

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

Experimentelle Untersuchungen
zur Wirksamkeit der 5-Aminolävulinsäure-basierten
Photodynamischen Therapie an einem in-vitro-Modell von
Hypophysenadenomzellen

Dissertation

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

vorgelegt von
Lisa Margarete Neumann
2019

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

gez.:

Dekan: Prof Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Priv.Doiz.Dr. Jan F. Cornelius

Zweitgutachter: Priv.Doiz. Dr. Rüdiger Sorg

*Ich glaube an den Fortschritt, ich glaube, die Menschheit ist zur Glückseligkeit
bestimmt.*

Heinrich Heine (1797-1856)

Für Andrea – in tiefer Dankbarkeit

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Efficacy of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in pituitary adenomas — experimental study on rat and human cell cultures, Neumann LM, Beseoglu K, Slotty PJ, Senger B, Kamp MA, Hänggi D, Steiger HJ, Cornelius JF., Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 2016, Volume 14, 77 – 83

Zusammenfassung

Hypophysenadenome stellen rund 15% aller intrakraniellen Tumore dar. Obwohl es sich um benigne, langsam wachsende Tumore handelt, besteht oft aufgrund der Kompression intrakranieller Strukturen bzw. hormoneller Dysregulationen die Indikation zur operativen Entfernung. Klinische Studien zeigten, dass es trotz Resektion regelmäßig zu Rezidiven kommt. Eine adjuvante Strahlentherapie kann zu Hypophyseninsuffizienz und Nekrosen führen, sodass nach alternativen adjuvanten Verfahren gesucht werden sollte.

Die Photodynamische Therapie (PDT) wird bereits bei der Therapie von dermatologischen, urologischen und gastrointestinalen Tumoren erfolgreich eingesetzt. Die Studienlage zur PDT mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) als Photosensibilisator bei Gliomen ist ebenfalls vielversprechend. Ziel der zugrundeliegenden Studie war es in einem *in-vitro*-Modell, die Wirksamkeit der 5-ALA-PDT bei einer immortalisierten Zelllinie und intraoperativ gewonnenen humanen Hypophysenadenomzellen zu untersuchen.

Gruppe I waren immortalisierte Ratten-Hypophysenadenomzellen (GH3), die in 96-Well-Platten kultiviert und mit variierenden 5-ALA Konzentrationen von 7,5-16,5 µg/ml photodynamisch behandelt wurden. In Gruppe II wurden primäre Hypophysenadenomzellen aus intraoperativ gewonnenem Adenomgewebe (n=15) kultiviert und ebenfalls bei unterschiedlichen 5-ALA Konzentrationen (12,5-100 µg/ml) mit PDT behandelt. Die Inkubationszeit betrug vier Stunden und die anschließende PDT wurde durch Laserlicht (635 nm, 625 s, 18.75 J/cm²) in einer Bestrahlungseinheit (Ceralas, BioLitec, Jena, Deutschland) durchgeführt. Die Wirksamkeit der PDT wurde mittels WST-1 Zellviabilitäts-Assay untersucht.

In beiden Gruppen zeigte sich ein 5-ALA-konzentrationsabhängiger Effekt der photo-dynamischen Therapie auf die Zellmortalität. Weder die Behandlung mit 5-ALA allein noch das Laserlicht allein beeinflussten das Zellüberleben. Zudem zeigten in Gruppe II die verschiedenen histologischen Subtypen der humanen Adenome unterschiedliche Sensitivitäten auf die 5-ALA PDT. Insbesondere kortikotrope Adenome erwiesen sich als hochgradig sensibel.

Die GH3-Zelllinie zeigte sich als sinnvolles Modell zur Optimierung unterschiedlicher PDT-Parameter. Primäre humane Hypophysenadenomzellen konnten ebenfalls durch 5-ALA PDT zerstört werden, wenngleich hierfür höhere 5-ALA-Konzentrationen nötig waren. Weiterhin zeigten die verschiedenen Adenom-Subtypen unterschiedliche Sensibilität auf 5-ALA PDT. Insbesondere die hohe Sensitivität von kortikotropen Adenomen sollte weiter untersucht werden, um zusätzliche Behandlungsoptionen für diesen klinisch schwerwiegenden Subtyp zu eruieren.

Summary:

Incomplete resection of pituitary adenomas may result in recurrence. As adjuvant irradiation is not riskless, alternative treatment options should be investigated. 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy (5-ALA based PDT) showed promising results for malignant gliomas. The present study examined the efficacy of 5-ALA PDT in vitro on benign pituitary adenoma cell cultures.

In group I experiments were performed on immortalized rat pituitary adenoma cells (GH3). The cultured cells were treated with different 5-ALA concentrations ranging from 7.5–16.5 µg/ml. In group II human pituitary adenoma cell cultures were obtained from surgically resected adenoma tissue (n = 15). These were incubated with 5-ALA concentrations from 12.5–100 µg/ml. The concentration ranges had been determined in preliminary dose-finding tests. For both groups incubation time was four hours and PDT was performed by exposition to laser light (635 nm, 625 s, 18.75 J/cm²). Cell viability was examined by WST-1 assay.

In both groups PDT showed a 5-ALA concentration-dependent effect on cell death. In group I lower 5-ALA concentrations were necessary to destroy all cells as compared to group II. Moreover, in group II, the different subtypes of human adenomas showed different sensitivities to 5-ALA-based PDT. Especially corticotroph adenomas were highly sensitive to 5-ALA PDT.

The GH3 cell line was a useful in vitro model to optimize different PDT parameters. Human pituitary adenoma cells could also be killed by 5-ALA PDT, however this required higher 5-ALA concentrations. Furthermore, the results suggested different 5-ALA sensitivities between different human adenoma cell types. More experiments are necessary to confirm these preliminary results.

Abkürzungsverzeichnis

A. / Aa.	<i>Arteria / Arteriae</i>
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
ALA / 5-ALA	5-Aminolävulinsäure
CT	<i>Computed tomography</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i> / Europäische Arzneimittelagentur
FGS	„fluorescence guided surgery“ / Fluoreszenzgestützte Resektion
FIPA	Familiär isolierte Hypophysenadenome
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GH	„growth hormone“/Somatotropin
HHL	Hypophysenhinterlappen
HpD	Hämatoporphyrinderivat
HVL	Hypophysenvorderlappen
IGF-1	„insulin-like growth factor 1“ / Somatomedin
KM	Kontrastmittel
LD ₅₀	<i>Lethal dose</i> / Mittlere letale Dosis
LH	Luteinisierendes Hormon
LINAC	„ <i>linear accelerator</i> “ / Linearbeschleuniger
MEN	Multiple endokrine Neoplasien
MRT	Magnetresonanztomographie
N. / Nn.	Nervus / Nervi
PDD	Photodynamische Diagnostik
PDT	Photodynamische Therapie

PpIX	Protoporphyrin IX
PRL	Prolaktin
T3/T4	Triiodthyronin/Thyroxin
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
WHO	<i>World Health Organization</i>

Die Standardeinheiten des SI-Systems sind nicht aufgeführt.

Fremdsprachliche Begriffe sind kursiv dargestellt

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Anatomie und Physiologie der Hypophyse	1
1.1.1	Physiologie der Hypophyse	1
1.1.2	Hypothalamisch-hypophysärer Regelkreis	2
1.2	Hypophysenadenome	3
1.2.1	Klassifikation und Inzidenz	3
1.2.2	Ätiologie	5
1.2.3	Klinik	6
1.2.4	Diagnostik	8
1.2.5	Therapiestrategien und Prognose	9
1.3	Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie	12
1.3.1	Grundlagen und Entwicklung	12
1.3.2	Hämoglobin-Biosynthese und Veränderungen in neoplastischen Zellen	13
1.3.3	Photosensibilisatoren	15
1.3.4	Fluoreszenzentstehung und Prinzip der PDT	17
1.3.5	Nutzungsansätze in der Neurochirurgie	19
1.4	Ziele der Arbeit	20
2	PUBLIZIERTE ORIGINALARBEIT: EFFICACY OF 5-AMINOLEVULINIC ACID BASED PHOTODYNAMIC THERAPY IN PITUITARY ADENOMAS — EXPERIMENTAL STUDY ON RAT AND HUMAN CELL CULTURES, NEUMANN LM, BESEGLU K, SLOTTY PJ, SENGER B, KAMP MA, HÄNGGI D, STEIGER HJ, CORNELIUS JF., PHOTODIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY 2016, VOLUME 14, 77 – 83	21
3	DISKUSSION	29
3.1	Materialgewinnung und Anzüchten einer Primärzellkultur	29
3.2	Vergleich der untersuchten Zellen	30
3.3	5-ALA Inkubationszeiten	32
3.4	Unterschiede in der 5-ALA Pharmakokinetik und –dynamik <i>in-vivo</i> und <i>in-vitro</i>	32
3.5	Licht: Eindringtiefe, Energie und Verteilung	33
3.6	Hyperthermie durch Licht	35
3.7	Wirkungsnachweis	35
3.8	5-ALA im Vergleich zu anderen Photosensibilisatoren	36
3.9	Potenzial und Grenzen der 5-ALA PDT	38
3.10	Zukunftsperspektiven und Integration in ein Behandlungsgesamtkonzept	40
4	VERZEICHNISSE	42
4.1	Literaturverzeichnis	42
4.2	Tabellenverzeichnis	49
4.3	Abbildungsverzeichnis	50
5	DANKSAGUNG	51
6	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

1 Einleitung

Kurz zusammengefasst werden nachfolgend die Anatomie und Physiologie der Hypophyse, die Ätiologie und Klinik der Hypophysenadenome sowie die aktuellen therapeutischen Optionen bei dieser Tumorentität dargestellt.

1.1 Anatomie und Physiologie der Hypophyse

Die Hypophyse gilt als essentielle Schnittstelle zwischen zentralem Nervensystem und den jeweiligen Zielorganen des menschlichen Hormonhaushalts [1].

Sie liegt extradural in einer bindegewebigen Kapsel in der *Fossa hypophysialis* als Teil der *Sella turcica* auf der Innenseite des *Os sphenoidale*, die als knöcherne Senke die mittlere Schädelgrube in der Medianebene teilt. Rostral der Hypophyse und des Hypophysenstiels liegen der *Canalis opticus*, die *Nn. optici*, deren mediale Anteile sich auf Höhe der Hypophyse im *Chiasma opticum* kreuzen und die *Aa. ophthalmicae*. Lateral wird die Hypophyse vom *Sinus cavernosus* umgeben, der den venösen Abfluss der Hypophyse sicherstellt (s. Abb. 1) [2].

1.1.1 Physiologie der Hypophyse

Embryologisch und physiologisch unterteilt sich die Hypophyse in drei Anteile:

- 1.) dem Hypophysenvorderlappen, oder sogenannte Adenohypophyse, die den größten Anteil der Hypophyse darstellt und embryologisch in Form der Rathke-Tasche als Ausstülpung aus dem Ektoderm entsteht,
- 2.) dem Hypophysenhinterlappen, der sogenannten Neurohypophyse, die embryologisch als Erweiterung des Diencephalons und somit dem zentralen Nervensystem entspringt und
- 3.) dem Hypophysenstiel, oder *Infundibulum*, der Verbindung zum Hypothalamus. Dieser Stiel zieht durch das fenestrierte *Diaphragma sellae* nach intradural [2].

Die Neurohypophyse als Erweiterung des ZNS dient als Speicherorgan für die beiden Hormone Oxytocin und ADH (antidiuretisches Hormon). Die Adenohypophyse als inkretorische Drüse, vertikal gesteuert durch den

Hypothalamus, hingegen verfügt über fünf endokrine Drüsenarten und ist für die Produktion und Sekretion der glandotropen Hormone TSH (Thyreotropin), LH (luteinisierendes Hormon) und ACTH (adrenokortikotropes Hormon) sowie die nicht-glandotropen Hormone GH (Somatotropin) und Prolaktin (PRL) verantwortlich [3].

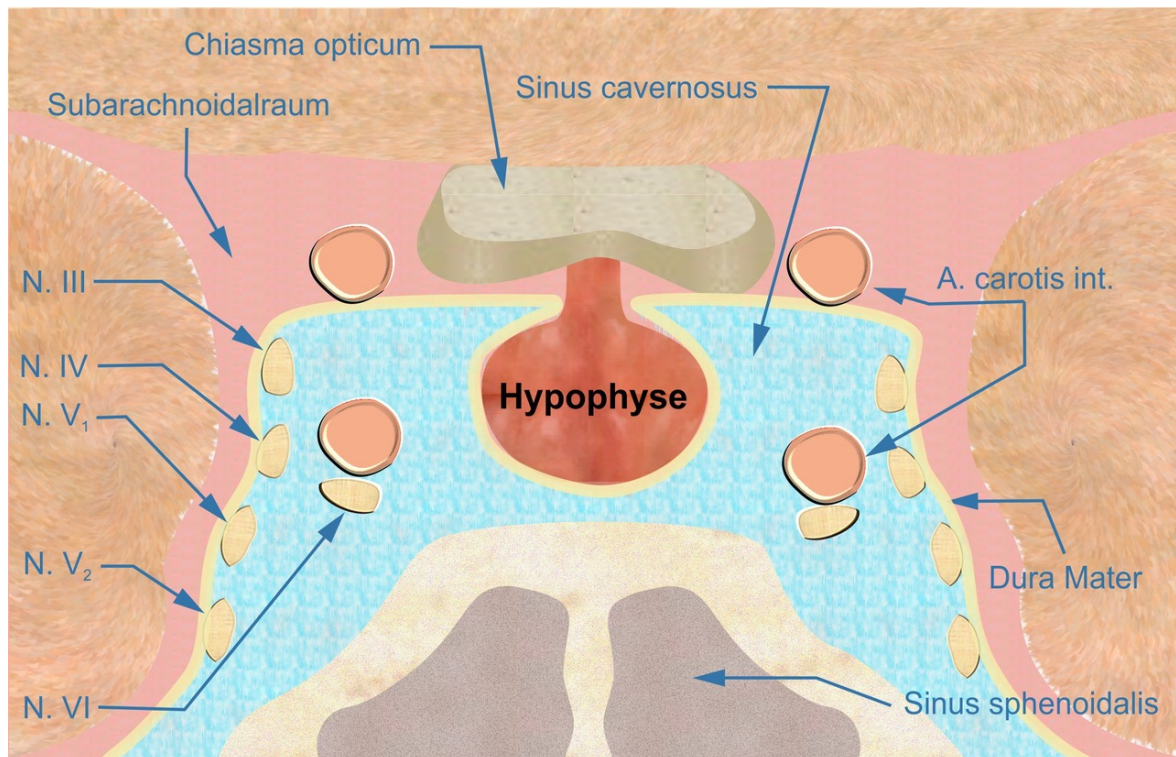


Abb. 1: koronarer Schnitt durch die mediane Schädelbasis auf Höhe der Hypophyse; N. III: N. oculomotorius, N. IV: N. trochlearis, N. V₁: N. optalmicus, N. V₂: N. maxillaris, N. VI: N. abducens; dunkelbraun: Hirnparenchym, beige: Knochen; modifiziert nach [4]

1.1.2 Hypothalamisch-hypophysärer Regelkreis

Trotz der geringen Masse von rund 0,5 g ist die Hypophyse ein essentieller Bestandteil der endokrinen Regulation [1]. Im Rahmen des hypothalamisch-hypophysären Regelkreises wird die Sekretion der Hypophysenhormone, die schließlich zur Stimulation der endokrinen Endorgane /-strukturen führt, durch *Releasing*- und *Inhibiting*-Hormone des Hypothalamus, die in einem engmaschigen Kapillarnetz in der Adenohypophyse münden, reguliert (s. Abb. 2). Durch einen physiologischen Feedbackmechanismus hemmen die Effektorhormone, die durch die endokrin aktiven Endorgane sezerniert werden, die Produktion der *Releasing*-

Hormone im Hypothalamus und regulieren so den komplexen Hormonhaushalt (negative Feedback-Regulation) [3].

Hypothalamisch-hypophysäre Achse

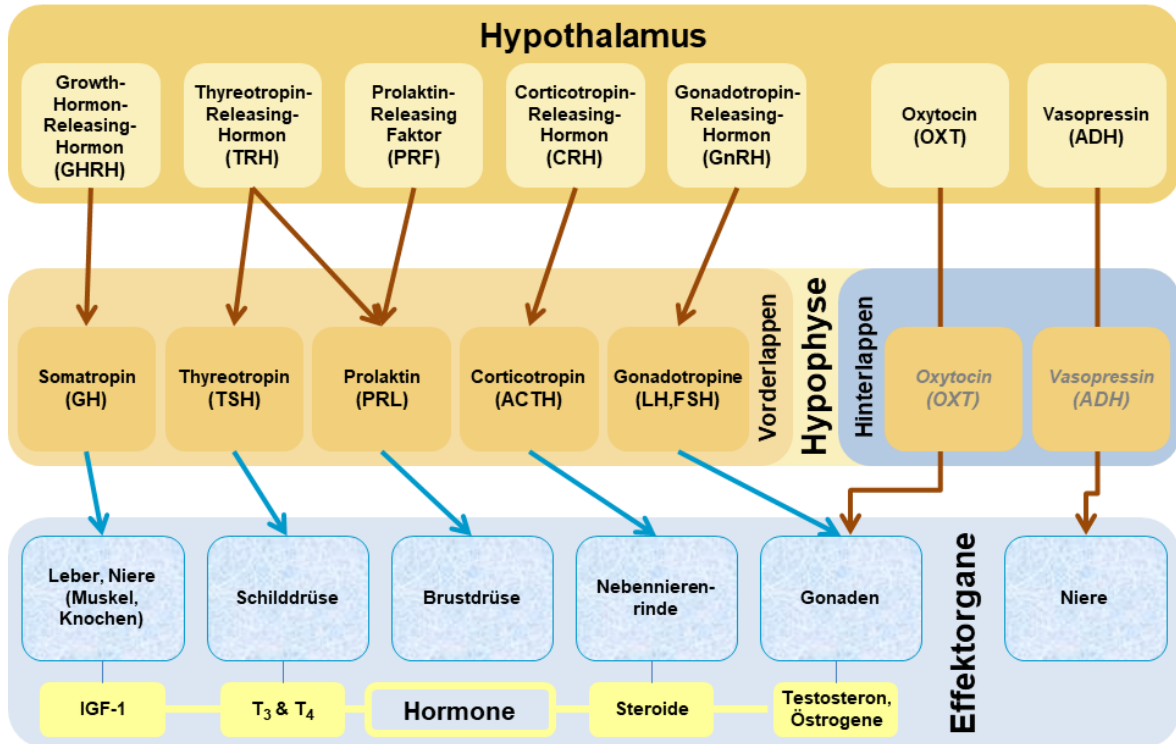


Abb. 2: Darstellung der hypothalamisch-hypophysären Achse mit Aufführung der Effektororgane (blau unterlegt) sowie deren Effektorhormone (gelb unterlegt). Hypophysenhinterlappen (HHL, dunkelblau), der als Speicherorgan für die hypothalamischen Hormone ADH und Oxytocin dient. Modifiziert nach [3]

1.2 Hypophysenadenome

Hypophysenadenome sind benigne, typischerweise vom Parenchym des Hypophysenvorderlappens (HVL) ausgehende, Tumore. Eingeteilt werden sie gemäß der aktuellen Klassifikation der WHO (*World Health Organization*) [5].

