

Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Daniel Hänggi

Experimentelle Untersuchungen
zur Wirksamkeit der Ciprofloxacin und 5-Aminolävulinsäure
gestützten Photodynamischen Therapie an immortalisierten
humanen Chordomzelllinien *in vitro*

Dissertation

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

vorgelegt von
Hanah Hadice Gull
2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Jan Frederick Cornelius

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Rüdiger Sorg

Der Fortgang der wissenschaftlichen Entwicklung ist im Endeffekt eine ständige Flucht vor dem Staunen.

-Albert Einstein (1879 – 1955)

Für Almas und Omed.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Ciprofloxacin enhances phototoxicity of 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic treatment for chordoma cell lines. Gull HH, Karadag C, Senger B, Sorg RV, Möller P, Mellert K, Steiger HJ, Hänggi D, Cornelius JF. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2021, Volume 35, 102346.

Zusammenfassung

Chordome sind sehr seltene, lokal aggressiv wachsende Tumore, die sich aus Relikten der embryonalen Notachorda entwickeln. Sie kommen typischerweise an der Schädelbasis, dem Sakrum und etwas seltener in der mobilen Wirbelsäule vor.

Die Therapie der Wahl besteht aus bestmöglicher Resektion, die jedoch häufig aufgrund von anatomischen Gegebenheiten limitiert ist. Die klassische adjuvante Therapie ist problematisch, da Chordome als chemo- bzw. strahlenresistent gelten. Neue Behandlungsstrategien sind daher dringend notwendig.

Die 5-Aminolävulinsäure gestützte Photodynamische Therapie (5-ALA PDT), die sich bereits für andere Tumorentitäten als wirksam erwiesen hat, könnte als Alternative infrage kommen. Das Wirkprinzip ist, dass exogenes 5-ALA durch Feedback-Hemmung in der Hämbiosynthese eine Akkumulation von Protoporphyrin (PPIX) in neoplastischen Zellen induziert. Dort fungiert PPIX dann als Photosensibilisator, wenn es mit monochromatischem Licht der geeigneten Wellenlänge (635 nm) bestrahlt wird. Letztlich bilden sich reaktive Sauerstoffradikale, welche dann zum Zelltod führen.

Weiter optimiert werden kann eine 5-ALA PDT durch Fluorchinolone, wie z.B. Ciprofloxacin, welche als Chelatbildner Eisen binden. Dies wiederum führt zur gesteigerten Akkumulation des Photosensibilisators PPIX.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von 5-ALA-PDT auf drei verschiedene immortalisierte humane Chordomzelllinien *in vitro* untersucht. Weiterhin wurden der Effekt von Ciprofloxacin sowie unterschiedliche 5-ALA Inkubationszeiten getestet.

Die Experimente wurden an den drei Chordomzelllinien U-CH2, U-CH2B bzw. U-CH2A durchgeführt. Nach 24-stündiger Vorinkubation mit unterschiedlichen Ciprofloxacin-Konzentrationen wurden die Zellen für weitere 4 oder 6 Stunden mit unterschiedlichen 5-ALA-Dosierungen inkubiert und anschließend der PDT ausgesetzt. Die Zellen wurden mit einem Diodenlaser 625 Sekunden lang bei $\lambda = 635$ nm bestrahlt, was einer Bestrahlung von 15.6 J / cm^2 entspricht.

In jeder Zelllinie wurden hauptsächlich zwei Versuchsgruppen untersucht: Zellen, die sowohl mit 5-ALA und Ciprofloxacin behandelt wurden vs. Zellen, die lediglich mit 5-ALA vorinkubiert wurden. Darüber hinaus wurden Negativproben untersucht. Die Vitalität der Zellen nach der PDT wurde durch einen WST-1-Assay quantifiziert.

Die 5-ALA-PDT wurde erfolgreich an drei menschlichen immortalisierten Chordomzelllinien durchgeführt.

Die Wirkung von 5-ALA-PDT konnte durch die zusätzliche Zufuhr von Ciprofloxacin signifikant gesteigert werden. Unterschiedliche Inkubationszeiten (4h oder 6h) spielten eine untergeordnete Rolle.

Alle getesteten Chordomzelllinien zeigten eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der (Ciprofloxacin-) 5-ALA-basierten PDT.

Weitere Experimente sind erforderlich, um diese *proof-of-principle* Ergebnisse weiter abzusichern.

Summary

Chordomas are very rare, locally aggressively growing tumors that develop from relics of the notochord. They typically occur in the skull base, the sacrum and more rarely in the mobile spine. The main therapy is a best possible resection, which however is often limited due to anatomical conditions. Classic adjuvant therapy is problematic because chordomas are considered chemo- and radiation-resistant. New effective treatment modalities are therefore urgently needed.

5-aminolaevulinic acid based photodynamic therapy (5-ALA based PDT) could be an alternative as it already proved to be effective for other tumor entities.

The mode of action is that exogenous 5-ALA induces an accumulation of protoporphyrin (PPIX) in neoplastic cells through feedback inhibition in the heme biosynthesis pathway. The accumulated PPIX acts as photosensitizer when irradiated with monochromatic light of the wavelength of 635 nm. Ultimately, reactive oxygen radicals are formed, which leads to cell death.

5-ALA PDT can be further optimized by fluoroquinolones such as for example ciprofloxacin, which bind iron ions as a chelating agent. This in turn leads to an increased accumulation of the photosensitizer PPIX.

In the present study, the influence of 5-ALA-PDT on three different immortalized human chordoma cell lines was investigated in vitro. Furthermore, the effect of ciprofloxacin and different 5-ALA incubation times were tested.

The experiments were carried out on the three chordoma cell lines U-CH2, U-CH2B and U-CH2A, respectively. After preincubation for 24 hours with different concentrations of ciprofloxacin, the cells were incubated for further 4 or 6 hours with different doses of 5-ALA and then exposed to PDT. The cells were irradiated with a diode laser for 625 seconds at $\lambda = 635$ nm, which corresponds to an irradiation of 15.6 J / cm^2 .

Mainly two experimental groups were examined in each cell line: cells that were treated with both 5-ALA and ciprofloxacin vs. cells that were only preincubated with 5-ALA. In addition, negative controls were examined. The vitality of the cells after PDT was quantified by a WST-1 assay.

The 5-ALA-PDT was successfully performed on three human immortalized chordoma cell lines. The effect of 5-ALA-PDT could be significantly increased by the additional intake of ciprofloxacin. Different incubation times (4h or 6h) played a subordinate role.

All tested chordoma cell lines showed a different sensitivity to the (ciprofloxacin-) 5-ALA-based PDT. Further experiments are required to further validate these proof-of-principle results.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| ALA / 5-ALA | 5-Aminolävulinsäure |
| A./ Aa. | Arteria/ Arteriae |
| CT | Computertomographie |
| FGS | <i>fluorescence guided surgery</i> |
| EMA | Europäische Arzneimittelbehörde |
| FDA | <i>US food and drug administration</i> |
| FECH | Ferrochelatase |
| GCTB | <i>Giant cell tumor of the bone</i> |
| J | Joule |
| LD ₅₀ | Lethal dose / Mittlere letale Dosis |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| N. / Nn. | Nervus / Nervi |
| PDD | Photodynamische Diagnostik |
| PBGD | Porphobilinogen-Desaminase |
| PDT | Photodynamische Therapie |
| PpIX | Protoporphyrin IX |
| ROS | Reactive Oxygen Species (Sauerstoffradikale) |
| W | Watt |
| WST-1 | Water Soluble Tetrazolium Salt-1 |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 CHORDOME | 1 |
| 1.1.2 EMBRYOLOGISCHER URSPRUNG | 1 |
| 1.1.3 KLASSEKATION UND INZIDENZ | 3 |
| 1.1.4 ÄTIOLOGIE | 4 |
| 1.1.5 GENETIK | 5 |
| 1.1.6 FAMILIÄRE HÄUFUNG | 5 |
| 1.1.7 GENDEFEKTE/ MUTATIONEN | 6 |
| 1.2 KLINIK | 6 |
| 1.3 DIAGNOSTIK UND DIFFERENTIALDIAGNOSEN | 10 |
| 1.4 THERAPIE UND PROGNOSE | 12 |
| 1.4.1 STRAHLENTHERAPIE | 13 |
| 1.4.2 DOSIS DER STRAHLUNG | 14 |
| 1.4.3 SYSTEMISCHE THERAPIE | 15 |
| 1.4.4 PROGNOSE | 16 |
| 1.5 PHOTODYNAMISCHE DIAGNOSTIK UND PHOTODYNAMISCHE THERAPIE | 17 |
| 1.5.1 BIOCHEMISCHE GRUNDLAGEN | 18 |
| 1.5.2 FLUORESZENZENTSTEHUNG, PDD | 19 |
| 1.5.3 HÄMOGLOBINSYNTHESE UND EIGENSCHAFTEN NEOPLASTISCHER ZELLEN | 20 |
| 1.5.4 FLUORCHINOLONE ALS PDT-VERSTÄRKER | 22 |
| 1.5.5 PHOTOSENSIBILISATOREN | 23 |
| 1.5.6 LASER | 26 |
| 1.5.7 ERFAHRUNG IN DER NEUROCHIRURGIE | 27 |
| 1.6 ZIELE DIESER ARBEIT | 28 |
| 2. PUBLIZIERTE ORIGINALARBEIT: | |
| CIPROFLOXACIN ENHANCES PHOTOTOXICITY OF 5-AMINOLEVULINIC ACID MEDIATED PHOTODYNAMIC TREATMENT FOR CHORDOMA CELL LINES. GULL HH, KARADAG C, SENGER B, SORG RV, MÖLLER P, MELLERT K, STEIGER H-J, HÄNGGI D, CORNELIUS JF. | 29 |
| 2.1 ANMERKUNG ZUM ETHIKVOTUM | 29 |
| 3. DISKUSSION | 36 |
| 3.1 U-CH2, U-CH2B, UND U-CH14 | 37 |
| 3.2 VERGLEICHBARKEIT DER STUDIE MIT EINEM IN-VIVO MODELL | 40 |
| 3.2.1 PHARMAKOKINETIK UND -DYNAMIK DER ANGEWANDTEN MEDIKAMENTE | 40 |
| 3.2.2 5-ALA INKUBATIONSZEITEN | 41 |
| 3.2.3 5-ALA INKUBATIONSZEITEN UNTER PRÄINKUBATION MIT CIPROFLOXACIN | 41 |
| 3.2.4 ÜBERLEGENHEIT DER DELTA-AMINOLÄVULINSÄURE | 43 |
| 3.3 ÜBERLEGUNGEN ZUM KLINISCHEN EINSATZ DER PDT BEI CHORDOMEN | 44 |
| 3.3.1 LASER: EINDRINGTIEFE, ENERGIE UND VERTEILUNG SPEZIELL IN CHORDOMZELLEN | 45 |
| 3.3.2 POTENZIAL DER KLINISCHEN ANWENDBARKEIT DER PDT BEI CHORDOMEN | 46 |
| 3.3.3 LIMITATIONEN DER KLINISCHEN PDT BEI CHORDOMEN | 48 |
| 3.4 ZUKUNFTSAUSSICHTEN | 51 |
| 4. VERZEICHNISSE | 53 |
| 4.1 LITERATURVERZEICHNIS | 53 |
| 4.2 TABELLENVERZEICHNIS | 73 |
| 4.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 74 |
| 5. ANHANG | 75 |
| 6. DANKSAGUNG | 82 |

1. Einleitung

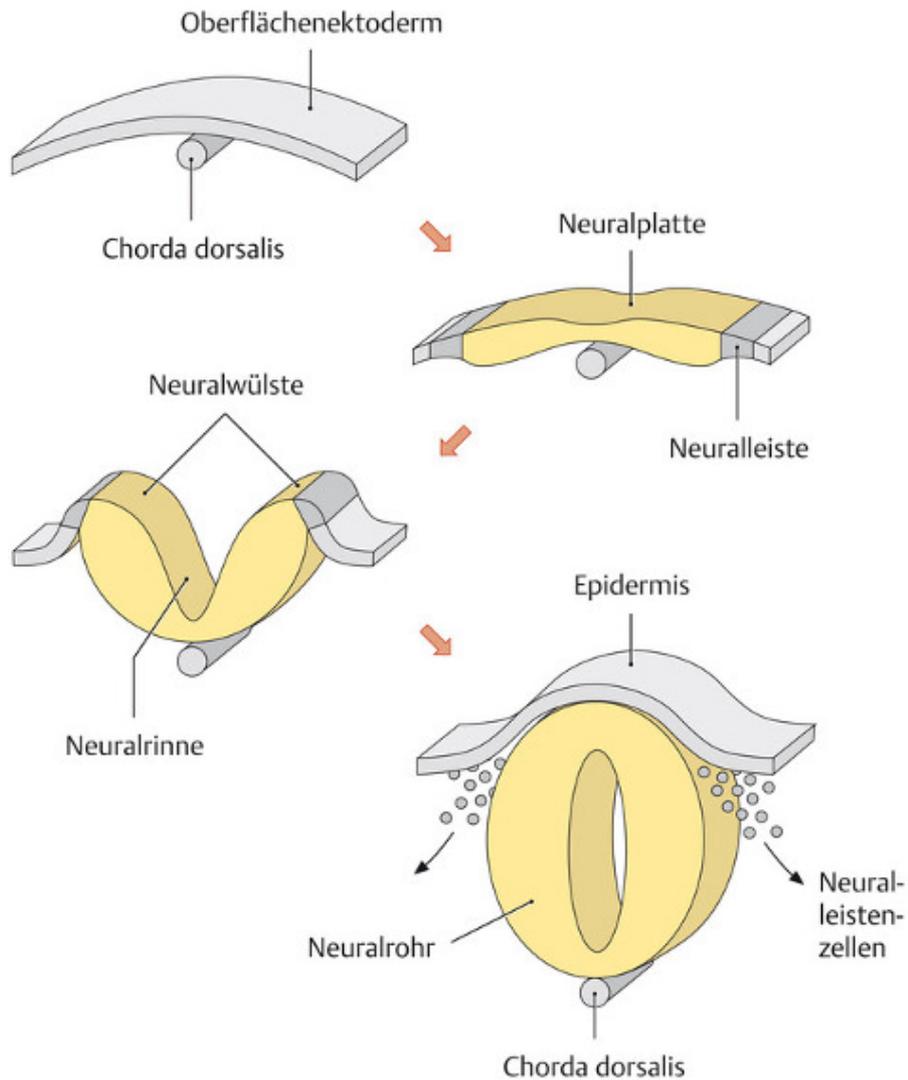
1.1 Chordome

Chordome, 1846 erstmalig beschrieben von dem deutschen Pathologen Rudolf Virchow (2, 3), sind seltene, aber maligne Tumore des Knochens, stammend aus dem Relikt der *Chorda dorsalis*, der frühen Wirbelsäulenanlage (4, 5). Sie erscheinen typischerweise entlang des axialen Skeletts, mit bevorzugter Lokalisation an der Schädelbasis und am Sakrum (3). Histologisch betrachtet handelt es sich hierbei um eine Tumorentität gering-gradiger Malignität. Allerdings verleihen einige Eigenschaften dieser Tumorentität einen malignen Charakter: So liegt eine Rezidivrate von bis zu 85% vor, ebenso existiert das Risiko der Metastasierung (6). Die fehlende Ansprechbarkeit auf Chemotherapie und auf eine gewöhnliche Strahlendosis, und das lokal aggressive und osteodestruktive Wachstum dieser Tumorentität sprechen ebenfalls für einen malignen Charakter (7-9).

1.1.2 Embryologischer Ursprung

Die bevorzugte Lokalisation der Chordome am Clivus sowie im sakrococcygealen Areal (7, 10) ist auf die Embryonalentwicklung der *Chorda dorsalis*, die Leitstruktur für die Entstehung des Nervensystems, zurückzuführen (**Abb. 1**):

Durch die strangförmige Auswanderung von Epiblastenzellen des Primitivknotens in das mesodermale Kompartiment entsteht der Chordafortsatz, aus dem später die *Chorda dorsalis*, auch Notochord genannt, hervorgeht. Dieser wandert entlang des Primitivstreifens aus, also entlang der späteren craniocaudalen Körperachse und endet an der Prächordalplatte. Diese Entwicklung verdeutlicht, wieso bestimmte Regionen entlang der Neuralachse gehäuft von der Ausbildung eines Chordoms betroffen sind, nämlich in 50% der Fälle das Sakrum, in 30% die Schädelbasis, und in 20% die bewegliche Wirbelsäule (6). Vereinzelt liegen in der Literatur auch Beschreibungen über extraskelletale Fälle, sog. *Soft Tissue Chordomas* vor. Diese stellen aber insgesamt eine Seltenheit dar (11).



(Abb. 1)
Schematische Darstellung der Embryonalentwicklung des Nervensystems

Das Nervensystem entwickelt sich aus dem Ektoderm, welches in der 3. Embryonalwoche in die Neuralplatte und in die seitlich gelegenen Neuralleisten differenziert. Die Neuralplatte bildet die Neuralrinne zwischen zwei Neuralwülsten, trennt sich vom übrigen Ektoderm und bildet das Neuralrohr, aus welchem das zentrale Nervensystem (Hirnbläschen, Rückenmark und Zellen der zentralen Glia) entsteht. Die Zellen der beiden Neuralleisten lösen sich ebenfalls vom Ektoderm ab und lagern sich einzeln in die Region seitlich des Neuralrohrs. Aus diesen bilden sich dann Anteile des peripheren Nervensystems (sensibler Anteil des Spinalnervs mit Spinalganglion, viszerales peripheres Nervensystem, Nebennierenmark und periphere Glia) (Quelle: Schünke et al.).

1.1.3 Klassifikation und Inzidenz

Die Tumorentität des Chordoms, Synonym Notochordales Sarkom, lässt sich histopathologisch in vier Subtypen differenzieren (12, 13):

Die häufigste Unterform ist *conventional/ classic chordoma*, die durch ihre Ähnlichkeit zu notochordalen Zellen auffällt. Darüber hinaus weist diese Form auch mikroskopisch vereinzelt knorpelige Areale auf.

Eine weitere Unterform stellt *poorly differentiated chordoma* dar; ein erst kürzlich identifizierter Subtyp, der durch ein schnelleres und aggressiveres Wachstum gekennzeichnet ist als *conventional chordoma*. Dieser Subtyp tritt vor allem in pädiatrischen Patienten auf und in Chordomen der Schädelbasis. Genetisch weist diese Unterform außerdem eine fehlende Expression des Proteins SMARCB1/INI1, ein Tumorsuppressor, auf (14).

Die dritte histologische Untergruppierung bildet *dedifferentiated chordoma*, eine eher seltene Unterform, die bei 5% der betroffenen Patienten auftritt, ebenfalls besonders gehäuft in pädiatrischen Fällen. Sie ist gekennzeichnet durch ein ausgeprägteres malignes Verhalten und schnelleres Wachstum. Außerdem neigt sie eher zu Metastasierungen. Ein Verlust der Expression des Tumorsuppressor-Gens INI1 kann hier ebenfalls vorliegen.

Die vierte Gruppe wird durch das *chondroid chordoma* gebildet. Diese Benennung diente ehemals zur klaren Unterscheidung des Chordoms vom histologisch schwer zu differenzierenden Chondrosarkom.

Da jedoch seit einigen Jahren die histopathologische Differentialdiagnostik durch das Überprüfen des Gewebes auf die Expression von *brachyury*, ein Transkriptionsfaktor, welches in *conventional chordomas* vorkommt, möglich ist, ist damit eine nahezu exakte Einteilung in Chondrosarkom oder Chordom möglich (15).

Chordome stellen mit einer Prävalenz von 0.5:1.000.000 etwa 1- 4 % aller malignen Knochentumore und ca. 20 % aller primär spinalen Tumore (7, 16) dar. Sie bilden auch die häufigste Tumorentität des Sakrums und der Halswirbelsäule.

Insgesamt stellen sie ca. 0.2 % aller Tumore des Zentralen Nervensystems dar (7).

In den USA beträgt die Inzidenz 0,08:100.000, und liegt somit bei ca. 300 Patienten/ Jahr, wohingegen sie in Deutschland ca. 1:1000.000 beträgt, und damit bei <100 Patienten/ Jahr liegt (17). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 50- 60 Jahren. Mit zunehmendem Alter wird eine steigende Inzidenz beobachtet (10). Dabei ist das Auftreten von sakrocoocygealen Läsionen in der fünften Lebensdekade vor allem bei der männlichen Bevölkerung häufiger, während sphenoccipitale Tumore häufiger bei pädiatrischen Patienten vorkommen (18) (19, 20). Craniale Läsionen sind v.a. in der Altersgruppe von 20- 40 Jahren zu beobachten (17). Die Metastasierungsrate liegt zwischen 5-20%. Demgegenüber ist die Rezidivrate von bis zu 85% besonders hoch (21).

1.1.4 Ätiologie

Die Entstehung eines Chordoms ist auf die Embryonalentwicklung zurückzuführen. Physiologisch kommt es in der 8. Woche der Embryonalentwicklung zu einer Rückbildung der Notochorda (syn. chorda dorsalis). Relikte der Chorda dorsalis finden sich in Form der Nuclei pulposi der Bandscheiben (22, 23).

Im Rahmen der Entwicklung eines Chordoms wird ein pathologisches Persistieren einiger Zellen der Notochorda in den Knochen der Wirbelsäule und der Schädelbasis diskutiert, aus denen im weiteren Verlauf maligne Neoplasien entstehen (6) (24).

Allerdings ist es Gegenstand aktueller Forschung, herauszufinden, welche Bedingungen dazu führen, wie ehemalige Zellen der Notochorda im Rahmen der Entstehung der Chordome zu bösartigen Neubildungen entarten (7).

Umweltfaktoren, Ernährungsgewohnheiten und Lebensstile als prädisponierende Faktoren sind bis dato nicht zu identifizieren.

1.1.5 Genetik

Zu beobachten ist das vermehrte Auftreten genetischer Veränderungen in der DNA-Sequenz des *Brachyury*- Proteins bei mehr als 95% der Patienten mit einem Chordom (11) (3).

Dabei handelt es sich beim *Brachyury* um einen Transkriptionsfaktor, der für die Entstehung und Differenzierung der Chorda dorsalis verantwortlich ist. Codiert wird dieser Transkriptionsfaktor durch das sog. TBXT-Gen, auch T-Gen genannt, auf dem langen Arm des Chromosomen 6 (25, 26).

Kommt es zur Variation eines einzelnen Basenpaares in einem komplementären DNA-Doppelstrang, spricht man von Einzelnukleotid-Polymorphismus, engl. *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)*. Diese SNPs sind von Mutationen abzugrenzen, da diese keine neu aufgetretene Veränderungen darstellen, sondern geerbte und vererbare Varianten sind, die beim Auftreten im *Brachyury*- Gen zwar nicht Chordome verursachen können, allerdings das Risiko der Entstehung eines Chordoms erhöhen (23, 27). Das Risiko der Entwicklung eines Chordoms ausgehend von SNPs im *Brachyury*-Gen beträgt weniger als 2:1.000.000 (25).

1.1.6 Familiäre Häufung

Weltweit sind in der Literatur nur wenige Fälle beschrieben, in denen familiäre Häufungen von Chordomen bekannt sind. Hier geht man von starker genetischer Prädisposition aus. Auffällig in einigen dieser betroffenen Familien ist die Art und Weise der Veränderung des T-Gens. Es liegen keine molekularen Variationen oder Mutationen vor, sondern eine komplette Duplikation des gesamten T-Gens (3).

Dennoch trifft diese Beobachtung einer zusätzlichen Kopie des T-Gens nicht in allen bekannten Familien, in denen Chordome gehäuft auftreten, zu (28). Dies lässt weitere, bisher nicht bekannte Mutationen anderer Gene, oder aber auch bisher nicht identifizierte Prozesse im T-Gen, die das Risiko der Entwicklung von Chordomen steigern, vermuten.

1.1.7 Gendefekte/ Mutationen

Eine höhere Inzidenz der Chordome ist in pädiatrischen Fällen zu finden, die zeitgleich betroffen sind von Tuberöser Sklerose, auch Bourneville-Brissaud-(Pringle-)Syndrom genannt, eine autosomal-dominante Erbkrankheit, die die Gene TSC1 und, oder TSC2 betrifft (23). Hier können Veränderungen in einem dieser beiden Gene prädisponierend für die Entwicklung des Chordoms sein (29) .

