platte für Kolorimetrie mit dem WST-1-Test 11
Abb. 3: Prozess des Mediumwechsels ("Waschen") nach abgelaufener ALA-
Einwirkzeit am Beispiel eines Näpfchens der Mikrotiterplatte 14
Abb. 4: Entdeckelte Bestrahlungskammer
Abb. 5: Reaktionsweg des WST-1-Assay. Modifiziert mit Nutzungsgenehmigung der
Roche Diagnostics GmbH, © 200816
Abb. 6: Versuchsplatte nach durchgeführtem WST-1-Assay
Abb. 7: Reaktionswege des LDH-Assay. Modifiziert mit Nutzungsgenehmigung der
Roche Diagnostics GmbH, © 2008
Abb. 8: Lysierung von Zellen durch die Lysis Solution
Abb. 9: 96-Well-Platte nach durchgeführtem LDH-Assay
Abb. 10: Umgang mit Ciprofloxacin und ALA vor PDT
Abb. 11: PPIX-Verdünnungsreihe
Abb. 12: Detailansicht der Fiberoptik-Halterung
Abb. 13: Aufbau der Versuchsgegenstände zur PPIX-Fluoreszenzspektrometrie 28
Abb. 14: Schematischer Querschnitt durch die Sondenspitze der Fiberoptik
Abb. 15: Zellletalität nach PDT in Abhängigkeit von der ALA-Einwirkzeit
Abb. 16: Zellvitalität nach PDT in Abhängigkeit von der ALA-Einwirkzeit
Abb. 17: Mittelwerte relativer Extinktionen der Negativkontrollen im LDH-Test und
WST-1-Test
Abb. 18: PDT-Verstärkung durch Ciprofloxacin

Abb. 19: Mittelwerte der Negativkontrollen zu den Versuchen mit Ciprofloxacin-
ALA-PDT
Abb. 20: Extinktion im LDH-Assay in Korrelation zur Zahl lysierter Zellen von
KT21-MG
Abb. 21: Versuchsplatte aus Abb. 21 nach Kolorimetrie
Abb. 22: Extinktion im LDH-Test im Zeitverlauf nach Lysierung von KT21-MG 38
Abb. 23: Relative Extinktion von zum Zeitpunkt der PDT lysierten Kontrollzellen in
Relation zu den relativen Extinktionen des High Control im LDH-Test
Abb. 24: Relative Extinktionen im WST-1-Test verschiedener ALA-Konzentrationen
nach unterschiedlicher Ruhezeit nach PDT 40
Abb. 25: Gegenüberstellung von LDH- und WST-1-Test
Abb. 26: Spektrometrische Ergebnisse der PPIX-Verdünnungsreihe 42
Abb. 27: Makroskopisch wahrnehmbare qualitativ konzentrationsabhängige PPIX-
Fluoreszenz unter Blaulichtbestrahlung
Abb. 28: Alle Versuche im Flussdiagramm
Abb. 29: Zelldichte im Well 66 Stunden nach Zelldistribution von 10 <sup>4</sup> Zellen/Well 48
Abb. 30: Theoretisches Modell ungebremster Entwicklung der Zellzahl im Well bei
KT21-MG im Versuchsablauf verschiedener PDT-Szenarien
Abb. 31: Fokal lädiertes zelluläres Monolayer nach Pipettieren im Well. Läsionen
sind mit Sternen markiert
Abb. 32: Michaelis-Kinetik der PBGD in menschlichen Erythrozyten. Modifiziert
nach [85]
Abb. 33: PPIX-Synthese nach vierstündiger Einwirkzeit von 5-ALA unterschie-
dlicher Konzentrationen am Beispiel der Zelllinie WiDr. Modifiziert nach [85] 52
Abb. 34: Theoretisches Modell zum Einfluss der Inkubationsdauer auf die PPIX-
Konzentration bei unterschiedlichen ALA-Konzentrationen
Abb. 35: Sättigung der Zunahme der Optischen Dichte im Zeitverlauf
Abb. 36: PPIX-Synthese in Abhängigkeit der Koinkubation von ALA und Fluoro-
chinolonen. Modifiziert nach [59]59