1.2.1 Klassifikation und Inzidenz

Die aktualisierte WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2017 unterteilt die Pathologien der Hypophyse unter anderem in die Hypophysenadenome, unterklassifiziert nach der jeweiligen Hormonexpression, die Hypophysenkarzinome und -blastome, sowie Tumore des Hypophysenhinterlappens (HHL), Kraniopharyngeome, neuronale und

paraneuronale Tumore (wie Neuroblastome oder Paragangliome), sowie in mesenchymale und Stammzelltumore (s. Tabelle 1) [5].

Entität	Subtyp
Hypophysenadenom	somatotropes Adenom laktotropes Adenom thyreotropes Adenom kortikotropes Adenom gonadotropes Adenom Nullzelladenom plurihormonelles Adenom
Hypophysenkarzinom	Hypophysenkarzinom
Hypophysenblastom	Hypophysenblastom
Tumor des HHL	Pituizytom Granularzelltumor der Sella Spindelzell-Onkozytom selläres Ependymom
Neuronaler und paraneuronaler Tumor	Gangliozytom und gemischtes Gangliozytom-Adenom Neurozytom Paragangliom Neuroblastom
Mesenchymaler und stromaler Tumor	Meningeom Schwannom Chordom solitärer fibröser Tumor/Hämangioperizytom
Hämatolymphoider Tumor	Hämatolymphoider Tumor
Keimzelltumor	Germinom Dottersacktumor embryonales Karzinom Choriokarzinom Teratom (reif/unreif/mit maligner Transformation) gemischter Keimzelltumor
Zweittumor	

Tabelle 1 4. Edition der WHO-Klassifikation der Tumore der Hypophyse, modifiziert nach [5]

Hypophysentumore stellen rund 15% aller intrakraniellen Neoplasien dar und entstehen im Allgemeinen ausschließlich in der Adenohypophyse und leiten sich

aus endokrin aktivem Gewebe ab [6, 7]. Im Allgemeinen zeigen Hypophysenadenome ein langsames Wachstum. Die überwiegende Anzahl der Hypophysenadenome sind entsprechend gutartig und nur weniger als 0,2% werden als maligne klassifiziert. Nichtsdestotrotz ist bei 45% der Tumore eine meningeale Infiltration festzustellen [8]. Nach Meningeomen und Gliomen, die jeweils rund 30% der intrakraniellen Neoplasien ausmachen, sind Hypophysenadenome die dritthäufigste Entität der intrakraniellen [6]. Die wahre Prävalenz scheint deutlich höher zu sein als die Daten vermuten lassen: Studien zeigten, dass bei zufällig ausgewählten Autopsien die Rate an zu Lebzeiten klinisch inapparenten Hypophysentumoren bei über 20% liegt, sodass von einer höheren Prävalenz -als allgemein angenommen- auszugehen ist [9].

Die Inzidenz der Hypophysenadenome beträgt rund drei bis vier pro 100.000 Einwohner/Jahr [10]. Sie treten meist im 4. bis 5. Lebensjahrzehnt auf, wobei Frauen geringfügig häufiger betroffen sind als Männer [11]. Steigende Inzidenzen lassen sich am ehesten durch häufigere kraniale Bildgebungen und verbesserte Diagnostik erklären [12]. Man spricht bei diesen Zufallsbefunden auch von „Inzidentalomen“ [13].

1.2.2 Ätiologie

Der Großteil der Hypophysenadenome tritt sporadisch auf. Bei nur rund 5% der Tumore sind ursächliche Syndrome bekannt, wie multiple endokrine Neoplasien (MEN), familiär isolierte Hypophysenadenome (FIPA) oder dem Carney-Komplex mit multiplen Myxomen und einer Prävalenz von 50% der Betroffenen für somatotrope Hypophysenadenome [14]. Untersucht wurde auch die familiäre Häufung von Hypophysen-tumoren, wobei eine große Bevölkerungsstudie in Utah (USA) zeigte, dass eine familiäre Häufung von Hypophysenadenomen beobachtet werden konnte [15].

Mögliche Umweltfaktoren werden zurzeit noch diskutiert. Tierversuche mit durch radioaktivem Jod¹³¹ versetztem Trinkwasser oder Acrylamide, welche in stark erhitzten, stärkehaltigen Lebensmitteln, z.B. Pommes Frites oder in Zigarettenrauch vorkommen, zeigten bei Ratten und Mäusen ein signifikant höheres Auftreten von Hypophysenadenomen [16-18]. Dies ließ sich bisher beim Menschen noch nicht nachweisen.

1.2.3 Klinik

Klinisch auffällig werden Hypophysenadenome meist durch eine Kombination von endokrinologischen Dysfunktionen (Hyper-/Hypopituitarismus) und/ oder neurologischen Defiziten. Zusätzlich zur histopathologischen und endokrinologischen Klassifikation kann eine bildmorphologische, typischerweise durch Magnetresonanztomografie (MRT), Einordnung erfolgen. Gemäß der Hardy-Klassifikation von 1979 werden die häufig asymptomatischen Mikroadenome (Durchmesser <10mm) von Makroadenomen (Durchmesser >10mm) unterschieden, welche aufgrund des raumverdrängenden Effekts neurologische Symptome verursachen [19].

Klinisch relevant ist die Unterscheidung der Hypophysenadenome in hormonaktive bzw. -inaktive Tumore. Bei Letzteren spricht man auch von sogenannten Nullzelladenomen, die ca. 40% der Adenome ausmachen. Bei endokrin aktiven Tumoren zeigen sich mit 30% am häufigsten Prolaktinome, die auch in der Therapie eine Sonderrolle spielen. Seltener treten GH-sezernierende, somatotrope (20%) und ACTH-produzierende, kortikotrope (5%) Tumore auf. Raritäten stellen die TSH- (thyreotropen) und LH/FSH-sezernierenden (gonadotropen) Raumforderungen dar [6, 7]. Gemeinsames Charakteristikum der sezernierenden Tumore ist die autonome Hormonhypersekretion. Daraus resultiert eine Überstimulation des peripheren Zielorgans sowie eine dauerhafte Überpräsenz an Effektorhormon. Das Releasinghormon (vom Hypothalamus) wird durch negative Rückkopplung zwar herunter reguliert, hat aber keinen Einfluss auf die autonome Hormonproduktion des Adenoms (Entkopplung des Regelkreises).

Dies führt zu charakteristischen Symptomen (s. Tabelle 2). Daneben treten unspezifische Manifestationen wie Cephalgien, allgemeine Leistungsminderung und Sehstörungen bis hin zur vollständigen Erblindung auf.

Subtyp	Hyper-sezernierende Hormone	Leitsymptome	Basisdiagnostik
Nullzelladenom	Keine (ggf. refl. PRL)	Durch lokal verdrängenden Effekt (s.u.)	
Prolaktinom	PRL	♀: Amenorrhö, Galaktorrhö, Zyklusstörungen ♂: Libido- und Potenzverlust (selten Gynäkomastie)	PRL im Serum
somatotropes Adenom	GH ($\pm$ PRL)	Akromegalie, Karpaltunnelsyndrom, Hyperhidrose (vor Schluss der Wachstumsfugen: Gigantismus)	GH, IGF-1 im Serum
kortikotropes Adenom	ACTH	M. Cushing	Dexamethason-Hemmtest, Cortisol im Serum
thyreotropes Adenom	β -TSH	Hyperthyreose	TSH, fT3/4 im Serum
gonadotropes Adenom	β -FSH, β -LH	Hypogonadismus, Amenorrhö	Testosteron (Gesamt/frei), Östradiol, GnRH-Stimulationstest
Klinik durch lokalen Verdrängungsprozess	Chiasma-Syndrom, Hypopituitarismus, Hirnnervenausfälle (III, IV, VI), Apoplexie, Diabetes insipidus		Hirnnervenstatus (insbes. III, IV, VI), Hormondiagnostik

Tabelle 2: Klinik, Klassifikation und Basisdiagnostik der Hypophysenadenome, modifiziert nach [5, 10]

Neben der durch Hypersekretion erklärbaren Symptomatik kann es gleichzeitig durch Tumorkompression auf umliegendes normales Hypophysengewebe auch zu einer Hypophyseninsuffizienz (Hypopituitarismus) kommen. Daneben kann es durch Minderperfusion auch zu ischämischen Nekrosen kommen [20].

Eine Sonderrolle spielen hormoninaktive Hypophysenadenome, die durch Kompression eine „Enthemmungs-Prolaktinämie“ auslösen können. Diese sind teilweise klinisch schwer von Prolaktinomen zu differenzieren [21, 22]. Der Mechanismus hierfür ist zunächst, dass das Adenom den Hypophysenstiel komprimiert. Das hierin enthaltene Dopamin aus dem Hypothalamus, welches die Prolaktinsekretion hemmt, fehlt.

Es kommt schließlich durch Desinhibition zur Hyperprolaktinämie ohne dass ein prolaktin-sezernierendes Adenom zugrunde liegt [21].

Ein weiteres, typischerweise bei Makroadenomen auftretendes Phänomen ist das sogenannte *Chiasma*-Syndrom. Dieses ist charakterisiert durch eine progrediente Visusminderung, eine bitemporale Hemianopsie und bei längerer Dauer eine Optikusatrophie [23].

1.2.4 Diagnostik

Eine vollständige Diagnostik umfasst die klinische und bildgebende Untersuchung sowie laborchemische Analysen.

Klinisch auffällig werden die Patienten meist durch eine endokrinologische Dysregulation, sodass zunächst neurologische und endokrinologische Untersuchungen erfolgen. Insbesondere die Hirnnervenuntersuchung und eine ophthalmologische Untersuchung unter Einbezug von Visus und Blickfeld ist elementar. Die endokrinologisch-laborchemische Diagnostik kann Aufschluss über die Funktionsfähigkeit der Hypophyse geben und lässt bereits erste Schlüsse über die mögliche Entität des Adenoms zu. Hierbei erfolgt die endokrinologische Basisdiagnostik der relevanten Hypophysen- und Effektorhormone (GH, ACTH, FSH, TSH, fT3/T4, Cortisol, IGF-1, Testosteron, Östradiol, Prolaktin; s. Tabelle 2). Bei pathologischen Befunden schließen sich spezielle Provokationsuntersuchungen (z.B. Dexamethason-Hemmtest) an.

Bei Verdacht auf eine Hypophysenpathologie im Rahmen der neurologischen und endokrinologischen Diagnostik hat sich die Magnetresonanztomographie (MRT) der Sellaregion mit und ohne Kontrastmittel als bildmorphologisches Verfahren der Wahl etabliert. Typischerweise erscheinen Hypophysenadenome hypointens in der nativen Bildgebung und reichern nur wenig Kontrastmittel (KM) an, sodass sie vor allem im Vergleich zum KM-anreichernden physiologischen Adenohypophysengewebe durch ihre hypointense Darstellung imponieren (s. Abb. 3) [24].

Im Hinblick auf die dynamische Perfusions-Bildgebung kommt es in der späten Phase nach KM-Applikation durch die KM-Ausschwemmung im Hypophysengewebe zu einer Anreicherung im Adenom und dadurch zu einer hyperintensiven Darstellung.

Eine Computertomographie-Untersuchung (CT) ist insbesondere dann indiziert, wenn eine Beurteilung möglicher Knochenarrosionen erfolgen soll, eine Infiltration der Schädelbasis vermutet wird oder eine MRT-Kontraindikation besteht (z.B. Herzschrittmacher, etc.) [25].

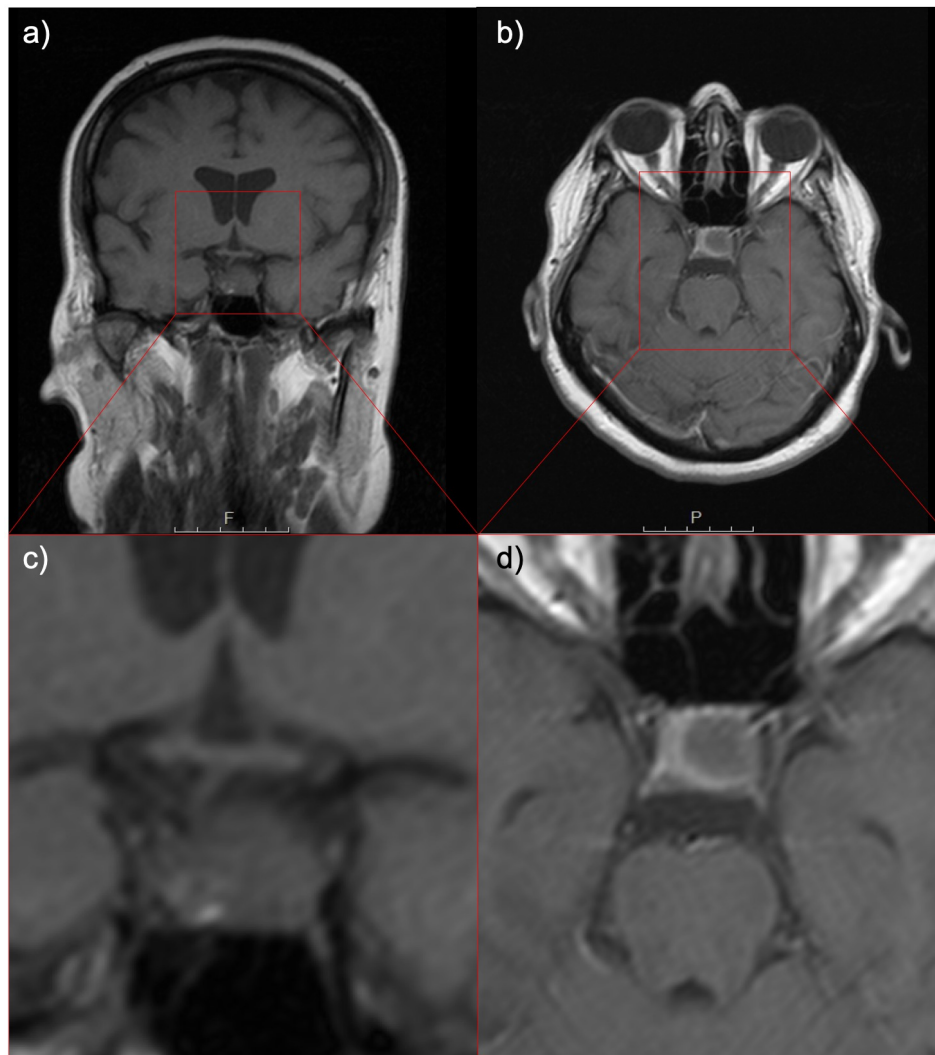


Abb. 3: Anatomische Darstellung eines linksseitig gelegenen Hypophysenadenoms mit den Ausmaßen von 15x15mm jeweils mit Kontrastmittel. a) & c) koronarer Schnitt, T1-gewichtet b) & d) axialer Schnitt, T1-gewichtet. Man erkennt jeweils eine hypointense linksseitige Raumforderung in der Sella turcica. durchgeführt: Institut für Radiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

1.2.5 Therapiestrategien und Prognose

Obwohl es sich meist um benigne, langsam wachsende Tumore handelt, sollten Hypophysenadenome bei Gefahr der Verdrängung von intrakraniellen und -zerebralen Strukturen sowie hormoneller Dysregulation therapiert werden [26]. Gemäß der aktuellen Lehrmeinung zeigen sich prinzipiell drei therapeutische Modalitäten, die sich aus der operativen Resektion, der medikamentösen Therapie,

der Strahlentherapie oder ggf. einer Kombination dieser drei Verfahren zusammensetzen [27]. Grundsätzlich besteht bei geringer Wachstumstendenz und asymptomatischem Patienten auch die Möglichkeit einer *wait & scan*-Strategie.

Die Behandlungsziele sollten bei der Therapieentscheidung sorgsam und patienten-individuell abgewogen werden:

- Normalisierung der endokrinologischen Funktion:
 - (1) Beseitigung der Überexpression einer Hormonachse
 - (2) Aufhebung eines reflektorischen Hypopituitarismus
- Aufhebung der durch Verdrängungsprozesse ausgelösten Symptome
- Minimierung des Rezidivrisikos
- Erhalt/Wiederherstellung der Lebensqualität
- Sicherung der Diagnose mittels histopathologischer Analysen

Die operative Resektion ist in der Mehrzahl der Fälle die Therapie der ersten Wahl [28]. Hierbei wird am häufigsten der transnasale-transsphenoidale Zugang gewählt. Verglichen mit dem transkraniellen Zugangsweg gestaltet sich hier der Zugangsweg sicherer, die Komplikationsrate geringer und die Rehabilitationsphase kürzer [28-30]. Vorteil des transkraniellen Zugangs ist eine bessere intraoperative Übersicht über den Tumor sowie angrenzende Strukturen. Dies erweist sich insbesondere bei sehr ausgedehnten Befunden, die über die Grenzen der *Sella turcica* hinausgehen (suprasellär) und über einen transsphenoidalen Zugang nicht zugänglich wären als wertvoll.

Beim transsphenoidalen Zugangsweg hat der Operateur die Wahl zwischen der Nutzung eines Mikroskops und eines Endoskops, wobei Letzteres zunehmende klinische Verbreitung findet [31-35]. Ziel einer operativen Therapie ist die R0-Resektion, da eine inkomplette Resektion häufig in progredientem Wachstum des Residuums und Persistenz der Endokrinopathie resultiert. Durch die anatomische Nähe zum *Chiasma opticum* und dem *Sinus cavernosus* mit seinen vaskulonervalen Strukturen ist eine vollständige Resektion jedoch nicht immer möglich. Es

kommt in diesen Fällen zu Tumorresiduen, für die es alternativer Behandlungskonzepte bedarf [26].

Mögliche operative Komplikationen sind neben den allgemeinen Risiken eines operativen Eingriffes und der Allgemeinanästhesie vor allem transienter oder persistenter Hypopituitarismus, Rhinoliqorrhö, Meningitis sowie die Schädigung des *N. opticus* mit Gesichtsfeldeinschränkungen bis hin zur Erblindung [34].

Die Radiotherapie findet insbesondere in der Behandlung von Rezidiven oder bei primär inoperablen Patienten ihre Bedeutung und stellt eine sinnvolle Alternative dar [36]. Die am häufigsten angewandte Methode besteht aus der perkutanen, fraktionierten Radiotherapie, wobei auch die stereotaktische Radiochirurgie zunehmend an klinischer Bedeutung gewinnt [37]. Allerdings zeigt sich auch bei der strahlentherapeutischen Versorgung ein breites Spektrum an Nebenwirkungen, hier insbesondere der Hypopituitarismus und die Strahlennekrose des umliegenden Gewebes – insbesondere des *Chiasma opticum* [37-39].