1.2 Klinik

Bemerkbar macht sich die Erkrankung durch Verdrängungserscheinungen, darauffolgend Schmerzen oder neurologische Ausfälle bzw. funktionelle Störungen. Abhängig von der Lokalisation des Tumors ist eine entsprechende Symptomatik zu beobachten (**Tab. 1**) (22) (24) (10).

| Clival | Sakral | Mobile Wirbelsäule |
|---|--|--|
| Kopf- und Nackenschmerzen | Sphinkterfunktionsstörungen | Dysphagie |
| Hirnnervenläsionen, insbesondere Doppelbilder, bitemporaler Hemianopsie | Lumboischialgien je nach Segment und Dermatome | Myelopathie Symptome |
| Obstruktionen Nasopharynx | anogenitale Dysästhesien | Kribbelparästhesien, Hypästhesien, Allodynie |
| Hypopituitarismus | | |
| Schwindel, Taubheit, Tinnitus | | |
| Hirnstammkompression | | |
| Liquorzirkulationsstörungen | | |

(Tab. 1)

Zusammenfassende Übersicht häufiger Symptome in Abhängigkeit von der Lokalisation (modifiziert nach (6))

Läsionen am Basion, also am ventralen Mittelpunkt des Foramen magnum an der Schädelbasis bzw. in der Nähe der inferioren Spitze des Clivus (**Abb. 2**) können zu Hirnstammkompression, darüber hinaus bei räumlicher Ausdehnung zu Nervenläsionen des N. hypoglossus, N. abducens oder des N. oculomotorius führen (24).

Wandert der Tumor aus dem Corpus ossis sphenoidalis des Clivus nach ventral, so verursacht dies durch die Entstehung einer Neoplasie im Nasopharynx Obstruktionen (24). Breitet sich dieser stattdessen nach dorsal aus, und führt damit zu Verdrängungserscheinungen des N. abducens, der nach seinem langen zisternalen Verlauf an der basalen

Oberfläche des Pons im Bereich des Clivus in die Dura eintritt, so kann dies typischerweise eine Diplopie verursachen (24). Diplopie gilt damit als häufigstes Frühsymptom von Clivuschordomen.

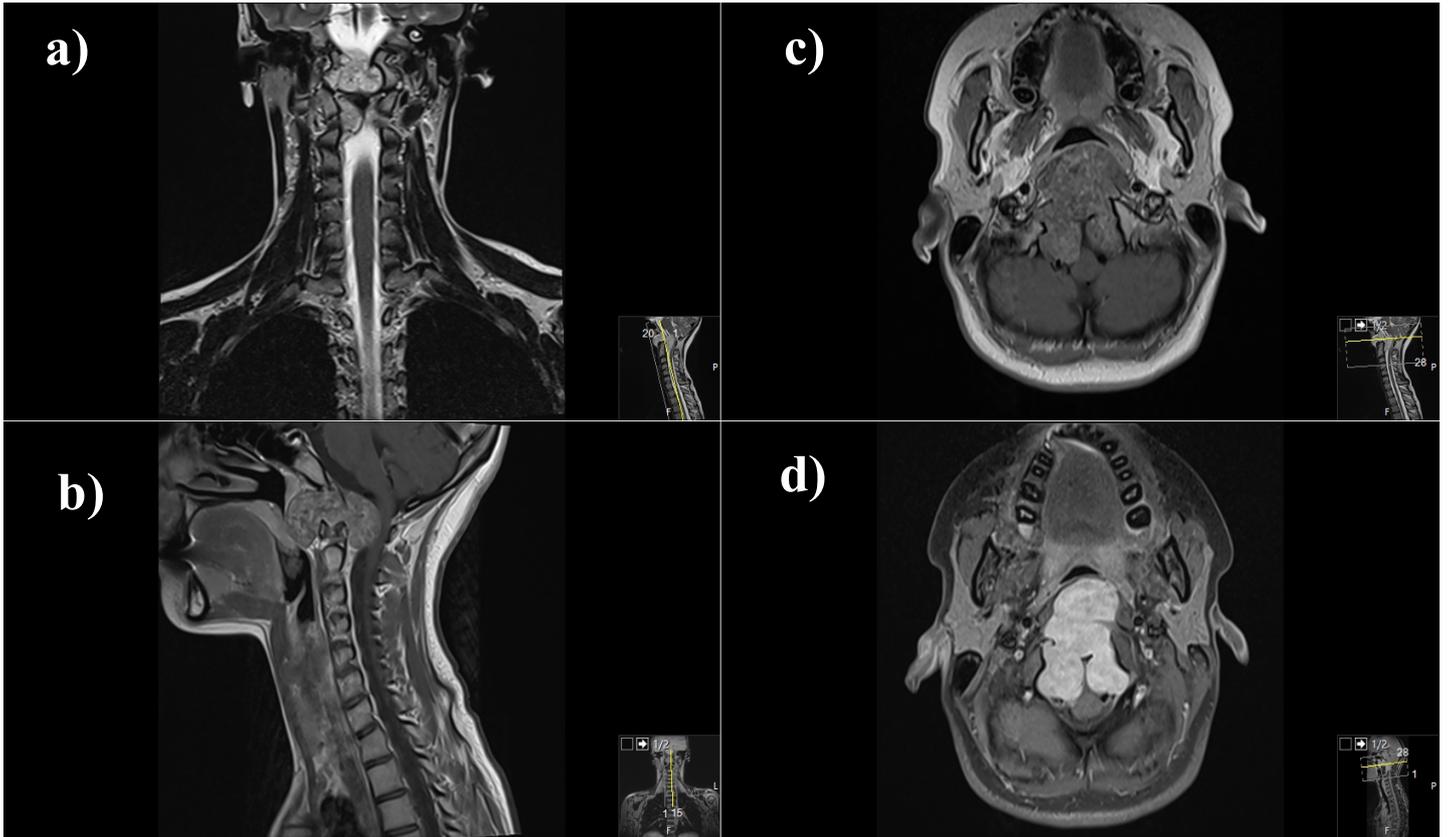
Läsionen an der *Sella turcica*, also am rostralen Ende des Clivus, können mit Hypopituitarismus einhergehen (24).

Breiten sich rostrale Clivalchordome nach lateral aus, führt dies zur Bildung einer parasellären Masse, die in den Sinus cavernosus hineinragen und damit den N. oculomotorius, N. trochlearis, N. ophthalmicus und N. maxillaris des N. trigeminus, und den N. abducens verdrängen kann (24)

Bei suprasellärer Extension kann durch Verdrängung des Chiasma opticums das Chiasma-Syndrom auftreten mit bitemporaler Hemianopsie (24).

Eine posterolaterale Ausdehnung von Chordomen aus der Mitte des Clivus heraus kann otologische Symptome wie Schwindel, Taubheit und Tinnitus hervorrufen. Darüber hinaus können Verdrängungserscheinungen des N. facialis auftreten durch Mitbeteiligung der Pars petrosa ossis temporalis (24)

Läsionen im Bereich des Sakrums können Sphinkterfunktionsstörungen oder Nervenwurzelkompressionsyndrome bestehend aus Rückenschmerzen mit Ausstrahlung verursachen. Letztere können auch bei Läsionen entlang der restlichen mobilen Wirbelsäule auftreten (30).



(Abb. 2)
Anatomische Darstellung eines clivalen Chordoms

a) coronarer Schnitt, T2 gewichtet

b) sagittaler Schnitt, T1 gewichtet

c) axialer Schnitt, T1 gewichtet

d) axialer Schnitt, T1 gewichtet mit Kontrastmittel

Zu erkennen ist eine große Weichteilmasse, die aus dem Clivus hervorgeht und sowohl nach rostral in die Keilbeinhöhle als auch nach posterior wächst, wo sie die Medulla oblongata komprimiert.

(Durchgeführt: Institut für Radiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf.)

1.3 Diagnostik und Differentialdiagnosen

Typischerweise präsentiert sich das Chordom als eine verdrängende Masse im Clivus oder im Sakrum.

Die Magnetresonanztomographie (MRT) stellt die radiologische Methode der Wahl dar, da in dieser besonders Weichteilbeteiligungen mit beurteilt werden können (31).

Zur Darstellung des Ausmaßes der Knocheninfiltration eignet sich besonders die Computertomographie (CT).

Diagnosesicherung ist mittels CT-gesteuerter Punktion möglich. Allerdings setzt dies eine Planung des operativen Eingriffs bereits vor Punktion voraus, da zur Verhinderung von *Seeding* (also der Verschleppung von Tumorzellen) die Punktionstrajektorie so erfolgen muss, dass diese mit exstirpiert werden kann (31).

Zur besseren operativen Planung kann bei Gefäßkompression oder -ummauerung eine Angiographie durchgeführt werden insbesondere zur Einschätzung der Gefäßinfiltration des Tumors (31). Bei kritischer Gefäßbeteiligung kann ein prä-operativer Ballon-Okklusionstest (BOT) weiter Aufschluss darüber geben, ob bei Gefäßsakrifizierung mit einem Infarkt zu rechnen wäre. In diesem Fall müsste im Vorfeld über eine entsprechende Revaskularisierungsstrategie nachgedacht werden (32).

Differentialdiagnostisch von Chordomen zu unterscheiden sind folgende Tumore: (i) Gutartige notochordale Zelltumore (*Benign notochordal cell tumors, BNCT*) verhalten sich in der MRT und CT- Untersuchung bildmorphologisch ähnlich wie Chordome. Allerdings bleiben diese gutartigen Tumore der Wirbelsäule im Knochen eingeschlossen, und können nicht -im Gegensatz zu Chordomen- das umliegende Gewebe infiltrieren. Hier wird *Watchful Waiting* als Therapieoption eingeleitet (33).

(ii) Chondrosarkome sind radiologisch in einer MRT oder CT-Bildgebung kaum von einem Chordom zu differenzieren. Wegweisend können hier Diffusions-MRT- Untersuchungen sein (34). Schlussendlich kann manchmal nur durch eine Biopsie die Diagnose gestellt werden.

- (iii) Maligne Zellen, Chondroid und eine lobuläre Struktur definieren Chondrosarkome. Lokalisation des Chondrosarkoms an der Schädelbasis sprechen in der Regel besser auf eine Bestrahlung an als Chordome an der Schädelbasis, weisen darüber hinaus eine bessere Prognose auf, da es sich hier um histologische Formen mit guter Differenzierung (Grad I und II) handelt (35). Des Weiteren können Chondrosarkome im Bereich des gesamten Körpers, ausgehend aus jedem Knorpelgewebe, entstehen (15).
- (iv) Das Osteosarkom und Chordom sind differentialdiagnostisch hauptsächlich vom Chondrosarkom zu differenzieren.
- (v) Ecchordosis physaliphora, ein gutartiger, kongenitaler Tumor aus notochordalen Überresten, der entlang der gesamten Wirbelsäule auftreten kann, ähnelt radiologisch morphologisch ebenfalls dem Chordom (36). Allerdings breiten diese sich normalerweise nicht in das umgebende Gewebe aus, wie es für Chordome typisch ist (37).
- (vi) Weiterhin zu differenzieren von Chordomen sind Riesenzelltumore des Knochens (*Giant cell tumor of the bone, GCTB*). Diese zeigen in der radiologischen Bildgebung kleinste Unterschiede zu den Chordomen, befinden sich außerdem tendenziell im oberen Bereich des Kreuzbeins (38).
- (vii) Schwannome sind insofern gut von Chordomen zu unterscheiden, da sie den Knochen anders schädigen als Chordome, darüber hinaus stellen sie sich radiologisch anders dar und breiten sich nicht auf benachbarte Muskeln oder Gelenke aus (39).
- (viii) Differentialdiagnostisch von Chordomen sind weiter folgende Tumore, die an der Schädelbasis oder entlang der Wirbelsäule entstehen können, abzugrenzen: Ewing-Sarkom, Osteosarkom und das myxopapilläre Ependymom. Beim letzteren handelt es sich hierbei um ein seltenes, langsam wachsendes Ependymom bzw. eine Art des Glioms, stammend aus dem Stützgewebe des Gehirns und Rückenmarks mit bevorzugter Lokalisation an der caudalen Wirbelsäule, die normalerweise als gutartig oder niedriggradig maligne (WHO-Grad I oder II) eingestuft werden (40).
- (ix) Zu bedenken sind des Weiteren Lymphome, Multiple Myelome und Metastasen primär maligner Tumore, die ebenfalls dieselbe Region des Körpers betreffen können wie Chordome.

1.4 Therapie und Prognose

Therapie der Wahl stellt nach umfangreicher Bildgebung bestehend aus CT, MRT und evtl. Angiographie die operative Entfernung dar; sowohl für neu diagnostizierte Chordome als auch für rezidivierende, fortgeschrittene oder auch metastasierende (6).

Da alle nach einer Operation zurückgebliebenen Tumorzellen nachwachsen können, wird eine radikale operative Entfernung angestrebt, mit möglichst großzügiger Entfernung der Resektionsränder (13) (41).

Anhand des Ausmaßes der Resektionsränder kann in etwa die Rezidivwahrscheinlichkeit angegeben werden. Dabei unterscheidet die *Chordoma Global Consensus Group* folgende Marginalzonen (13):

Wide resection, breite Resektion, beschreibt die operative Entfernung des gesamten Gewebes mit zusätzlicher Entfernung von 1 mm gesundem Gewebe, das den Tumor umgibt.

Marginal resection, also Randresektion, liegt vor, wenn weniger als 1 mm gesundes Gewebe um den Tumor herum mitreseziert werden kann, ohne dass dabei sichtbares Tumorgewebe zurückbleibt.

Intralesional resection, intraläsionale Resektion beschreibt den Zustand, in dem sichtbares Tumorgewebe zurückbleibt oder Tumorzellen in die Umgebung gelangt sind, weil z.B. der Tumor intraoperativ geschnitten bzw. zerstückelt werden musste (sog. *piece meal resection*). Dies ist im Bereich der Schädelbasis regelhaft nötig, da hier eine en bloc Resektion aufgrund umliegender Strukturen oft unmöglich ist (41, 42). Auch im Bereich der mobilen Wirbelsäule und des Sakrums ist eine en bloc Resektion häufig problematisch (43).

Auf der anderen Seite belegen Studien, dass eine radikale und damit vollständige Resektion mit breiten, tumorfreien Rändern mit niedrigen Rezidivraten und höherer Überlebensrate einhergehen (4).

Schädelbasistumore verlangen häufig die interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen der Neurochirurgie und der HNO, zeitgleich fordern vor allem sakral gelegene Tumore eine interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen verschiedensten Chirurgen aus der Neurochirurgie, orthopädischen Chirurgie, kolorektalen Chirurgie und im Rahmen von Rekonstruktionen aus der plastischen Chirurgie, um das Ziel der operativen Entfernung, nämlich möglichst eine En-bloc-Resektion, also eine vollständige Entfernung des Tumors in

einem Stück mit breiten Resektionsrändern des den Tumor umgebenden, gesunden Gewebes, zu erreichen (44-46).

Da allerdings die Radikalität der operativen Entfernung des Tumors in schwer zugänglichen Bereichen wie z.B. in der Schädelbasis oder im kraniozervikalen Übergang, in der die Chordome häufig wichtige Nerven und Strukturen berühren, limitiert ist, darüber hinaus trotz kompletter Tumorsektion Rezidivraten zwischen 50 und 100% beschrieben sind (44)-(47), stellt die Strahlentherapie einen integralen Bestandteil in der adjuvanten Therapie der Chordome dar.

1.4.1 Strahlentherapie

Die Strahlentherapie kann sowohl präoperativ, oder postoperativ als auch prä- und postoperativ erfolgen, je nach Stadium und Lokalisation der Erkrankung. Ziel ist es hierbei, (verbliebene) Tumorzellen im Körper abzutöten oder deren Wachstum zu stoppen (48).

Prä- und postoperative Bestrahlung wird vor allem bei sakral gelegenen Chordomen oder Chordomen der mobilen Wirbelsäule angewandt (30).

Bei erstmalig diagnostizierten Chordomen dient die Strahlentherapie zur Reduktion der Rezidivwahrscheinlichkeit nach vorheriger chirurgischer Resektion (48-50). Sie kann allerdings auch als Hauptbehandlung eingesetzt werden, wenn der Tumor nicht operativ entfernt werden kann oder der Patient inoperabel ist. Die Strahlentherapie allerdings erweist sich postoperativ als besonders effektiv, je mehr Tumorgewebe entfernt werden konnte, (insbesondere im Bereich des Hirnstamms und Sehnervs) (51).

Bei rezidivierenden Tumoren kann die Strahlentherapie, wenn sie hochdosiert erfolgen kann, als kurativer Therapieansatz eingesetzt werden (43). Wenn jedoch eine hochdosierte Bestrahlung nicht eingesetzt werden kann, wird im Rahmen der palliativen Behandlung eine niedrigere Dosis angewandt, um das Wachstum des wiederkehrenden Tumors zu verlangsamen und mögliche Symptome zu lindern. Als Strahlentherapie kann zum Einsatz gebracht werden externe Strahlstrahlung, Protonenstrahlung, Kohlenstoffionentherapie, Photonenstrahlung oder interne Strahlung (Brachytherapie) (21, 50-52).

Lokal fortgeschrittene und metastasierte Chordome können in Kombination mit einer systemischen Therapie behandelt werden (52); Dabei kann durch die Bestrahlung das Immunsystem angeregt werden, sodass die systemische Therapie besser wirken kann (53). Die Kombinationstherapie, bestehend aus Bestrahlung und systemischer Therapie, ist Grundlage aktueller Forschung in klinischen Studien (54-56).

1.4.2 Dosis der Strahlung

Da Chordome sehr strahlenresistent sind, ist eine sehr hohe Strahlendosis erforderlich, um überhaupt einen Effekt in der Therapie zu erzielen. Daher ist eine sehr hohe Gesamtdosis von mindestens 74 GyE (Gray Equivalents) für Protonen- und Photonenstrahlung notwendig (49). Dabei limitiert allerdings die enge Nachbarschaft zu strahlensensiblen, wichtigen Strukturen, wie z.B. Nerven, Rückenmark, oder Hirnstamm die Möglichkeit einer Dosiserhöhung oder sogar Repetition konventioneller Strahlentherapie. Ab 24-30 Gy beispielsweise kommt es bereits zum vollständigen Verlust der Geschmacksfähigkeit (57). Der Hirnstamm kann bereits ab einer Dosis von 54 Gy in Mitleidenschaft gezogen werden (58).

Darüber hinaus schließt sich möglicherweise die Option einer weiteren Bestrahlung im Rahmen eines Rezidivs aus, wenn bereits hohe Strahlendosen verabreicht wurden auf Grund der potenzierten Toxizität bei mehrfacher Bestrahlung.

Trotz Fokussierung der Strahlung auf den Tumor wie bei der Protonen- oder der Kohlenstoffionentherapie, treten kurz- und langfristige Nebenwirkungen auf (50);

Diese sind üblicherweise Hautausschlag, Hautreizungen bis hin zu tiefen Ulzerationen, Übelkeit und Müdigkeit und des Weiteren in Abhängigkeit von der Lokalisation folgende Nebenwirkungen: Bestrahlungen im Bereich der Schädelbasis führen häufig zu lokalem Haarausfall, Reizungen im Mund- und Rachenbereich, Veränderungen des Geruchs-, Geschmacks-, und Gehörsinns, Schluckbeschwerden, verschwommener Sicht und starken Kopfschmerzen. Bei Bestrahlung der mobilen Wirbelsäule beklagen Patienten lokalen Haarausfall, Halsschmerzen, Schluckbeschwerden und Kurzatmigkeit. Eine

Strahlentherapie der Sakralregion kann zu Durchfall, Beeinträchtigung der Darm- oder Blasenfunktion und der sexuellen Funktion führen (56).

Auch sind späte Strahlenschäden beschrieben. Hierbei handelt es sich um Störungen im endokrinen System, darüber hinaus auch langfristige Veränderungen im Hören, Sehen, Schlucken, in der Darm-, Blasen- oder sexuellen Funktion, sowie Neuropathien, einschließlich Schmerzen, Schwäche und Taubheit im Gesicht oder an den Extremitäten (51, 52, 59).

1.4.3 Systemische Therapie

Die systemische Therapie umfasst Chemotherapie, Target Therapie und Immunotherapie (53). Sie wird angewandt bei lokal fortgeschrittenen, rezidivierenden oder metastasierten Chordomen, wenn eine chirurgische Behandlung und / oder eine Bestrahlung nicht möglich sind bzw. nicht empfohlen werden. Außerdem kann die systemische Therapie in Erwägung gezogen werden, wenn der Tumor schnell wächst, oder es sich um einen schlecht differenzierten oder dedifferenzierten Typ handelt (54).

Gegenwärtig ist eine systemische Therapie zur Behandlung von Chordomen von den staatlichen Aufsichtsbehörden der US-amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA und der Europäischen Arzneimittelbehörde EMA nicht zugelassen (6).

In einigen Ländern ist es aber Ärzten erlaubt, *off-label* Therapien im Sinne von Target Therapie, Immuntherapie und Chemotherapie im Rahmen von klinischen Studien durchzuführen, z.B. **ClinicalTrials.gov ID's:** [NCT03083678](#), [NCT04042597](#), [NCT03623854](#), [NCT02989636](#), [NCT03110744](#), [NCT03955042](#); insbesondere für pädiatrische und jüngere Patienten: **ClinicalTrials.gov ID:** [NCT04718675](#), [NCT04416568](#), [NCT03155620](#).

1.4.4 Prognose

Die Prognose ist abhängig von individuellen Faktoren, wie z.B. dem Patientenalter, der Chordomart, der Tumorgröße und -lokalisierung, sowie der Therapieform und dem Ausmaß der Resektion. Die Prognose wird besonders bestimmt durch Ausmaß und Vollständigkeit der Tumorresektion. Das 5-Jahresgesamtüberleben liegt zwischen 35 und 60 % (13), die lokale 5-Jahreskontrolle unter 50 %.

Dabei spielt das Alter bei der Erstdiagnose ebenfalls eine wichtige Rolle; hierbei erweist sich ein jüngeres Alter als prognostisch günstig im Hinblick auf ein *disease-free survival* nach der operativen Entfernung des Tumors (42).

Zeitgleich haben besonders Kinder unter 5 Jahren mit der Diagnose eines craniovertebralen oder spinalen Chordoms eine besonders schlechte Prognose, während eine radikale Resektion gefolgt von Strahlentherapie in älteren Kindern eine gute Prognose hat (60).

Im Rahmen einer postoperativen Fortführung der Therapie wird die Protonentherapie der konventionellen Bestrahlung vorgezogen. In wie weit dies beeinflusst wird durch den Einsatz stereotaktischer Bestrahlungstechniken und tumorkonformer Bestrahlung wird aktuell klinisch untersucht (61, 62). Die Nebenwirkungen für alle Therapieformen gemessen an RTOG-Grad III und IV liegen zwischen 6 und 10 % (59, 60, 63, 64) (**Tab. 2**).

| RTOG/EORTC grade | Description |
|------------------|---|
| Grade 0 | No symptoms |
| Grade 1 | Mild diarrhea, mild cramping, bowel movement five times daily. Slight rectal discharge or bleeding |
| Grade 2 | Moderate diarrhea and colic bowel movement >5 times daily Excessive rectal mucus or intermittent bleeding |
| Grade 3 | Obstruction or bleeding requiring surgery |
| Grade 4 | Necrosis/perforation/fistula |

RTOG, Radiation Therapy Oncology Group; EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer.

(Tab. 2)

Toxizitätskriterien der Radiation Therapy Oncology Group und der European Organization for Research and Treatment of Cancer (DOI:10.5114/jcb.2018.77953)

1.5 Photodynamische Diagnostik und Photodynamische Therapie

Der Mensch zieht Nutzen aus Licht in Form von Sonnenenergie zur Therapie von diversen Hauterkrankungen bereits seit der Antike (65). Als deutscher Medizinstudent entdeckte Oscar Raab 1899 unter der Leitung des Direktors von Tappeiner, dass Reagenzien wie Akridin, Phenylakridin, Eosin und Chinin unter dem Einfluss des Tageslichtes eine toxische Wirkung auf Paramaecien ausüben, während diese Stoffe eigenmächtig und im Dunkeln nicht bzw. nur wenig schädlich wirkten (66). So führte 5 Jahre daraufhin von Tappeiner den Begriff „photodynamisch“ ein (67). Geehrt wurde der dänische Arzt Niels Finsen im Jahre 1903 für die Behandlung der kutanen Tuberkulose mit ultraviolettem Licht und die Entwicklung der Verwendung von Kohlenstoff-Lichtbogen zur Therapie dieser Erkrankung mit dem Nobelpreis (68).

1.5.1 Biochemische Grundlagen

Die Photodynamische Therapie (PDT) basiert auf lichtinduzierter Destruktion krankhaft veränderten Gewebes bei gleichzeitiger Wahrung physiologischer und anatomischer Integrität.