#### 6.4 Materialienverzeichnis

Produkt	Hersteller; Standort
5-ALA-Hydrochlorid [CAS: 5451-09-2]	Merck; Darmstadt, D
96-Well-Zellkultur-Platte, Cellstar, F-Bottom	Greiner bio-one; Frickenhausen, D
Aluminium-Folie	Handelsübliches Produkt
Armschützer, Foliodrape, 50cm lang	Hartmann; Heidenheim, D
Becherglas, 50ml	Schott; Mainz, D
Bestrahlungskammer	CeramOptec; Bonn, D
	Welabo; Düsseldorf, D
Ciprofloxacin-Hydrochlorid-Lösung, 5ml	Zentralapotheke UKD
[CAS: 93107-08-5]	
CO2-Inkubator CB 1501	Binder; Tuttlingen, D
DMEM, gibco, ohne bzw. mit Phenolrot,	Life Technologies; Grand Island,
500ml	NY/USA
DMSO [CAS: 67-68-5]	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
DPBS, gibco, 500ml	Life Technologies; Grand Island,
	NY/USA
Elektrischer Handdispenser, Multipette	Ennendorf: Hamburg, D
Stream, 50ml	Eppendori, maniburg, D
Excel 2010 und Powerpoint 2010	Microsoft, Redmond, WA/USA
Falcons, Cellstar Tubes, 50ml	Greiner bio-one; Frickenhausen, D
Fetal Bovine Serum Gold 500ml	PAA Laboratories; Pasching, AT
Fiberoptik, kundenspezifische Anfertigung	Ocean Optics; Dunedin, FL/USA
Gewebekulturflasche T75 Cellstar	Greiner bio-one; Frickenhausen, D
Halbmikroküvette aus Quarz, Suprasil 104-	VWR; Darmstadt, D
QS, 10mm	
Halterung für Fiberoptik und Küvette, benut-	Werkstatt des Instituts für Laserme-
zerspezifisch	dizin des UKD
Hämazytometer, Neubauer Improved, mit	Assistent Germany; Sondheim, D
Deckgläschen	
Isopropanol, 99,9% [CAS: 67-63-0]	Zentralapotheke UKD; Düsseldorf
KT-21MG, anaplastische Meningeom-	Gabe von Prof. Dr. Riemenschnei-
Zelllinie	der, Universität Regensburg
Kryoröhrchen, Cryotube Vials	Nunc; Roskilde, DK
Laser, Ceralas, 635nm	BioLitec; Jena, D

Laser-Fiber, Frontal Light Diffusor	Medlight; Ecublens, CH
Latex-Handschuhe NITRA-TEX, puderlos	Ansell; Tamworth, UK
LED ("Neutral White" und "Blue" (405nm))	Ocean Optics; Dunedin, FL/USA
Magnetrührer, RETbasic, mit Heizung	IKA Labortechnik; Staufen, D
Magnet-Rührstab	VWR; Darmstadt, D
Microplate Reader, Model 680XR	Bio-Rad Laboratories; München, D
Mikroskop CK2-TR	Olympus Europa, Hamburg, D
Mikroskop Eclipse Ti-S	Nikon GmbH, Düsseldorf, D
Mikroskop-Software NIS-Elements BR	Nikon GmbH, Düsseldorf, D
Misch-Temperierer, Thermomixer comfort, für Well-Platten	Eppendorf; Hamburg, D
Multipette	Eppendorf; Hamburg, D
Multipette-Pipettenspitzen Combitips (500µl, 2.5ml, 5ml, 50ml)	Eppendorf; Hamburg, D
Multi-Channel Light Source (MCLS)	Ocean Optics; Dunedin, FL/USA
Natrium-Pyruvat 100mM 100ml	Biochrom; Berlin, D
Pasteurpipetten aus Glas	Brand; Wertheim, D
Penicillin-Streptomycin 100ml	Life Technologies; Grand Island,
	NY/USA
Pipetten Eppendorf Research plus (1-10µl, 10-100µl, 100-100µl, 1-10ml)	Eppendorf; Hamburg, D
Pipettiergerät, accu-jet pro, elektrisch	Brand; Wertheim, D
Pipettenspitzen (5 ml, 10 ml, 25 ml) costar	Corning; Corning, NY/USA
STRIPETTE, für accu-jet pro	
Pipettenspitzen, ep Dualfilter T.I.P.S., für	Ennondorf: Hamburg, D
Eppendorf Research plus	Eppendori, framourg, D
Präzisionswaage, Kern 410	PK Elektronik; Velten, D
Präzisionswischtücher, Kimtech Science,	Kimberly-Clark Europe; Reigate,
weiß	UK
Protoporphyrin-9 [CAS: 553-12-8]	Santa Cruz Biotechnology; Heidel-
	berg, D
Powerpoint 2010	Microsoft, Redmond, WA/USA
Reagenzglasschüttler, REAX 2000	Heidolph; Schwabach, D
Reaktionsgefäß, Safe-Lock Tube Eppendorf	Ennendorf Hamburg D
Biopur, 1,5ml	Leppendori, Humourg, D