Die medikamentöse Therapie zeigt sich in der Therapie von Prolaktinomen als Therapeutikum der ersten Wahl [40]. Gemäß aktueller klinischer Empfehlungen ist der mehrjährige Einsatz von Dopaminagonisten, wie Cabergolin oder Bromocriptin, sinnvoll [22]. Sie führen durch Hemmung der Prolaktinsekretion in der Hypophyse zu einer Normalisierung der Prolaktinspiegel und in über 80% der Fälle auch zu einer signifikanten Volumenminderung des Adenoms. In zahlreichen Studien hat sich Cabergolin deutlich potenter und nebenwirkungsärmer als Bromocriptin gezeigt [22]. Zusätzlich kann eine Substitution von Effektorhormonen bei Suppression der entsprechend darüber geschalteten Hypophysenhormone sinnvoll sein und sollte regelmäßig klinisch und laborchemisch reevaluiert werden.

Häufig findet die medikamentöse Therapie auch als Adjuvanz nach operativer Resektion ihren Einsatz: So kann der Einsatz von Somatostatin-Analoga, wie Octreotid oder Lanreotid, bei operativ unbefriedigenden Ergebnissen und weiterhin bestehender hormoneller Dysregulation bei GH-, TSH- oder ACTH-sezernierenden Adenomen in einer Symptombesserung der Endokrinopathie resultieren [41, 42].

Bei steigender Diagnosestellung von Inzidentalomen gewinnt auch zunehmend die *wait & scan* – Strategie an Bedeutung, wobei dies in den Fachgesellschaften intensiv diskutiert wird [13]. Hierbei wird insbesondere die Frage nach der Notwendigkeit therapeutischer Interventionen bei klinisch asymptomatischen

Patienten in Bezug auf das Risiko eines im Verlauf möglicherweise infiltrativen Wachstums auf der einen und einem potentiell vermeidbaren Operationsrisiko auf der anderen Seite diskutiert.

Ein Problem der zur Verfügung stehenden therapeutischen Modalitäten ist die mögliche Tumornähe zu den vulnerablen Sehbahnen, zum *Sinus cavernosus* und zum Hypothalamus. Hier ergibt sich das Dilemma, dass es bei Schonung dieser Strukturen zu vitalem Resttumorgewebe kommen kann, was die Rezidivraten in der Größenordnung zwischen 10 und 30% erklärt [29].

1.3 Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie

Erste Beschreibungen der Nutzung von Licht als Therapeutikum gehen zurück auf das antike Griechenland, Ägypten und Indien, wo Licht im Rahmen von diversen Hauterkrankungen eingesetzt wurde. 1900 beschrieb erstmals Oscar Raab als Begründer der modernen Photodynamischen Therapie (PDT) den durch die Kombination von Acridin und Licht resultierenden letalen Effekt auf Malaria-verursachende Protozoen [43]. Durch die zwei Weltkriege in der Forschung zurückgeworfen, wurden erst in den 50er-Jahren des 20. Jahrhundert entscheidende Fortschritte in der Photodynamischen Diagnostik (PDD) und PDT gemacht: Rasmussen-Taxdal *et al.* konnten in ersten Studien zeigen, dass es bei Einsatz des Photosensibilisators Hämatoporphyrin Hydrochlorid (HpD) zu einer gesteigerten Fluoreszenz in malignen Tumoren kommt [44]. Dieses Prinzip wurde in den darauf folgenden Jahrzehnten stetig vertieft und mit weiteren Photosensibilisatoren und Indikationsgebieten getestet, sodass dieses schließlich seinen Weg in die Neurochirurgie fand [45].

1.3.1 Grundlagen und Entwicklung

Mittlerweile hat die PDD und PDT insbesondere in der Dermatologie, Urologie und der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren, aber auch in der Neurochirurgie Einzug in den klinischen Alltag gefunden. Insbesondere die intraoperative Fluoreszenzdiagnostik mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) hat sich durch verbesserte Resektionsergebnisse in der Gliomchirurgie etabliert und zählt mittlerweile als

Standarddiagnostikum im intraoperativen *Setting* [46, 47]. Durch erfolgreiche Etablierung des 5-ALA im Rahmen der PDD rückten Versuche mit 5-ALA in Bezug auf eine PDT in den Fokus der Forschung. Erste Studien bei Gliompatienten, die 5-ALA-PDT mit der derzeitigen Standardtherapie, bestehend aus operativer Resektion und anschließender kombinierter Radiochemotherapie, verglichen, konnten signifikante Überlebensvorteile bei Patienten mit Rezidiv-Glioblastom aufzeigen [48].

Grundsätzlich beruht das Prinzip der PDT als therapeutische Maßnahme zur Behandlung von Neoplasien auf 3 Komponenten:

- Einsatz eines Photosensibilisators respektive eines Stoffes, der zum Photosensibilisator metabolisiert
- hochenergetisches Licht
- Vorhandensein von Sauerstoff

Die Kombination der Komponenten führt zur Erzeugung einer phototoxischen Reaktion, die letztlich zur Apoptose der neoplastischen Zellen führen soll.

1.3.2 Hämoglobin-Biosynthese und Veränderungen in neoplastischen Zellen

Die Ausgangssubstrate der im Mitochondrium stattfindenden Hämoglobin-Biosynthese sind jeweils 8 aus dem Citratzyklus stammende Moleküle Succinyl-Coenzym A und Glycin. Mithilfe der 5-ALA-Synthase, die gleichzeitig den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Hämoglobin-Biosynthese darstellt und durch Häm eine negative Rückkopplung erfährt, werden diese Substrate zu 4 Molekülen 5-ALA kondensiert [49]. Dieses 5-ALA gelangt aus dem Mitochondrium ins Zytosol. Dort wird es über mehrere enzymatische Zwischenschritte und weitere Kondensationen zu Coproporphyrinogen III weiter metabolisiert. Dieses wird schließlich zurück in das Mitochondrium transportiert. Dort wird dann über einen weiteren Zwischenschritt photosensibles Protoporphyrin IX (PpIX) gebildet, welches den charakteristischen Porphyrinring beinhaltet.

Aus diesem wird durch die Ferrochelatase unter Zuführung eines Eisenions (Fe^{2+}) das Häm-Molekül synthetisiert. Dieses ist für den Sauerstofftransport der Erythrozyten von entscheidender Bedeutung (s. Abb. 4) [49].

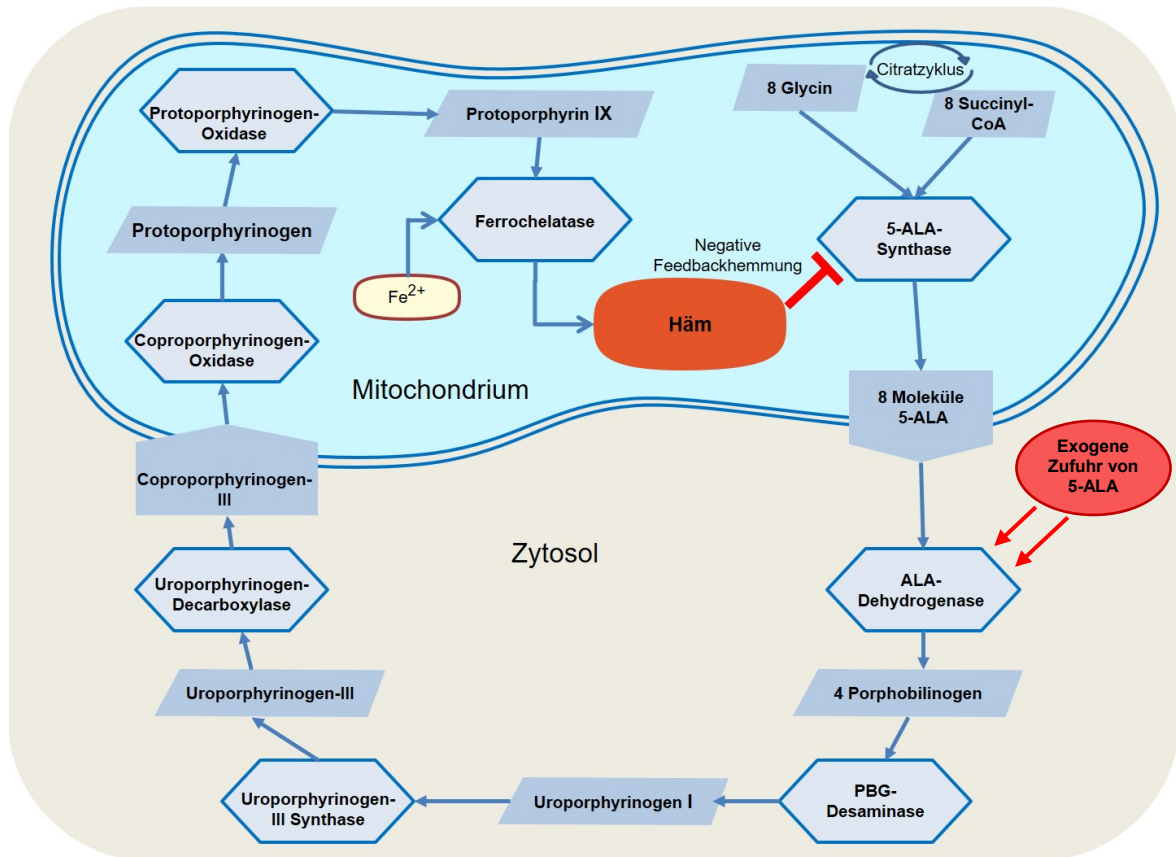


Abb. 4: Darstellung der physiologischen Hämoglobin-Biosynthese im Mitochondrium und Zytosol. Endprodukt ist das Häm, welches eine negative Feedback-Hemmung auf die 5-ALA-Synthase ausübt. Entscheidender Aspekt bei der PDD/PDT ist die exogene Zufuhr von 5-ALA (rot) zur gesteigerten Synthese von PpIX. Modifiziert nach [49]

Mehrere Studien zeigten, dass es in neoplastischen Zellen bei exogener Zugabe von Derivaten des PpIX, wie beispielsweise 5-ALA, welches selbst noch keinen Photosensibilisator darstellt, zu einer selektiven Anreicherung von PpIX kommt [50]. Wenngleich der vollständige Mechanismus nicht vollends geklärt ist, ist unter anderem eine reduzierte Ferrochelataseaktivität und die Mindereexpression bestimmter Transporterproteine für die Anreicherung verantwortlich [51, 52]. Dieser Effekt wird durch die exogene 5-ALA-Zufuhr durch Erschöpfung der verbleibenden enzymatischen Aktivität verstärkt [51]. Diese Aspekte lassen sich durch die exogene Zufuhr von 5-ALA als physiologischem Teil der Häm-Biosynthese und daraus resultierender Anreicherung von PpIX im Tumorgewebe nutzbar machen.

Durch die Anreicherung des PpIX als Photosensibilisator ist die zelluläre Grundlage der PDD und PDT geschaffen [53].

1.3.3 Photosensibilisatoren

Ziel einer Substanz, die letztlich im Rahmen einer PDT als Photosensibilisator optimal genutzt werden kann, soll es sein:

- eine möglichst hohe Akkumulation des Photosensibilisators zu erreichen
- und gleichzeitig ein günstiges Nebenwirkungsprofil zu besitzen [54].

PpIX als exogen zuzuführende Substanz hat sich als Photosensibilisator in zahlreichen Versuchen bewährt, zeitgleich zeigt sich im Rahmen der *in-vivo* Anwendung ein unvorteilhaftes Nebenwirkungsspektrum, sodass bereits frühzeitig auf Substrate, die erst in *in-situ* zu PpIX metabolisiert werden, ausgewichen wurde [55, 56].

Grundlage der meisten therapeutisch eingesetzten Photosensibilisatoren ist die Nutzung eines Tetrapyrrol-Ringes. Ziele dieser Vorläufersubstanzen sind:

- eine Akkumulation von photosensiblen PpIX zu erreichen,
- über ein starkes Absorptionsmaximum im Rot- bis Infrarotspektrum (650 bis 800nm) zu verfügen,
- und gleichzeitig ein günstiges Nebenwirkungsprofil zu besitzen [54].

Als Photosensibilisator der ersten Generation etablierte sich das sogenannte „Hämatoporphyrinderivat“ (HpD), in seiner reineren Form schließlich Photofrin® (Pinnacle Biologics/Bioprojet Pharma, Chicago, USA), welches metabolisch ähnliche Eigenschaften wie PpIX aufweist und als Photosensibilisator selbst im Tumorgewebe akkumuliert. Insbesondere sein niedriger Absorptionskoeffizient bei einer Wellenlänge von $\lambda = 630\text{nm}$ und damit die Notwendigkeit der Nutzung von sehr

hohen Konzentrationen von Sensibilisator und Licht zeigt sich ungünstig. Die daraus resultierende ausgeprägte Photosensibilität der Haut, die bei den Patienten oft für mehrere Wochen bis Monate persistiert, offenbart sein ungünstiges Nebenwirkungsprofil und bestärkte die Bestrebungen nach alternativen Substanzen [56]. Allerdings findet auch heute noch weltweit Photofrin® seinen klinischen Einsatz in der PDD und PDT [57]. Als Porphyrinderivat der zweiten Generation hat sich vor rund 30 Jahren 5-ALA als bereits bekannter physiologischer Metabolit der Häm-Biosynthese für die medizinische Anwendung etabliert [58, 59]. 5-ALA kann nach exogener Zufuhr – analog zum endogenen 5-ALA – im Rahmen der Häm-Biosynthese zum eigentlichen Photosensibilisator PpIX metabolisiert werden. Durch ein deutlich günstigeres Nebenwirkungsprofil sowie höhere Selektivität im Absorptionsspektrum bei der topischen sowie auch oral-systemischen Applikation hat sich 5-ALA heute weltweit etabliert [60, 61]. Aktuelle Bestrebungen untersuchen die Optionen der Entwicklung von Photosensibilisatoren der dritten Generation, bei denen Photosensibilisatoren mit Antikörpern oder biologischen *target*-Molekülen vereint werden.

Es befinden sich zurzeit zahlreiche weitere Substanzen, wie Chlorine, Phtalocyanine oder auch synthetische Farbstoffe in der klinischen Erprobung. Auch natürliche Substanzen wie Hypericin, welches als Wirkstoff des Johanniskrauts in der Therapie von Depressionen etabliert ist, oder Riboflavin werden eingesetzt [57] und wurden auch schon in der Therapie von Hypophysenadenomen sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* getestet [62, 63].

1.3.3.1 5-Aminolävulinsäure

Die Wirkung von exogen zugeführtem 5-ALA im Rahmen der PDD als physiologischen Bestandteil der Hämbiosynthese beruht auf folgendem Prinzip: Der negative Rückkopplungsmechanismus auf die 5-ALA-Synthase durch das Häm wird durch exogene Zufuhr von 5-ALA umgangen. So kommt es zur Akkumulation von PpIX bei insgesamt verminderter Ferrochelatase-Aktivität in Tumorzellen und gleichzeitiger Erschöpfung der Eisenvorräte bei insgesamt erhöhter Stoffwechselaktivität für die Häm-Biosynthese [61]. Dadurch wird der *Feedback*-Mechanismus obsolet. 5-ALA und das daraus resultierende PpIX verfügt über ein

Absorptionsspektrum von Licht der Wellenlänge $\lambda = 400\text{nm}$ und ein Emissionsspektrum zwischen $\lambda = 536$ und 700nm . Das Absorptionsspektrum wird sich bei der PDD zu Nutzen gemacht, indem Tumorgewebe, welches selektiv PpIX akkumuliert, zur Fluoreszenz angeregt werden kann [50]. Das Emissionsspektrum hingegen ist für die PDT von entscheidender Bedeutung.

Durch sein günstiges Nebenwirkungsspektrum ist 5-ALA als einziger porphyrin-basierter Photosensibilisator in der topischen Anwendung zugelassen und findet daher insbesondere in der Dermatologie seine Anwendung [64]. Aber auch in der Gliomchirurgie wird 5-ALA durch die günstigen Absorptionsspektren, insbesondere in der PDD, in klinischen Studien eingesetzt [47, 60].

1.3.4 Fluoreszenzentstehung und Prinzip der PDT

Das Prinzip der PDT beruht auf der topischen oder systemischen Zugabe eines Photosensibilisators, welche zur selektiven Akkumulation im Tumorgewebe führt. Aufgabe dieses Photosensibilisators ist die Absorption von Licht. Im Falle des 5-ALA mit Licht einer Wellenlänge $\lambda = 405\text{nm}$ zur PDD und $\lambda = 635\text{nm}$ zur PDT. Durch Aufnahme eines Photons gelangt dieses in einen angeregten Singulettzustand. Dieser Zustand ist sehr instabil und dauert aufgrund von Relaxationsmechanismen und Abgabe von Fluoreszenzlicht, welches für die PDD genutzt werden kann, nur wenige Pikosekunden an. Durch die sogenannte Interkombination (*intersystem crossing*), welche den Spinwechsel des angeregten Elektrons herbeiführt, ist allerdings auch ein Übergang in den weniger energiereichen Triplett-Status möglich. Dieser Triplettstatus ist zwar weniger energiereich, hat jedoch eine längere Überlebenszeit von einigen Millisekunden. Auch in diesem Zustand ist ein erneuter Spinwechsel möglich, welcher sich in der Phosphoreszenz des Stoffes zeigt [65]. Durch die lange Überlebenszeit ist jedoch auch eine Interaktion in zweierlei Wegen mit molekularem Sauerstoff möglich, welche letztlich in einer photochemischen und -toxischen Reaktion resultiert (s. Abb. 5):

Die sog. Typ-I-Reaktion beschreibt die Reaktion zwischen dem angeregten Photosensibilisator und einem Substratmolekül, auf das ein Elektron oder Wasserstoffatom transferiert wird. Hieraus entstehen zahlreiche Radikale, wie Superoxidanionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale ($\text{OH}^\cdot$).

Bei der Typ-II-Reaktion kommt es zu einer direkten Energieübertragung des angeregten Photosensibilisatormoleküls auf Sauerstoff, was in der Entstehung eines Singulett-Sauerstoffs ($^1\text{O}_2$) und der Rückführung des Photosensibilisators in seinen unerregten Grundzustand resultiert [66].

Durch die Bildung der zahlreichen Radikale kommt es durch oxidativen Stress zu apoptotischen und nekrotischen Prozessen im behandelten Tumorgewebe. Gesundes Gewebe bleibt durch die physiologischen Metabolisierungsmöglichkeiten des 5-ALA in Häm (bei normaler Ferrochelatase-Funktion und ausreichenden Eisenvorräten) von der PDT unberührt, sodass von einer hohen Tumorselektivität auszugehen ist [64, 67]. Im Mechanismus der phototoxischen Reaktion offenbart sich auch die Eindringtiefe des Lichtes von 5-10 mm als entscheidender und therapielimitierender Faktor [68, 69]: Insbesondere bei oberflächlichen oder intraoperativ gut darstellbaren Tumoren, bei denen mit geringer Eindringtiefe vom Operationsfeld ausgehend interveniert werden kann, zeigt die PDT ihre Stärken.