Dabei kommt es zur tumorselektiven Anreicherung lichtempfindlicher Substanzen, sog. *Photosensitizer* (69). Als Photosensibilisatoren wirken z.B. Porphyrine (70). Diese entfalten dann auf molekularer Ebene die photodynamische Wirkung durch Absorption von Licht einer Wellenlänge von 630 nm bis 635 nm. Die Absorption des Lichtes führt zu angeregten Energiezuständen des Sensibilisators, indem 1 Molekül des Photosensibilisators ein Photon des Lichtes absorbiert, und dadurch in den ersten angeregten Singulett- Zustand übergeht (71). Nun kann es auf Grund der starken Instabilität dieses Singulett- Zustandes zur Interkombination (*intersystem crossing*) kommen, woraus durch den Spinwechsel des angeregten Elektrons der weniger energiereiche Triplett- Zustand entsteht. Dabei gilt; je länger die Lebensdauer des Singulett-Zustands umso größer die Wahrscheinlichkeit des Übergangs in den Triplett- Zustand. Dieser weist eine besonders lange Lebensdauer von wenigen Millisekunden auf. Diese lange Lebensdauer begünstigt den Zusammenstoß mit besonders vielen Molekülen der Umgebung. Trifft dabei das Molekül des Photosensibilisators im Triplett-Zustand auf ein weiteres Molekül mit dem Grundzustand eines Triplett-Zustandes, wird die phototoxische Reaktion ausgelöst (72, 73). Eine Interaktion ist auf zwei Weisen mit molekularem Sauerstoff, eins der wenigen Moleküle im Triplett-Grundzustand, möglich. Bei der sog. Typ-I-Reaktion kommt es zu einem Transfer eines Elektrons oder Wasserstoffatoms des angeregten Photosensibilisators auf das Substratmolekül. So kommt es zur Entstehung vieler Radikale, wie z.B. Superoxidationen (O_2^-), Hydroxylradikale (OH^\cdot) oder Wasserstoffperoxide (H_2O_2). Dagegen formt während der Typ-II-Reaktion die Relaxation in ein metastabiles Zwischenniveau die Basis für die direkte Energieübertragung des angeregten Photosensibilisators auf Sauerstoff, der dadurch in einen Singulett- Sauerstoff (1O_2) übergeht, und der Photosensibilisator in seinen unerregten Grundzustand überführt wird (74). Diese Radikale sind gekennzeichnet von chemischer Reaktionsfreudigkeit, sodass Zellbestandteile in der Umgebung wie Zytoskelett, Plasmamembran, und andere Zellorganellen, nicht aber der Zellkern, durch Oxidation

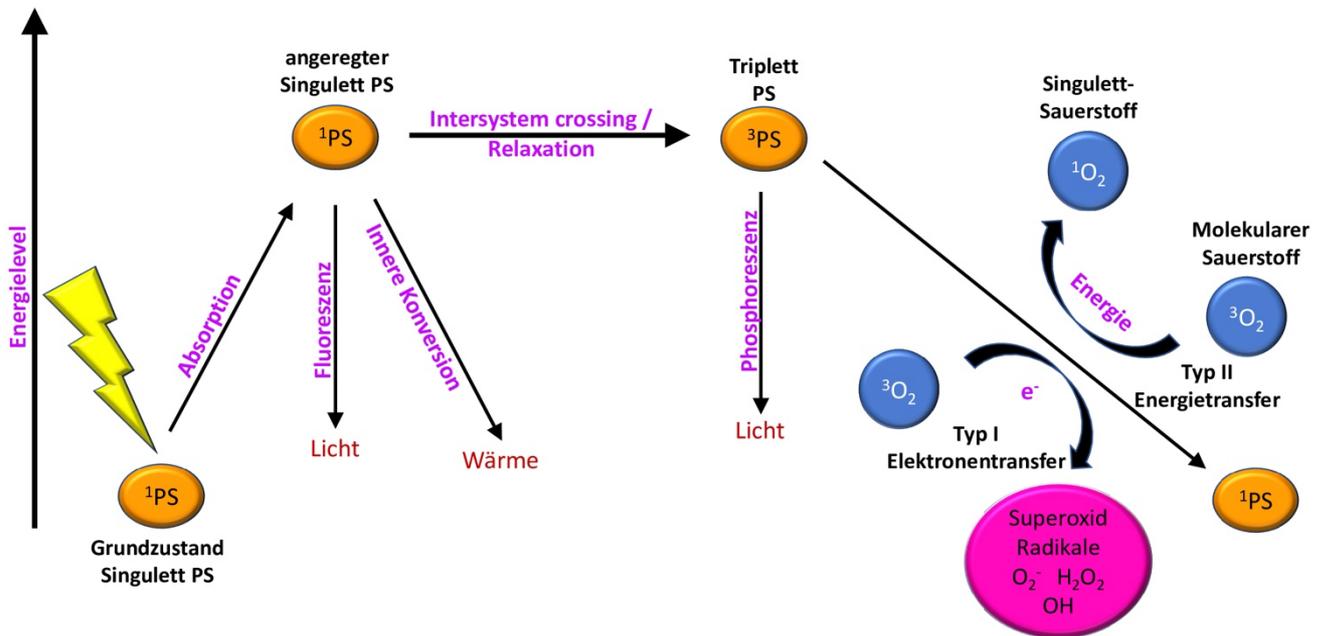
geschädigt werden (75). Dies resultiert in oxidativem Stress, Nekrose und - durch die Wirkung auf die Mitochondrienmembran- in einer Apoptose des behandelten Tumorgewebes. Somit wird deutlich, dass der Effekt der PDT besonders vom Sauerstoffangebot abhängig ist (76). Über die tumortoxische Wirkung hinaus, bewirkt die PDT außerdem eine Aktivierung des Immunsystems. Unter subletaler Dosierung kommt es zur Zellaktivierung unter Bildung von Eicosanoiden, Zytokinen und des Tumornekrosefaktors (77).

Bemerkenswert ist, dass physiologisches Gewebe von der PDT unangetastet bleibt. Dies liegt vor allem in der bevorzugten Akkumulation der Photosensibilisatoren im Tumor (78). Die Ursache hierfür liegt in der physiologischen Metabolisierungsform des Photosensibilisators im gesunden Gewebe bei normaler Ferrochelatase- Aktivität sowie genügend Eisenvorräten. Aus diesem Grund weist die PDT in ihrem Effekt eine hohe Tumorselektivität auf (75, 79).

1.5.2 Fluoreszenzentstehung, PDD

Da nicht die gesamte Energie bei einer Bestrahlung mit $\lambda = 405 \text{ nm}$ aufgenommen werden kann, wird eingestrahlte überschüssige Energie als sichtbares Licht reflektiert (80).

Dies liegt daran, dass durch die Aufnahme eines Photons der Photosensibilisator in einen angeregten Singulett-Zustand gelangt, der sehr instabil ist und wegen Relaxationsmechanismen und der Abgabe von Fluoreszenzlicht wenige Pikosekunden anhält (1). Dieser Aspekt wird im Rahmen der Photodynamischen Diagnostik genutzt; Tumoreale fluoreszieren auf diese Weise, sodass eine fluoreszenzdiagnostische Abgrenzung der Tumore und sogar eine Erkennung subklinischer Tumorstufen möglich ist (80, 81), nachdem der Photosensibilisator mittels Blaulicht der Exzitationswellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$ zur Fluoreszenz angeregt wurde (**Abb. 3**).



(Abb. 3)
 Schematische Darstellung des Wirkungsprinzips der Photodynamischen Therapie
 sowie der Entwicklung von Fluoreszenz (modifiziert nach (1))

1.5.3 Hämoglobinsynthese und Eigenschaften neoplastischer Zellen

Der Effekt der PDD und der PDT sind biochemisch zurückzufolgen auf eine Akkumulation des Zwischenprodukts Protoporphyrin (PpIX) im Hämoglobinstoffwechsel. Zum Verständnis wird im folgender näher auf den Hämoglobinstoffwechsel eingegangen (82) (Abb.4);

Im geringen Maße findet dieser fast in allen Zellen statt, hauptsächlich jedoch in den Erythroblasten im Knochenmark für Hämoglobin und in den Hepatozyten für Cytochrom-C. Ausgehend von Succinyl-CoA, einem Zwischenprodukt des mitochondrialen

Tricarbonsäure-Zyklus', entsteht durch Kondensation mit Glycin δ -Aminolävulinat (5-ALA) (83). Dieser Schritt wird katalysiert durch das geschwindigkeitsbestimmende Enzym δ -Aminolävulinatsynthase. Die 5-ALA-Synthase ist abhängig von Pyridoxalphosphat.

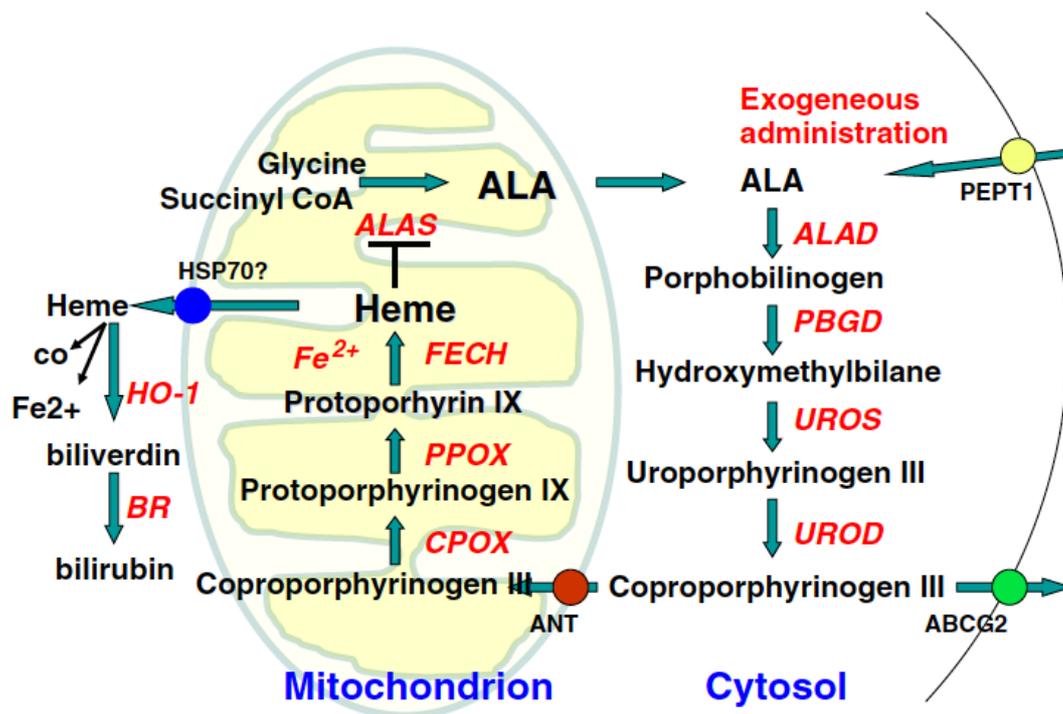
Zwei Moleküle 5-ALA gelangen nun aus dem Mitochondrium ins Zytosol und kondensieren nun unter Wasserabspaltung zu Porphobilinogen, welches die für das Häm typische Pyrrolstruktur enthält.

4 Porphobilinogenmoleküle kondensieren unter Desaminierung zu Uroporphyrinogen III, einer Tetrapyrrolverbindung. Diese wird decarboxyliert, zurück ins Mitochondrium transportiert, daraufhin zweimal oxidiert, sodass nun die für Häm typische Methingruppen zwischen den Pyrrolringen entstehen, das Protoporphyrin IX (PpIX).

An dieser Stelle wirkt ein für die PDD und PDT ausschlaggebendes Enzym, nämlich die Ferrochelatase (FECH). Unter Zuführung eines Eisenatoms bewirkt dieses nämlich die Synthese von Häm aus dem photochemisch aktiven PpIX. Durch zelluläre Transportproteine können Porphyrin-Metabolite der PpIX-Synthese entgehen (84).

Häm als Endprodukt der Synthese ist ein allosterischer Inhibitor des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Biosynthese, der 5-ALA-Synthase.

Bereits mehrere Studien bewiesen, dass in neoplastischen Zellen die Expression des Enzyms Ferrochelatase vermindert ist im Vergleich zu der in physiologischen Zellen (85-87). Desweiteren liegt in neoplastischen Zellen eine *down-regulation* bestimmter Transportproteine vor (88). Diese Faktoren begünstigt die selektive Anreicherung von PpIX nach exogener Gabe von 5-ALA. Diese Wirkung wird darüber hinaus durch eine Sättigungsdynamik der beteiligten Enzyme bei insgesamt erhöhter Stoffwechselaktivität in neoplastischen Zellen und damit durch Erschöpfung der verbleibenden enzymatischen Aktivitäten potenziert (89).



(Abb. 4)
Schematische Darstellung der Hämoglobin-Biosynthese im Mitochondrium und Zytosol

Die Biosynthese findet hauptsächlich in der Leber sowie in den roten Blutkörperchen statt. Daran beteiligt sind acht verschiedene Enzyme, einschließlich die 5-ALA-Synthase und die Ferrochelatase. Die exogene Zufuhr von 5-ALA führt letztlich zur gesteigerten Synthese von Protoporphyrin IX. Dies ist maßgebend für die PDD/PDT (Quelle: Masahiro Ishizuka et al).

1.5.4 Fluorchinolone als PDT-Verstärker

Eine für die PDT interessante Eigenschaft der Gruppe der Fluorchinolone ist, dass sie u.a. eine Chelation von Eisen bewirken können (90). Wie aus der vorherigen Beschreibung ersichtlich benötigt die Ferrochelatase, ein wichtiges Enzym in der Hämbiosynthese, in ihrer Funktion die Anwesenheit von freien Eisenionen. Werden diese nun durch den Effekt der Fluorchinolone, der aus Eisen-Komplexierung besteht (91, 92), eingenommen, so liegt ein

intrazellulärer Eisenmangel vor, der den FECH-katalysierten Reaktionsschritt von PpIX in Häm zusätzlich beeinträchtigt. Dies resultiert in einer noch stärkeren Akkumulation von PpIX.

Dieser Effekt wird bereits seit den frühen 1990er- Jahren nachgewiesen. Als Wirkstoff dienten hierbei besondere Chelatoren wie EDTA, Citrat und Deferoxamin (93, 94). Basierend auf Forschungsergebnisse der Gruppe *Ohgari et al.*, die eine Effektivitätssteigerung der 5-ALA-PDT durch Fluorchinolone zeigen konnte, erwies sich Ciprofloxacin im Vergleich zu anderen getesteten Antibiotika derselben Gruppe als besonders effektiv (90). So zeigte sich beispielsweise Ciprofloxacin in zwei- bis achtmal niedrigeren Konzentrationen im Vergleich zu Ofloxacin immer noch als wirksam.

Aufgrund seiner breiten klinischen Anwendung als Antibiotikum erscheint Ciprofloxacin aufgrund der möglichen Übertragbarkeit in ein klinisches Setting im Sinne eines „*from bench to bedside*“ besonders interessant.

1.5.5 Photosensibilisatoren

Photosensibilisatoren führen als Donor und Akzeptor von Licht zu einer Lichtübertragung. Dabei liegt der Absorptionsbereich des Photosensibilisators genau in dem Wellenlängenbereich, in dem auch das zur Bestrahlung eingesetzte Licht liegt (80).

Der Photosensibilisator überträgt die Lichtenergie dann auf ein zweites Molekül mit anderen Absorptionseigenschaften. Dies verursacht Fluoreszenz, und weitere photodynamische Reaktionsschritte. Für die Wirkung der PDD und PDT ist es notwendig, dass durch die Applikation des Photosensibilisators die Konzentration von PpIX zunimmt (74, 95).

Im klinischen Setting ist es darüber hinaus von großer Relevanz, dass ein Photosensibilisator ein günstiges Nebenwirkungsprofil aufweist, möglichst im pathologischen Gewebe akkumuliert und zudem leicht applizierbar ist (96).

Dabei ist die Akkumulation von Photosensibilisatoren zu einem Teil abhängig von deren Affinität zu Low-Density-Lipoproteinen (LDL) (74). Denn die Photosensibilisatoren sind an LDL gebunden. Diese Bindung wird durch Tumorgewebe bevorzugt aufgenommen. Dies

erfolgt durch Endozytose (74). Darüber hinaus erfolgt eine verstärkte Aufnahme bei erhöhter Tumorneovaskularisation, niedrigem pH-Wert im Tumorgewebe und damit verbunden der verminderten Löslichkeit des Photosensibilisators im sauren Milieu (97). Auch der verminderte Abtransport eines Stoffes wegen noch unterentwickelter Tumorlymphgefäße führt zu einer stärkeren Akkumulation der Photosensibilisatoren im neoplastischen Gewebe (74).

Zu den Photosensibilisatoren der 1. Generation gehört das Hämatoporphyrin-Derivat (HPD), ein lipophiles Porphyringemisch wie beispielsweise Photofrin I, und die besser aufgereinigte Form Dihämatoporphyrinester-Dihämatoporphyrinäther (DHE), wie z.B. Photofrin II (98). Nach intravenöser Applikation dieser Photosensibilisatoren konnten unterschiedlichste Neoplasien, wie z.B. Basaliome, Melanome, Kaposi-Sarkome, spinozelluläre Karzinome, lokal rezidivierende Mammakarzinome und Tumore der Mykosis fungoides in klinischen Studien behandelt werden (80, 97, 99-104). In Kanada ist DHE für Blasenkarzinome, in den Niederlanden für Lungen- und Ösophaguskarzinome, in Japan für Lungen-, Ösophagus-, Magen- und Gebärmutterhalskarzinome zugelassen (74) (105).

Diese Photosensibilisatoren weisen einen niedrigen Absorptionskoeffizienten bei einer Wellenlänge von $\lambda = 630$ nm auf. Dies erfordert eine hohe Konzentration des Sensibilisators. Dies wiederum führt dazu, dass eine extreme Wirkdauer von ca. 6 bis 8 Wochen der starken Photosensibilisierung der Haut und der Augen verursacht wird, sodass die klinische Anwendung dieser Photosensibilisatoren sehr begrenzt ist (106).

So entwickelten sich als Alternative Photosensibilisatoren der 2. Generation mit deutlich kürzeren Photosensibilisierungszeiten (107, 108). Zu diesen gehören: Benzoporphyrin-Derivate (BPD), Zink-Phthalocyanin, Aluminiumchlorosulfophthalocyanin (AlClSPz), meso-Tetraphenylporphine, katatonische Farbstoffe (Phenoxazin), (meso-) Tetraphenylporphin-sulfonat (TPPS4), Chlorin (Chlorin e6, NPe6), und Porphyrine, die bis heute in klinischer Erprobung sind. Diese weisen außerdem Absorptionsspektren im langwelligen Bereich bei gleichzeitig größerer optischer Penetrationstiefe des Lichtes auf, sodass selbst dickere Tumore erreicht werden können (107).

J. Kennedy entdeckte vor ca. 35 Jahren delta-Aminolävulinsäure, ebenfalls zu den Photosensibilisatoren der 2. Generation zählend, als neue Therapiemodalität (109, 110). 5-ALA selbst wirkt dabei nicht als Photosensibilisator, sondern lediglich als Vorgänger von Häm im körpereigenen Metabolismus. Durch die exogene Zufuhr wird dem ersten Reaktionsschritt in der Hämsynthese ausgewichen, welcher eigentlich die Porphyrinsynthese begrenzt. So ist eine ungehemmte Produktion endogener Porphyrine möglich, die physiologischerweise über den negativen Feedbackmechanismus durch die freie Hämkonzentration begrenzt ist (108). Das Absorptionsspektrum von 5-ALA liegt im Wellenbereich von Licht der Länge $\lambda = 400$ nm, und das Emissionsspektrum zwischen $\lambda = 536$ nm und 700 nm.

Im Rahmen der PDD wird das Absorptionsspektrum genutzt, da bei Bestrahlung des Gewebes, das an PpIX angereichert ist, mit einer Wellenlänge von 400nm, dieses Gewebe zur Fluoreszenz angeregt wird, während das Emissionsspektrum für den Effekt der PDT eingesetzt wird (111).

5-ALA hat sich durch seine Vorteile weltweit als Photosensibilisator etabliert (99, 107, 112-114). Dabei begünstigten folgende Aspekte dessen Einsatz: ein im Vergleich zu anderen Photosensibilisatoren günstigeres Nebenwirkungsprofil, eine Photosensibilisierungszeit von lediglich 8-24 h, und eine höhere Selektivität im Absorptionsspektrum (83, 102). Aus diesen Gründen ist 5-ALA als einziger Photosensibilisator nicht nur in der topischen Anwendung anerkannt, sondern auch in der Neurochirurgie ein zugelassenes Pharmazeutikum als Gliolan[®] (medac GmbH, Wedel, Deutschland).

Photosensibilisatoren der dritten Generation sind Gegenstand aktueller Forschung. Hier geht es um die Entwicklung von Antikörpern oder biologischen *target*-Molekülen, die mit Photosensibilisatoren gekoppelt werden (102).

1.5.6 Laser

Für die PDT mit HPD oder DHE sind argon- oder kupferdampfgepumpte Rhodaminfarbstofflaser mit einer Wellenlänge von 630 nm bzw. der Golddampflaser mit einer Wellenlänge von 628 nm als Bestrahlungsquelle optimal (115).

In-Situ Karzinome, also oberflächlich gelegene Tumore, bei denen keine tiefe Gewebepenetration des Lichts erforderlich ist, profitieren von frequenzverdoppelten Neodym-YAG-Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm (74).

Für die PDT mit Photosensibilisatoren der 2. Generation eignen sich besonders Festkörperlaser (solidstate laser, Wellenlängenbereich 720 bis 800 nm), und Titanium-Saphir-Laser (Wellenlängenbereich 700 bis 900 nm), sowie die kompakteren und preisgünstigeren Dioden-Laser (semiconductor diode laser) (74). Letzteres ist im Wellenlängenbereich zwischen 770 und 850 nm durch Temperaturänderung verstellbar (116).

Polychromatische Lichtquellen, wie z.B. 250-W- oder 500-W-Quarz-Halogen Lampen herkömmlicher Diaprojektoren oder Xenostrahler, wie gerne zur PDT in der Dermatologie genutzt, ermöglichen eine homogenen Bestrahlung großflächiger Hautareale (74).

Die optische Penetrationstiefe des Lichtes beschränkt die Tiefenwirksamkeit der PDT. In der Haut besteht ein optisches Fenster für Wellenlängen zwischen 600 und 1200 nm (74). Besonders Hämoglobin absorbiert Wellenlängen < 600 nm, während Wasser Wellenlängen > 1200 nm absorbiert (74). Photochemische Reaktionen können bei nicht ausreichender Energie nicht mehr ausgelöst werden. Dies betrifft Photonen der Wellenlängen > 850 nm bis 900 nm, und das obwohl ihre Eindringtiefe größer ist (117). Ein therapeutischer Effekt in einer Gewebetiefe und Tumordicke von bis zu 10 mm kann erreicht werden nach intravenöser Gabe von Photosensibilisatoren und anschließender topischer Bestrahlung mittels Licht einer Wellenlänge zwischen 600 nm und 800 nm, während die topische PDT nach epikutaner 5-ALA-Applikation eine Gewebetiefe von nur 1 mm erreicht (106).

Das Multiplizieren der akkumulierten Photosensibilisatorkonzentration mit der Dosis der Lichtbestrahlung resultiert in einer idealen photodynamischen Dosis (74).

Zu beachten ist hierbei, dass durch eine zu hohe Bestrahlungsdosis das den Tumor umgebende physiologische Gewebe irreversibel geschädigt werden kann und damit eine zu hohe Bestrahlungsdosis die Selektivität der PDT stark senken kann (74).

Genauere Mechanismen zur Erhöhung der Selektivität der PDT durch fraktionierte Bestrahlung sind Gegenstand aktueller Forschung (96).

1.5.7 Erfahrungen mit PDD und PDT in der Neurochirurgie

Auch die Neurochirurgie profitiert von einer 5-ALA gestützten PDD. Eine fluoreszenzgestützte Resektion ermöglicht eine gezielte, intraoperative Tumordetektion, sodass bessere operative Resektionsergebnisse erreicht werden können (118, 119). So konnten Stummer *et al.* in einer Phase-III-Studie belegen, dass durch 5-ALA basierte PDD signifikant höhere Resektionsgrade erreicht werden konnten im Vergleich zu einer Resektion unter konventionellen Operationsbedingungen, also Mikrochirurgie unter Weißlicht. Dies resultierte in einem höheren rezidiv-freien Intervall sowie Gesamtüberleben (120).

Allerdings ist zu bedenken, dass nicht jede Tumorentität exakt homogen oder deutlich fluoresziert, sodass eine gezielte Bestimmung von Infiltrationsgrenzen zu funktionellem Hirngewebe oft schwierig ist (83, 121). Zur Diskussion steht die Relation des Ausmaßes des intraoperativen Fluoreszenzsignals zur tatsächlichen Tumormasse, oder aber auch die Korrelation zum Malignitätsgrad (122-124). Nachgewiesen ist bisher ein Zusammenhang zwischen starkem intraoperativen Fluoreszenzsignal und hoher histopathologischer Stoffwechselaktivität des Tumorgewebes (125, 126).

Der Einsatz der 5-ALA-PDT in der Gliomchirurgie zeigte bisher erste, vielversprechende Ergebnisse (118, 119, 127). So konnten Stummer *et al.* in Phase-III-Studien durch den Einsatz der 5-ALA gestützten PDT unverzüglich nach der Tumorresektion ein signifikant besseres Gesamtüberleben nachweisen.