Reaktionsgefäßständer, neoRack, für Falcons	Neolab; Heidelberg, D
Spatel-Löffel, Blattbreite 5mm gebogen	Welabo; Düsseldorf, D
Spektrometer USB 2000+	Ocean Optics; Dunedin, FL/USA
Spektrometrie-Software, benutzerspezifisch	Dr. Igor Fischer; Neurochirurgische
	EDV UKD
Sprühflasche, Laborsicherheitsflasche	Vitlab; Grossostheim, D
SPSS Statistics 22	IBM, Armonk, NY/USA
Sterilwerkbank Laminair, HA 2448	Heraeus; Hanau, D
Targa Traveller XTR; Laptop	Actebis; Soest, D
Trypanblau-Lösung 0,4% [CAS: 72-57-1]	Sigma-Aldrich; Steinheim ,D
Trypsin-EDTA [EC: 3.4.21.4]	PAA Laboratories; Pasching, AT
Wasserbad WNB	Memmert; Schwabach, D
Wasser für Injektionszwecke	Braun; Melsungen, D
WST-1 Kit	Roche Diagnostics; Risch, CH

### Danksagung

Keine Doktorarbeit kommt ohne menschliche Unterstützung aus. In Dankbarkeit möchte ich mehrere Personen hervorheben.

Ich danke herzlich Herrn Dr. med. Jan-Frederick Cornelius, der mich in die Thematik eingeführt hat und sich mit seiner freundlichen und besonnenen Weise, sowie seiner zügigen und unkomplizierten Kommunikation, als ein guter Betreuer erwies.

Dem Direktor der Neurochirurgie des Düsseldorfer Universitätsklinikums, Herrn Prof. Dr. med. Hans-Jakob Steiger, danke ich für die guten Rahmenbedingungen meiner Doktorarbeit und die regelmäßigen Labor-Besprechungen, die ich durch seine ruhige Art und wissenschaftliche Expertise stets als fruchtbar empfand.

Der MTA des neurochirurgischen Labors, Frau Brigitte Senger, gebührt höchste Dankbarkeit für ihre Unterstützung, die weit über ihre bloße Pflichterfüllung hinausging. Sie ist während der gesamten experimentellen Phase dieser Dissertation eine kaum verzichtbare Hilfe gewesen. Bis heute schätze ich nicht nur das kollegiale, sondern auch freundschaftliche Verhältnis zu ihr. Besonders kostbar waren ihre Mahnungen zu praktisch-strukturierter, gründlicher und präziser Arbeit angesichts meiner studentischen Neigung zu übermäßig theoretisierender Ergebnisinterpretation. Brigitte Senger habe ich nicht nur zahlreiche gute Daten zu verdanken, sondern auch ein produktives Arbeitsklima in einem tadellos geführten Labor.

Dr. Igor Fischer, dem EDV-Mitarbeiter der UKD-Neurochirurgie, danke ich für angeregte Fachgespräche und die benutzerspezifische Betriebssoftware der spektrometrischen Versuche.

Meinem ehemaligen Kommilitonen Patrick Fischer möchte ich für die Weiterführung seiner Ciprofloxacin-Fragestellung danken.

Danken möchte ich ebenfalls den Herren Münstermann und Stürmer von der Werkstatt des Instituts für Lasermedizin. Sie standen mir bei der Verwirklichung handwerklicher Anliegen rasch, hilfsbereit und unbürokratisch zur Seite. Die letzte und sogleich erste Danksagung gebührt meinen Eltern für die feste Burg, die liebevolle Saat und die vollen Kammern.

# **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.

22. Januar 2015, Alexander Giannakis