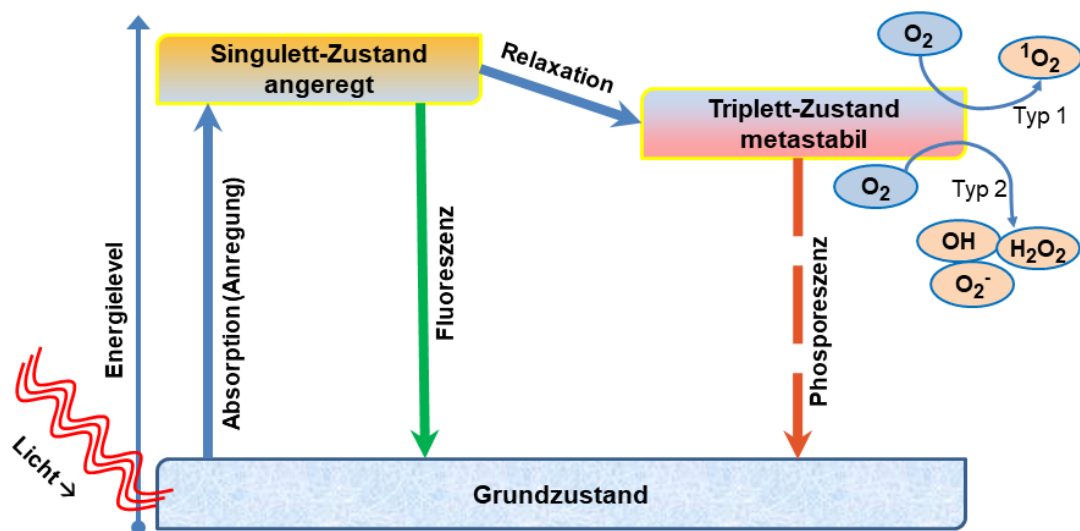


Abb. 5: Wirkungsprinzip der Photodynamischen Therapie und Fluoreszenzentstehung bei Zugabe eines Photosensibilisators unter Präsenz von hochenergetischem Licht. Modifiziert nach [65]

1.3.5 Nutzungsansätze in der Neurochirurgie

Insbesondere die PDD hat sich in der Neurochirurgie etabliert. Im Rahmen der fluoreszenz-gestützten Resektion (*fluorescence guided surgery*, FGS) wird 5-ALA zur gezielten, intraoperativen Tumordetektion in der Gliomchirurgie und experimentell bei Meningeomen zur Verbesserung des operativen Resektionsergebnisses eingesetzt [46, 70]. Insbesondere Stummer *et al.* konnten in einer Phase-III-Studie nachweisen, dass mithilfe der 5-ALA-PDD ein signifikant höherer Resektionsgrad und ein höheres rezidivfreies Intervall sowie Gesamtüberleben erreicht werden konnten [46, 47]. Auch die Quantifizierung des intraoperativen Fluoreszenzsignals als möglichen Marker für die Tumormasse und zur gezielten Bestimmung von Infiltrationsgrenzen wurde in klinischen Studien untersucht [71, 72].

Es zeigten sich erste vielversprechende Ergebnisse in der Anwendung der 5-ALA-PDT im Rahmen der Gliomchirurgie [46, 70, 73], bei denen bereits mehrere Studien ein signifikant besseres Gesamtüberleben der zusätzlich zur Operation mit PDT-behandelten Patienten aufzeigen konnten. Allerdings waren die Fallzahlen der Studien zu gering, um allgemeine Behandlungsempfehlungen daraus ableiten zu können. Aktuell befindet sich eine multizentrische, prospektive Phase-IIb-Studie in der Planung, die Sicherheit und Effizienz der stereotaktischen 5-ALA-PDT in Rezidivsituationen bei Glioblastompatienten untersucht (NOA-11, EudraCT-Nr.: 2015-002727-25). Diese Studie stellt einen entscheidenden Schritt im Fortschritt der 5-ALA-PDT bei intrazerebralen Prozessen dar.

Die 5-ALA-PDD bei Hypophysenadenomen wurde erstmalig 2009 durch Eljamel *et al.* beschrieben und zeigte in einer kleinen Studienpopulation von 30 Patienten ein positives Fluoreszenzsignal nach präoperativer 5-ALA-Gabe [74].

Die PDT bei Hypophysenadenomen wurde kaum untersucht. Erste *in-vivo*-Studien zeigten bei einer PDT mit Photofrin® sowie Hypericin eine grundsätzliche Wirksamkeit [62, 75]. Eine Untersuchung der 5-ALA-PDT bei Hypophysenadenomen hat nach unserem Kenntnisstand bisher nicht stattgefunden.

1.4 Ziele der Arbeit

Auf Grundlage der eben ausgeführten Überlegungen war die Untersuchung der Photodynamischen Therapie an Hypophysenadenomzellen Hauptziel der Arbeit. Aufgrund des günstigen Nebenwirkungsprofils von 5-ALA wurde es als Photosensibilisator ausgewählt. Es wurde mit einem Tumorzellkultur-Modell *in vitro* gearbeitet.

Im Einzelnen sollten hierbei folgende Fragestellungen untersucht werden:

- 1.) Untersuchung der Wirksamkeit der 5-ALA-PDT anhand der GH3-Zelllinie der Ratte in einem *in-vitro* Modell (*proof of principle*),
- 2.) Testung und Optimierung unterschiedlicher PDT-Parameter in diesem *in-vitro* PDT Modell,
- 3.) Etablierung des *in-vitro* PDT-Modells an primären humanen Adenomenzellen,
- 4.) Serienmäßige Durchführung der 5-ALA-PDT *in-vitro* an primären humanen Adenomenzellen

Die Studie wurde vom Ethikkomitee der Universität Düsseldorf genehmigt (# 4290, 11. Juni 2013).

Dieser Dissertation liegt eine Originalpublikation zugrunde, die im Folgenden in voller Länge abgedruckt ist. Es schließen sich eine vertiefende Diskussion sowie die Schlussfolgerungen an.

- 2 Publierte Originalarbeit: Efficacy of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in pituitary adenomas — experimental study on rat and human cell cultures, Neumann LM, Beseoglu K, Slotty PJ, Senger B, Kamp MA, Hänggi D, Steiger HJ, Cornelius JF., Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 2016, Volume 14, 77 – 83**



Efficacy of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in pituitary adenomas—experimental study on rat and human cell cultures



Lisa Margarete Neumann^a, Kerim Beseoglu^a, Philipp Joerg Slotty^a, Brigitte Senger^a, Marcel Alexander Kamp^a, Daniel Hänggi^{a,b}, Hans Jakob Steiger^a, Jan Frederick Cornelius^{a,*}

^a Department of Neurosurgery, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University, Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf, Germany

^b Department of Neurosurgery, Medical Faculty, Ruprecht-Karls-University Heidelberg, Theodor-Kutzer-Ufer 1-3, 68167 Mannheim, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 December 2015

Received in revised form 13 February 2016

Accepted 17 February 2016

Available online 22 February 2016

Keywords:

5-ALA

PDT

Photodynamic therapy

Pituitary adenoma

Recurrence

ABSTRACT

Background: Incomplete resection of pituitary adenomas may result in recurrence. As adjuvant irradiation is not riskless, alternative treatment options should be investigated. 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy (5-ALA based PDT) showed promising results for malignant gliomas. The present study examined the efficacy of 5-ALA PDT *in vitro* on benign pituitary adenoma cell cultures.

Methods: In group I experiments were performed on immortalized rat pituitary adenoma cells (GH3). The cultured cells were treated with different 5-ALA concentrations ranging from 7.5–16.5 µg/ml. In Group II human pituitary adenoma cell cultures were obtained from surgically resected adenoma tissue ($n = 15$). These were incubated with 5-ALA concentrations from 12.5–100 µg/ml. The concentration ranges had been determined in preliminary dose-finding tests. For both groups incubation time was four hours and PDT was performed by exposition to laser light (635 nm, 625 s, 18.75 J/cm²). Cell viability was examined by WST-1 assay.

Results: In both groups PDT showed a 5-ALA concentration-dependent effect on cell death. In group I lower 5-ALA concentrations were necessary to destroy all cells as compared to group II. Moreover, in group II, the different subtypes of human adenomas showed different sensitivities to 5-ALA-based PDT (secreting vs. non-secreting). Especially corticotroph adenomas were highly sensitive to 5-ALA PDT.

Conclusions: The GH3 cell line was an useful *in vitro* model to optimize different PDT parameters. Human pituitary adenoma cells could also be killed by 5-ALA PDT, however this required higher 5-ALA concentrations. Furthermore, the results suggested different 5-ALA sensitivities between different human adenoma cell types. More experiments are necessary to confirm these preliminary results.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pituitary adenomas represent approximately 16% of all intracranial tumors [1]. Although pituitary adenomas are slow-growing benign tumors, they should be resected if symptomatic or growing in serial neuroimaging. Previous studies showed that complete resection may be hindered around the cavernous sinus and

the optic nerve harboring a risk of recurrence [2] [3]. Adjuvant radiotherapy of incompletely resected adenomas may cause hypopituitarism and/or radionecrosis [4,5].

Therefore alternative adjuvant treatments should be investigated [6,7]. Photo-dynamic therapy (PDT) is a well-studied local cancer treatment for skin, bladder and GIT tumors [8–10]. For pituitary tumors experience is still limited [3,11–15]. Two former studies revealed that PDT with hypericin resulted in cell death of subcutaneous implanted human pituitary adenoma cells in mice [12,16]. Despite encouraging preliminary results PDT for pituitary adenoma in a clinical setting has not been further pursued [3].

* Corresponding author at: Neurosurgical Department, University Hospital Düsseldorf, Heinrich Heine University, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany. Fax: + 49 211 8119298.

E-mail addresses: cornelius@hhu.de, janfcornelius@yahoo.com (J.F. Cornelius).

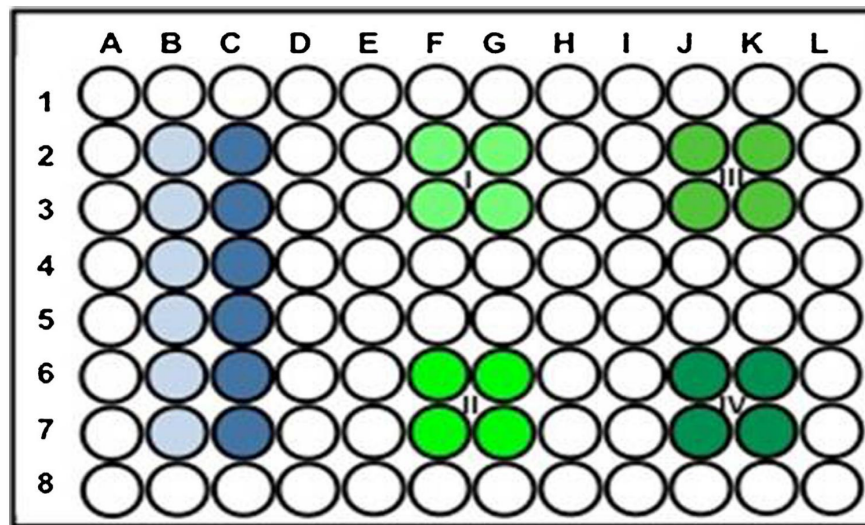


Fig. 1. Graphic illustration of the 96-well microplate; row of medium-filled blank (light blue), row of negative control with untreated cells (dark blue), four blocks with cells and different 5-ALA concentrations for PDT (different green colors).

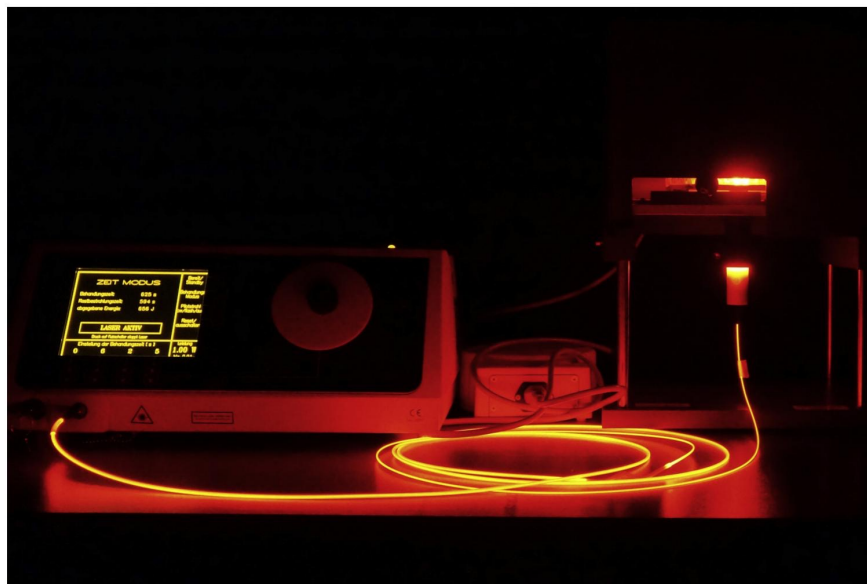


Fig. 2. Irradiation setup during PDT: Laser (left), fiberglass probe (middle), 96-well plate in the irradiation chamber (right).

More clinical experience exists for 5-ALA based photodiagnosis and photodynamic therapy of gliomas [17–24]. Meanwhile 5-aminolevulinic acid has proven safe and effective in daily neurosurgical routine of glioma surgery. It was authorized in the European Community for fluorescence-guided resection of malignant gliomas [23].

Therefore we proposed to investigate 5-ALA based PDT in pituitary adenomas. We screened the efficacy of 5-ALA PDT in rat pituitary adenoma cells (GH3 cell line). Furthermore, we studied 5-ALA PDT of pituitary adenoma cells which were obtained from operated patients.

2. Material and methods

2.1. Ethical

The study was approved by the local ethic committee (study 4290, 11th June 2013). Informed and written consent was obtained pre-operatively from each patient.

2.2. Materials

Collagenase solution and HDB buffer were obtained from the central hospital pharmacy. 5-Aminolevulinic acid (5-ALA) was delivered from Merck, Darmstadt, Germany. Dulbecco's modified

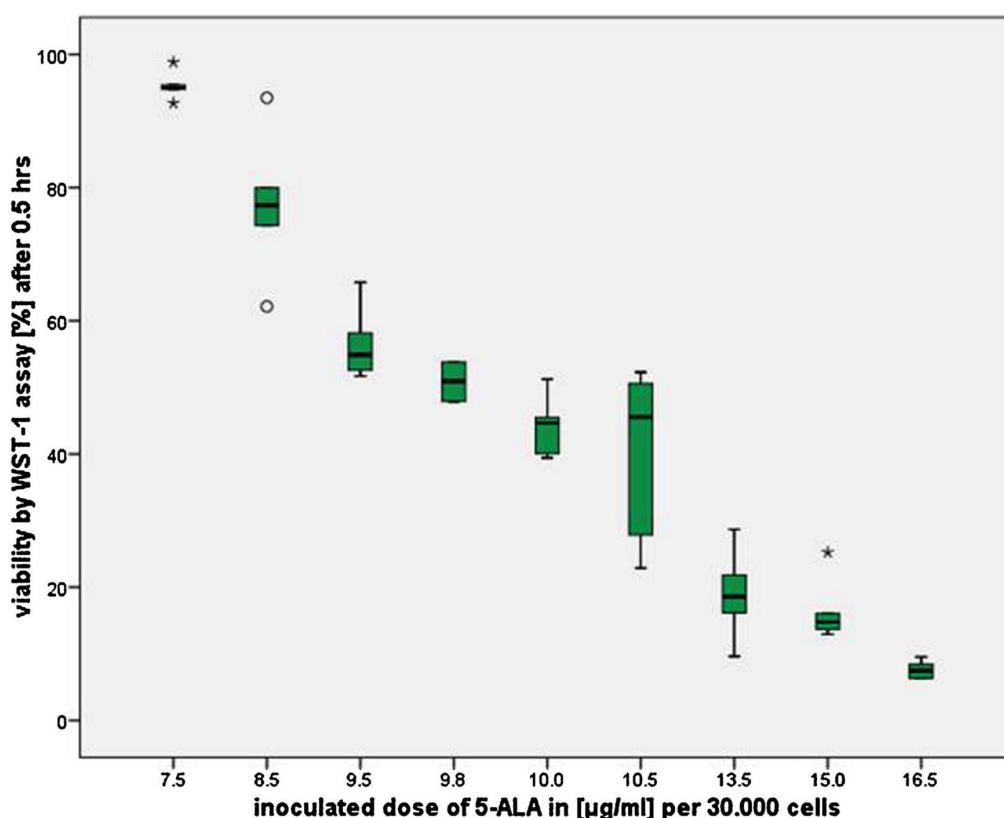


Fig. 3. Effect of 5-ALA PDT on GH3 cell line for different 5-ALA concentrations as measured by WST-1 cell viability assay. Y-axis: relative extinction (low relative extinction corresponds to low cell viability), x-axis: different 5-ALA concentrations.

Table 1

Group I (GH3 cell line): viability rate in percent (mean, standard deviation in brackets) as measured by WST-1 assay for different ALA concentrations.

[ALA] in µg/ml	7.5	8.5	9.5	9.8	10.0	10.5	13.5	15.0	16.5
Cell viability in %	94.97 (2.07)	82.57 (6.87)	56.32 (5.23)	50.87 (2.75)	45.99 (4.24)	40.93 (9.30)	18.7 (5.44)	15.38 (5.89)	6.88 (2.63)

Eagle's medium (DMEM), Minimum essential medium (MEM) Vitamin Solution, MEM Non-Essential Amino Acids Solution (NEAA), Partricin and GlutaMax™ were products from GIBCO® invitrogen, Paisley, UK. ZellShield™ and Fetal bovine serum (FBS) were delivered from Biochrom®, Berlin, Germany. Other substances were standard laboratory equipment.

2.3. Group I: cell culture of rat GH₃ cells

Pituitary adenoma cells of rats (GH₃) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum, 1% GlutaMax™, 1% Partricin and 1% ZellShield™ as described before [25]. When the culture reached a cell density of 80% cells were split and prepared for experiments. Cells were seeded in a 96-well microplate. Disturbance by scattered light from neighboring wells were avoided by leaving two rows of wells between the filled wells (Fig. 1).

Negative control and treatment wells were filled with 100 µl of cell solution corresponding to 30,000 cells per well. The blank wells were filled with 100 µl of the colorless medium solution. The 96-well microplate was incubated for 68 h at 37 °C in 5% CO₂.

2.4. Pituitary adenomas

Between 1st February 2014 and 31st July 2015 tissue of 15 patients was included in the study. The series was not consecutive, because of lacking consent or insufficient material for cultivation in some cases. Only patients with histologically confirmed pituitary adenoma tissue were included.

2.5. Group II: cell culture of human pituitary adenoma

After tumor resection pituitary adenoma cells were prepared for cultivation according to a protocol adapted from Vale et al. [26]. In preliminary experiments with GH₃ and human adenoma cells we established the following procedure: Tissue was washed by HDB and PBS and separated from macroscopically visible blood and connective tissue before being minced with scissors. Collagenase solution was used for enzymatic preparation of dissociated cell suspension for 30 min. To remove the collagenase solution Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum, 1% GlutaMax™, 1% Partricin and 1% ZellShield™ as described before was used to wash the tissue and was centrifugated 3 min three times at 1000 min⁻¹/160G. In order to avoid contamination by non-digested tissue the cell suspension was filtered with a 100 µm filter

after first wash. The remaining cell pellet was re-suspended in medium solution as used for GH3-cultivation however with additional 1% MEM and 1% NEAA. This was filled in a 96-well microplate with 100 μ l of cell solution corresponding to 10,000 cells per well. Blank wells were filled with 100 μ l of colorless medium solution. Further experiences showed same results with 30,000 cells per well. The 96-well microplate was incubated for 90 h at 37 °C in 5% CO₂.