Obwohl in Japan die PDT in der Behandlung maligner Gliome eine klinische Zulassung erhalten hat, allerdings basierend auf *chlorin-type* Photosensibilisator NPe6 (Laserphyrin 1), muss die Effektivität und Sicherheit der stereotaktischen 5-ALA-PDT noch gründlicher untersucht werden (128). Wichtig in diesem Zusammenhang ist eine aktuelle kontrollierte,

multizentrische, prospektive Phase-IIb-Studie zur Untersuchung der Effizienz der 5-ALA gestützten PDT in Rezidivfällen bei Glioblastompatienten; Diese untersucht die stereotaktische Anwendung der 5-ALA-PDT bei Patienten mit einem Rezidiv-Glioblastom („Controlled clinical trial to evaluate the safety and efficacy of stereotactical photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid (Gliolan) in recurrent glioblastoma“, EudraCT-Nr.: 2015-002727-25, NOA-11).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Chordome stellen auf Grund ihrer biologischen Komplexität nicht nur eine chirurgische, sondern insgesamt eine medizinische Herausforderung dar, der mit den aktuellen Mitteln nicht ausreichend begegnet werden kann. Neue Therapieansätze sind aus diesem Grund dringend notwendig.

Mit unserer Arbeit streben wir an, den Effekt der Photodynamischen Therapie an mehreren immortalisierten humanen Chordomzelllinien zu untersuchen und zu optimieren.

Im Einzelnen fokussierten wir uns auf folgende Fragestellungen:

- 1) Nachweis und Untersuchung des Effekts der 5-ALA basierten PDT an drei Chordomzelllinien im *in-vitro* Modell (*proof of principle*)
- 2) Untersuchung der Effektivitätssteigerung der 5-ALA basierten PDT durch die zusätzliche Gabe von Ciprofloxacin als Eisenchelator an diesen Zelllinien
- 3) Untersuchung der Rolle der Inkubationszeit bei der 5-ALA basierten PDT sowohl mit als auch ohne der zusätzlichen Gabe von Ciprofloxacin

2. Publierte Originalarbeit:

Ciprofloxacin enhances phototoxicity of 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic treatment for chordoma cell lines.

Hanah Hadice Gull, Cihat Karadag, Brigitte Senger, Rüdiger V. Sorg, Peter Möller, Kevin Mellert, Hans-Jakob Steiger, Daniel Hänggi, Jan Frederick Cornelius Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 2021, Volume 35, 102346.

2.1 Anmerkung zum Ethikvotum:

An dieser Stelle möchten wir auf folgenden Passus aus der Promotionsordnung verweisen:

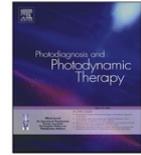
„Für jegliche Forschung am oder mit Menschen (auch mit Verstorbenen), für Forschung mit menschlichem Körpermaterial sowie für Forschung, bei der Daten über Menschen erhoben, gespeichert oder ausgewertet werden, muss vor Forschungsbeginn eine zustimmende Bewertung durch die Ethikkommission (EK) an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bzw. durch die jeweils zuständige EK vorliegen. Dies gilt gleichermaßen für prospektiv wie für retrospektiv ausgerichtete Forschungsprojekte. Ausnahme: für Arbeiten mit kommerziell erhältlichen humanen Zellen wird kein Ethikvotum benötigt“ (182).

Da es sich bei unserer Arbeit um kommerziell erhältliche humane Zellen handelte, hatte diese Arbeit kein Ethikvotum benötigt.



Contents lists available at ScienceDirect

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pdpdt

Ciprofloxacin enhances phototoxicity of 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic treatment for chordoma cell lines

Hanah Hadice Gull^{a,d}, Cihat Karadag^a, Brigitte Senger^a, Rüdiger V. Sorg^b, Peter Möller^c, Kevin Mellert^c, Hans-Jakob Steiger^a, Daniel Hänggi^a, Jan Frederick Cornelius^{a,*}^a Department of Neurosurgery, Medical Faculty, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany^b Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, Medical Faculty, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany^c Institute of Pathology, University Hospital, Ulm, Germany^d Department of Neurosurgery and Spine Surgery, University Hospital of Essen, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

5-ALA
5-Amino levulinic acid
Chordoma
Ciprofloxacin
Iron chelator
Photo-dynamic therapy (PDT)

ABSTRACT

Background: Chordoma are uncommon aggressive tumors of the skeleton. Surgical resection is often subtotal and adjuvant treatment possibilities are limited as chordomas are highly chemo- and radioresistant. In the present study we examined the impact of 5-ALA PDT on different human chordoma cell lines. Furthermore, we investigated the variation of two parameters: (1.) 5-ALA incubation time and (2.) supplemental use of ciprofloxacin as iron chelator.

Methods: Experiments were realized in vitro with three different human chordoma cell lines: U-CH2, U-CH2B and U-CH14. After pre-incubation for 24 h with various concentrations of ciprofloxacin (1.5 – 5.0 µg/ml), different amounts of 5-ALA (15 - 50 µg/ml) were applied to the cells either for a brief (4 h) or a long (6 h) incubation time. Subsequently cells were exposed to photodynamic radiation. Cell viability was exploited by WST-1 assay. Thus, for each of the three cell lines, two drug combinations (ciprofloxacin plus 5-ALA and 5-ALA only) and two incubation times (short, 4 h and long, 6 h) were tested. Negative control groups were also examined.

Results: Supplemental use of ciprofloxacin led to increased cell death in each of the cell lines. Different 5-ALA incubation times (4 h vs. 6 h) showed no significant differences in cell viability except for U-CH2.

Conclusion: Ciprofloxacin as an ordinary applied antibiotic, enhanced the effect of 5-ALA PDT on different human chordoma cell lines in vitro. The impact was dependent on the dose of ciprofloxacin-5-ALA. There were no notable differences for the tested 5-ALA incubation times. In human chordoma cell lines 5-ALA PDT may effectively be amended by ciprofloxacin.

1. Introduction

Chordomas are rare tumors (incidence of 0.008–0.5/ 100.000 persons per year) that derive from the primitive notochord and can arise anywhere along the spine [1]. The sacrococcygeal and clival regions, and especially the sphenococcygeal synchondrosis in children, are the sites of preference [2,3]. Although histologically chordomas are considered low-grade malignancies, their clinical behavior is more malignant characterized by a high recurrence rate of 85% and the ability to metastasize [19]. Locally, these tumors grow aggressively and cause bony destruction [4,5]. Their location in anatomically complicated areas make radical resection challenging [6–8]. Classically, they are

refractory to chemotherapy and to regular doses of radiotherapy [9–12]. Therefore, alternative treatment modalities are sought for.

Photodynamic Therapy (PDT) was shown to be a promising strategy in gliomas [13–15].

5-ALA-PDT may further be enhanced by iron chelators (e.g. ciprofloxacin) as was previously shown in skin-, cervix tumors and immortalized meningioma and chordoma cell lines [16–18].

In order to further investigate this research avenue, we examined the impact of 5-ALA PDT on three different human chordoma cell lines and analyzed the effect of ciprofloxacin as iron chelator and the role of incubation time.

* Corresponding author at: Neurosurgical Department, University Hospital Düsseldorf, Heinrich Heine University, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany. E-mail addresses: HanahHadice.Gull@uk-essen.de (H. Hadice Gull), cornelius@hhu.de (J. Frederick Cornelius).

<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102346>

Received 8 December 2020; Received in revised form 21 April 2021; Accepted 14 May 2021

Available online 24 May 2021

1572-1000/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

2. Material and methods

2.1. Cell lines

The immortalized human chordoma cell lines U-CH2, U-CH2B, and U-CH14 were obtained from the Institute of Pathology of the University Hospital, Ulm, Germany. U-CH2 originated from a biopsy of a primary sacral tumor, U-CH2B derived from tissue of the final resection of the same tumor. U-CH14 arose from a clival primary tumor.

Cells were grown in Iscove's Modified Dulbecco's Medium/ Rosewell Park Memorial Institute Medium-1640 (GIBCO® invitrogen, Paisley, UK) in a ratio of 4:1, complemented with 20% fetal bovine serum (Biochrom®, Berlin), 1% GlutaMax™ (GIBCO® invitrogen, Paisley, UK) and 1% Zellshield™ (Biochrom®, Berlin) at 37 °C and 5% CO₂. They were re-cultured and reaped for experiments, when cells reached 90% confluency in T-75 cell culture flasks.

2.2. Photodynamic treatment of human chordoma cell lines

For irradiation therapy, cells were sown in culture medium at 30.000 cells/well in quadruplicates in shaded 96-well plates (100 µl/well). In order to select most vital cells, trypan blue was used for cell counting [22]. In a laboratory pilot study, we could determine that a cell density of 30.000 cells/well allows regularly arranged cells within the well avoiding cell-overlapping but enabling cell to cell contact. When cells had become adherent, graded doses of ciprofloxacin (1,5 – 5 µg/ml) were appended and cell culture was continued. After 24 h of culture with ciprofloxacin, varying amounts of 5-ALA (15 - 50 µg/ml) for a brief or long period were added (Fig. 1). After pre-incubation with ciprofloxacin and after treatment with 5-ALA, cells were lavaged extensively with colorless medium to remove excess ciprofloxacin and 5-ALA. Furthermore, the following negative controls were realized: untreated human chordoma cells, cells with 5-ALA only, cells with ciprofloxacin only, cells with laser irradiation only, cells with ciprofloxacin and laser irradiation, cells with ciprofloxacin and 5-ALA. Negative controls were repeated $n = 7$ each.

A customized PDT laser appliance was used according to a standard in-house protocol, which has been validated before for glioma, meningioma, pituitary adenoma, chordoma and medulloblastoma cell lines [18,23–28]. The unit comprises a diode laser (Ceralas 635 Lasersystem, Biolitec GmbH, Jena, Germany), which radiates light of 635 nm wavelength as monochromatic radiation. A fiber optic probe including a diffusing lens provides constant illumination at the bottom of the 96-well microplate.

The distance between the microplate and the lens amounted 93 nm.

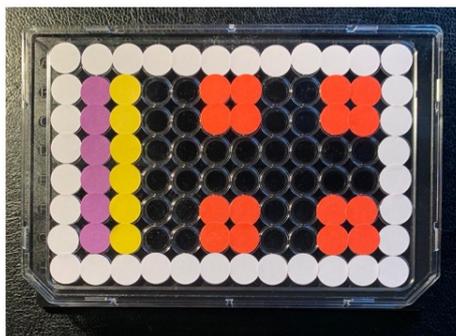


Fig. 1. illustration of the 96-well microplate white: phosphate-buffered saline, purple: row of medium-filled blank (protection against evaporation), yellow: row of negative control (untreated cells), red: four blocks with cells and different drugs and concentrations.

This position enables the creation of a therapy with the power of 30 mW/cm² for 625 s, which allowed a total irradiation level of 18.75 J/cm² (Fig. 2).

2.3. Evaluation of cell vitality

Cell viability after PDT was quantified by a colorimetric WST-1 assay (water soluble tetrazolium salt, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Metabolically active cells transform tetrazolium salt into formazan. At 450 nm wavelength the color change from light red to dark red is measured by a microplate reader (Microplate ELISA reader 680XR, Bio-Rad, Munich, Germany). After photodynamic therapy, the cells were cultured in colorless medium for 24 h (U-CH2 and U-CH14) or 48 h (U-CH2B) at 37 °C and 5% CO₂. At this point, direct and indirect signal transduction was accomplished for the different cell lines. WST-1 dye was subjoined. As the three different cell lines exhibit different metabolic characteristics concerning cell culture, they needed different incubation times with WST-1 until a standard extinction of about 1,0 (absolute number) was reached. So, the irradiated U-CH2-cells were processed for 40 min, U-CH2B for 55 min, and U-CH14 for 70 min. Afterwards the ELISA microplate reader quantified the absorbance of living cells.

2.4. Data analysis

SPSS Statistics 26 (IBM Corporation, Somers, USA) computed Student's *t*-test and multifactorial ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test. Significances of $p < 0.05$ and $p < 0.01$ were rated significant and highly significant, respectively. Illustrative details are stated in arithmetic mean \pm standard deviation. Graphs were developed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

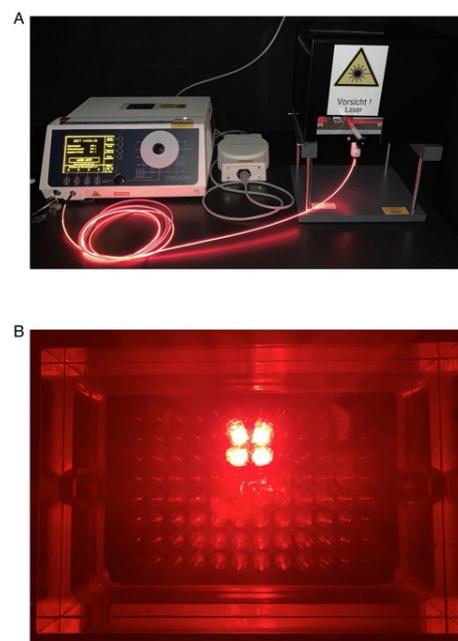


Fig. 2. illustration of experimental setup A) Irradiation assembly during PDT; Laser with 625 s at $\lambda = 635$ nm with 15,6 J/cm² (left), fiberglass probe (in the middle), 96-well plate in the black irradiation box (right) B) Exemplary 96-well plate during irradiation therapy of block 1 in the irradiation box.

2. Results

3.1. Human chordoma cells and the effect of 5-ALA plus additional ciprofloxacin

To establish whether the cytotoxicity of 5-ALA PDT can be increased when exposed to supplementary ciprofloxacin, the cells were pre-incubated for 24 h with increasing doses of ciprofloxacin and afterwards with 5-ALA for 4 and 6 h, and in contrast with 5-ALA only. After irradiation, cell death was measured by WST-1 assay.

We found that all cell lines were dose-dependently sensitive to 5-ALA equally whether cells were medicated with 5-ALA for 4 or 6 h. U-CH2 and U-CH2B were similarly sensitive to 5-ALA-PDT (effective dose (ED₅₀) of U-CH2 ~ 31 µg/ml, ED₅₀ of U-CH2B ~ 27 µg/ml for 4 h and 6 h incubation time of 5-ALA), whereas U-CH14 reacted less sensitive to 5-ALA-PDT. For U-CH14 the effective dose could not be reached by treating the cells with the applied doses of 5-ALA only. Negative controls did not show any effects of 5-ALA incubation only (i.e. without irradiation therapy), nor any effect of irradiation therapy without drugs.

In all experiments complementary ciprofloxacin increased the effect of 5-ALA PDT. Viability was significantly lower, when cells were treated with additional ciprofloxacin compared to 5-ALA treatment only (U-CH2, U-CH2B and U-CH14: respectively $p < 0.001$ for ≥ 1.5 µg/ml Ciprofloxacin plus 15 µg/ml 5-ALA). All examined human chordoma cell lines exhibited a dose-dependent decline in vitality quota: the higher the concentration, the higher the effect of ciprofloxacin based 5-ALA PDT. By treating the cells with additional ciprofloxacin, the effective dose could be achieved in all cell lines (ED₅₀ of U-CH2 ~ 18 µg/ml if cells were medicated with 5-ALA for 4 h, and ~ 26 µg/ml if processed with 5-ALA for 6 h, ED₅₀ of U-CH2B ~ 23 µg/ml, and ED₅₀ of U-CH14 ~ 34 µg/ml, for U-CH2B and U-CH14 different 5-ALA incubation time led to same ED₅₀). The results are illustrated in Fig. 3.

Negative controls did not show any effects (Fig. 4).

3.2. Effect of 5-ALA incubation time on ciprofloxacin-based PDT

To ascertain the optimum time of 5-ALA incubation after pretreatment with the iron-chelator ciprofloxacin, cells were treated with appropriate drugs for 4 h and in comparison, for 6 h.

For U-CH2B and U-CH14, different 5-ALA incubation times (4 vs. 6 h) showed no significant differences ($p < 0.001$).

Concerning the U-CH2 cell line, the effect on cell death was better after short incubation time (4 h vs. 6 h) for low drug concentrations (cipro ≤ 3 µg/ml + 5-ALA ≤ 30 µg/ml; $p \leq 0.001$). In contrast, the effect on cell death was better after long incubation time (6 h vs. 4 h) for high drug concentrations (cipro 5 µg/ml + 5-ALA 50 µg/ml; $p \leq 0.001$) (Fig. 3).

3. Discussion

The present in vitro study revealed that the effect of 5-ALA-PDT on human chordoma cell lines may be significantly increased through co-administration of ciprofloxacin. Furthermore, we could observe that different cell lines respond with different sensitivity to the combined ciprofloxacin-/ 5-ALA based PDT. Though, the effect was consistently highly significant.

However, in this study, after the cells were processed with ciprofloxacin for 24 h, a short (4 h) and a long (6 h) incubation period of 5-ALA, led to no significant differences in cell viability, except for the treatment of U-CH2 cells. These showed an enhanced effect of ciprofloxacin-/ 5-ALA based PDT, when cells were incubated at lower concentrations of drugs for 4 h, and at higher concentrations for 6 h.

Neurosurgery makes use of fluorescence-guided resection of gliomas since Stummer et al. (2006) detected upper frequency of exhaustive resection of contrast-enhancing tumor after administration of 5-amino-levalulinic acid as compared to conventional microsurgery guided by

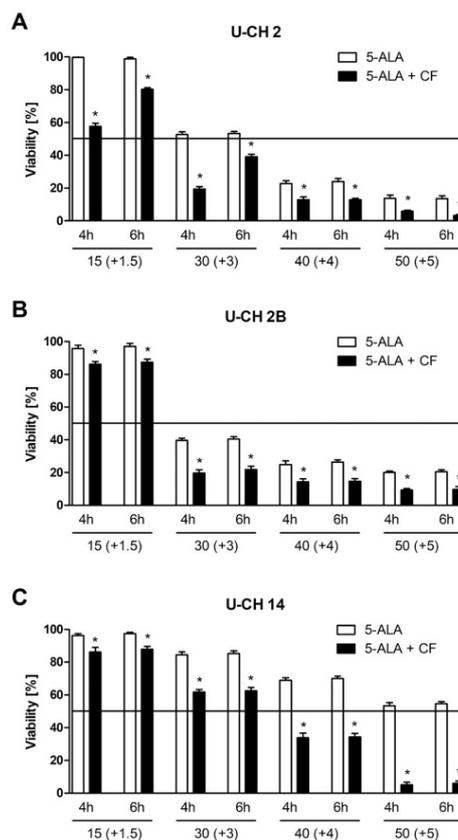


Fig. 3. Cell viability via WST-1 assay

Cells were pre-incubated with graded doses of ciprofloxacin for 24 h, then with graded doses of 5-ALA for 4 h and 6 h, and subsequently irradiated by PDT. By contrast, cells were only incubated with graded doses of 5-ALA for 4 h and 6 h, subsequently irradiated by PDT. Afterwards cell viability was analyzed photo-metrically by WST-1 assay for: A) U-CH2 cell line B) U-CH2B cell line C) U-CH14 cell line

Abscissa: different concentrations of 5-ALA (15–50 µg/ml) and ciprofloxacin (1,5–5 µg/ml), and different incubation times of 5-ALA (4 h vs. 6 h)

Ordinate: cell viability [%] calculated as ratio compared to untreated controls (living cells [%] = (extinctiontest : extinctioncontrol) × 100) Significant changes

($p < 0.001$) 5-ALA vs. 5-ALA & supplemental ciprofloxacin are marked (*).

white light in a large phase III study [13,15,29–31]. This allowed new surgical techniques for several brain tumors, such as gliomas and meningiomas resulting in better resection results [26,32–37].

Former experiments already revealed that the human chordoma cell line U-CH2 takes 5-ALA up, which leads to PPIX accumulation in vitro, as well as an effective destruction of those cells by 5-ALA based photodynamic therapy [18]. With the present study, we could corroborate these findings for further chordoma cell lines. The management of tumors in anatomically complex areas like chordomas could benefit from this effect. First experiences with PDT in a clinical setting have already successful for recurrent malignant brain tumors [30,34]. Translating these promising advances of PDD and PDT to destructive and difficult to treat chordoma would be an enormous progress [6,7].

In these experiments, we could furthermore state a significant

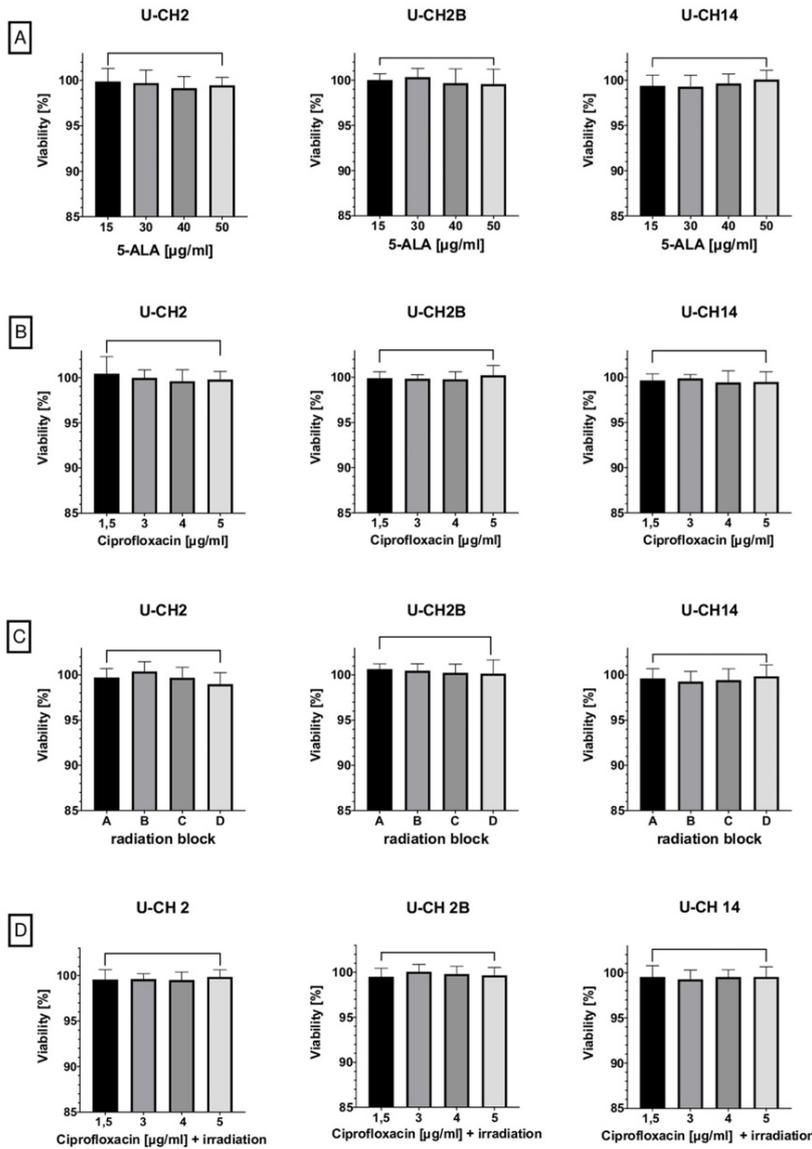


Fig. 4. Overview of all negative controls
 A) Cells were incubated with graded amounts of 5-ALA for 6 h. Afterwards cell viability was measured photometrically by WST-1 assay.
 B) Cells were incubated with graded doses of ciprofloxacin for 24 h. Afterwards cell viability was measured photometrically by WST-1 assay.
 C) Cells were not treated with any drugs, but only irradiated by laser beam with 625 s at $\lambda = 635$ nm with 15,6 J/cm². Afterwards cell viability was analyzed photometrically by WST-1 assay.
 D) Cells were incubated with graded doses of Ciprofloxacin for 24 h, subsequently irradiated by laser beam with 625 s at $\lambda = 635$ nm with 15,6 J/cm². Afterwards cell viability was measured photometrically by WST-1 assay.

enhancement of 5-ALA PDT by adding ciprofloxacin. Many factors may influence 5-ALA based PDT such as temperature, availability of intracellular oxygen, the level of protoporphyrin, glucose content, amount of free Ca²⁺, pH-level, iron chelators, porphyrin efflux and immunological processes. Several attempts have been made to increase the effect of PDT [20,39–41].

Recently, Ohgari et al. described promising results, especially with regard to clinical practicability in an in vitro model where 5-ALA-PDT was enhanced in human epithelial cervical cancer and epidermoid carcinoma cells by various quinolones (antibiotics) [16]. The rationale was

that quinolones act as iron chelators interfering with metabolic process of ferric effecting the heme biosynthesis. This leads to increased iron-complexation, and accordingly to lack of iron molecules. But these iron molecules are essential for ferrochelatase activity. The caused downregulation of ferrochelatase results in boosted PPIX levels. However, at present, the accurate role of quinolones during 5-ALA-PDT is still not entirely explored [17].

In the present study, we sought to examine the impact of ciprofloxacin. This is a widely used antibiotic in clinical practice and consequently has a well-known risk-/ benefit profile [42]. Moreover, our

laboratory had already successfully used it to increase 5-ALA based PDT effects on human meningioma cells [17].

Because the optimal timing and the highest PPIX-accumulation in brain tumors is still a matter of debate and based on previous experiments, we compared two different 5-ALA incubation times [28,43,44]. In the present study, we tested, whether an incubation period of 4 h or 6 h would be more effective in the PDT of human chordoma cell lines.

No significant differences in cell viability were observed after incubation times of 4 h or 6 h of 5-ALA only.

As ED₅₀ of glioblastoma cells amount 24.1 µg/ml 5-ALA [15,18,24,29] there are similarities to the sensitivity of chordoma cells, since we ascertained ED₅₀ of U-CH2 ~ 31 µg/ml and ED₅₀ of U-CH2B ~ 27 µg/ml with this study. These slight differences between the cell lines U-CH2 and U-CH2B may be explained, because they derived from the same sacral chordoma, the former was biopsy tissue, the latter was obtained several days later from the main tumor bulk.

U-CH14 seemed to be more robust, as ED₅₀ could not be reached by the applied amounts of 5-ALA alone. As opposed to the other cell lines, U-CH14 was obtained from a clival chordoma, therefore it will be highly interesting in future studies to investigate if there are any differences between clival and sacral location concerning their responsiveness to 5-ALA-PDT.

To the best of our knowledge, no interaction between ciprofloxacin and 5-ALA incubation time is reported in the literature.

A trend towards higher efficacy of ciprofloxacin-/ 5-ALA PDT could be demonstrated, when U-CH2B cells and U-CH14 cells were processed with 5-ALA for 4 h.

The impact of ciprofloxacin in the irradiation therapy on the human chordoma cell line U-CH2 was particularly pronounced when cells were incubated 4 h with 5-ALA at lower concentrations, and 6 h with 5-ALA at higher drug concentrations. This corresponds to several in vitro- and in vivo models which already described the dependence of PPIX kinetics of distinct 5-ALA incubation periods as well as of the concentration of the pre-metabolites [45]. Moreover, this underlines the individual metabolic characteristic traits of each cell line.

In sum, in all cell lines ED₅₀ was already achieved at lower pharmaceutical concentrations of ciprofloxacin-/ 5-ALA based PDT than for 5-ALA PDT only.

Based on the present results we can confirm that significant effects may be obtained for 5-ALA-incubation time in the range from 4 h to 6 h [21,25,30].

In the presented model, individual in-vivo pharmacokinetic and -dynamics could not be simulated. In fact, it is impossible to adjust the three-dimensionality of human tumor issues or to imitate the human blood-brain-barrier [14] [46]. On the other hand, the human blood-brain-barrier becomes permeable in brain tumors, so that permeability for drugs increases [47,48]. Problems of PDT-light penetration depth may become less important in chordomas as, they are composed of characteristic physaliphorous cells comprising bright vacuoles. This might allow subjacent pervasion of laser light [49]. This structure of chordoma cells could benefit extra from therapeutic potential of PDT as compared to other more compact cells. Furthermore, PDT may lead to an adaptive immune response which may indirectly destroy tumor cells not reached by laser irradiation directly [35].

Quinolones such as ciprofloxacin should be used carefully due to possible side effects [50]. But even the maximum experimental ciprofloxacin dose of about 6 µg/ml (18 µmol/l) remains within the lower range of blood concentrations in common currency as per clinical dosage of 10–250 µmol/l [38].

Finally, the negative controls revealed the necessity of 5-ALA to achieve cyto- and phototoxicity by PDT. In absence of 5-ALA neither ciprofloxacin alone, nor ciprofloxacin combined with laser light could cause photodamage or cell death in human chordoma cells as already described in previous studies in human meningioma cells [17].

4. Conclusion

In the present study 5-ALA PDT was successfully performed in three immortalized human chordoma cell lines. The results represent a strong proof a principle. Furthermore, the effect of 5-ALA PDT could significantly be increased by ciprofloxacin acting as iron chelator. This may become clinically interesting, because ciprofloxacin is a widely used antibiotic in clinical practice. However, different incubation times (4 h vs. 6 h) played a minor role. In summary, 5-ALA based PDT is a promising research axis for adjuvant treatment strategies for chordomas.

Declaration of Competing Interest

None.

References

- [1] R. Sahyouni, et al., A historical recount of chordoma, *J. Neurosurg. Spine* 28 (4) (2018) 422–428.
- [2] M. Koutourousiou, et al., Skull base chordomas, *Otolaryngol. Clin. North Am.* 44 (5) (2011) 1155–1171.
- [3] B.P. Walcott, et al., Chordoma: current concepts, management, and future directions, *Lancet Oncol.* 13 (2) (2012) e69–e76.
- [4] O. Al-Mefty, Chordoma, *Acta Neurochir. (Wien)* 159 (10) (2017) 1869–1871.
- [5] B.O. Colli, A. M.O., Chordomas of the skull base: follow-up review and prognostic factors, *Neurosurg. Focus* 10 (3) (2001) Article 1.
- [6] S. Chibbaro, et al., Endoscopic endonasal approach in the management of skull base chordomas—clinical experience on a large series, technique, outcome, and pitfalls, *Neurosurg. Rev.* 37 (2) (2014) 217–224, discussion 224–5.
- [7] M. Yasuda, et al., Chordomas of the skull base and cervical spine: clinical outcomes associated with a multimodal surgical resection combined with proton-beam radiation in 40 patients, *Neurosurg. Rev.* 35 (2) (2012) 171–182, discussion 182–3.
- [8] K. Arnaudovic, A. M.O., Surgical seeding of chordomas, *J. Neurosurg.* 95 (5) (2001) 798–803.
- [9] K. Sakai, et al., Analysis of immunohistochemical expression of p53 and the proliferation marker Ki-67 antigen in skull base chordomas: relationships between their expression and prognosis, *Brain Tumor Pathol.* 24 (2) (2007) 57–62.
- [10] Greenberg, M.S., *Handbook of Neurosurgery*. Eighth edition ed, ed. M.S. Greenberg. 2016, New York: Thieme.
- [11] L.N.L. Eugen B. Hug, Jerry D. Slater, Alexander Devries, Roger I. Grove, Rosemary A. Schaefer, Andrew E. Rosenberg, James M. Slater, Proton radiation therapy for chordomas and chondrosarcomas of the skull base, *J. Neurosurg.* 91 (3) (1999) 432–439.
- [12] S. Stacchiotti, J. Sommer, Building a global consensus approach to chordoma: a position paper from the medical and patient community, *Lancet Oncol.* 16 (2) (2015) e71–e83.
- [13] W. Stummer, 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.
- [14] P.J. Muller, B.C. Wilson, Photodynamic therapy of brain tumors—a work in progress, *Lasers Surg. Med.* 38 (5) (2006) 384–389.
- [15] T.J. Beck, 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.
- [16] Y. Ohgari, et al., Quinolone compounds enhance delta aminolevulinic acid-induced accumulation of protoporphyrin IX and photosensitivity of tumour cells, *J. Biochem.* 149 (2) (2011) 153–160.
- [17] J.F. Cornelius, et al., Enhancing the effect of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in human meningioma cells, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 11 (1) (2014) 1–6.
- [18] J.F. Cornelius, et al., 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy of chordoma: in vitro experiments on a human tumor cell line, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 20 (2017) 111–115.
- [19] S. Stacchiotti, et al., Best practices for the management of local-regional recurrent chordoma: a position paper by the Chordoma Global Consensus Group, *Ann. Oncol.* 28 (6) (2017) 1230–1242.
- [20] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: part two—Cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2 (1) (2005) 1–23.
- [21] B. Olzowy, S.Stocker C.S.H., K. Bise, H.J. Reulen, W. Stummer, Photoirradiation therapy of experimental malignant glioma with 5-aminolevulinic acid, *J. Neurosurg.* 97 (2002) 970–976.
- [22] W. Strober, Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability, in: *Curr. Protoc. Immunol.* Appendix 3: Appendix 3B, 21, 15 May 2001.
- [23] N. Etmnian, 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.
- [24] A. Schimanski, et al., Human glioblastoma stem-like cells accumulate protoporphyrin IX when subjected to exogenous 5-aminolevulinic acid, rendering them sensitive to photodynamic treatment, *J. Photochem. Photobiol. B* 163 (2016) 203–210.

- [25] M. El Khatib, 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.
- [26] J.F. Cornelius, et al., Impact of 5-aminolevulinic acid fluorescence-guided surgery on the extent of resection of meningiomas—with special regard to high-grade tumors, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 11 (4) (2014) 481–490.
- [27] L.M. Neumann, et al., Efficacy of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in pituitary adenomas—experimental study on rat and human cell cultures, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 14 (2016) 77–83.
- [28] A. Briel-Pump, et al., Accumulation of protoporphyrin IX in medulloblastoma cell lines and sensitivity to subsequent photodynamic treatment, *J. Photochem. Photobiol. B* 189 (2018) 298–305.
- [29] W. Stummer, et al., Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report, *J. Neurooncol.* 87 (1) (2008) 103–109.
- [30] W. Stummer, H.Stepp A.N., 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.
- [31] H. Stepp, W. Stummer, 5-ALA in the management of malignant glioma, *Lasers Surg. Med.* 50 (5) (2018) 399–419.
- [32] Y. Kajimoto, S.Miyatake T.K., T. Ichioka, M. Miyashita, H. Tanaka, et al., Use of 5-aminolevulinic acid in fluorescence-guided resection of meningioma with high risk of recurrence, *J. Neurosurg.* (6) (2007) 106.
- [33] D. Coluccia, et al., Intraoperative 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in meningiomas, *Acta Neurochir. (Wien)* 152 (10) (2010) 1711–1719.
- [34] 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.
- [35] M.C. Tetaud, et al., Experimental use of photodynamic therapy in high grade gliomas: a review focused on 5-aminolevulinic acid, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 11 (3) (2014) 319–330.
- [36] B.J. Quirk, et al., Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors—where do we stand? *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 12 (3) (2015) 530–544.
- [37] R.R. Allison, Fluorescence guided resection (FGR): a primer for oncology, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 13 (2016) 73–80.
- [38] N. Shimony, et al., Surgical resection of skull-base chordomas: experience in case selection for surgical approach according to anatomical compartments and review of the literature, *Acta Neurochir. (Wien)* 159 (10) (2017) 1835–1845.
- [39] Y.L. Liu, et al., Regulation of ferrochelatase gene expression by hypoxia, *Life Sci.* 75 (17) (2004) 2035–2043.
- [40] L. Wyld, Reed MW T.M., N.J. Brown, Aminolevulinic acid-induced photodynamic therapy: cellular responses to glucose starvation, *Br. J. Cancer* 86 (8) (2002) 1343–1347.
- [41] Allison, R.R. and K. Moghissi, *Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. Clin. Endosc.*, 2013. 46(1): p. 24–9.
- [42] J.F. Schlender, et al., A Physiologically-Based Pharmacokinetic Model to Describe Ciprofloxacin Pharmacokinetics Over the Entire Span of Life, *Clin. Pharmacokinet.* 57 (12) (2018) 1613–1634.
- [43] W. Stummer, Meinel T R.H., U. Pichlmeier, W. Schumacher, J.C. Tonn, V. Rohde, F. Oettel, B. Turovski, C. Woiciechowsky, K. Franz, T. Pietsch, ALA-Glioma Study Group, Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias, *Neurosurgery* 62 (3) (2008) 564–576, discussion 564–76.
- [44] A. Juzeniene, Q. Peng, J. Moan, Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis, *Photochem. Photobiol. Sci.* 6 (12) (2007) 1234–1245.
- [45] K.M. Harmatys, et al., Small molecule additive enhances cell uptake of 5-aminolevulinic acid and conversion to protoporphyrin IX, *Photochem. Photobiol. Sci.* 15 (11) (2016) 1408–1416.
- [46] S.R. Emis, J.Xiang A.N., P. Shakui, T. Masada, W. Stummer, D.E. Smith, R.F. Keep, Transport of 5-aminolevulinic acid between blood and brain, *Brain Res.* 959 (2) (2003) 226–234.
- [47] M.C. Papadopoulos, C.J. S.S., Woodrow, D.C. Davies, P. Costa-Martins, R.F. Moss, S. Krishna, B.A. Bell, Occludin expression in microvessels of neoplastic and non-neoplastic human brain, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 27 (5) (2001) 384–395.
- [48] Susana Bulnes, Microvascular adaptive changes in experimental endogenous brain gliomas, *Histol. Histopathol.* 24 (6) (2009) 693–706.
- [49] R. Chugh, et al., Chordoma: the nonsarcoma primary bone tumor, *Oncologist* 12 (11) (2007) 1344–1350.
- [50] A.C. Bennett, B.J. B.C., Witherspoon, K.B. Knopf, An evaluation of reports of ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin-association neuropsychiatric toxicities, long-term disability, and aortic aneurysms/dissections disseminated by the Food and Drug Administration and the European Medicines Agency, *Expert Opin. Drug Saf.* 18 (11) (2019) 1055–1063.

3. Diskussion

Die experimentellen Untersuchungen an humanen immortalisierten Chordomzelllinien ergaben zusammengefasst folgende Ergebnisse:

- drei humane Chordomzelllinien konnten *in vitro* durch 5-ALA gestützte PDT zerstört werden
- in allen untersuchten Zelllinien steigerte die zusätzliche Gabe des Antibiotikums Ciprofloxacin signifikant den dosisabhängigen letalen Effekt der 5-ALA gestützten PDT
- Unterschiedliche 5-ALA Inkubationszeiten (4 h vs. 6 h) führten zu keinem signifikanten Unterschied in der Wirksamkeit der 5-ALA PDT in allen Zelllinien bzw. der Ciprofloxacin-5-ALA-PDT in den Zelllinien U-CH2B und U-CH14
- Dagegen erfuhren die Zellpopulationen der Zelllinie U-CH2 einen besonders starken letalen Effekt in der Ciprofloxacin-5-ALA-PDT, wenn diese zuvor mit niedrigeren Konzentrationen von 5-ALA für 4 h inkubiert wurden und 6 h lang mit 5-ALA höherer Wirkstoffkonzentrationen

3.1 U-CH2, U-CH2B, und U-CH14

Alle drei humanen immortalisierten Zelllinien stammen aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm.

U-CH2 stammt aus einer Biopsie eines Rezidiv Sakralchordoms, welche für das Gesamtvolumen repräsentativ war und U-CH2B aus dem Gewebe desselben Tumors, welches 4 bis 5 Tage nach der Biopsie reseziert wurde. Zwischen bioptischer Tumorsicherung sowie operativer Resektion fand keine andere Therapie bei dem Patienten statt. Somit handelt es sich hier streng genommen um 2 verschiedene Subklone aus demselben Tumor.

U-CH14 stammt aus einem primären Clivuschordom.

Diese ursprünglich unterschiedlichen Eigenschaften der Chordomzellen könnten die unterschiedlichen Reaktionen auf eine (Ciprofloxacin-)5-ALA gestützten PDT erklären; Denn U-CH2 und U-CH2B zeigten eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber der 5-ALA-PDT: die Effektive Dosis (ED_{50}) von U-CH2 betrug $\sim 31,1 \mu\text{g/ml}$, die ED_{50} von U-CH2B betrug $\sim 27,2 \mu\text{g/ml}$ nach 4h bzw. U-CH2 $\sim 31,2 \mu\text{g/ml}$ und U-CH2B $\sim 27,5 \mu\text{g/ml}$ nach 6h 5-ALA- Inkubationszeit. Im Gegensatz dazu konnte die ED_{50} für U-CH14 mit alleiniger 5-ALA-PDT nicht erreicht werden, weder nach 4-stündiger noch nach 6-stündiger 5-ALA-Inkubationszeit

Erst durch die zusätzliche Behandlung der U-CH14 Zellen mit Ciprofloxacin konnte hier ein letaler Effekt erreicht werden: wobei die ED_{50} von U-CH14 für Ciprofloxacin- 5-ALA $\sim 34,2 \mu\text{g/ml}$ nach 4 stündiger 5-ALA Inkubation bzw. $\sim 34,4 \mu\text{g/ml}$ nach 6-stündiger 5-ALA Inkubation betrug. Im Vergleich dazu betrug die ED_{50} von U-CH2 für Ciprofloxacin- 5-ALA etwa $\sim 18 \mu\text{g/ml}$, wenn die Zellen 4h lang mit 5-ALA inkubiert wurden bzw. $\sim 26 \mu\text{g/ml}$, wenn sie für 6h mit 5-ALA behandelt wurden. Die ED_{50} einer Ciprofloxacin-5-ALA basierten PDT betrug für U-CH2B $\sim 23,2 \mu\text{g/ml}$ nach 4h 5-ALA Inkubationszeit bzw. $\sim 23,6 \mu\text{g/ml}$ nach 6-stündiger 5-ALA Inkubationszeit.

Somit machte es mit Ausnahme für die U-CH2 Zellen keinen Unterschied, die Zellen mit 4h bzw. 6h 5-ALA zu inkubieren. Dabei sieht man bei den U-CH2 Zellen auch nur einen Unterschied in der Ciprofloxacin-5-ALA gestützten Behandlung. Die Zellen, die aus einem

primären Clivuschordom stammten, schienen insgesamt robuster zu sein, da die letale Dosis mit den hier angewandten 5-ALA-Konzentrationen nicht erreicht werden konnte.

Zusätzlich zu den unterschiedlichen Ursprüngen der Zelllinien muss man die Bedingungen einer Zellkultur bedenken.

Vernachlässigen darf man nicht, dass mit jeder Zellteilung die Seneszenz von Zelllinien voranschreitet. Diese immortalisierten Zelllinien besitzen die Fähigkeit der unkontrollierten Zellteilung, welche mit dem Verlust von Tumorsuppressorgenen oder erhöhter Chromosomenzahl einhergehen, teilweise sogar Gene exprimieren, die für die Embryogenese typisch sind. Dies führt schließlich zum Verlust typischer Eigenschaften der Zellen oder aber auch zum Hinzugewinnen neuer Eigenschaften (129, 130).

Um das Risiko für Schwankungen und Änderungen durch die Seneszenz der Zelllinien so gering wie möglich zu halten, haben wir in dieser Arbeit Untersuchungen in allen drei Zelllinien in ähnlichen Zellpassagen (Px+ 22 bis Px+37) durchgeführt. Vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Ulms haben wir die drei verwendeten Zelllinien in einer ähnlichen Passagezahl erhalten (~ Px+ 11). Nach Abschluss unserer Versuchsreihen ließen wir darüber hinaus immunhistochemische Untersuchungen an den drei Zelllinien durchführen, um zu bestätigen, dass es sich bei den Zellkulturen weiterhin um Chordomzellen handelte. Es wurden hierfür zunächst die Zellen durch die Neuropathologie des Universitätsklinikum Düsseldorf aufbereitet, und schließlich am Institut für Neuropathologie am German Cancer Research Center der Universität Heidelberg DNA-Methylierungs-Untersuchungen an den Zellen durchgeführt (**s. Anhang, S. 75 ff.**). Diese konnten in der höchsten Passagezahl anhand der hohen Methylierungsscores und Kopienzahlprofile bestimmter Protein-Kodierungsgene nachweisen, dass es sich weiterhin um Chordomzellen handelte.

Interessant sind des Weiteren die klinischen Informationen zu diesen Zelllinien:

U-CH2 stammte aus einer Probenexzision eines sakral gelegenen Tumors eines 72 Jahre alten männlichen Patienten, U-CH2 B aus dem Resttumor desselben Patienten wohingegen

U-CH14 aus einem clival gelegenen Tumors eines 79 Jahre alten männlichen Patienten stammte.

Wenn man clivale und sakrale Chordome vergleicht, lässt sich insgesamt hervorheben, dass clivale Chordome in der Regel auf Grund ihrer Lokalisation kleiner sind und die hervorgerufenen Symptome im Allgemeinen früher auftreten. Darüberhinaus neigen clivale Chordome weniger zu Rezidiven und Metastasen, obwohl die Resektion auf Grund der komplexen anatomischen Lage meistens unvollständig ist (131, 132). In der Literatur sind ebenfalls bereits Unterschiede im Verhalten der in unserer Versuchsreihe untersuchten Zelllinien beschrieben; Jäger et al. analysierten, dass clivale Chordom-Zelllinien z.B. einen niedrigeren Ki-67-Proliferationsindex aufweisen im Vergleich zu sakralen Chordom-Zelllinien (133). Dies kann z.B. die längere Verdopplungszeit der U-CH14 Zelllinie in unseren Versuchsreihen erklären, da diese bei den U-CH14 Zellen ca. 17 Tage gedauert hat, während sie bei U-CH2 und U-CH2B nur 10 Tage betrug. Auch steht diese Beobachtung im Einklang zu der häufigeren Metastasierungs- und Rezidivrate von sakralen Chordomen, die einen erhöhten Ki-67-Proliferationsindex von >10% zeigten (133). Weitere Unterschiede zeigten sich in der p53-Expression: sakrale Chordome wiesen höhere p53-Expressionindizes auf (133). Außerdem untersuchte Jäger et al. die Genetik mittels *Pathway*-Analysen; hier zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression von mehr als 1000 Genen bezüglich der Entwicklung und der Funktion des Organismus, der Gewebeentwicklung, der Entwicklung des Fortpflanzungssystems und der Embryonalentwicklung zwischen clival und sakral gelegenen Chordomen (133). Signifikante Unterschiede zeigten sich auch in der Expression von HOX-Genen, die verantwortlich sind für die Gliederung des Organismus entlang der kranio-kaudalen Körperachse. Clivale Chordom-Zelllinien zeigten hier eine herunterregulierte Expression der HOX-Gene (133).

Somit bestätigt die Literatur biologische Unterschiede zwischen clivalen und sakralen Chordomen, die wir in unseren Untersuchungen in Form eines unterschiedlichen Ansprechens auf die (Ciprofloxacin-)5-ALA-basierten PDT ebenfalls beobachten konnten.

3.2 Vergleichbarkeit der Studie mit einem in-vivo-Modell

Zu bedenken sind im Rahmen dieser Studie auch Unterschiede hinsichtlich Umweltfaktoren, klinischer, pharmakologischer sowie auch neoplastischer Einflüsse zwischen einem *in-vitro* und einem *in-vivo* Modell.

3.2.1 Pharmakokinetik und -dynamik der angewandten Medikamente

In unserem experimentellen Setting befinden sich während der Photodynamischen Behandlung einzelne Tumorzellen in unmittelbarer Nähe zueinander, während *in-vivo* umliegendes Gewebe noch vorhanden ist, welches das Mikromilieu beeinflusst (134). So liegen wesentliche Unterschiede in der Höhe der Temperatur, des pH- Wertes, des Glucose-Gehalts und der Sauerstoff-Verfügbarkeit vor, welche die PDT beeinflussen (135-138). Während die Elimination eines Medikaments im menschlichen Körper stetig verläuft, ist die Konzentration unserer *in-vitro* benutzten Medikamente 5-ALA und Ciprofloxacin abhängig von dem zunehmenden physikalischen Zerfall im Nährmedium und der Stoffwechselaktivität der Chordomzellen (139, 140).

Zu bedenken ist außerdem die Blut- Hirn- Schranke, die wir in unseren Versuchen nicht nachgestellt haben. Die Blut- Hirn- Schranke besteht aus geschlossenem, nicht-gefenstertem Kapillarendothel, einer Basalmembran, Perizyten und Astrozytenfortsätzen, und ist damit von der Blutzirkulation in besonderer Weise isoliert. Dies erlaubt den Durchtritt lipophiler Substanzen. Da Fluorchinolone im physiologischen pH-Bereich des Blutes von 7,4 als Zwitterionen, und damit in ungeladener, lipophiler Form vorliegen, weisen diese eine besonders hohe Membrandurchlässigkeit/ Membranpenetration vor. Dagegen liegt 5-ALA in lipophober Form vor, weswegen ihre Aufnahme bei intakter Blut-Hirn-Schranke begrenzt ist. Allerdings ist zu beachten, dass bei Vorhandensein von ZNS-Tumoren die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke deutlich erhöht ist (141, 142).

3.2.2 5-ALA Inkubationszeiten

Die optimale 5-ALA-Inkubationszeit zum Erreichen eines maximalen PDD und PDT-Effekts wurde in vorherigen Arbeiten immer wieder kontrovers diskutiert (87, 143, 144). Ob es hier ein allgemein gültiges Optimum gibt, oder ob diese Zeiten tumorspezifisch variieren, ist unklar. Aus diesen Überlegungen heraus untersuchten wir den Effekt der 5-ALA-PDT nach 4- stündiger 5-ALA-Inkubation bzw. 6-stündiger Inkubationsdauer. Hierbei stellten sich keine signifikanten Unterschiede nach einer alleinige 5-ALA-PDT im Zellüberleben heraus. Dies passt zu den in der Literatur beschriebenen 5-ALA-Inkubationszeiten in hirneigenen Tumoren, die ebenfalls zwischen vier bis sechs Stunden beschrieben sind [78, 86]. Außerdem bestätigen sich hier Ergebnisse aus vorherigen Arbeiten mit der human immortalisierten Zelllinie U-CH2, die darlegen, dass insbesondere eine 6-stündige 5-ALA-Inkubationszeit zu einer erhöhten Akkumulation von PPIX führt (145).