2.6. Photodynamic therapy (PDT)

After incubation cells were treated with 50 μ l of a 5-ALA dilution (0.5 g 5-ALA powder (hospital pharmacy) were dissolved in 10 ml aqua dest and diluted by DMEM).

In group I cells were added 5-ALA solution with concentrations between 7.5 and 16.5 μ g/ml. The number of experiments was $n=6$ for concentrations of 9.5 and 9.8 μ g/ml, $n=10$ for 7.5 and 10.0 μ g/ml, $n=15$ for 8.5 μ g/ml, $n=16$ for 15.0 μ g/ml and $n=20$ for 10.5 and 13.5 μ g/ml (and each of those was done in four wells). Negative controls were [1], untreated cells, [2] cells with 9.8/10/15 μ g/ml 5-ALA only and [3] cells with laser irradiation only. The number of negative controls was $n=10$.

In group II cells were treated with 5-ALA-concentrations ranging between 12.5 and 100 μ g/ml. The following concentrations were tested: 12.5, 25, 50, 75 and 100 μ g/ml (each concentration $n=4$). The number of negative controls was $n=6$.

Blank and control cells were filled with 50 μ l of DMEM. The microplate was incubated for four hours in a CO₂ incubator. The time of four hours was defined after pre-liminary flow cytometry analysis had shown a maximum 5-ALA uptake for that incubation time. Before irradiation primary cells were washed to minimize interference of free, extracellular 5-ALA. The microplate was centrifuged (3 min, 1000 min⁻¹/160G), supernatant was vacuumed and wells were refilled with 100 μ l DMEM. We figured out that this step is not necessary with a higher cell count (e.g., 30,000 cells/well), so that GH3 cells were not washed before irradiation.

The irradiation setup corresponded to a standard protocol that we had validated for glioma and meningioma cell lines [27,28]: In brief the PDT unit was custom made by Welabo GmbH (Düsseldorf, Germany). It is based on a diode laser (Ceralas 635 Lasersystem, BioLitec GmbH, Jena, Germany) with light emission at a wavelength of 635 nm through a fiberglass probe with a diffusor lens. The well is placed above the lens and covered by a dark irradiation chamber (Fig. 2).

The fiberglass was positioned with a distance of 93 mm to the 96-well microplate and achieved an intensity of 30 mW/cm² for 625s resulting in a total radiation dose of 18.75 J/cm². After irradiation the microplate was incubated for 60 min.

2.7. Cell viability assay

To quantify cell viability after PDT the colorimetric assay WST-1 (water soluble tetrazolium salt, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) was used. Light red colored tetrazolium salt is cleaved to dark red colored formazan by enzymes of living cells. The color change can be photometrically quantified by a scanning multiwell spectrophotometer (wavelength 450 nm, Microplate ELISA reader 680XR, Bio-Rad, Munich, Germany) and is proportional to the count of metabolically active cells. The ratio of living cells was calculated as compared to untreated controls and blanks (no cells) to eliminate background absorbance. In group I the cell viability was measured 0.5 h after treatment with WST-1, whereas group II was measured 2 h after treatment with WST-1 to reach higher extinctions due to lower cell count.

Table 2

Group II (primary tumor cells): viability rate in percent (mean, standard deviation in brackets) as measured by WST-1 assay for different ALA concentrations.

[ALA] in μ g/ml	12.5	25	50	75	100
Cell viability in %	85.28 (14.66)	68.48 (16.69)	36.29 (13.48)	17.57 (10.02)	9.41 (6.61)

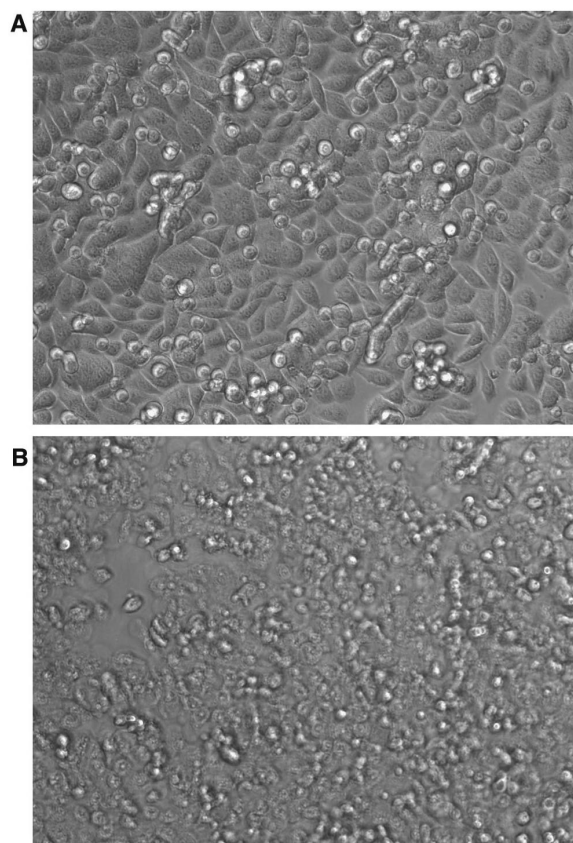


Fig. 4. A and B Sample of GH3 cell line before PDT (A) and one hour after PDT (B) with 5-ALA concentration of [16.5 μ g/ml]; note mainly apoptotic cells after treatment (magnification $\times 200$ -fold).

2.8. Data analysis

SPSS Statistics 22 (IBM Corporation, Somers, CT, USA) was used to perform Chi²-test, Kruskal–Wallis-Test and one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test; $p < 0.05$ and $p < 0.01$ were considered significant and highly significant, respectively. Data was expressed as average $\pm$ standard deviation. Graphs were created using SPSS and GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Effect of 5-ALA based PDT on GH3 cell line

After ALA treatment and irradiation the GH3 cell line showed a significant and dose-dependent decrease in viability rate. The results are summarized in Table 1 and Fig. 3.

For 5-ALA concentration of 8.5 μ g/ml and higher cell viability was highly significantly reduced ($p < 0.01$). Lethal effects of 5-ALA based PDT on cell morphology is illustrated in Fig. 4. For lower

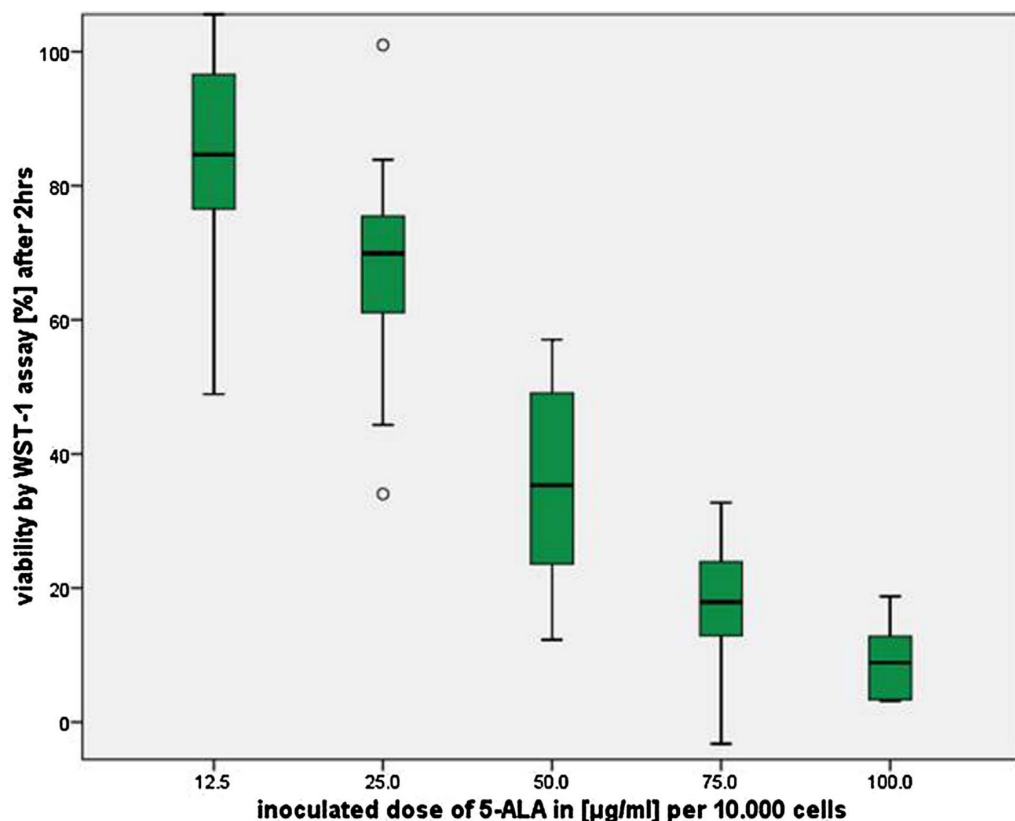


Fig. 5. Effect of 5-ALA PDT on primary tumor cells for different 5-ALA concentrations as measured by WST-1 cell viability assay. Y-axis: relative extinction (low relative extinction corresponds to low cell viability), x-axis: different 5-ALA concentrations.

5-ALA concentration no significant lethal effect was observed. Furthermore negative controls including cells without treatment, cells with 5-ALA only (9.8, 10.0, 15.0 µg/ml) and cells with laser only did not show significant effects. The LD50 for 5-ALA was reached at a concentration of 9.8 µg/ml.

3.2. Material from human pituitary adenomas

The studied population comprised five (33.3%) females and ten (66.7%) males. Age at resection ranged from 33 to 72 years (average: 53.7 years). Five were classified as null cell adenoma, two as corticotroph adenoma, four as gonadotrophic adenoma, two as somatotrophic adenoma and two as chromophobic adenoma by a senior pathologist. All tumors were classified as WHO grade I tumor [29].

3.3. Effect of 5-ALA based PDT on primary human pituitary adenoma cell cultures

All 15 primary cell cultures showed a significant and dose-dependent decrease in viability rate (Table 2, Fig. 5 and 6). LD50 was estimated between 25 and 50 µg ALA/ml. Irradiated cells without 5-ALA treatment did not show any significant toxic effect ($n = 6$, Fig. 5). Cells with 5-ALA treatment but without irradiation did not show any significant effect either. The different subtypes of human adenomas showed different sensitivities to 5-ALA-based PDT *in vitro* (secreting vs. non-secreting). It was remarkable that both corticotroph adenomas were especially sensitive to 5-ALA PDT; almost all cells were killed at a concentration below 75 µg/ml.

4. Discussion

The present study demonstrated, that [1] 5-ALA based PDT showed a dose-dependent highly significant lethal effect on rat GH3 cell line, [2] human pituitary adenoma cell cultures are highly sensitive to 5-ALA based PDT treatment *in vitro* and [3] different histological subtypes of human pituitary adenomas showed a trend to different sensitivities to 5-ALA PDT *in vitro*.

4.1. 5-ALA based PDT of brain tumors

The concept is based on selective light-induced tumor destruction while anatomical and physiological structures are preserved [6,7,17–24]. Furthermore PDT may destroy neo-plastic cells by inducing an adaptive immune response to the antigens of the tumor [23]. This holds potential to destroy tumor cells in the depth which are not directly illuminated. PDT may be considered as primary or adjunct treatment option. It has already been established in dermatological, urological and gastroenterological cancer treatment [8–10]. In neurosurgery 5-ALA based PDT was already used for therapy of recurrent malignant brain tumor [19,20,22].

This concept may also be extended to benign brain tumors such as meningiomas or pituitary adenomas which also show 5-ALA fluorescence [15,30,31]. While experimental 5-ALA PDT was reported for human meningioma cells no larger study exists for human pituitary adenoma cells, which was the rationale for the present study [11,27,30–32].

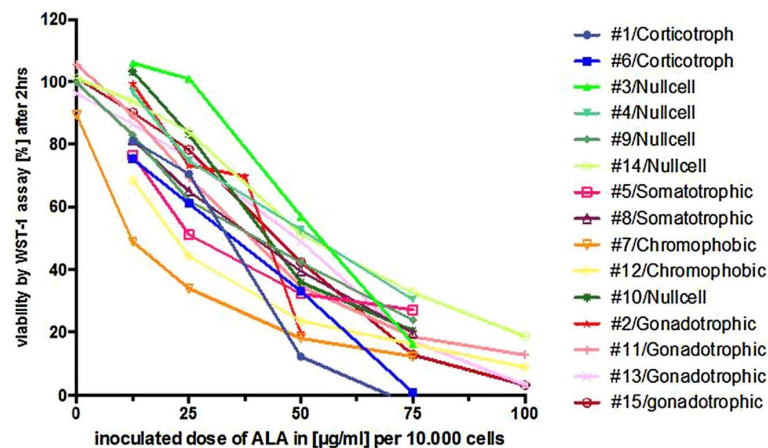


Fig. 6. Effect of 5-ALA based PDT for 15 primary pituitary adenoma cell cultures with different 5-ALA concentrations as measured by WST-1 cell viability assay 2 h after PDT. Y-axis: relative extinction (low relative extinction correlates to low cell viability), x-axis: different 5-ALA concentrations.

4.2. 5-ALA based PDT of pituitary adenomas

Our experimental set-up with immortalized GH3 rat cells and different human pituitary adenoma cells showed a dose-dependent effect of 5-ALA based PDT. We observed that higher concentrations of 5-ALA were necessary to destroy human adenoma cells. The efficacy of 5-ALA based PDT of different adenoma subtypes has to be further investigated. Especially if the observed trend of higher sensitivity of corticotroph adenomas would be confirmed this may open new perspectives because they represent an aggressive subtype [33].

As studies reported accumulation of protoporphyrin IX around blood vessels clinical trials of PDT have to be cautiously planned [34–36]. Special care is required to prevent damage to surrounding structures such as the carotid artery and the optic system.

4.3. Limitations of the present study

Pituitary adenoma tissue was not obtained with a standardized intraoperative protocol. However, due to soft and nearly liquid tumor consistency a standardized sample collection seems not mandatory for representative sampling. The study involved only a small number of patients. Higher patient numbers are necessary to confirm the trend of different sensitivities to 5-ALA PDT for different histological adenoma subtypes. Human pituitary adenoma cell cultures do not perfectly simulate *in vivo* conditions. Firstly, biodistribution and up-take of 5-ALA in human may influence feasibility. However as 5-ALA based fluorescence of pituitary adenomas has already been reported this concern seems of minor importance [15]. Secondly, blood and connective tissue were removed in the experiments. *In vivo* these factors may alter the efficacy of PDT due to light absorption. Such concerns may ultimately only be addressed in a clinical setting.

5. Conclusions

5-ALA based photodynamic therapy showed a dose-dependent effect in a rat pituitary adenoma cell line (GH3) and different primary human pituitary adenoma cell cultures. Neither 5-ALA nor PDT alone did affect cell survival. Further experiments are necessary to confirm the trend to different sensitivities of distinct histological subtypes of pituitary adenomas.

Disclosure

The authors declare that they have no financial interests in the materials, drugs and methods used in the present study.

Acknowledgement

We want to thank the department of neuropathology for excellent collaboration with the histopathological specimens.

References

- [1] Q.T. Ostrom, H. Gittleman, P. Liao, C. Rouse, Y. Chen, J. Dowling, et al., CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007–2011, *Neurooncol* 16 (Suppl. 4) (2014) iv1–63.
- [2] G. Jefferson, Extrasellar extensions of pituitary adenomas: (section of neurology), *Proc. R. Soc. Med.* 33 (7) (1940) 433–458.
- [3] P.V. Marks, P.E. Belchetz, A. Saxena, U. Igbaseimokumo, S. Thomson, M. Nelson, et al., Effect of photodynamic therapy on recurrent pituitary adenomas: clinical phase I/II trial—an early report, *Br. J. Neurosurg.* 14 (4) (2000) 317–325.
- [4] O. al-Mefty, J.E. Kersh, A. Routh, R.R. Smith, The long-term side effects of radiation therapy for benign brain tumors in adults, *J. Neurosurg.* 73 (4) (1990) 502–512.
- [5] K.O. Lillehei, D.L. Kirschman, B.K. Kleinschmidt-DeMasters, E.C. Ridgway, Reassessment of the role of radiation therapy in the treatment of endocrine-inactive pituitary macroadenomas, *Neurosurgery* 43 (3) (1998) 432–438, discussion 8–9.
- [6] R.R. Allison, Fluorescence guided resection (FGR): a primer for oncology, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.11.008>, pii: S1572-1000(15)30051-X [Epub ahead of print].
- [7] R.R. Allison, K. Moghissi, Oncologic photodynamic therapy: clinical strategies that modulate mechanisms of action, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 10 (4) (2013) 331–341.
- [8] A.M. Abulafi, M.L. DeJode, J.T. Allardice, J.K. Ansell, N.S. Williams, Adjuvant intraoperative photodynamic therapy in experimental colorectal cancer using a new photosensitizer, *Br. J. Surg.* 84 (3) (1997) 368–371.
- [9] E. Szliszka, Z.P. Czuba, A. Kawczyk-Krupka, K. Sieron-Stoltny, A. Sieron, W. Krol, Chlorin-based photodynamic therapy enhances the effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in bladder cancer cells, *Med. Sci. Monit.* 18 (1) (2012) BR47–53.
- [10] C. Matei, M. Tampa, T. Poteca, G. Panea-Paunica, S.R. Georgescu, R.M. Ion, et al., Photodynamic therapy in the treatment of basal cell carcinoma, *J. Med. Life* 6 (1) (2013) 50–54.
- [11] S. Marbacher, E. Klinger, L. Schwyzer, I. Fischer, E. Nevzati, M. Diepers, et al., Use of fluorescence to guide resection or biopsy of primary brain tumors and brain metastases, *Neurosurg. Focus* 36 (2) (2014) E10.
- [12] R.W. Kirolos, P.V. Marks, U. Igbaseimokumo, A. Chakrabarty, A preliminary experimental *in vivo* study of the effect of photodynamic therapy on human pituitary adenoma implanted in mice, *Br. J. Neurosurg.* 12 (2) (1998) 140–145.
- [13] P.V. Marks, Adjuvant therapy for pituitary adenomas: the possible role of photodynamic therapy, *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 77 (4) (1995) 308–312.