3.2.3 5-ALA Inkubationszeiten unter Präinkubation mit Ciprofloxacin

Interessanterweise konnten wir allerdings beobachten, dass bei Vorinkubation der Zellen mit Ciprofloxacin ein Unterschied im Zellüberleben besteht, abhängig von einer 4- bzw. 6-stündigen 5-ALA-Inkubationsdauer. Für die Populationen der Zelllinie U-CH2B und U-CH14 führte eine 4-stündige Ciprofloxacin-5-ALA gestützte PDT zu keinem signifikanten Unterschied im Überleben im Vergleich zu einer 6-stündigen Ciprofloxacin-5-ALA gestützten PDT.

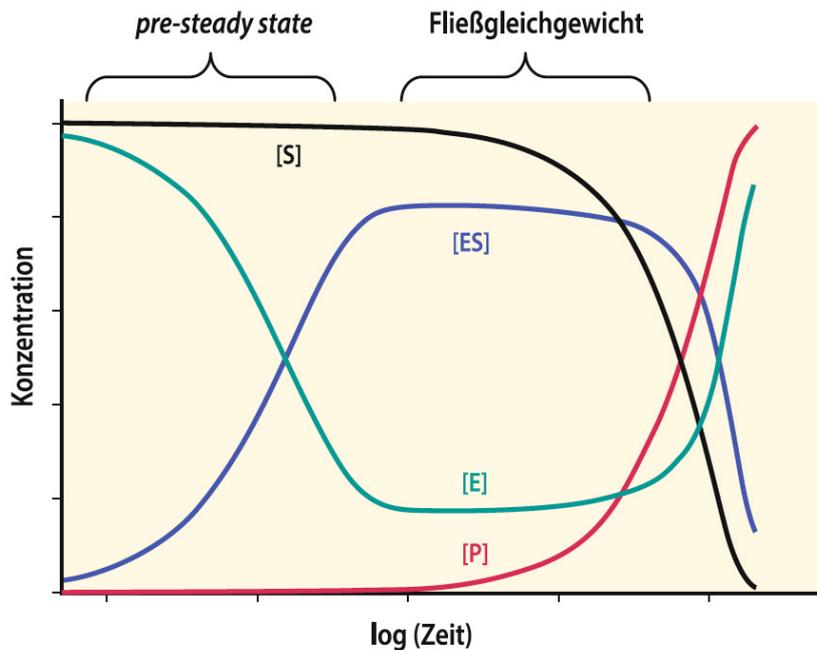
Andere Ergebnisse zeigten sich jedoch in der Ciprofloxacin-5-ALA basierten PDT an der Zelllinie U-CH2. Hier ergab die Inkubation mit niedrigeren Konzentrationen einen signifikant besseren Effekt, wenn die Zellen lediglich 4 h lang mit 5-ALA inkubiert wurden, wohingegen höhere Konzentrationen bei einer 6-stündigen 5-ALA Inkubation zu einem signifikant höheren Effekt der PDT führten. Diese Beobachtungen lassen sich anhand der Kinetik der Protoporphyrin (PPIX)- Synthese nachvollziehen: Durch die exogene Zufuhr von 5-ALA wird das Schlüsselenzym der Hämbiosynthese, die δ -Aminolävulinsäure-Synthase, dessen Aktivität durch die negative Rückkopplung von Häm, dem Endprodukt der Hämbiosynthese, gesteuert wird, umgangen. Somit wird vermutlich das nächst langsamere

Enzym, Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) zum Schrittmacherenzym (88) (86) . Geht man nun davon aus, dass dieses Enzym in den humanen immortalisierten Zellen eine ähnliche Enzymkinetik aufweist wie in menschlichen Erythrozyten, so liegt *in-vitro* eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit der PBGD vor (146). Dies bedeutet, dass bei niedrigeren Wirkstoffkonzentration, bei der allerdings die Diffusionsprozesse überwiegen, die PPIX-Synthese noch schnell läuft, jedoch mit zunehmendem Substratverbrauch die Geschwindigkeit abnimmt. Folglich tritt der Substratverbrauch bei geringeren Wirkstoffkonzentrationen schneller ein, weswegen eine niedrigere 5-ALA Konzentration bereits bei kürzerer Inkubationszeit zu einem signifikant höheren Effekt der PDT führen könnte, während höhere Konzentrationen durch eine längere Inkubation den gewünschten Effekt hervorbringen können.

Dies bestätigt *in-vitro- und in-vivo-* Modelle zur Zeitabhängigkeit der 5-ALA gestützten PPIX-Synthese, die zeigten, dass die PPIX-Fluoreszenzkinetik in verschiedenen Geweben nicht nur abhängig ist von der Inkubationszeit des 5-ALA, sondern auch von der jeweiligen Konzentration des Wirkstoffs (147-151) (Abb. 11).

Unklar bleibt hier jedoch, warum dieser Effekt nicht auch bei den anderen Zelllinien zu beobachten war.

Hierbei ist es wichtig, zu bedenken, dass -wie im vorherigen Abschnitt beschrieben- es sich um drei verschiedene humane Chordom-Zelllinien handelt und damit um unterschiedliches Gewebe mit unterschiedlichen Eigenschaften.



(Abb. 5)
 Entstehung eines Fließgleichgewichts während einer enzymkatalysierten Reaktion

S = Substrat, E = Enzym, ES = Enzym-Substrat-Komplex, P = Produkt

Während der pre-steady state- Phase bildet sich der ES, dessen Konzentration während der Fließgleichgewicht-Phase ungefähr konstant ist. Währenddessen nimmt während der Fließgleichgewicht-Phase die Produktkonzentration linear zu (modifiziert nach (82)).

3.2.4 Überlegenheit der delta-Aminolävulinsäure

5-ALA zeigt im Vergleich zu anderen Photosensibilisatoren ein besonders günstiges Nebenwirkungsprofil. Photofrin dagegen z.B. erhöht das Risiko für neurologischen Defizite, insbesondere bei angewandter Lichtenergie von über 4000 J. Darüberhinaus sind Schädigungen des physiologischen Hirngewebes beschrieben, während Studien beweisen, dass eine 5-ALA basierte PDT-Behandlung mit einer Energie von 4320 J und bis zu 11520 J in zylindrisch verteilten Lichtdiffusoren keinen Schaden beim Menschen auslöst (109).

Beobachtet wurden bei 5-ALA Applikation in einer Häufigkeit von $\geq 1/100$ aber $< 1/10$

laborchemische Veränderungen im Blutbild im Sinne von Thrombozytopenien, Leukozytose und erhöhte Leberenzyme sowie in 80% der Fälle Lichtüberempfindlichkeiten von Haut und Retina (152, 153). Wenn diese auftreten, sind sie allerdings nur von kurzfristiger Dauer (i. d. R. von 72h Dauer). Weiterhin können diesen auch durch einfache prophylaktische Maßnahmen wie der Vermeidung von direktem Sonnenlicht, z.B. Raumabdunkelung sowie das Vermeiden der gleichzeitigen Gabe anderer phototoxischer Substanzen wie z.B. Tetrazykline, Sulfonamide oder Hypericinextrakte, vorgebeugt werden.

Insgesamt erscheint 5-ALA besonders interessant auf Grund einer hohen Tumorselektivität, geringen systemischen Nebenwirkungen, einer raschen Elimination sowie der etablierten klinischen Erfahrungen für die PDT (69, 83, 96, 101, 103, 148, 149, 154-156). 5-ALA hat sich bisher als einziger Photosensibilisator in der Hirntumorchirurgie durchgesetzt (120). Das Medikament besitzt seit dem Jahre 2007 in einer empfohlenen Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht unter dem Handelsnamen Gliolan® die Zulassung durch die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) für die operative Resektion von malignen Gliomen. Diese Zulassung lässt die Anwendung von 5-ALA in analoger Handhabung auch für die PDT realistisch erscheinen.

3.3 Überlegungen zum potenziellen klinischen Einsatz der PDT bei Chordomen

Zum jetzigen Zeitpunkt bleibt die Anwendung der PDD bzw. der PDT in der Behandlung von Chordomen hoch experimentell. Bis dato liegen lediglich Daten aus *in vitro* Studien vor (145). Um die experimentelle Ciprofloxacin-5-ALA gestützte PDT in die Klinik zu übertragen, sind weitere Zwischenschritte nötig. Diese bestehen aus Untersuchungen der photodynamischen Therapie an Primärzelllinien von Chordomen (157), sowie daraufhin Tierexperimente (26). Basierend auf solche Experimente, können Phase I Studien (158) und im Verlauf Phase II Studien erarbeitet werden (56).

3.3.1 Laser: Eindringtiefe, Energie & Verteilung speziell in Chordomzellen

In den vorliegenden Experimenten war mit 93 mm der Abstand zwischen Lichtquelle und Tumoroberfläche vergleichsweise klein, was aufgrund des Abstandsquadratgesetzes zu relativ hohen Energien führte.

Leider wären solche idealen und konstanten Bedingungen im intraoperativen Setting aufgrund der Variabilität von Tumormorphologie, der Anatomie des OP-Situs und anderen Gegebenheiten nicht immer streng reproduzierbar. Auf der anderen Seite gilt zu bedenken, dass ein zu geringer Abstand zwischen der Lichtquelle und dem Tumorgewebe zu einem kleineren Bestrahlungsgebiet führt.

Durch eigene Dosisfindungs-Vorversuche (unveröffentlichte Ergebnisse), adaptiert an unser Versuchsmodell bestehend aus *Monolayer*-Gewebe, nutzten wir *in-vitro* eine Strahlungsintensität von 18.75 J/cm^2 , wohingegen *in-vivo* Strahlungsintensitäten von $100 - 250 \text{ J/cm}^2$ durchaus notwendig sind (157) (96). Die niedrige Strahlungsintensität von nur 18.75 J/cm^2 erweist sich insofern als ausreichend, als bei einem Monolayer-Gewebe keine große Eindringtiefe des Lichtes bis zum Erreichen der Tumorzellen notwendig ist.

Dieses Monolayer-Gewebe in den 96-wells-Platten entspricht nicht einer dreidimensionalen Matrix, wie in *in-vivo*. Der Aufbau der Lichtleiterkonstruktion war punktuell mit geringer Streustrahlung, so dass hier eine maximale Bestrahlungsintensität erreicht wurde. Für die klinische Anwendung wäre eine flächenhafte Lichtverteilung vorteilhaft. Diese wäre z.B. durch Diffusorlinsen bestehend aus zylindrisch aufgebauten Fasern möglich (159). Auch das Nutzen von Ulbricht-Kugeln wäre im klinischen Setting denkbar, um einen im dreidimensionalen Raum maximalen Effekt einer PDT zu erreichen (160).

Weiterhin müssen die histopathologischen Eigenschaften der Chordome berücksichtigt werden. Chordome weisen mikroskopisch lobulierte, fibröse Septen auf und zeichnen sich durch große, polygonale Zellen mit klarem bis eosinophilem Zytoplasma (sog. physaliphore Zellen) mit intrazytoplasmatischen blasigen Vakuolen (28, 161). Diese lobulierte und blasige Architektur kann theoretisch eine tiefere Eindringtiefe ermöglichen (112, 151, 162).

3.3.2 Potenzial der Klinischen Anwendbarkeit der PDT bei Chordomen

In der Literatur ist im Vergleich zu anderen Therapieformen bei der Therapieform der PDT beim Glioblastom keine Resistenzentwicklung beschrieben worden (163). Diese Eigenschaft wäre insbesondere bei tiefer liegenden bzw. schwieriger zu erreichenden Tumoren, wie z.B. Chordomen von Vorteil, da durch eine repetitive Nutzung mehr pathologische Zellen erreicht werden würden. So zeigte eine Phase-III-Studie bei Glioblastomen einen deutlichen Effekt der wiederholten Anwendung 5-ALA basierter PDT innerhalb von 24 h nach operativer Resektion (119). Es wurde bei Glioblastom-Patienten, die innerhalb von 24 h nach einer fluoreszenzgesteuerten Resektion fünf Mal eine PDT sowie im Verlauf eine fraktionierte Strahlentherapie erhielten, eine verzögerte mittlere Tumorprogression (8.6 vs. 4.8 Monate) und ein erhöhtes mittleres Überleben (52.8 vs. 24.6 Wochen) beschrieben im Vergleich zu Glioblastom-Patienten, die lediglich eine konventionelle Operation sowie fraktionierte Strahlentherapie, aber keine PDT erhielten (119) (96).

In einer weiteren Studie, einer Phase-I-Pilotstudie, erhielten 10 Patienten mit rezidivierenden, nicht-operablen malignen Gliomen eine 5-ALA-PDT-Behandlung (113). Hierfür erhielten die Patienten 1 h vor der Behandlung 5-ALA oral. Interstitiell wurden 6 zylindrische Lichtdiffusoren platziert. Es wurde Licht mit einer Leistung von 200 mW/cm pro Diffusorlänge für eine Behandlungszeit von 1 h (also 720 J/cm) an Tumoren mit einem Volumen von 2.1 und bis zu 10.2 cm³ appliziert. Die mittlere angewandte Lichtenergie betrug 7.212 J mit einer mittleren Gesamtvolumeneffektivität von 1.405 J/cm³. In dieser Studie wurden keine Nebenwirkungen beschrieben. Es wurde eine 1-Jahres-Überlebensrate von 60% und ein mittleres Überleben von 15 Monaten beobachtet (113). Demgegenüber wird in der Literatur das mittlere Überleben für rezidivierende maligne Gliome mit ca. 6 Monaten beschrieben (164). Darüber hinaus beschrieben die Autoren ein spontanes Verschwinden von asymptomatischen periläsionalen Ödemen innerhalb von 3 Monaten nach PDT. Größere Phase-IIb-Studien befinden sich aktuell in der Rekrutierungsphase (NOA-11/PDT): Hier wird eine stereotaktische 5-ALA gestützte PDT bei Rezidiv-Glioblastompatienten untersucht. In einer weiteren Studie (NCT03048240) wird bei erstdiagnostizierten Glioblastompatienten intraoperativ nach der chirurgischen Resektion des Tumors eine 5-ALA gestützte PDT angewandt.

Die Ergebnisse dieser Studien bleiben abzuwarten, könnten aber prinzipiell als Pioniere in der klinischen Anwendbarkeit der PDT bei Hirntumoren gelten und somit auch die Basis für die klinische Anwendbarkeit der PDT bei Chordomen bilden.

Auf Grund des malignen Charakters der Chordome scheint der Effekt der PDT gegenüber potenziellen Grenzen oder Risiken zu überwiegen (165).

Eine adjuvante PDT-Behandlung wäre bei nachgewiesener klinischer Wirksamkeit z.B. einer postoperativen Strahlentherapie vorzuziehen, da bis dato in der klinischen Anwendung der PDT bei Hauttumoren oder in klinischen Studien bei Glioblastom-Patienten keine Strahlennekrosen, Resistenzentwicklungen und/ oder post-radiogen induzierte Zweittumore beobachtet wurden (165).

Die ideale Krebsbehandlung umfasst nicht nur das Zerstören des Primärtumors, sondern umfasst vor allen Dingen das Mitbehandeln von verbleibenden Tumorzellen. Hier spielt neueren Erkenntnissen zufolge auch die Anregung des Immunsystems eine wichtige Rolle (54, 166, 167). Bei der PDT wurden neben phototoxischen Effekten auch immunologische Phänomene nachgewiesen (167-169). Ein PDT-induzierter Zellschaden führt nämlich nicht nur zu Ausbildung von Radikalen wie Superoxidanionen (O_2^-), Hydroxylradikalen (OH^-) oder Wasserstoffperoxiden (H_2O_2) und somit zum direkten Zelltod, sondern auch zur Ausreifung von Tumorantigenen und weiteren Signalen, die sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem aktivieren (73, 100, 111, 166, 167, 170).

In einer *in vitro* durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass eine 5-ALA-PDT in Glioblastom-Sphäroiden verantwortlich war für die Rekrutierung und Aktivierung von dendritischen Zellen, die die Tumor-Antigen-präsentierenden Zellen stimulierten (171). Außerdem konnte eine erhöhte Induktion des Hitzeschockproteins-70 auf den Sphäroiden nach der 5-ALA-PDT beobachtet werden (168).

In einer *in vivo*- Studie an Nagetieren mit G422-HGGs Zellen führte die PDT zu einer erhöhten Infiltration von Immunzellen und einer gesteigerten Zytokinfreisetzung (167). Dies stützt die Hypothese einer durch die PDT erzeugten lokalen sowie auch systemischen Antitumorimmunität.

Weitere Hinweise auf eine PDT-vermittelte Immunmodulation bei der Behandlung von HGG-Zellen lieferte auch die Arbeit von Li et al. Hier wurde allerdings ein Hämatorporphyrinderivat als Photosensibilisator genutzt. Diese konnte nachweisen, dass die PDT in murinen G422 GBM-Zellen eine Durchsetzung der Tumorzellen mit Immunzellen induzierte, die zur Freisetzung von Zytokinen wie Interferon- γ und Tumornekrosefaktor- α führte. Zusätzlich führte ein Splenozytentransfer von immunkompetenten, PDT-behandelten, Gliom tragenden Mäusen zu einer Unterdrückung des Gliomwachstums bei immunsuprimierten Empfängertieren. Dies unterstreicht den Effekt der systemischen Antitumorimmunität durch die PDT (109) (167). Inwieweit dies in Chordomzellen auch erreicht werden könnte, muss durch weitere Studien untersucht werden.

3.3.3 Limitationen der Klinischen PDT bei Chordomen

Hirschberg et al. beobachteten in einer experimentellen Studie über die PDT-Behandlung von Gliomsphäroiden von Menschen und Ratten, dass die mittels sphärischer Bestrahlung durchgeführte PDT eine Energie von 2 W erzeugte, welche wiederum zu einer lokalen Freisetzung von Wärme führte. Es zeigten sich Temperaturerhöhungen von bis zu $+8^{\circ}\text{C}$, wobei diverse Faktoren wie z.B. Tumortyp, Dauer der Behandlung, sowie Photosensibilisator-Eigenschaften diesen Mechanismus beeinflussen können (154).

Diese Mechanismen mitberücksichtigt können also lokal Temperaturen von bis zu $37^{\circ}\text{C} + 8^{\circ}\text{C}$, also 45°C entstehen (154).

Auch in unserem experimentellen Setting kam es stets zur Ausbildung von Kondenswasser am Deckel der 96-wells Platten nach PDT. Es stellt sich also die Frage, in welchem Maß eine solche Hyperthermie das physiologische Nachbargewebe schädigen würde.

In der Literatur gibt es Hinweise für die Ausbildung eines Hirnödems nach PDT in Glioblastompatienten (154, 172). Weitere toxische Effekte auf gesundes Gewebe, wie Nerven oder Gefäße sind bis dato nicht beschrieben (96, 119, 128, 158, 173).

Spezifisch für Chordome kann diese Frage mangels Erfahrung bisher ebenfalls noch nicht beantwortet werden. Aufgrund theoretischer Überlegungen spielen hier aber sicher die Nähe zu neuro-vaskulären Strukturen eine wichtige, zu beachtende Rolle.

Die PDT in der Neurochirurgie erweist sich als denkbare Konstrukt. Sie könnte neoadjuvant, oder bei residueller Infiltration auch intraoperativ adjuvant eingesetzt werden. Bis dato sind in der Anwendung der PDT bei Hauttumoren keine Interferenzen mit parallel laufenden Therapien wie z.B. Chemotherapie oder Strahlentherapie beschrieben worden (78).

Allerdings gibt es Medikamente, die die im pathologischen Gewebe zur Verfügung stehende Konzentration von 5-ALA beeinflussen könnten und somit mitberücksichtigt werden müssten. Experimentell ist z.B. gezeigt worden, dass Phenytoin (Antiepileptikum der 1. Generation) die Synthese von PPIX um bis zu 55% in humanen Glioblastomzellen im *in-vitro* Modell reduzierte (174). Dagegen allerdings zeigte sich im selben experimentellen Setting, dass Levetiracetam (Antiepileptikum der 2. Generation) keinen signifikanten Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von PPIX oder auf die PDT-Wirksamkeit hat (174).

Ein weiterer Aspekt ist der Einfluss einer 5-ALA gestützten PDT auf die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke. Im gesunden Mausmodell zeigte sich experimentell eine gesteigerte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke nach PDT (175). Da Hirntumore im Allgemeinen die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke bereits beeinflussen, ist hier eine Potenzierung zu erwarten. Dementsprechend erscheinen zum aktuellen Zeitpunkt noch genauere Untersuchungen zur optimalen Dosisfindung notwendig, bevor Medikamente, wie z.B. Ciprofloxacin in der klinischen Anwendung der PDT bei Hirntumor-Patienten zum Einsatz kommen können.

Chinolone, wie z.B. Ciprofloxacin, sollten auf Grund ihrer potenziellen Nebenwirkungen bedacht in der Klinik eingesetzt werden. Im Rote-Hand-Brief aus dem Jahre 2019 werden

Nutzen und Risiken aller Chinolon- und Fluorchinolon-Antibiotika und ihre Indikation in der gesamten EU re-evaluiert (176, 177).

Es wird dabei besonders auf schwerwiegende Nebenwirkungen des Bewegungsapparates aufmerksam gemacht, wie z.B. Tendinitis, Sehnenruptur, Myalgie, Muskelschwäche, Arthralgie, Gelenkschwellung und Gangstörungen, sowie auf systemische Nebenwirkungen wie z.B. Neuropathie, Schlaflosigkeit, Depression, Fatigue, Seh-, Hör-, Geruchs- und Geschmacksstörungen und eingeschränktes Erinnerungsvermögen. Allerdings handelt es sich hierbei um seltene schwerwiegende Nebenwirkungen nach Anwendung in therapeutischer Dosierung und in therapeutischer Dauer in 1 von 1000 Patienten (178).

Dennoch erscheinen diese unerwünschten Nebenwirkungen als vertretbar verglichen zum derzeit typischen Verlauf einer Chordomerkrankung. Die durchschnittliche Überlebenszeit nach Diagnosestellung des klassischen oder des chondroiden Chordoms beträgt 7 Jahre, die der aggressiveren dedifferenzierten Chordome ist sogar kürzer (27). Nach einer R-0 Resektion, die auf Grund der komplexen Lage von Chordomen insbesondere in der Schädelbasis oder in der oberen Halswirbelsäule schwierig zu erreichen ist, sind rezidivfreie Überlebensraten bei Chordomen der Schädelbasis nach 5 und 10 Jahren zwischen 47-76 % bzw 42-71 % beschrieben und bei Chordomen der mobilen Wirbelsäule nach 5 und 10 Jahren zwischen 58 % und 32 % (179). Trotz Chemo- und Radiotherapie sind dagegen Rezidivraten von >50 % nach 5 und 10 Jahren beobachtet worden (13, 46). Bei vollständig resezierten Chordomen des Sakrums sind Rezidivraten nach 5; 10 und 15 Jahren von 30 %, 46 % und 57 % beschrieben (13). Eine fortgeschrittene Chordomerkrankung, insbesondere im Falle von Chordomrezidiven ist außerdem verbunden mit einer Metastasierungsrate von mindestens 40 % (6).

Im Gegensatz dazu ist hervorzuheben, dass in unserem experimentellen Setting lediglich eine *single-shot*-Dosis von bis zu maximal 6 µg/ml (=18 µmol/l) angewandt wurde, welche unterhalb der klinisch üblichen Dosierungen von 10-250 µmol/l liegt (41), sodass auch vor diesem Hintergrund die oben genannten seltenen Nebenwirkungen einer einmaligen Ciprofloxacin-Anwendung im Rahmen einer potenziellen 5-ALA-PDT durchaus vertretbar erscheinen.

3.4 Zukunftsaussichten

Besonders wegen der Rarität der Chordome und ihrer hohen Rezidivneigung besteht die dringende Notwendigkeit zur Etablierung neuer, risikoarmer adjuvanter Verfahren als Ergänzung bzw. Ersatz der herkömmlichen Behandlung.

Auf der einen Seite haben sich 5-ALA und das Antibiotikum Ciprofloxacin bereits durch jahrelange klinische Erfahrung und eine verbreitete medizinische Anwendung als sichere Substanzen erwiesen (120, 140, 180, 181). Auf der anderen Seite bewährte sich die Methode der 5-ALA PDT in ersten klinischen Studien an Gliomen bereits als vielversprechend (119, 158). Auf der Grundlage dieser klinischen Erfahrungen (96, 113) und der in dieser experimentellen Arbeit über die Ciprofloxacin-5-ALA-PDT an Chordomzelllinien neu gewonnenen Ergebnisse erscheint in Analogie eine Übertragung der PDT auf die klinische Chordombehandlung als sinnvoll. Insbesondere handelt es sich hierbei um eine Therapieform, die *à priori* im Gegensatz zu anderen adjuvanter Therapieformen weder zur Resistenzentwicklung noch zu Strahlennekrosen, noch zu induzierten Zweitumoren führen würde.