- [14] P.V. Marks, T. Buxton, C.E. Furneaux, In vitro study of the effect of photodynamic therapy on pituitary adenomas, *Br. J. Neurosurg.* 7 (4) (1993) 401–406.
- [15] M.S. Eljamel, G. Leese, H. Moseley, Intraoperative optical identification of pituitary adenomas, *J. Neurooncol.* 92 (3) (2009) 417–421.
- [16] C.D. Cole, J.K. Liu, X. Sheng, S.S. Chin, M.H. Schmidt, M.H. Weiss, et al., Hypericin-mediated photodynamic therapy of pituitary tumors: preclinical study in a GH4C1 rat tumor model, *J. Neurooncol.* 87 (3) (2008) 255–261.
- [17] T.J. Beck, F.W. Kreth, W. Beyer, J.H. Mehrkens, A. Obermeier, H. Stepp, et al., Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX, *Lasers Surg. Med.* 39 (5) (2007) 386–393.
- [18] H. Stepp, T. Beck, T. Pongratz, T. Meinel, F.W. Kreth, J. Tonn, et al., ALA and malignant glioma: fluorescence-guided resection and photodynamic treatment, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 26 (2) (2007) 157–164.
- [19] W. Stummer, A. Novotny, H. Stepp, C. Goetz, K. Bise, H.J. Reulen, Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients, *J. Neurosurg.* 93 (6) (2000) 1003–1013.
- [20] W. Stummer, U. Pichlmeier, T. Meinel, O.D. Wiestler, F. Zanella, H.J. Reulen, et al., Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial, *Lancet Oncol.* 7 (5) (2006) 392–401.
- [21] W. Stummer, S. Stocker, S. Wagner, H. Stepp, C. Fritsch, C. Goetz, et al., Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence, *Neurosurgery* 42 (3) (1998) 518–525, discussion 25–26.
- [22] M.S. Eljamel, C. Goodman, 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.* 23 (4) (2008) 361–367.
- [23] M.C. Tetard, M. Vermandel, S. Mordon, J.P. Lejeune, N. Reyns, Experimental use of photodynamic therapy in high grade gliomas: a review focused on 5-aminolevulinic acid, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 11 (3) (2014) 319–330.
- [24] B.J. Quirk, G. Brandal, S. Donlon, J.C. Vera, T.S. Mang, A.B. Foy, et al., Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors—where do we stand? *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 12 (3) (2015) 530–544.
- [25] A. Matsuno, A. Mizutani, J. Itoh, S. Takekoshi, T. Nagashima, H. Okinaga, et al., Establishment of stable GH3 cell line expressing enhanced yellow fluorescent protein-growth hormone fusion protein, *J. Histochem. Cytochem.* 53 (9) (2005) 1177–1180.
- [26] W. Vale, G. Grant, M. Amoss, R. Blackwell, R. Guillemin, Culture of enzymatically dispersed pituitary cells: functional validation of a method, *Endocrinology* 91 (2) (1972) 562–572.
- [27] M. El-Khatib, C. Tepe, B. Senger, M. Dibue-Adjei, M.J. Riemenschneider, W. Stummer, et al., Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy of human meningioma: an in vitro study on primary cell lines, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (5) (2015) 9936–9948.
- [28] N. Etminan, C. Peters, J. Ficin, S. Anlasik, E. Bunemann, P.J. Slotty, et al., Modulation of migratory activity and invasiveness of human glioma spheroids following 5-aminolevulinic acid-based photodynamic treatment. Laboratory investigation, *J. Neurosurg.* 115 (2) (2011) 281–288.
- [29] D.N. Louis, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee, P.C. Burger, A. Jouvet, et al., The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system, *Acta Neuropathol.* 114 (2) (2007) 97–109.
- [30] J.F. Cornelius, P.J. Slotty, M.A. Kamp, T.M. Schneiderhan, H.J. Steiger, M. El-Khatib, Impact of 5-aminolevulinic acid fluorescence-guided surgery on the extent of resection of meningiomas—with special regard to high-grade tumors, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 11 (4) (2014) 481–490.
- [31] D. Coluccia, J. Fandino, M. Fujioka, S. Cordovi, C. Muroi, Landolt H: intraoperative 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in meningiomas, *Acta Neurochir.* 152 (10) (2010) 1711–1719.
- [32] J.F. Cornelius, P.J. Slotty, M. El Khatib, A. Giannakis, B. Senger, H.J. Steiger, Enhancing the effect of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in human meningioma cells, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 11 (1) (2014) 1–6.
- [33] H.Y. Cho, S.W. Kim, S.W. Kim, C.S. Shin, K.S. Park, S.Y. Kim, Silent corticotroph adenomas have unique recurrence characteristics compared with other nonfunctioning pituitary adenomas, *Clin. Endocrinol.* 72 (5) (2010) 648–653.
- [34] T. Ando, E. Kobayashi, H. Liao, T. Maruyama, Y. Muragaki, H. Iseki, et al., Precise comparison of protoporphyrin IX fluorescence spectra with pathological results for brain tumor tissue identification, *Brain Tumor Pathol.* 28 (1) (2011) 43–51.
- [35] C. Goetz, A. Hasan, W. Stummer, A. Heimann, O. Kempfski, Experimental research photodynamic effects in perifocal, oedematous brain tissue, *Acta Neurochir.* 144 (2) (2002) 173–179, discussion 9.
- [36] W. Stummer, C. Gotz, A. Hassan, A. Heimann, O. Kempfski, Kinetics of Photofrin II in perifocal brain edema, *Neurosurgery* 33 (6) (1993) 1075–1081, discussion 81–82.

3 Diskussion

Die durchgeführte Studie ergab zusammenfassend folgende Ergebnisse:

- die 5-ALA basierte PDT zeigte einen dosisabhängigen, letalen Effekt auf die untersuchte immortalisierte Rattenzelllinie GH3 (*proof of principle*),
- die Etablierung eines *in-vitro* PDT-Modells von humanen Adenomzellen war erfolgreich möglich,
- eine dosisabhängige Letalität von humanen Hypophysenadenomzellen durch 5-ALA basierte PDT *in-vitro* (Serienuntersuchung) wurde nachgewiesen,
- ein ungleiches Ansprechen auf 5-ALA basierte PDT in Abhängigkeit von der Tumorphistologie wurde beobachtet

3.1 Materialgewinnung und Anzüchten einer Primärzellkultur

In der Literatur sind nach derzeitigem Kenntnisstand keine erfolgreichen, standardisierten Verfahren zur dauerhaften, immortalisierten Kultivierung von Primärzellen ausgehend von humanen Hypophysenadenomen beschrieben. Angelehnt an die von Kim *et al.* sowie Kabuto beschriebenen Verfahren zur Kultivierung von humanem Hypophysen- und Hypophysenadenomgewebe entwickelten wir in Anlehnung an laboreigene Erfahrungen und Standards bei der Gliom- und Meningeomkultivierung ein Verfahren zur Präparation und Kultivierung der Primärzellen [76-78].

Als problematisch erwies sich das zuvor auch bei Kabuto beschriebene Überwachsen von Fibroblasten in der Zellkultur, welches sich trotz weiter entwickelten Filter- und Reinigungsmethoden in der Präparation nicht vollständig beseitigen ließ. So zeigte sich auch in unseren Versuchen – auch aufgrund der

ausgeprägten Seneszenz und des verminderten Wachstumsreiz – dass eine Immortalisierung nicht realisierbar war [76]. Andere Studien lassen den Verdacht auf ein Fehlen des hypothalamischen Wachstums- und Hormonsekretionsreizes als mögliche Ursache der gesteigerten Seneszenz zu [79].

Diese Faktoren erschienen aufgrund unseres Versuchsaufbaus, bei dem die Zellen unmittelbar untersucht wurden, eher unwesentlich. Die Situation *in-vivo* entspricht in vieler Hinsicht nicht einer *in-vitro*-Reinkultur und ist viel komplexer, da *in-vivo* von Unterschieden in der Tumorzellkonzentration, anderen Zell-populationen (z.B. Fibroblasten) sowie einem anderen Milieu (z.B. pH, pO₂, pCO₂) und Zellumgebung (z.B. Gefäße, Bindegewebe, Muskulatur) auszugehen ist.

In den Versuchen konnten mit der zur Verfügung stehenden Tumormasse jeweils mehrmalige Messungen durchgeführt werden, und es zeigte sich hier eine gute Reproduzierbarkeit innerhalb eines Tumors. Die inter-individuellen Unterschiede, die wir *in-vitro* beobachten konnten, lassen am ehesten auch auf interindividuelle Unterschiede *in-vivo* schließen.

3.2 Vergleich der untersuchten Zellen

Im Rahmen der Studie wurden zunächst die immortalisierte GH3-Zelllinie (Ratte) und anschließend humane Primärzellen aus intraoperativ gewonnenem Adenommaterial untersucht. In der Literatur gibt es andere Studien, die spezie-spezifischen Besonderheiten zwischen Nager (insbesondere Mäusemodelle) und Mensch verglichen: Die Unterschiede in der Hormonexpression zwischen humanem und Maus-Hypophysengewebe zeigen sich insbesondere im Rahmen der Untersuchungen nach Tumorentstehungen bei der Deletion einzelner Gensegmente: So führt beispielsweise die Deletion des Gens, welches für den D2-Dopamin-Rezeptor kodiert, zu einer unkontrollierten Produktion von Prolaktin und so zur Bildung von Prolaktinomen im Mausmodell, welches sich auch beim Menschen bereits feststellen ließ [80, 81]. Hierzu gegensätzlich wurde gezeigt, dass Mausmodelle mit gezielter Deletion von Rb oder p27 mit keiner Bildung von menschlichen Hypophysenadenomen korrelieren [82].

Es zeigt sich grundsätzlich, dass Tiertumormodelle das Verständnis für die Prozesse der Tumorentstehung und -therapie verbessern, eine direkte Analogie von Nagern und Menschen insbesondere im Hinblick auf unterschiedliche Gen- und auch Hormonexpression jedoch nicht ohne Weiteres möglich ist [81]. Ein direkter Vergleich zwischen Rattenzellen und humanen Zellen ist sicher auch in unserem Modell nicht ohne Weiteres möglich. Grundsätzliche Unterschiede zeigten sich zudem in der geringeren Zellkonzentration der Primärzellen sowie dem Einwachsen von Fibroblasten, was am ehesten durch den geringeren Aufreinigungsgrad im Vergleich zur immortalisierten Zelllinie zurückzuführen ist.

In unseren Versuchen zeigte sich zudem eine Diskrepanz der mittleren letalen Dosis (LD₅₀) zwischen Primärzellen (25-50 µg/ml) und der immortalisierten Zelllinie (9,8 µg/ml). Dieser Aspekt ist nicht neu und wird intensiv diskutiert [83, 84]. Insbesondere die Proteinexpression, die bei immortalisierten Zellen auf einem geringeren Niveau stattfindet, wird hierbei kritisch benannt. Hierdurch lassen sich insbesondere die Antworten auf eine durchgeführte Therapie zwischen Zelllinie und Primärzellen nur schwer vergleichen. Diese Unterschiede erschweren auch grundsätzlich die Vergleichbarkeit zu *in-vivo* Bedingungen [83, 84]:

Vorteile einer immortalisierten Zelllinie sind rasche Verfügbarkeit, standardisierte Protokolle und gute Planbarkeit von Versuchen, die wenig von der Seneszenz der Zellen abhängig sind. Zudem lässt sich eine gute Reproduzierbarkeit bei gleichbleibenden Zelleigenschaften und -qualität erreichen [84].

Allerdings sind immortalisierte Zelllinien im Allgemeinen genetisch manipuliert, was dann zu einer Veränderung ihrer Funktionen und Reaktionen auf äußere Reize führen kann. Dadurch lässt sich auch die in unseren Versuchen gemessene deutlich bessere *Response* auf die 5-ALA-PDT erklären, dessen Effekt zugleich durch die Zellreinheit verstärkt wird. Hauptvorteil der Primärzellen ist unter diesem Aspekt insbesondere eine bessere Analogie zu *in-vivo*-Bedingungen [85], da es hier zu keiner genetischen Veränderung kommt.

Es ist gemäß aktuellen klinischen Erfahrungen in der PDD und PDT bei Gliomen zum Beispiel davon auszugehen, dass bei einer PDT *in-vivo* die optimale 5-ALA-Dosis eher im Bereich dessen liegt, was *in-vitro* bei Primärzellen im Vergleich zur GH3-Zelllinie nötig war [46]. Allerdings sind hierzu weitere Studien notwendig, die *in-vivo*-Bedingungen besser simulieren.

Insgesamt erwiesen sich trotz der eben diskutierten Limitationen die GH3-Versuche als sinnvolles *Screening*-Modell zur Beantwortung der grundsätzlichen Frage nach der Sensibilität von Hypophysenadenomzellen auf 5-ALA-PDT (*proof of principle*). Ein weiterer Schritt hin zur klinischen Anwendung war die Anwendung der 5-ALA-PDT an humanen Primärzellen zunächst *in vitro*.

3.3 5-ALA Inkubationszeiten

Grundlage der Versuche war das von Stummer *et al.* in experimentellen Untersuchungen der 5-ALA-PDT an Gliomen standardisierte Verfahren [64, 86]. Insbesondere die Inkubationszeit von 5-ALA ist jedoch nicht abschließend beantwortet. In der Literatur zu hirneigenen Tumoren sind Inkubationszeiten zwischen vier und sechs Stunden beschrieben [78, 86]. Eigene Vorversuche zeigten bei der GH3-Zelllinie und den Primärzellen mittels Durchflusszytometrie nach rund vier Stunden eine maximale PpIX-Konzentration, wohingegen nach zwei und sechs Stunden noch eine An- bzw. Abflutung der Konzentration gezeigt werden konnte. Aufgrund dieser Voruntersuchungen erschien uns für die Versuche eine Inkubationszeit von vier Stunden am sinnvollsten. *In-vivo* werden insbesondere bei der PDD in der Literatur Inkubationszeiten von fünf Stunden angegeben [47].

3.4 Unterschiede in der 5-ALA Pharmakokinetik und –dynamik *in-vivo* und *in-vitro*

Die Pharmakokinetik *in-vivo* lässt sich nicht einfach auf ein Zellmodell übertragen [87, 88]. Insbesondere einzelne Tumorzellen ohne umgebendes Gewebe spiegeln die *in-vivo* Verhältnisse nicht angemessen wieder. *In-vivo* gibt es ein anderes Mikromilieu [87], insbesondere differiert z.B. die Verfügbarkeit von Sauerstoff, welcher in der PDT eine zentrale Rolle spielt [89].

Auch die 5-ALA-Aufnahme in die Zelle unterscheidet sich *in-vivo* und im *in-vitro*-Modell, was sich in unseren Versuchen durch die Diskrepanz zwischen den

experimentellen und klinisch üblichen 5-ALA-Dosen von 20mg/kg Körpergewicht äußerte (Primärzellen um den Faktor 5 höher als in der Klinik, LD₅₀ der Primärzellen gemessen zwischen 25 und 50 mg/kg). Als ersten Anhalt für eine 5-ALA PDT *in-vivo* können erste Dosisfindungs-Studien für die experimentelle 5-ALA PDD an Hypophysenadenomen dienen: Eljamel *et al.*, die die Wirksamkeit der Fluoreszenzdiagnostik bei Hypophysenadenomen untersuchten, beschrieben eine Dosis von 20 mg 5-ALA/kg Körpergewicht für die 5-ALA-PDD von Hypophysenadenomen als sinnvoll [74]. Eine Analogie in Bezug auf die 5-ALA-Dosisfindung zwischen PDD und PDT wurde im Rahmen der Gliomchirurgie bereits erfolgreich etabliert. Die Empfehlung zur Gabe von 20 mg/kg Körpergewicht 5-ALA wird aktuell von Autoren, die sich mit den klinischen Studien bei der PDD und PDT bei Gliomen auseinandersetzen, ebenfalls vorgenommen und finden bereits im Rahmen der PDD bei Gliomen ihren Einzug in den klinischen Alltag [46, 47].

Ein weiterer Unterschied *in-vivo* sind Verunreinigungen durch Blut oder Gewebedebris. In einer Studie wurde bei spektrometrischen Messungen durch Blutauflagerungen das auf 5-ALA basierende Fluoreszenzsignal nahezu ausgelöscht [72].

3.5 Licht: Eindringtiefe, Energie und Verteilung

Kritisch diskutiert werden muss als nächstes die Eindringtiefe, die mittels 5-ALA-PDT erreicht werden kann. Nicht ohne Grund ist die PDT insbesondere in der Dermatologie und Urologie mit hauptsächlich oberflächlich gelegenen Tumoren erfolgreich etabliert worden [90-92]. Erster Aspekt hierbei ist der Sondenabstand mit dem die 5-ALA-PDT durchgeführt wird. In unserer standardisierten Bestrahlungseinheit betrug der Abstand zwischen Lichtquelle und Zellen konstruktionsbedingt konstant 93mm.

In einem intraoperativen *Setting* ist aufgrund der interindividuellen Unterschiede der Anatomie, Morphologie und Resektionsergebnisse ein standardisierter Abstand nur schwer realisierbar. Ideal erscheint aufgrund des physikalischen Abstand-quadratgesetzes (Strahlungsintensität $I=1/r^2$) ein möglichst geringer Abstand zwischen Lichtquelle und Tumorgewebe. Dieser Zusammenhang erscheint

aufgrund der zuvor beschriebenen engen anatomischen Verhältnisse in der *Sella turcica* unproblematisch. Umgekehrt ist ein zu geringer Abstand zwischen Lichtquelle und Gewebe unvorteilhaft, da so nur ein kleineres Feld bestrahlt werden kann.

Ein weiterer Unterschied bei der Bestrahlung unter *in-vitro*- bzw. *in-vivo*-Bedingungen ist die Gewebestruktur: bei einem *Monolayer*-Gewebe fällt die nötige Eindringtiefe des Lichts zum Erreichen aller Tumorzellen geringer aus. Um dies zu berücksichtigen, nutzten wir eine durch laborinterne Dosisfindungs-Vorversuche festgelegte (unveröffentlichte Ergebnisse, [78, 93]) geringere Strahlungsintensität ($18,75 \text{ J/cm}^2$) im Vergleich zu Literaturwerten von *in-vivo*-Intensitäten (100 bis 250 J/cm^2) [78, 94].

In unserem *in-vitro*-Versuch erfolgte durch den Aufbau der Lichtleiterkonstruktion eine punktuelle Bestrahlung mit geringer Streuung, die für den von uns genutzten Versuchsaufbau die maximale Bestrahlungsintensität ermöglichte. Einem dreidimensionalen Aufbau, wie *in-vivo* gefordert, wurden wir damit nicht gerecht. Durch die Nutzung eines Ballons könnte man klinisch die Lichtausbreitung an die sphärische Anatomie der *Sella turcica* anpassen [95]. So könnten im Rahmen der PDT durch das Licht auch noch schwer zugängliche Bereiche miterfasst werden und erreicht werden. Es gibt viele Ansätze, um die Lichtintensität auf größeren Behandlungsflächen zu optimieren, z.B. flächige „*light blankets*“ oder Weiterentwicklungen des Ballons hinsichtlich Form und Füllungsmedien [96-98].

In früheren Studien zeigte sich, dass Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 635 \text{ nm}$ eine Eindringtiefe von rund 5 mm erreichen kann [94], wobei auch Eindringtiefen von bis zu 1 cm beschrieben wurden [99]. Würde man die 5-ALA-PDT klinisch bei Hypophysenadenomen einsetzen, wären solche Eindringtiefen ausreichend, da Tumorresiduen in einer Dicke dieser Größenordnung zu erwarten wären.

3.6 Hyperthermie durch Licht

Im Rahmen unserer Versuche zeigte sich eine ausgeprägte Kondenswasserbildung in den Deckeln der 96-Well-Platten im Anschluss an die PDT. Dies wird auch durch Beobachtungen vorangegangener, laboreigener Studien bestätigt (unveröffentlichte Daten). Offen bleibt bisher, ob die durch die PDT ausgelöste lokale Hyperthermie ausschließlich einen toxischen Effekt auf Tumorzellen hat oder auch physiologisches Gewebe schädigen kann [100].