Schlussfolgerungen

In dieser Studie wurde am *in-vitro* Modell von drei human immortalisierten Chordom-Zelllinien, davon zwei aus einem sakralen Chordom und eine aus einem clivalen Chordom stammend, die Wirksamkeit der 5-ALA PDT nachgewiesen. Der Effekt wurde durch das Antibiotikum Ciprofloxacin, welches als Chelatbildner wirkt, verstärkt. Zudem wurde der Einfluss unterschiedlicher 5-ALA Inkubationszeiten untersucht.

Ein dosis-abhängiger letaler Effekt der 5-ALA PDT konnte in allen Zelllinien erreicht werden. Dieser wurde durch die zusätzliche Gabe von Ciprofloxacin gesteigert.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um in Zukunft neue Therapiewege in der Behandlung der Chordome klinisch zu etablieren. Hierzu dient unser experimentelles Modell als geeignete Basis, um die Möglichkeiten PDT gestützter Therapieverfahren und mögliche Einflussfaktoren zu untersuchen.

4. Verzeichnisse

4.1 Literaturverzeichnis

1. Feng G, Zhang GQ, Ding D. Design of superior phototheranostic agents guided by Jablonski diagrams. *Chem Soc Rev.* 2020;49(22):8179-234.
2. Bailey P BD. Intracranial Chordoblastoma. *Am J Pathol.* 1929;5:439-50.5.
3. Sahyouni R, Goshtasbi K, Mahmoodi A, Chen JW. A historical recount of chordoma. *J Neurosurg Spine.* 2018;28(4):422-8.
4. Yasuda M, Bresson D, Chibbaro S, Cornelius JF, Polivka M, Feuvret L, et al. Chordomas of the skull base and cervical spine: clinical outcomes associated with a multimodal surgical resection combined with proton-beam radiation in 40 patients. *Neurosurg Rev.* 2012;35(2):171-82; discussion 82-3.
5. Chugh R, Tawbi H, Lucas DR, Biermann JS, Schuetze SM, Baker LH. Chordoma: the nonsarcoma primary bone tumor. *Oncologist.* 2007;12(11):1344-50.
6. Stacchiotti S, Sommer J. Building a global consensus approach to chordoma: a position paper from the medical and patient community. *The Lancet Oncology.* 2015;16(2):e71-e83.
7. Walcott BP, Nahed BV, Mohyeldin A, Coumans J-V, Kahle KT, Ferreira MJ. Chordoma: current concepts, management, and future directions. *The Lancet Oncology.* 2012;13(2):e69-e76.
8. Loic Lebellec FB, Emmanuelle Tresch-Bruneel, Emmanuelle Bompas, Yves Toiron, Luc Camoin, Olivier Mir, Valerie Laurence, Stephanie Clisant, Emilie Decoupigny, Jean-Yves Blay, Anthony Goncalves, Nicolas Penel. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) as predictive factor of progression-free survival in patients with advanced chordoma receiving sorafenib: an analysis from a phase II trial of the french sarcoma group (GSF/GETO). *Oncotarget.* Vol. 7, No. 45.

9. Huang JF, Chen D, Sang CM, Zheng XQ, Lin JL, Lin Y, et al. Nomogram for Individualized Prediction and Prognostic Factors for Survival in Patients with Primary Spinal Chordoma: A Population-Based Longitudinal Cohort Study. *World Neurosurg.* 2019.
10. Sciubba D. CJ, Petteys R., Weber K., Frassica D., Gokaslan ZL. Chordoma of the sacrum and vertebral bodies. *J Am Acad Orthop Surg.* 2009 Nov;17((11)):708-17.
11. Lauer SR EM, Gardner JM, Sebastian A, Weiss SW. . Soft tissue chordomas: a clinicopathologic analysis of 11 cases. *Am J Surg Pathol.* 2013;37:719–26.
12. Diaz RJ, Cusimano MD. The biological basis for modern treatment of chordoma. *J Neurooncol.* 2011;104(2):411-22.
13. Stacchiotti S, Gronchi A, Fossati P, Akiyama T, Alapetite C, Baumann M, et al. Best practices for the management of local-regional recurrent chordoma: a position paper by the Chordoma Global Consensus Group. *Ann Oncol.* 2017;28(6):1230-42.
14. Manila Antonelli M, PhD,* Alessandro Raso, PhD,w Samantha Mascelli, PhD,w Marco Gessi, MD, PhD,z Paolo Nozza, MD,w Antonella Coli, PhD,y Marina P. Gardiman, MD,8 Antonietta Arcella, PhD,z Maura Massimino, MD,# Francesca R. Buttarelli, PhD,**, and Felice Giangaspero M. SMARCB1/INI1 Involvement in Pediatric Chordoma. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(1):56-61.
15. Yoshimura Y, Isobe K, Arai H, Aoki K, Kito M, Kato H. Preoperative radiographic and histopathologic evaluation of central chondrosarcoma. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2013;133(9):1225-31.
16. Stiller CA, Trama A, Serraino D, Rossi S, Navarro C, Chirlaque MD, et al. Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: report from the RARECARE project. *Eur J Cancer.* 2013;49(3):684-95.
17. McMaster ML GA, Bromley CM, Ishibe N, Parry DM. Chordoma: incidence and survival patterns in the United States, 1973-1995. *Cancer Causes Control.* 2001;12(1):1-11.

18. Shih AR, Cote GM, Chebib I, Choy E, DeLaney T, Deshpande V, et al. Clinicopathologic characteristics of poorly differentiated chordoma. *Mod Pathol*. 2018;31(8):1237-45.
19. Benjamin L. Hoch GPN, mNorbert J. Liebsch,, and Andrew E. Rosenberg. Base of Skull Chordomas in Children and Adolescents A Clinicopathologic Study of 73 Cases. *Am J Surg Pathol*. 2006;30:811-8.
20. Sebro R, DeLaney T, Hornicek F, Schwab J, Choy E, Nielsen GP, et al. Differences in sex distribution, anatomic location and MR imaging appearance of pediatric compared to adult chordomas. *BMC Med Imaging*. 2016;16(1):53.
21. Eugen B. Hug LNL, Jerry D. Slater, Alexander Devries, Roger I. Grove, Rosemary A. Schaefer, Andrew E. Rosenberg and James M. Slater. Proton radiation therapy for chordomas and chondrosarcomas of the skull base. *Journal of Neurosurgery*. 1999;91(3):432-9.
22. Greenberg MS. *Handbook of neurosurgery*. Eighth edition ed. Greenberg MS, editor. New York: Thieme; 2016.
23. Dahl NA, Luebbert T, Loi M, Neuberger I, Handler MH, Kleinschmidt-DeMasters BK, et al. Chordoma Occurs in Young Children With Tuberous Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2017;76(6):418-23.
24. Koutourousiou M, Snyderman CH, Fernandez-Miranda J, Gardner PA. Skull base chordomas. *Otolaryngol Clin North Am*. 2011;44(5):1155-71.
25. Sharifnia T, Wawer MJ, Chen T, Huang QY, Weir BA, Sizemore A, et al. Small-molecule targeting of brachyury transcription factor addiction in chordoma. *Nat Med*. 2019;25(2):292-300.
26. Karikari IO, Gilchrist CL, Jing L, Alcorta DA, Chen J, Richardson WJ, et al. Molecular characterization of chordoma xenografts generated from a novel primary chordoma cell source and two chordoma cell lines. *J Neurosurg Spine*. 2014;21(3):386-93.

27. Barth TFE, von Witzleben A, Moller P, Scheil-Bertram S. [Notochordal tumors : Benign notochordal tumors and chordomas]. *Pathologe*. 2018;39(2):117-24.
28. von Witzleben A, Goerttler LT, Lennerz J, Weissinger S, Kornmann M, Mayer-Steinacker R, et al. In chordoma, metastasis, recurrences, Ki-67 index, and a matrix-poor phenotype are associated with patients' shorter overall survival. *Eur Spine J*. 2016;25(12):4016-24.
29. Presneau N, Shalaby A, Idowu B, Gikas P, Cannon SR, Gout I, et al. Potential therapeutic targets for chordoma: PI3K/AKT/TSC1/TSC2/mTOR pathway. *Br J Cancer*. 2009;100(9):1406-14.
30. Stefano Boriani SB, Roberto Biagini, Patrizia Bacchini, Luca Boriani, Michele Cappuccio, Francois Chevalley, Alessandro Gasbarrini, Piero Picci,, and James N. Weinstein. Chordoma of the Mobile Spine: Fifty Years of Experience. *SPINE*. 2006;31(4):493-503.
31. Santegoeds RGC, Temel Y, Beckervordersandforth JC, Van Overbeeke JJ, Hoeberigs CM. State-of-the-Art Imaging in Human Chordoma of the Skull Base. *Curr Radiol Rep*. 2018;6(5):16.
32. Kuribara T, Mikami T, Iihoshi S, Miyata K, Kim S, Kawata Y, et al. Ischemic Tolerance Evaluated by Computed Tomography Perfusion during Balloon Test Occlusion. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2020;29(6):104807.
33. Jennifer Kreshak FdRL, Piero Picci, Stefano Boriani, Joseph Mirra, Biagio Merlino, Eugenio Brunocilla and Daniel Vanel. Difficulty distinguishing benign notochordal cell tumor from chordoma further suggests a link between them. *Cancer Imaging*. 2014;14(4).
34. Sasaki T, Moritani T, Belay A, Capizzano AA, Sato SP, Sato Y, et al. Role of the Apparent Diffusion Coefficient as a Predictor of Tumor Progression in Patients with Chordoma. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2018;39(7):1316-21.

35. Liu C, Xi Y, Li M, Jiao Q, Zhang H, Yang Q, et al. Dedifferentiated chondrosarcoma: Radiological features, prognostic factors and survival statistics in 23 patients. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173665.
36. Rotondo M, Natale M, Mirone G, Cirillo M, Conforti R, Scutto A. A rare symptomatic presentation of ecchordosis physaliphora: neuroradiological and surgical management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78(6):647-9.
37. Zhong XL, Huang B, Liu C, Zhan SQ. Multiple Ecchordosis Physaliphora: A Challenging Diagnosis. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(20):2826-8.
38. He Y, Wang J, Zhang J, Du L, Lu Y, Xu J, et al. Magnetic resonance feature of "paintbrush borders" sign as a novel way to predict recurrence of giant cell tumor of bone after curettage: a pilot study. *J Int Med Res*. 2018;46(2):710-22.
39. Gao Y, Qin Z, Li D, Yu W, Sun L, Liu N, et al. Intracerebral schwannoma: A case report and literature review. *Oncol Lett*. 2018;16(2):2501-10.
40. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803-20.
41. Shimony N, Gonen L, Shofty B, Abergel A, Fliss DM, Margalit N. Surgical resection of skull-base chordomas: experience in case selection for surgical approach according to anatomical compartments and review of the literature. *Acta Neurochir (Wien)*. 2017;159(10):1835-45.
42. Di Maio S, Temkin N, Ramanathan D, Sekhar LN. Current comprehensive management of cranial base chordomas: 10-year meta-analysis of observational studies. *J Neurosurg*. 2011;115(6):1094-105.
43. Dhawale AA, Gjolaj JP, Holmes L, Jr., Sands LR, Temple HT, Eismont FJ. Sacrectomy and adjuvant radiotherapy for the treatment of sacral chordomas: a single-center experience over 27 years. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2014;39(5):E353-9.
44. Arnautovic K. A-MO. Surgical seeding of chordomas. *J Neurosurg*. 2001;95(5):798–803.

45. Bekelis K, Coy S, Simmons N. Operative Duration and Risk of Surgical Site Infection in Neurosurgery. *World Neurosurg.* 2016;94:551-5 e6.
46. Yamada Y, Gounder M, Laufer I. Multidisciplinary management of recurrent chordomas. *Curr Treat Options Oncol.* 2013;14(3):442-53.
47. Colli BO A-MO. Chordomas of the skull base: follow-up review and prognostic factors. *Neurosurg Focus.* 2001;10(3):Article 1.
48. Park L, Delaney TF, Liebsch NJ, Hornicek FJ, Goldberg S, Mankin H, et al. Sacral chordomas: Impact of high-dose proton/photon-beam radiation therapy combined with or without surgery for primary versus recurrent tumor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;65(5):1514-21.
49. Foweraker KL, Burton KE, Maynard SE, Jena R, Jefferies SJ, Laing RJ, et al. High-dose radiotherapy in the management of chordoma and chondrosarcoma of the skull base and cervical spine: Part 1--Clinical outcomes. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2007;19(7):509-16.
50. Holliday EB, Mitra HS, Somerson JS, Rhines LD, Mahajan A, Brown PD, et al. Postoperative proton therapy for chordomas and chondrosarcomas of the spine: adjuvant versus salvage radiation therapy. *Spine (Phila Pa 1976).* 2015;40(8):544-9.
51. Rotondo RL, Folkert W, Liebsch NJ, Chen YL, Pedlow FX, Schwab JH, et al. High-dose proton-based radiation therapy in the management of spine chordomas: outcomes and clinicopathological prognostic factors. *J Neurosurg Spine.* 2015;23(6):788-97.
52. Imai R, Kamada T, Araki N, Working Group for B, Soft Tissue S. Carbon Ion Radiation Therapy for Unresectable Sacral Chordoma: An Analysis of 188 Cases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2016;95(1):322-7.
53. Bompas E, Le Cesne A, Tresch-Bruneel E, Lebellec L, Laurence V, Collard O, et al. Sorafenib in patients with locally advanced and metastatic chordomas: a phase II trial of the French Sarcoma Group (GSF/GETO). *Ann Oncol.* 2015;26(10):2168-73.
54. Stacchiotti S, Casali PG. Systemic therapy options for unresectable and metastatic chordomas. *Curr Oncol Rep.* 2011;13(4):323-30.

55. Stacchiotti S, Marrari A, Tamborini E, Palassini E, Viridis E, Messina A, et al. Response to imatinib plus sirolimus in advanced chordoma. *Ann Oncol.* 2009;20(11):1886-94.
56. DeMaria PJ, Bilusic M, Park DM, Heery CR, Donahue RN, Madan RA, et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase II Study of Yeast-Brachyury Vaccine (GI-6301) in Combination with Standard-of-Care Radiotherapy in Locally Advanced, Unresectable Chordoma. *Oncologist.* 2021;26(5):e847-e58.
57. Siddiqui F, Movsas B. Management of Radiation Toxicity in Head and Neck Cancers. *Semin Radiat Oncol.* 2017;27(4):340-9.
58. Mayo C, Yorke E, Merchant TE. Radiation associated brainstem injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;76(3 Suppl):S36-41.
59. Catton C OSB, Bell R, Laperriere N, Cummings B, Fornasier V, Wunder J. Chordoma: long-term follow-up after radical photon irradiation. *Radiother Oncol.* 1996;41(1):67-72.
60. Habrand IL A-SM, Birnbaum S, Wray S, Carroll R, Munzenrider J, Verhey L, Urie M, Goitein M. Neurovisual outcome following proton radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1989;16(6):1601-6.
61. Debus J HE, Liebsch NJ, O'Farrel D, Finkelstein D, Efird J, Munzenrider JE. Brainstem tolerance to conformal radiotherapy of skull base tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997;39(5):967-75.
62. Debus J S-ED, Schad L, Essig M, Rhein B, Thillmann CO, Wannemacher M. Stereotactic fractionated radiotherapy for chordomas and chondrosarcomas of the skull base. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;47(3):591-6.
63. M.D. OA-MMDaLABB. Skull base chordomas: a management challenge. *Journal of Neurosurgery.* 1997;86(2):182-9.
64. Colli B. A-MO. Chordomas of the craniocervical junction: follow-up review and prognostic factors. *J Neurosurg.* 2001;95(6):933-43.
65. Epstein JM. Phototherapy and photochemotherapy. *The New England journal of medicine.* 1990;322(16):1149-51.

66. Gerold Kick GM, Gerd Plewig. Historische Entwicklung der Photodynamischen Therapie. *Der Hautarzt*. 1996;47(8):644-49.
67. von Tappeiner H JA. Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. *Dtsch Arch Klin Med*. 1904;80:427-87.
68. Roger Ackroyd CK, Nicola Brown and Malcolm Reed. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 2001;74(5).
69. van den Boogert J vHR, de Rooij FW, de Bruin RW, Edixhoven-Bosdijk A, Houtsmuller AB, Siersema PD, Wilson JH, Tilanus HW. 5-Aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in tissues: pharmacokinetics after oral or intravenous administration. *J Photochem Photobiol B*. 1998;44(1):29-38.
70. Müller M BH, Löffler G and Petrides PE. Porphyrine - Synthese und Aufbau. *Biochemie & Pathobiochemie*. Biochemie & Pathobiochemie, Springer Verlag, Berlin. 8. Auflage:379-94.
71. Foote CS. DEFINITION OF TYPE I AND TYPE I1 PHOTSENSITIZED OXIDATION. *Photochemistry und Photobiology*. 1991;54(5):659.
72. Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc*. 2013;46(1):24-9.
73. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2005;2(1):1-23.
74. HI P. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *Journal of the National Cancer Institute*. 1993;85(6).
75. Munna L, Agarwal MEC, Ella J, Harvey, Helen H, Evans, Antonio R, Antunez and Nancy L, Oleinick. Photodynamic Therapy Induces Rapid Cell Death by Apoptosis in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Cancer Res* 1991 Nov 1;51(21):5993-6. 1991;51(21):5993-6.

76. 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):1001-10.
77. Wolf P. Photodynamische Therapie Grundlagen und klinische Anwendung in der Dermatologie. *Deutsches Ärzteblatt.* 1999;96(22).
78. Wilson BC. Photodynamic therapy for cancer: Principles. *Can J Gastroenterol.* 2002;16((6)):393-6.
79. Stummer W, Stocker S, Novotny A, Heimann A, Sauer O, Kempfski O, et al. In vitro and in vivo porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolevulinic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 1998;45(2-3):160-9.
80. Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, St Denis TG, et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front Microbiol.* 2012;3:120.
81. Jane Dobson GFdQ, Jon P Golding Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects. *Vet J.* 2018:8-18.
82. Peter C. Heinrich MMI, Lutz Graeve Löffler/Petrides
*Biochemie und Pathobiochemie*2014. 379-89 p.
83. von Campe G, Moschopoulos M, Hefti M. 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence as immediate intraoperative indicator to improve the safety of malignant or high-grade brain tumor diagnosis in frameless stereotactic biopsies. *Acta Neurochir (Wien).* 2012;154(4):585-8; discussion 8.
84. Shinohara Y, Endo Y, Abe C, Shiba I, Ishizuka M, Tanaka T, et al. Development of a novel Schiff base derivative for enhancing the anticancer potential of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017;20:182-8.
85. Kamp MA, Santacrose A, Zella S, Reichelt DC, Felsberg J, Steiger HJ, et al. Is it a glioblastoma? In dubio pro 5-ALA! *Acta Neurochir (Wien).* 2012;154(7):1269-73.

86. Yang X, Li W, Palasuberniam P, Myers KA, Wang C, Chen B. Effects of Silencing Heme Biosynthesis Enzymes on 5-Aminolevulinic Acid-mediated Protoporphyrin IX Fluorescence and Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol.* 2015;91(4):923-30.
87. Briel-Pump A, Beez T, Ebbert L, Remke M, Weinhold S, Sabel MC, et al. Accumulation of protoporphyrin IX in medulloblastoma cell lines and sensitivity to subsequent photodynamic treatment. *J Photochem Photobiol B.* 2018;189:298-305.
88. Teng L, Nakada M, Zhao SG, Endo Y, Furuyama N, Nambu E, et al. Silencing of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based fluorescence and photodynamic therapy efficacy. *Br J Cancer.* 2011;104(5):798-807.
89. Schimanski A, Ebbert L, Sabel MC, Finocchiaro G, Lamszus K, Ewelt C, et al. Human glioblastoma stem-like cells accumulate protoporphyrin IX when subjected to exogenous 5-aminolaevulinic acid, rendering them sensitive to photodynamic treatment. *J Photochem Photobiol B.* 2016;163:203-10.
90. Ohgari Y, Miyata Y, Chau TT, Kitajima S, Adachi Y, Taketani S. Quinolone compounds enhance delta-aminolevulinic acid-induced accumulation of protoporphyrin IX and photosensitivity of tumour cells. *J Biochem.* 2011;149(2):153-60.
91. Ohgari Y, Miyata Y, Miyagi T, Gotoh S, Ohta T, Kataoka T, et al. Roles of porphyrin and iron metabolisms in the delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced accumulation of protoporphyrin and photodamage of tumor cells. *Photochem Photobiol.* 2011;87(5):1138-45.
92. Ohgari Y, Nakayasu Y, Kitajima S, Sawamoto M, Mori H, Shimokawa O, et al. Mechanisms involved in delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of tumor cells: relation of ferrochelatase and uptake of ALA to the accumulation of protoporphyrin. *Biochem Pharmacol.* 2005;71(1-2):42-9.

93. Ortel B, A. Tanew, and H. Honigsmann. Lethal photosensitization by endogenous porphyrins of PAM cells--modification by desferrioxamine. *J Photochem Photobiol.* 1993;17(3):273-8.
94. Iinuma S, et al. A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. *Br J Cancer.* 1994;70(1):21-8.
95. Muller PJ, Wilson BC. Photodynamic therapy of brain tumors--a work in progress. *Lasers Surg Med.* 2006;38(5):384-9.
96. Quirk BJ, Brandal G, Donlon S, Vera JC, Mang TS, Foy AB, et al. Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors--where do we stand? *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12(3):530-44.
97. Yanovsky RL, Bartenstein DW, Rogers GS, Isakoff SJ, Chen ST. Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2019;35(5):295-303.
98. Bechet D, Mordon SR, Guillemin F, Barberi-Heyob MA. Photodynamic therapy of malignant brain tumours: a complementary approach to conventional therapies. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(2):229-41.
99. Kou J DD, Yang L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget.* 2017;8(46).
100. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(7):535-45.
101. Dong L, Li X, Shen X, Zhang W, Zhang J, Wang Y, et al. Efficacy and safety of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of ulcerative squamous cell carcinoma. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;30:101710.
102. Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *Br J Pharmacol.* 2008;154(1):1-3.
103. Juzeniene A, Peng Q, Moan J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem Photobiol Sci.* 2007;6(12):1234-45.

104. Ozog DM, Rkein AM, Fabi SG, Gold MH, Goldman MP, Lowe NJ, et al. Photodynamic Therapy: A Clinical Consensus Guide. *Dermatol Surg.* 2016;42(7):804-27.
105. Wilson BD MT, Stoll H, Jones C,, Cooper M DT. Photodynamic Therapy for the Treatment of Basal Cell Carcinoma. *Archives of Dermatology.* 1992;128(12).
106. Fink-Puches R SH, Hofer A, Kerl H,, P W. Long-term Follow-up and Histological Changes of Superficial Nonmelanoma Skin Cancers Treated With Topical δ -Aminolevulinic Acid Photodynamic Therapy. *Arch Dermatol.* 1998;134:821–6.
107. Zhang J, Jiang C, Figueiro Longo JP, Azevedo RB, Zhang H, Muehlmann LA. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2018;8(2):137-46.
108. Ormond AB, Freeman HS. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials (Basel).* 2013;6(3):817-40.
109. Mahmoudi K, Garvey KL, Bouras A, Cramer G, Stepp H, Jesu Raj JG, et al. 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of high-grade gliomas. *J Neurooncol.* 2019;141(3):595-607.
110. Liang H, et al., . Subcellular phototoxicity of 5-aminolaevulinic acid (ALA). *Lasers Surg Med.* 1998;22(1):14-24.
111. Skupin-Mrugalska P, Sobotta L, Kucinska M, Murias M, Mielcarek J, Duzgunes N. Cellular changes, molecular pathways and the immune system following photodynamic treatment. *Curr Med Chem.* 2014;21(35):4059-73.
112. Inglut CT, Gaitan B, Najafali D, Lopez IA, Connolly NP, Orsila S, et al. Predictors and Limitations of the Penetration Depth of Photodynamic Effects in the Rodent Brain. *Photochem Photobiol.* 2020;96(2):301-9.
113. Beck TJ, Kreth FW, Beyer W, Mehrkens JH, Obermeier A, Stepp H, et al. Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. *Lasers Surg Med.* 2007;39(5):386-93.