Bisher zeigte sich in klinischen Studien kein Hinweis auf eine Schädigung physiologischen Gewebes [70, 73]. So konnten Stylli *et al.* in ihrer Langzeitstudie zur Beobachtung des Langzeitüberlebens von Patienten mit Glioblastomen und durchgeführter PDT bei 136 Patienten keinen toxischen Effekt auf gesundes Gewebe feststellen.

Lediglich eine zerebrale Ödembildung im Anschluss an die PDT konnte bei 3 der 136 Patienten festgestellt werden. Ein Gefäß- oder Nervenschaden wurde nicht beschrieben. Allerdings muss der besonderen Anatomie der Hypophyse Rechnung getragen werden und die möglicherweise verstärkte Hyperthermie-Wirkung durch die enge Anatomie künftig in Betracht gezogen werden. Aufgrund der empfindlichen anatomischen Strukturen in Hypophysennähe sollte dies unbedingt weiter beobachtet und kritisch evaluiert werden [74].

3.7 Wirkungsnachweis

Der Messungen der PpIX-Anreicherung in den Zellen ließen sich mit der methodisch gut etablierten Durchflusszytometrie durchführen [102].

In unseren Versuchen zeigten die verschiedenen histologischen Adenomsubgruppen unterschiedliches Ansprechen auf 5-ALA-PDT. Insbesondere die Primärzellen der kortikotropen Adenome wiesen eine überdurchschnittliche hohe Photosensibilität auf. Da aufgrund geringer Fallzahlen die Ergebnisse nur einen Trend aufzeigen, aber nicht statistisch aussagekräftig sind, sind hier weitere Untersuchungen sinnvoll.

Dies wäre klinisch insbesondere für kortikotrope Adenome und sog. *Crooke's-Zelladenome*, die sich als Sonderformen der kortikotropen Adenome durch eine ausgesprochene Aggressivität und hohe Rezidivrate auszeichnen [7, 103-105], interessant.

Bei der einzigen Untersuchung, in der sich durch die 5-ALA-PDT kein signifikanter Effekt auf die Zellviabilität gezeigt hatte, stellte sich in der histopathologischen Beurteilung heraus, dass die Biopsie überwiegend physiologisches Gewebe enthalten hatte. Diese Beobachtung ist beachtenswert, da dies ein Hinweis auf die Spezifität der 5-ALA-PDT ist. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Basalzellkarzinomen gemacht, wo sich ebenfalls kein Einfluss der 5-ALA-PDT auf gesundes Hautgewebe gezeigt hatte [106]. Eine fehlende Schädigung von physiologischem Gewebe wird ebenfalls im Rahmen der mittlerweile weit verbreiteten 5-ALA fluoreszenz-gestützten Gliomchirurgie berichtet [107, 108]. Unter Zusammenschau unserer präklinischen Ergebnisse und klinischer Forschungsergebnisse der Gliomchirurgie erscheint eine Übertragung auf Hypophysenadenome realisierbar.

3.8 5-ALA im Vergleich zu anderen Photosensibilisatoren

Der ideale Photosensibilisator im neurochirurgischen Setting sollte zusammengefasst über folgende Aspekte verfügen:

- maximale Eindringtiefe, wobei diese von der Wellenlänge abhängig ist (maximal zwischen $\lambda = 650 - 1100$ nm), wobei mit zunehmender Wellenlänge die Energie abnimmt,
- hohe Tumorselektivität,
- geringe Hautreaktion und systemische Nebenwirkungen,
- rasche Elimination

Da 5-ALA diese Kriterien am besten erfüllte und bereits eine Zulassung zur PDD durch die Europäische Arzneimittelagentur (EMA) vorlag, fiel die Wahl auf 5-ALA als Photosensibilisator für die vorliegende Studie [47]. 5-ALA zeigte von allen potentiellen Photosensibilisatoren das günstigste Wirkungs-/ Nebenwirkungsprofil [47, 54, 56, 57].

Im Vergleich zu Photosensibilisatoren der ersten Generation (z.B. HpD/ Photofrin®) hat 5-ALA eine kürzere Eliminationszeit, was geringere Einschränkungen der Lebensqualität bedeutet (Schutz vor Sonne zur Vermeidung schwerer Hautreaktionen) [109].

Webber *et al.* zeigten bereits in den 90er Jahren die rasche Elimination von 5-ALA *in-vivo* binnen etwa 48 Stunden, was die Karenz von Sonnenlicht im Vergleich zum Photofrin® (mehrere Wochen) drastisch reduziert [50]. Allerdings offenbarte sich auch in dieser Studie bei rund einem Viertel der Patienten ein – wenngleich auch transienter – Anstieg der Transaminasen, die insbesondere bei höheren Dosen 5-ALA (Vergleich zwischen 30 und 60 mg/g KG 5-ALA) auftraten. Eine tumorselektive Anreicherung von 5-ALA – mit Ausnahme der Leber, worauf auch der Anstieg der Transaminasen hindeutet – konnte ebenfalls nachgewiesen werden.

Photofrin® wurde bereits von Marks *et al.* in einer klinischen Phase I/II-Studie im Rahmen der PDT an Hypophysenadenomen untersucht [62]. Hier zeigte sich bei vier von zwölf Patienten eine Hautreaktion, eine davon als schwer klassifiziert. Zudem erfolgte die intravenöse Applikation von Photofrin® 24 bzw. 48 Stunden präoperativ. Im Hinblick auf eine klinische Praktikabilität erscheint insbesondere die lange Vorbereitungszeit als unkomfortabel und ist im Vergleich zum 5-ALA, welches aktuell im Rahmen der PDD etwa fünf Stunden präoperativ oral gegeben werden kann, als Nachteil anzusehen.

Zudem ist die hohe Rate an Hautreaktionen deutlich ungünstiger als bei der Nutzung von 5-ALA [62] und zeigte zudem auch eine deutlich geringere Tumorselektivität mit Schädigung des umgebenden Gewebes [110].

Cole *et al.* untersuchten die Wirksamkeit der PDT an Hypophysenadenomzellkulturen mit Hypericin als Photosensibilisator [75]. Hypericin kommt als natürlich auftretender Photosensibilisator in Johanniskraut vor und findet insbesondere in der Therapie von Depressionen seine klinische Anwendung. Hypericin ist ein passiver Photosensibilisator, der *in-situ* lediglich von Licht aktiviert und nicht mehr

metabolisiert werden muss, und über ein Fluoreszenzmaximum zwischen 590 und 640 nm verfügt.

Im Rahmen der PDT kommt es beim intravenös verabreichten Hypericin zur Kaspasen- und Cytochrom-C-induzierten Apoptose [111]. Es zeigte sich, dass Hypericin ebenfalls ein potenter Photosensibilisator ist, der sowohl für die PDD als auch die PDT eingesetzt werden kann [112]. Allerdings sind auch bei Hypericin in systemischer und topischer Anwendung starke phototoxische Hautreaktionen und Ödembildungen beschrieben [113].

Der Einsatz von Hypericin in der FGS und PDT in der Neurochirurgie sollte vorerst nur im Rahmen klinischer Studien erfolgen, um das Wirkungs-/ Nebenwirkungsprofil besser zu erfassen [56, 112].

3.9 Potenzial und Grenzen der 5-ALA PDT

Die 5-ALA-PDT ist mit vertretbarem apparativem und personellem Aufwand realisierbar. Sie kann adjuvant oder primär eingesetzt werden und interferiert gemäß aktueller Lehrmeinung nicht mit anderen adjuvanten Therapien [68].

Aufgrund der Benignität von Hypophysenadenomen sollte für eine PDT eine Nutzen-Risiko-Abwägung im Einzelfall erfolgen. Prinzipiell wäre nach operativer Therapie und bei residueller Infiltration oder Kompression benachbarter Strukturen, z.B. des *Sinus cavernous* oder der *A. carotis interna*, ein intraoperativer adjuvanter PDT Einsatz denkbar.

Wie zuvor beschrieben ist auch eine adjuvante Strahlentherapie aufgrund der Gefahr von Strahlennekrosen oder Induktion von Zweittumoren nicht unproblematisch. Solche adjuvanten Konzepte müssen sorgfältig gegen eine postoperative *wait & scan*-Strategie abgewogen werden [38].

Nachteil einer intraoperativen PDT wäre die Verlängerung der OP-Zeit und damit einhergehend die Erhöhung des Narkoserisikos [114]. In der bisherigen Literatur werden bei der PDT Bestrahlungszeiten zwischen 20 und 45 Minuten beschrieben [47]. Weiterhin sind bei der 5-ALA-PDT von Gliomen im Tierversuch post-interventionell das Auftreten von Ödemen beschrieben worden [73, 115]. Hierfür

zeigte sich in der von Ito *et al.* vorgenommenen Studie ein schlechtes Ansprechen auf Steroide zur Senkung des intrazerebralen Drucks [115].

Hornung *et al.* zeigten, dass es zu keiner Resistenzbildung des Tumors kommt, sodass eine repetitive PDT grundsätzlich möglich erscheint [116]. Eljamel *et al.* zeigten in einer kleinen Phase-III-Studie an Glioblastompatienten einen signifikanten Überlebensvorteil der Patienten, die mit repetitiver 5-ALA-PDT behandelt wurden [70]. Größere Fallzahlen im Rahmen der in der Initiierung befindlichen NOA-11 Studie müssen abgewartet werden (NOA-11, EudraCT-Nr.: 2015-002727-25).

Tierversuche lassen den Schluss nahe, dass eine repetitive 5-ALA-PDT mit Verzögerungen von jeweils einigen Wochen signifikant bessere Ergebnisse offenbart [116, 117]. Dies scheint insbesondere im Hinblick auf Tumore mit tieferer Infiltrationstiefe, als der beschriebenen Eindringtiefe von 5-10 mm, ein weiterer möglicher therapeutischer Angriffspunkt zu sein [116].

Zudem erscheint der immunologische Effekt der PDT Potential zu haben: Eine *in domo* durchgeführte 5-ALA-PDT-Studie mit Sphäroiden der Glioblastom-Zelllinien U87 und U251 konnte zeigen, dass es zu einer Anreicherung und Reifung von Dendritischen Zellen kam, die Tumorantigene von den Sphäroiden effektiv erfassten. Zudem wurde das Hitzeschockprotein-70 nach der 5-ALA-PDT-Behandlung auf den Sphäroiden hochreguliert [118]. Dies lässt den Schluss zu, dass die 5-ALA-PDT die erworbene Immunantwort zusätzlich fördern kann, sodass hierdurch auch potentiell tiefere Schichten erreicht werden könnten.

Insgesamt nachteilig erscheint insbesondere die grundsätzlich geringe Eindringtiefe der Behandlung, sodass die Indikationsstellung in der Neurochirurgie eher in kleinen Tumorresiduen oder Bestrahlung der Resektionsränder zu sehen ist.

3.10 Zukunftsperspektiven und Integration in ein Behandlungsgesamtkonzept

Grund für die geringe Forschungsintensität für adjuvante Therapien bei Hypophysenadenomen ist gewiss die Benignität und häufig gute Resektabilität. Wie zuvor beschrieben entsteht die Notwendigkeit zur Etablierung neuer, risikoarmer adjuvanter Verfahren insbesondere aus der möglichen Infiltration der dem Tumor angrenzenden Strukturen wie den *Nn. optici* oder der *A. carotis interna* [10, 11]. Hier ist es bedeutsam, ein klinisches Gesamtkonzept der Behandlung solch operativ nicht vollständig zu resezierender Tumore zu entwickeln.

Perspektivisch erscheint die Übertragung von Forschungsergebnissen der Gliomchirurgie sinnvoll zu sein. 5-ALA hat sich als sichere Substanz bewährt und die PDT selbst zeigt sich in ersten klinischen Studien an Gliomen auch für intrazerebrale Eingriffe als klinisch praktikabel [46, 54]. Eine Übertragung der 5-ALA-PDT auf Hypophysenadenome scheint somit grundsätzlich realisierbar.

Schlussfolgerungen.

In dieser Studie wurden am *in-vitro*-Modell der GH3-Zelllinie zunächst PDT-Parameter optimiert. Die Erkenntnisse wurden in einer Serienuntersuchung an primären humanen Adenomzellen weiter umgesetzt.

Es konnte insbesondere ein dosis-abhängiger letaler Effekt der 5-ALA-PDT gezeigt werden.

Weiterhin zeigte die Subgruppe der kortikotropen Adenome ein besonders gutes Ansprechen auf die Behandlung. Sicher ist eine weitere experimentelle Absicherung der Ergebnisse nötig, aber prinzipiell erscheint die 5-ALA-PDT als mögliches alternatives adjuvantes Therapieverfahren für Hypophysenadenome infrage zu kommen.

4 Verzeichnisse

4.1 Literaturverzeichnis

1. Lindholm, J. and E.H. Nielsen, *Pituitary-gonadal axis: historical notes*. Pituitary, 2009. **12**(3): p. 226-35.
2. Drenckhahn, D.H.B., Drenckhahn, ed. *Anatomie, Band 2, 16. Auflage*. Urban & Fischer, Elsevier, München. 2004. 186-197.
3. Löffler G, K.h.J.a.P.P., *Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe*. Biochemie & Pathobiochemie 8. Auflage., Springer Verlag, Berlin, 2007: p. 841 - 892.
4. Schünke, M.S., Erik; Schumacher, Udo, *Kopf, Hals und Neuroanatomie, Band 2*. PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie, 2015.
5. Lloyd RV, O.R., Klöppel G, Rosai J, *WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs*. WHO Classification of Tumours, 4th Edition, Volume 10, 2017.
6. Surawicz, T.S., et al., *Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994*. Neuro Oncol, 1999. **1**(1): p. 14-25.
7. Sanno, N., et al., *Pathology of pituitary tumors*. Neurosurg Clin N Am, 2003. **14**(1): p. 25-39, vi.
8. Meij, B.P., et al., *The long-term significance of microscopic dural invasion in 354 patients with pituitary adenomas treated with transsphenoidal surgery*. J Neurosurg, 2002. **96**(2): p. 195-208.
9. Ezzat, S., et al., *The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review*. Cancer, 2004. **101**(3): p. 613-9.
10. Klingmueller, D., Saller, B., Quabbe, Hans-Juergen, *Diagnostik von Hypophysenadenomen*. Dtsch Aerztebl International, 2001. **3053**-(98): p. 46.
11. Schramm J., K.R., *Selläre und periselläre Tumoren*. In: Schlegel U, Weller M, Westphal M, Hrsg. Neuroonkologie. Stuttgart-New York: Thieme, 2003: p. 254-268.
12. Molitch, M.E. and E.J. Russell, *The pituitary "incidentaloma"*. Ann Intern Med, 1990. **112**(12): p. 925-31.
13. Freda, P.U., et al., *Pituitary incidentaloma: an endocrine society clinical practice guideline*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(4): p. 894-904.
14. Beckers, A. and A.F. Daly, *The clinical, pathological, and genetic features of familial isolated pituitary adenomas*. Eur J Endocrinol, 2007. **157**(4): p. 371-82.
15. Couldwell, W.T. and L. Cannon-Albright, *A heritable predisposition to pituitary tumors*. Pituitary, 2010. **13**(2): p. 130-7.
16. Ueno, M., et al., *Modification of mortality and tumorigenesis by tocopherol-mono-glucoside (TMG) administered after X irradiation in mice and rats*. Radiat Res, 2009. **172**(4): p. 519-24.
17. Johnson, K.A., et al., *Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats*. Toxicol Appl Pharmacol, 1986. **85**(2): p. 154-68.
18. Tareke, E., et al., *Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(17): p. 4998-5006.

19. Hardy, J. and J.L. Vezina, *Transsphenoidal neurosurgery of intracranial neoplasm*. Adv Neurol, 1976. **15**: p. 261-73.
20. Arafah, B.M., *Medical management of hypopituitarism in patients with pituitary adenomas*. Pituitary, 2002. **5**(2): p. 109-17.
21. Serri, O., et al., *Diagnosis and management of hyperprolactinemia*. CMAJ, 2003. **169**(6): p. 575-81.
22. Melmed, S., et al., *Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(2): p. 273-88.
23. Hollenhorst RW, Y.B., *Ocular manifestations produced by adenomas of the pituitary gland: Analysis of 1000 cases*. In: Kohler PO, Ross GT, Hrsg. *Diagnosis and treatment of pituitary tumours*, Amsterdam: Excerpta Medica, 1973.
24. Bonneville, J.F., F. Bonneville, and F. Cattin, *Magnetic resonance imaging of pituitary adenomas*. Eur Radiol, 2005. **15**(3): p. 543-8.
25. Dietemann, J.L., et al., *Computed tomography of the sellar spine*. Neuroradiology, 1983. **24**(3): p. 173-4.
26. Jefferson, G., *Extrasellar Extensions of Pituitary Adenomas: (Section of Neurology)*. Proc R Soc Med, 1940. **33**(7): p. 433-58.
27. Maldaner, N., et al., *[Modern Management of Pituitary Adenomas - Current State of Diagnosis, Treatment and Follow-Up]*. Praxis (Bern 1994), 2018. **107**(15): p. 825-835.
28. Buchfelder, M., *Treatment of pituitary tumors: surgery*. Endocrine, 2005. **28**(1): p. 67-75.
29. Couldwell, W.T., *Transsphenoidal and transcranial surgery for pituitary adenomas*. J Neurooncol, 2004. **69**(1-3): p. 237-56.
30. Komotar, R.J., et al., *Endoscopic endonasal compared with microscopic transsphenoidal and open transcranial resection of giant pituitary adenomas*. Pituitary, 2012. **15**(2): p. 150-9.
31. Gao, Y., et al., *Endoscopic versus microscopic transsphenoidal pituitary adenoma surgery: a meta-analysis*. World J Surg Oncol, 2014. **12**: p. 94.
32. Li, A., et al., *Endoscopic Versus Microscopic Transsphenoidal Surgery in the Treatment of Pituitary Adenoma: A Systematic Review and Meta-Analysis*. World Neurosurg, 2017. **101**: p. 236-246.
33. Karppinen, A., et al., *Transition From Microscopic to Endoscopic Transsphenoidal Surgery for Nonfunctional Pituitary Adenomas*. World Neurosurg, 2015. **84**(1): p. 48-57.
34. Theodros, D., et al., *Pituitary adenomas: historical perspective, surgical management and future directions*. CNS Oncol, 2015. **4**(6): p. 411-29.
35. Ciric, I., et al., *Complications of transsphenoidal surgery: results of a national survey, review of the literature, and personal experience*. Neurosurgery, 1997. **40**(2): p. 225-36; discussion 236-7.
36. Delgado-Lopez, P.D., et al., *Recurrent non-functioning pituitary adenomas: a review on the new pathological classification, management guidelines and treatment options*. Clin Transl Oncol, 2018.
37. Loeffler JS, S.H., *Radiation therapy in the management of pituitary adenomas*. J Clin Endocrinol Metab., 2011. **96**((7)): p. 1992-2003.

38. al-Mefty, O., et al., *The long-term side effects of radiation therapy for benign brain tumors in adults*. J Neurosurg, 1990. **73**(4): p. 502-12.
39. Lillehei, K.O., et al., *Reassessment of the role of radiation therapy in the treatment of endocrine-inactive pituitary macroadenomas*. Neurosurgery, 1998. **43**(3): p. 432-8; discussion 438-9.
40. Gillam, M.P., et al., *Advances in the treatment of prolactinomas*. Endocr Rev, 2006. **27**(5): p. 485-534.
41. Colao, A., et al., *Long-term effects of depot long-acting somatostatin analog octreotide on hormone levels and tumor mass in acromegaly*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(6): p. 2779-86.
42. Melmed, S., et al., *Clinical review 75: Recent advances in pathogenesis, diagnosis, and management of acromegaly*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(12): p. 3395-402.
43. Raab, O., *Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien*. Zeitschrift für Biol., 1900. **39**(524–546).
44. Rassmussen-Taxdal, D.S., G.E. Ward, and F.H. Figge, *Fluorescence of human lymphatic and cancer tissues following high doses of intravenous hematoporphyrin*. Cancer, 1955. **8**(1): p. 78-81.
45. Ackroyd, R., et al., *The history of photodetection and photodynamic therapy*. Photochem Photobiol, 2001. **74**(5): p. 656-69.
46. Stepp, H., et al., *ALA and malignant glioma: fluorescence-guided resection and photodynamic treatment*. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2007. **26**(2): p. 157-64.
47. Stummer, W., et al., *Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial*. Lancet Oncol, 2006. **7**(5): p. 392-401.
48. Zelenkov, P., et al., *Acute morphological sequelae of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in the C6 spheroid model*. J Neurooncol, 2007. **82**(1): p. 49-60.
49. Müller M, B.H., Löffler G and Petrides PE, *Porphyrine - Synthese und Aufbau*. Biochemie & Pathobiochemie 8. Auflage., Springer Verlag, Berlin, 2007: p. 379-394.
50. 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.
51. Teng, L., et al., *Silencing of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based fluorescence and photodynamic therapy efficacy*. Br J Cancer, 2011. **104**(5): p. 798-807.
52. Robey, R.W., et al., *ABCG2-mediated transport of photosensitizers: potential impact on photodynamic therapy*. Cancer Biol Ther, 2005. **4**(2): p. 187-94.
53. 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.
54. Abrahamse, H. and M.R. Hamblin, *New photosensitizers for photodynamic therapy*. Biochem J, 2016. **473**(4): p. 347-64.
55. Asakura, T., et al., *Combination of Globin and It's Derivatives with Hemins and Porphyrins*. J Biochem, 1964. **56**: p. 594-600.

56. Senders, J.T., et al., *Agents for fluorescence-guided glioma surgery: a systematic review of preclinical and clinical results*. Acta Neurochir (Wien), 2017. **159**(1): p. 151-167.
57. Allison, R.R. and C.H. Sibata, *Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2010. **7**(2): p. 61-75.
58. Liang, H., et al., *Subcellular phototoxicity of 5-aminolaevulinic acid (ALA)*. Lasers Surg Med, 1998. **22**(1): p. 14-24.
59. Malik, Z. and M. Djaldetti, *5-Aminolevulinic acid stimulation of porphyrin and hemoglobin synthesis by uninduced Friend erythroleukemic cells*. Cell Differ, 1979. **8**(3): p. 223-33.
60. Krammer, B. and K. Plaetzer, *ALA and its clinical impact, from bench to bedside*. Photochem Photobiol Sci, 2008. **7**(3): p. 283-9.
61. Wachowska, M., Muchowicz, Angelika, Firczuk, Małgorzata, Gabrysiak, Magdalena, Winiarska, Magdalena, Wańczyk, Małgorzata, Bojarczuk, Kamil, Golab, Jakub, *Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer*. Molecules, 2011. **1420-3049**(16): p. 5.
62. Marks, P.V., et al., *Effect of photodynamic therapy on recurrent pituitary adenomas: clinical phase I/II trial--an early report*. Br J Neurosurg, 2000. **14**(4): p. 317-25.
63. Kirollos, R.W., et al., *A preliminary experimental in vivo study of the effect of photodynamic therapy on human pituitary adenoma implanted in mice*. Br J Neurosurg, 1998. **12**(2): p. 140-5.
64. Stummer, W., et al., *In vitro and in vivo porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolevulinic acid*. J Photochem Photobiol B, 1998. **45**(2-3): p. 160-9.
65. Dai, T., Fuchs, B. B., Coleman, J. J., Prates, R. A., Astrakas, C., St. Denis, T. G., ... Tegos, G. P, *Concepts and Principles of Photodynamic Therapy as an Alternative Antifungal Discovery Platform*. Frontiers in Microbiology,, 2012. **3**(120).
66. Foote, C.S., *Definition of type I and type II photosensitized oxidation*. Photochem Photobiol, 1991. **54**(5): p. 659.
67. Agarwal, M.L., et al., *Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells*. Cancer Res, 1991. **51**(21): p. 5993-6.
68. Wilson, B.C., *Photodynamic therapy for cancer: principles*. Can J Gastroenterol, 2002. **16**(6): p. 393-6.
69. Wilson, B.C. and M.S. Patterson, *The physics of photodynamic therapy*. Phys Med Biol, 1986. **31**(4): p. 327-60.
70. 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.
71. Cornelius, J.F., et al., *Minispectrometer with handheld probe for 5-ALA based fluorescence-guided surgery of brain tumors: Preliminary study for clinical applications*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2017. **17**: p. 147-153.
72. Knipps, J., et al., *Fluorescence Behavior and Dural Infiltration of Meningioma Analyzed by 5-Aminolevulinic Acid-Based Fluorescence:*

- Operating Microscope Versus Mini-Spectrometer*. World Neurosurg, 2017. **108**: p. 118-127.
73. Stylli, S.S., et al., *Photodynamic therapy of high grade glioma - long term survival*. J Clin Neurosci, 2005. **12**(4): p. 389-98.
 74. Eljamel, M.S., G. Leese, and H. Moseley, *Intraoperative optical identification of pituitary adenomas*. J Neurooncol, 2009. **92**(3): p. 417-21.
 75. Cole, C.D., et al., *Hypericin-mediated photodynamic therapy of pituitary tumors: preclinical study in a GH4C1 rat tumor model*. J Neurooncol, 2008. **87**(3): p. 255-61.
 76. Kabuto, M., *Culture technique of human pituitary adenoma cells*. Methods Mol Med, 1996. **2**: p. 447-55.
 77. Kim, G.L., et al., *Generation of immortal cell lines from the adult pituitary: role of cAMP on differentiation of SOX2-expressing progenitor cells to mature gonadotropes*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27799.
 78. El-Khatib, M., et al., *Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy of human meningioma: an in vitro study on primary cell lines*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(5): p. 9936-48.
 79. Kohler, P.O., et al., *Hormone production by human pituitary adenomas in culture*. Metabolism, 1969. **18**(9): p. 782-8.
 80. Asa, S.L., *The pathology of pituitary tumors*. Endocrinol Metab Clin North Am, 1999. **28**(1): p. 13-43, v-vi.
 81. Cushman, L.J. and S.A. Camper, *Molecular basis of pituitary dysfunction in mouse and human*. Mamm Genome, 2001. **12**(7): p. 485-94.
 82. Jacks, T., et al., *Effects of an Rb mutation in the mouse*. Nature, 1992. **359**(6393): p. 295-300.
 83. Pan, C., et al., *Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(3): p. 443-50.
 84. Kaur, G. and J.M. Dufour, *Cell lines: Valuable tools or useless artifacts*. Spermatogenesis, 2012. **2**(1): p. 1-5.
 85. Pastor, D.M., et al., *Primary cell lines: false representation or model system? a comparison of four human colorectal tumors and their coordinately established cell lines*. Int J Clin Exp Med, 2010. **3**(1): p. 69-83.
 86. Olzowy, B., et al., *Photoirradiation therapy of experimental malignant glioma with 5-aminolevulinic acid*. J Neurosurg, 2002. **97**(4): p. 970-6.
 87. McGinnity, D.F. and R.J. Riley, *Predicting drug pharmacokinetics in humans from in vitro metabolism studies*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 2): p. 135-9.
 88. Houston, J.B. and A. Galetin, *Progress towards prediction of human pharmacokinetic parameters from in vitro technologies*. Drug Metab Rev, 2003. **35**(4): p. 393-415.
 89. Albert, I., M. Hefti, and V. Luginbuehl, *Physiological oxygen concentration alters glioma cell malignancy and responsiveness to photodynamic therapy in vitro*. Neurol Res, 2014. **36**(11): p. 1001-10.
 90. Diana K. Cohen, P.K.L., *Photodynamic Therapy for Non-Melanoma Skin Cancers*. Cancers (Basel). 2016 Oct; 8(10): 90, 2016.

91. Inoue, K., *5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for bladder cancer*. Int J Urol, 2017. **24**(2): p. 97-101.
92. Agostinis, P., et al., *Photodynamic therapy of cancer: an update*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(4): p. 250-81.
93. Cornelius, J.F., et al., *Enhancing the effect of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in human meningioma cells*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2014. **11**(1): p. 1-6.
94. Quirk, B.J., et al., *Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors--where do we stand?* Photodiagnosis Photodyn Ther, 2015. **12**(3): p. 530-44.
95. Madsen, S.J., et al., *Development of a novel indwelling balloon applicator for optimizing light delivery in photodynamic therapy*. Lasers Surg Med, 2001. **29**(5): p. 406-12.
96. Liang, X., et al., *Maximizing fluence rate and field uniformity of light blanket for intraoperative PDT*. Proc SPIE Int Soc Opt Eng, 2012. **8210**.
97. Hu, Y., K. Wang, and T.C. Zhu, *Pre-clinic study of uniformity of light blanket for intraoperative photodynamic therapy*. Proc SPIE Int Soc Opt Eng, 2010. **7551**.
98. Dupont, C., et al., *A novel device for intraoperative photodynamic therapy dedicated to glioblastoma treatment*. Future Oncol, 2017. **13**(27): p. 2441-2454.
99. 88., A.r.N., *Photodynamic Therapy Dosimetry*. Published for the American Association of Physics in Medicine by Medical Physics Publishing 2005.
100. Hirschberg, H., et al., *Enhanced cytotoxic effects of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy by concurrent hyperthermia in glioma spheroids*. J Neurooncol, 2004. **70**(3): p. 289-99.
101. 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.
102. Hryhorenko, E.A., et al., *Characterization of endogenous protoporphyrin IX induced by delta-aminolevulinic acid in resting and activated peripheral blood lymphocytes by four-color flow cytometry*. Photochem Photobiol, 1998. **67**(5): p. 565-72.
103. Baldeweg, S.E., et al., *A spectrum of behaviour in silent corticotroph pituitary adenomas*. Br J Neurosurg, 2005. **19**(1): p. 38-42.
104. Scheithauer, B.W., et al., *Clinically silent corticotroph tumors of the pituitary gland*. Neurosurgery, 2000. **47**(3): p. 723-9; discussion 729-30.
105. George, D.H., et al., *Crooke's cell adenoma of the pituitary: an aggressive variant of corticotroph adenoma*. Am J Surg Pathol, 2003. **27**(10): p. 1330-6.
106. Wennberg, A.M., et al., *Delta-aminolevulinic acid in superficial basal cell carcinomas and normal skin-a microdialysis and perfusion study*. Clin Exp Dermatol, 2000. **25**(4): p. 317-22.
107. Matsumura, H., et al., *Uptake and retention of the photosensitizer mono-L-asparthyl chlorine e6 in experimental malignant glioma*. Lasers Med Sci, 2008. **23**(3): p. 237-45.
108. Tsurubuchi, T., et al., *Corrigendum to "The optimization of fluorescence imaging of brain tumor tissue differentiated from brain*

- edema-in vivo kinetic study of 5-aminolevulinic acid and talaporfin sodium" [Photodiagn. Photodyn. Ther. 6 (2009), 19-27]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2017. 18: p. 351.*
109. Tetard, M.C., et al., *Experimental use of photodynamic therapy in high grade gliomas: a review focused on 5-aminolevulinic acid.* Photodiagnosis Photodyn Ther, 2014. **11**(3): p. 319-30.
 110. Rosenthal, M.A., et al., *Phase I and pharmacokinetic study of photodynamic therapy for high-grade gliomas using a novel boronated porphyrin.* J Clin Oncol, 2001. **19**(2): p. 519-24.
 111. Vantieghem, A., et al., *Hypericin-induced photosensitization of HeLa cells leads to apoptosis or necrosis. Involvement of cytochrome c and procaspase-3 activation in the mechanism of apoptosis.* FEBS Lett, 1998. **440**(1-2): p. 19-24.
 112. Ritz, R., et al., *In vitro comparison of hypericin and 5-aminolevulinic acid-derived protoporphyrin IX for photodynamic inactivation of medulloblastoma cells.* PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51974.
 113. Boiy, A., et al., *Photosensitizing activity of hypericin and hypericin acetate after topical application on normal mouse skin.* Br J Dermatol, 2008. **158**(2): p. 360-9.
 114. Kim, J.Y., et al., *Surgical duration and risk of venous thromboembolism.* JAMA Surg, 2015. **150**(2): p. 110-7.
 115. Ito, S., et al., *Oedema formation in experimental photo-irradiation therapy of brain tumours using 5-ALA.* Acta Neurochir (Wien), 2005. **147**(1): p. 57-65; discussion 65.
 116. Hornung, R., et al., *m-THPC-mediated photodynamic therapy (PDT) does not induce resistance to chemotherapy, radiotherapy or PDT on human breast cancer cells in vitro.* Photochem Photobiol, 1998. **68**(4): p. 569-74.
 117. Hirschberg, H., et al., *Repetitive photodynamic therapy of malignant brain tumors.* J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2006. **25**(1-2): p. 261-79.
 118. Etminan, N., et al., *Heat-shock protein 70-dependent dendritic cell activation by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment of human glioblastoma spheroids in vitro.* Br J Cancer, 2011. **105**(7): p. 961-9.

4.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle	1	4. Edition der WHO-Klassifikation der Tumore der Hypophyse, modifiziert nach Lloyd RV, O.R., Klöppel G, Rosai J, <i>WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs</i> . WHO Classification of Tumours, 4th Edition, Volume 10, 2017.....	4
Tabelle	2	Klinik, Klassifikation und Basisdiagnostik der Hypophysenadenome, modifiziert nach 4. Edition der WHO-Klassifikation der Tumore der Hypophyse, modifiziert nach Lloyd RV, O.R., Klöppel G, Rosai J, <i>WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs</i> . WHO Classification of Tumours, 4th Edition, Volume 10, 2017. und Klingmueller, D., Saller, B., Quabbe, Hans-Juergen, <i>Diagnostik von Hypophysenadenomen</i> . Dtsch Aerztebl International, 2001. 3053 -(98): p. 46.....	7

4.3 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** koronarer Schnitt durch die mediane Schädelbasis auf Höhe der Hypophyse; N. III: N. oculomotorius, N.IV: N. trochlearis, N.V₁: N. optalmicus, N. V₂: N. maxillaris, N. VI: N. abducens; dunkelbraun: Hirnparenchym, beige: Knochen; modifiziert nach Schünke, M.S., Erik; Schumacher, Udo, *Kopf, Hals und Neuroanatomie, Band 2*. PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie, 2015..... 2
- Abb. 2:** Darstellung der hypothalamisch-hypophysären Achse mit Aufführung der Effektororgane. (blau unterlegt) sowie deren Effektorhormone (gelb unterlegt). Hypophysenhinterlappen (HHL, dunkelblau), der als Speicherorgan für die hypothalamischen Hormone ADH und Oxytocin dient. Modifiziert nach Löffler G, K.h.J.a.P.P., *Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe*. Biochemie & Pathobiochemie 8. Auflage., Springer Verlag,Berlin, 2007: p. 841 - 892. 3
- Abb. 3:** Anatomische Darstellung eines linksseitig gelegenen Hypophysenadenoms mit den Ausmaßen von 15x15mm jeweils mit Kontrastmittel. a) koronarer Schnitt, T1-gewichtet b) sagittaler Schnitt, T1-gewichtet c) axialer Schnitt, T1-gewichtet. Es imponiert jeweils eine hypointense Raumforderung links in der Sella turcica. d) axialer Schnitt, T2-gewichtet, hier hyperintense Darstellung des Adenoms; durchgeführt: Universitätsklinikum Düsseldorf 9
- Abb. 4:** Darstellung der physiologischen Hämoglobin-Biosynthese im Mitochondrium und Zytosol. Endprodukt ist das Häm, welches eine negative Feedback-Hemmung auf die 5-ALA-Synthase ausübt. Entscheidender Aspekt bei der PDD/PDT ist die exogene Zufuhr von 5-ALA zur gesteigerten Synthese von PpIX. Modifiziert nach Müller M, B.H., Löffler G and Petrides PE, *Porphyrine - Synthese und Aufbau*. Biochemie & Pathobiochemie 8. Auflage., Springer Verlag,Berlin, 2007: p. 379-394. 14
- Abb. 5:** Wirkungsprinzip der Photodynamischen Therapie und Fluoreszenzentstehung bei Zugabe eines Photosensibilisators unter Präsenz von hochenergetischem Licht. Modifiziert nach Dai, T., Fuchs, B. B., Coleman, J. J., Prates, R. A., Astrakas, C., St. Denis, T. G., ... Tegos, G. P, *Concepts and Principles of Photodynamic Therapy as an Alternative Antifungal Discovery Platform*. Frontiers in Microbiology,, 2012. **3**(120)..... 18

5 Danksagung

„Dankbarkeit ist das Gedächtnis des Herzens.“

Jean-Baptiste Massieu (1743-1818)

An dieser Stelle ist der Punkt gekommen, Danke zu sagen. Dank an die Weggefährten, die mich in vielfältigster Art und Weise unterstützt haben und ohne deren Mithilfe diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

Zunächst gilt mein Dank Herrn PD Dr. Cornelius, meinem Doktorvater, welcher die Arbeit von Beginn an mit herausragendem Engagement begleitet hat und stets mit Rat, Anregungen und einem allzeit offenen Ohr an meiner Seite stand.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Steiger, Direktor der Klinik für Neurochirurgie, für die Ermöglichung der Arbeit in seiner Klinik bedanken. Ein gutes Labor wird geführt von einer guten MTA – deshalb gebührt ein besonderer Dank Frau Brigitte Senger, Herz und Seele dieses Labors. Die Einarbeitung, die stringente Führung des Labors, den steten Ideenaustausch und die Diskussionen (letztlich über Gott und die Welt) habe ich sehr zu schätzen gewusst.

Auch möchte ich Dr. Marcel Kamp für die kritische Durchsicht und wertvollen Anregungen bei der Verfassung des Papers und dieser Arbeit sowie Dr. Jörg Felsberg aus dem Institut für Neuropathologie für das kritische Hinterfragen meiner Ideen und niederschweligen Hilfe bei histopathologischen Fragen danken.

Ich danke meiner kleinen, aber feinen Familie und ganz besonders meinem Vater, der trotz widrigster Umstände immer das Beste für mich im Sinn hatte und mich vorbehaltlos unterstützt, gefördert und gefordert hat. Mein liebevollster Dank gilt Johannes Knipps, ohne dessen endlose Geduld und Verständnis in langen Labornächten und bei diversen Schreibblockaden die Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Du bist mein steter Antrieb und Kompass.