114. Allison RR. Fluorescence guided resection (FGR): A primer for oncology. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016;13:73-80.
115. Lui H. Photodynamic Therapy in Dermatology. *Archives of Dermatology.* 1992;128(12).
116. Levy JG JC, Pilson LA. The preclinical and clinical development of photofrin and benzoporphyrin derivative: a reflection on opportunities and challenges. *J Photochem Photobiol B: Biology.* 1995;30:79-82.
117. Wolf P RF, Kerl H. Topical photodynamic therapy with endogenous porphyrins after application of 5-aminolevulinic acid: an alternative treatment modality for solar keratoses, superficial squamous cell carcinomas, and basal cell carcinomas? *J Am Acad Dermatol.* 1993;28:17-21.
118. Herbert Stepp TB, Thomas Pongratz, Thomas Meinel,² Friedrich-Wilhelm Kreth, Jörg Ch. Tonn & Walter Stummer. ALA and Malignant Glioma: Fluorescence-Guided Resection and Photodynamic Treatment. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology.* 2007;26(2):157-64.
119. Eljamel MS, Goodman C, Moseley H. ALA and Photofrin fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre Phase III randomised controlled trial. *Lasers Med Sci.* 2008;23(4):361-7.
120. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen H-J. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet Oncology.* 2006;7(5):392-401.
121. Kamp MA, Grosser P, Felsberg J, Sloty PJ, Steiger HJ, Reifenberger G, et al. 5-aminolevulinic acid (5-ALA)-induced fluorescence in intracerebral metastases: a retrospective study. *Acta Neurochir (Wien).* 2012;154(2):223-8; discussion 8.
122. Cornelius JF, Placke JM, Knipps J, Fischer I, Kamp M, Steiger HJ. Minispectrometer with handheld probe for 5-ALA based fluorescence-guided surgery of brain tumors:

- Preliminary study for clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017;17:147-53.
123. Johansson A, Palte G, Schnell O, Tonn JC, Herms J, Stepp H. 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels in tissue of human malignant brain tumors. *Photochem Photobiol.* 2010;86(6):1373-8.
 124. Cornelius JF, Slotty PJ, Kamp MA, Schneiderhan TM, Steiger HJ, El-Khatib M. Impact of 5-aminolevulinic acid fluorescence-guided surgery on the extent of resection of meningiomas--with special regard to high-grade tumors. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014;11(4):481-90.
 125. Widhalm G, Wolfsberger S, Minchev G, Woehrer A, Krssak M, Czech T, et al. 5-Aminolevulinic acid is a promising marker for detection of anaplastic foci in diffusely infiltrating gliomas with nonsignificant contrast enhancement. *Cancer.* 2010;116(6):1545-52.
 126. NATALI REBEIZ CCR, SEAN ARKINS, KEITH W. KELLEY and CONSTANTAIN A. REBEIZ. PHOTODESTRUCTION OF TUMOR CELLS BY INDUCTION OF ENDOGENOUS ACCUMULATION OF PROTOPORPHYRIN IX: ENHANCEMENT BY 1,10-PHENANTHROLINE. *Photochemistry and Photobiology.* 1992;55(3):431-5.
 127. Stylli SS, Kaye AH, MacGregor L, Howes M, Rajendra P. Photodynamic therapy of high grade glioma - long term survival. *J Clin Neurosci.* 2005;12(4):389-98.
 128. Akimoto J. Photodynamic Therapy for Malignant Brain Tumors. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2016;56(4):151-7.
 129. PH. Overview of cell and tissue culture techniques. *Curr Protoc Pharmacol.* 2001;12(12.1).
 130. Alsabeeh N, Chausse B, Kakimoto PA, Kowaltowski AJ, Shirihai O. Cell culture models of fatty acid overload: Problems and solutions. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2018;1863(2):143-51.
 131. Bergh P KL, Gunterberg B, Remotti F, Ryd W, Meis-Kindblom JM. Prognostic Factors in Chordoma of the Sacrum and Mobile Spine. *Cancer.* 2000;88(9):2122-34.

132. E Gay LNS, E Rubinstein, D C Wright, C Sen, I P Janecka, C H Chordomas and chondrosarcomas of the cranial base: results and follow-up of 60 patients. *Neurosurgery*. 1995;36(5):887-96.
133. Jager D, Barth TFE, Bruderlein S, Scheuerle A, Rinner B, von Witzleben A, et al. HOXA7, HOXA9, and HOXA10 are differentially expressed in clival and sacral chordomas. *Sci Rep*. 2017;7(1):2032.
134. McGinnity DFJR. Predicting drug pharmacokinetics in humans from in vitro metabolism studies. *Biochem Soc Trans*. 2001;29(2):135-9.
135. Wyld L TM, Reed MW, Brown NJ. Aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy: cellular responses to glucose starvation. *Br J Cancer*. 2002;86(8):1343-7.
136. Wyld L RM, Brown NJ. The influence of hypoxia and pH on aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy in bladder cancer cells in vitro. *Br J Cancer*. 1998;77(10):1621-7.
137. Liu YL, Ang SO, Weigent DA, Prchal JT, Bloomer JR. Regulation of ferrochelatase gene expression by hypoxia. *Life Sci*. 2004;75(17):2035-43.
138. Georgakoudi I KP, Foster TH. Hypoxia significantly reduces aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX synthesis in EMT6 cells. *Br J Cancer*. 1999;79(9-10):1372-7.
139. Mercedes Novo GH, Heyke Diddens Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1996;34:143-8.
140. Rotschafer KV-BRPGC. Clinical Pharmacokinetics of Ciprofloxacin. *Clinical Pharmacokinetics*. 1990;19(6):434-61.
141. Susana Bulnes JBaJVL. Microvascular adaptive changes in experimental endogenous brain gliomas. *Histol Histopathol*. 2009;24(6):693-706.
142. Papadopoulos MC SS, Woodrow CJ, Davies DC, Costa-Martins P, Moss RF, Krishna S, Bell BA. Occludin expression in microvessels of neoplastic and non-neoplastic human brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2001;27(5):384-95.

143. Stepp H, Stummer W. 5-ALA in the management of malignant glioma. *Lasers Surg Med.* 2018;50(5):399-419.
144. Cornelius JF, Slotty PJ, El Khatib M, Giannakis A, Senger B, Steiger HJ. Enhancing the effect of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in human meningioma cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014;11(1):1-6.
145. Cornelius JF, Eismann L, Ebbert L, Senger B, Petridis AK, Kamp MA, et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy of chordoma: In vitro experiments on a human tumor cell line. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017;20:111-5.
146. Erlandsen EJ, Jorgensen PE, Markussen S, Brock A. Determination of porphobilinogen deaminase activity in human erythrocytes: pertinent factors in obtaining optimal conditions for measurements. *Scand J Clin Lab Invest.* 2000;60(7):627-34.
147. D. Kleemann AJM, T. Mentzel, P. M. Speight, and S. G. Bown. Photodynamic therapy on the normal rabbit larynx with phthalocyanine and 5-aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX photosensitisation. *Br J Cancer.* 1996;74(1):49-58.
148. Loh CS BJ, MacRobert AJ, Krasner N, Phillips D, Bown SG. Photodynamic therapy of the normal rat stomach: a comparative study between di-sulphonated aluminium phthalocyanine and 5-aminolaevulinic acid. *Br J Cancer.* 1992;66(3):452-62.
149. Loh CS MA, Bedwell J, Regula J, Krasner N, Bown SG. Oral versus intravenous administration of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy. *Br J Cancer.* 1993;68(1):41-51.
150. Loh CS, Vernon, D., MacRobert, A.J., Bedwell, J., Brown, S.G. und Brown, S.B. Endogenous porphyrin distribution induced by 5-Aminolevulinic acid in the tissue layers of the gastrointestinal tract. *JPhotochemPhotobiol B.* 1993;20:47-54.
151. Riesenbergr FC, Kriegmair M. Photodynamic effects of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin on human bladder carcinoma cells in vitro. *Eur J Cancer* 1996 Feb;32A(2):328-34. 1996;32A(2):328-34.

152. B. Olzowy CSH, S. Stocker, K. Bise, H.J. Reulen, W. Stummer. Photoirradiation therapy of experimental malignant glioma with 5-aminolevulinic acid. *Journal of Neurosurgery*. 2002;97:970-6.
153. Anderson I, Naylor T, McKinlay J, Sivakumar G. Intra-operative acidosis during 5-aminolevulinic acid assisted glioma resection. *BMJ Case Rep*. 2015;2015.
154. Henry Hirschberg C-HS, Bruce J. Tromberg, Alvin T. Yeh and Steen J. Madsen. Enhanced cytotoxic effects of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy by concurrent hyperthermia in glioma spheroids. *Journal of Neuro-Oncology*. 2004;70:289–99.
155. Webber J KD, Fromm D. Plasma levels of protoporphyrin IX in humans after oral administration of 5-aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol B*. 1997;37(1-2):151-3.
156. Y. Kajimoto TK, S. Miyatake, T. Ichioka, M. Miyashita, H. Tanaka, et al. Use of 5-aminolevulinic acid in fluorescence-guided resection of meningioma with high risk of recurrence. *Journal of Neurosurgery*. 2007;106(6).
157. El-Khatib M, Tepe C, Senger B, Dibue-Adjei M, Riemenschneider MJ, Stummer W, 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):9936-48.
158. Mark A. Rosenthal BK, John S. Hill, Denis J. Morgan, Roger L. Nation, Stanley S. Stylli, Russell L. Bassler, Shannon Uren, Howard Geldard, Michael D. Green, Stephen B. Kahl, and Andrew H. Kaye. Phase I and Pharmacokinetic Study of Photodynamic Therapy for High-Grade Gliomas Using a Novel Boronated Porphyrin. *J Clin Oncol*. 2001;19:519-24.
159. Liang X, Kundu P, Finlay J, Goodwin M, Zhu TC. Maximizing fluence rate and field uniformity of light blanket for intraoperative PDT. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng*. 2012;8210.
160. Glennie DL, Farrell TJ, Hayward JE, Patterson MS. Integrating spheres for improved skin photodynamic therapy. *J Biomed Opt*. 2010;15(5):058001.

161. Sakai K, Hongo K, Tanaka Y, Nakayama J. Analysis of immunohistochemical expression of p53 and the proliferation marker Ki-67 antigen in skull base chordomas: relationships between their expression and prognosis. *Brain Tumor Pathol.* 2007;24(2):57-62.
162. Kim JK, Byun MR, Maeng CH, Kim YR, Choi JW. Selective Targeting of Cancer Stem Cells (CSCs) Based on Photodynamic Therapy (PDT) Penetration Depth Inhibits Colon Polyp Formation in Mice. *Cancers (Basel).* 2020;12(1).
163. Henry Hirschberg 1 DRS, Even Angell-Petersen, Qian Peng, Bruce Tromberg, Chung-Ho Sun, Signe Spetalen, Steen Madsen Repetitive photodynamic therapy of malignant brain tumors. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2006;25(1-2):261-79.
164. Stupp R, Wong ET, Kanner AA, Steinberg D, Engelhard H, Heidecke V, et al. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer.* 2012;48(14):2192-202.
165. OSSAMA AL-MEFTV JEK, ANUPAM ROUTRl, AND, SMITH RR. The long-term side effects of radiation therapy for benign brain tumors in adults. *J Neurosurg.* 1990;73:502-12.
166. Anzengruber F, Avci P, de Freitas LF, Hamblin MR. T-cell mediated anti-tumor immunity after photodynamic therapy: why does it not always work and how can we improve it? *Photochem Photobiol Sci.* 2015;14(8):1492-509.
167. Li F, Cheng Y, Lu J, Hu R, Wan Q, Feng H. Photodynamic therapy boosts anti-glioma immunity in mice: a dependence on the activities of T cells and complement C3. *J Cell Biochem.* 2011;112(10):3035-43.
168. Etminan N, Peters C, Lakbir D, Bunemann E, Borger V, Sabel MC, 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):961-9.

169. Li W, Yang J, Luo L, Jiang M, Qin B, Yin H, et al. Targeting photodynamic and photothermal therapy to the endoplasmic reticulum enhances immunogenic cancer cell death. *Nat Commun.* 2019;10(1):3349.
170. Hirschberg H, Berg K, Peng Q. Photodynamic therapy mediated immune therapy of brain tumors. *Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2018;5.
171. Etminan N, Peters C, Ficnar J, Anlasik S, Bunemann E, Slotty PJ, et al. Modulation of migratory activity and invasiveness of human glioma spheroids following 5-aminolevulinic acid-based photodynamic treatment. Laboratory investigation. *J Neurosurg.* 2011;115(2):281-8.
172. Ito S, Rachinger W, Stepp H, Reulen HJ, Stummer W. Oedema formation in experimental photo-irradiation therapy of brain tumours using 5-ALA. *Acta Neurochir (Wien).* 2005;147(1):57-65; discussion
173. JOHN S. HILL SBK, ANDREW H. KAYE, STANLEY S. STYLLI, MYOUNG-SEO MICHAEL F. GONZALES, NICHOLAS J. VARDAXIS1, AND CHRISTOPHER I. JOHNSON Selective tumoruptake of a boronated porphyrin in an animal model of cerebral glioma. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89:1785-9.
174. Hefti M, Albert I, Luginbuehl V. Phenytoin reduces 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in malignant glioma cells. *J Neurooncol.* 2012;108(3):443-50.
175. Semyachkina-Glushkovskaya O, Kurths J, Borisova E, Sokolovski S, Mantareva V, Angelov I, et al. Photodynamic opening of blood-brain barrier. *Biomed Opt Express.* 2017;8(11):5040-8.
176. Califf RM. Oral Fluoroquinolones. *J Am Coll Cardiol.* 2019;74(11):1451-3.
177. Guzzardi DG, Teng G, Kang S, Geeraert PJ, Pattar SS, Svystonyuk DA, et al. Induction of human aortic myofibroblast-mediated extracellular matrix dysregulation: A potential mechanism of fluoroquinolone-associated aortopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2019;157(1):109-19 e2.
178. Rotehandbrief. Wichtige Arzneimittelinformation

Systemisch und inhalativ angewendete Chinolon- und Fluorchinolon-Antibiotika: Risiko von die Lebensqualität beeinträchtigenden, lang anhaltenden und möglicherweise irreversiblen Nebenwirkungen - Anwendungsbeschränkungen. Schwarzeck-Verlag GmbH. 2019.

179. Casali PG, Bielack S, Abecassis N, Aro HT, Bauer S, Biagini R, et al. Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2018;29(Suppl 4):iv79-iv95.
180. Bennett AC BC, Witherspoon BJ, Knopf KB. An evaluation of reports of ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin-association neuropsychiatric toxicities, long-term disability, and aortic aneurysms/dissections disseminated by the Food and Drug Administration and the European Medicines Agency. *Expert Opin Drug Saf.* 2019;18(11):1055-63.
181. Marc LeBel PD. Ciprofloxacin: chemistry, mechanism of action, resistance, antimicrobial spectrum, pharmacokinetics, clinical trials, and adverse reactions. *Pharmacotherapy.* 1988;8(1):3-33.
182. Die Rektorin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Stabstelle Juristariat. Amtliche Bekanntmachungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Nr. 11/2017, 13. März 2017. Seite 6.

4.2 Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----------------|---|----|
| (Tab. 1) | Zusammenfassende Übersicht häufigster Symptome in Abhängigkeit von der Lokalisation modifiziert nach Stacchiotti S, Sommer J. Building a global consensus approach to chordoma: a position paper from the medical and patient community. The Lancet Oncology. 2015;16(2):e71-e83. | 7 |
| (Tab. 2) | Toxizitätskriterien der Radiation Therapy Oncology Group und der European Organization for Research and Treatment of Cancer EROS study: Evaluation between high-dose-rate and low-dose-rate vaginal interventional radiotherapy (brachytherapy) in terms of overall survival and rate of stenosis, August 2018, Journal of Contemporary Brachytherapy 10(4):315-320 DOI:10.5114/jcb.2018.77953 | 17 |

4.3 Abbildungsverzeichnis

- (Abb. 1) **Schematische Darstellung der Embryonalentwicklung des Nervensystems** Schünke M, Schulte E, Schumacher U et al., Hrsg. Prometheus LernAtlas - Kopf, Hals und Neuroanatomie. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2009. doi:10.1055/b-004-134447 S. 2622
- (Abb. 2) **Anatomische Darstellung eines clivalen Chordoms** durchgeführt: Universitätsklinikum Düsseldorf9
- (Abb. 3) **Schematische Darstellung des Wirkungsprinzips der Photodynamischen Therapie sowie der Entwicklung von Fluoreszenz** 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*“ 2012.20
- (Abb. 4) **Schematische Darstellung der Hämoglobin-Biosynthese im Mitochondrium und Zytosol** Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. Masahiro Ishizuka et al., *International Immunopharmacology* 11 (2011) 358–365, 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.22
- (Abb. 5) **Entstehung eines Fließgleichgewichts während einer enzymkatalysierten Reaktion** Peter C. Heinrich, M.M.I., Lutz Graeve *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Lehrbuch. Vol. 9. 2014. p.11143

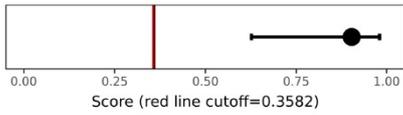
5. Anhang

850-k Methylierungsassays der Zelllinien U-CH2, U-CH2B und U-CH14;

Zellen aufbereitet durch Dr. med. Christiane Knobbe-Thomsen, Untersuchung durchgeführt an der Heidelberger University Hospital, Molecular Neuropathology.

MGMT promotor methylation (MGMT-STP27)

MGMT promotor status prediction



| Status | Estimated | CI lower | CI upper |
|-----------|-----------|----------|----------|
| methyated | 0.90253 | 0.62693 | 0.98078 |

(see Bady et al, J Mol Diagn 2016; 18(3):350-61)

Disclaimer

Classification using methylation profiling is a research tool under development, it is not verified and has not been clinically validated. Implementation of the results in a clinical setting is in the sole responsibility of the treating physician. Intended for non-commercial use only.

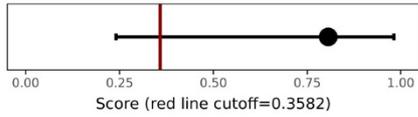
Run information

Report: idat_reportBrain_v11b4_sample Version 2.0
Task version:

| Task | Version |
|------------------------|---------|
| idat_qc | 2.0 |
| idat_predictBrain | 2.1 |
| idat_rs_gender | 2.0 |
| idat_predictMGMT | 2.0 |
| idat_cnvp | 3.0 |
| idat_reportBrain_v11b4 | 2.0 |

MGMT promotor methylation (MGMT-STP27)

MGMT promotor status prediction



| Status | Estimated | CI lower | CI upper |
|------------|-----------|----------|----------|
| methylated | 0.8057 | 0.24066 | 0.9819 |

(see Bady et al, J Mol Diagn 2016; 18(3):350-61)

Disclaimer

Classification using methylation profiling is a research tool under development, it is not verified and has not been clinically validated. Implementation of the results in a clinical setting is in the sole responsibility of the treating physician. Intended for non-commercial use only.

Run information

Report: idat_reportBrain_v11b4_sample Version 2.0

Task version:

| Task | Version |
|------------------------|---------|
| idat_qc | 2.0 |
| idat_predictBrain | 2.1 |
| idat_rs_gender | 2.0 |
| idat_predictMGMT | 2.0 |
| idat_cnvp | 3.0 |
| idat_reportBrain_v11b4 | 2.0 |

Methylation profiling report

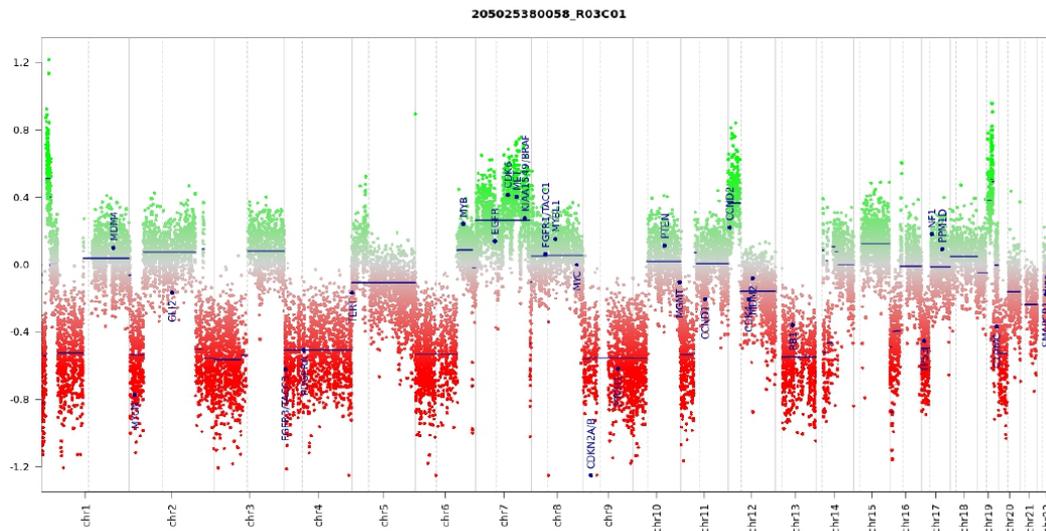
Supplier information

Sample identifier: **UCH-14**
 Sentrix ID: **205025380058_R03C01**
 Material type: **FFPE DNA**
 Gender: **NA**
 Supplier diagnosis: **-**

Class descriptions

Methylation class chordoma: The methylation class "chordoma" exclusively comprises tumors with the histological diagnosis chordoma. The most frequent locations are suprasellar and around the clivus. Median age is 37 years (range 14 to 71). Additional characteristic molecular features of this class are not known to date. Numeric chromosomal alteration are frequent, with over 50% of cases showing gain of chromosome 7 and/or loss of Chromosome 3p, 13 and 14.

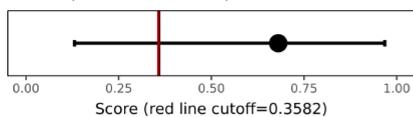
Copy number variation profile



Depiction of chromosome 1 to 22 (and XY if automatic prediction was successful). Gains/amplifications represent positive, losses negative deviations from the baseline. 29 brain tumor relevant gene regions are highlighted for easier assessment. (see Hovestadt & Zapatka, <http://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/html/conumee.html>)

MGMT promotor methylation (MGMT-STP27)

MGMT promotor status prediction



| Status | Estimated | CI lower | CI upper |
|-------------|-----------|----------|----------|
| methylyated | 0.68037 | 0.13082 | 0.96785 |

(see Bady et al, J Mol Diagn 2016; 18(3):350-61)

Disclaimer

Classification using methylation profiling is a research tool under development, it is not verified and has not been clinically validated. Implementation of the results in a clinical setting is in the sole responsibility of the treating physician. Intended for non-commercial use only.

Run information

Report: idat_reportBrain_v11b4_sample Version 2.0

Task version:

| Task | Version |
|------------------------|---------|
| idat_qc | 2.0 |
| idat_predictBrain | 2.1 |
| idat_rs_gender | 2.0 |
| idat_predictMGMT | 2.0 |
| idat_cnv | 3.0 |
| idat_reportBrain_v11b4 | 2.0 |

6. Danksagung

In jede hohe Freude mischt sich eine Empfindung der Dankbarkeit.

Marie von Ebner-Eschenbach, 1830-1916.

All jenen, die mich auf diesem spannenden und für mich besonderen Weg begleitet haben, möchte ich aufrichtig danken.

Ganz besonders danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. J.F. Cornelius. Er ermöglichte mir durch diese Arbeit, den Grundbaustein für eine wissenschaftlich geprägte Laufbahn legen zu dürfen. Seine stetige Betreuung, Unterstützung und Weitergabe wertvoller Hinweise werde ich stets zu schätzen wissen.

Danken möchte ich mich herzlich auch bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. H.-J. Steiger für das entgegengebrachte Vertrauen sowie Ermöglichen, in seiner Klinik promovieren zu dürfen. Zu danken habe ich insbesondere auch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. D. Hänggi für das Ermöglichen der Weiterführung und des Abschlusses dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. rer. nat. R. Sorg aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika möchte ich ebenfalls besonderen Dank aussprechen. Als Co-Betreuer stand er mir zu jeder Zeit mit wichtigen Hinweisen und Ratschlägen aus seiner langjährigen Erfahrung zur Seite.

Diese Arbeit wäre niemals möglich gewesen ohne Frau Brigitte Senger, die bewundernswerte Führung des Neurochirurgischen Labors der Universitätsklinik Düsseldorf. Ihre Leidenschaft für die Forschung, für das wissenschaftliche Arbeiten und stringente Denken, sowie Ihre stetigen klaren Linien werden für mich persönlich immer „gute wissenschaftliche Praxis“ definieren. Meine Dankbarkeit Ihr gegenüber wird niemals in Worte zu fassen sein.

Meinen Schwestern Lane, Sheyda und Helin danke ich für das regelmäßig zeitliche Erinnern daran, wann die Doktorarbeit denn fertig sein wird. Ihr seid meine stetige Motivation. Meinen Eltern danke ich von Herzen dafür, mir ein Leben ermöglicht zu haben, in dem ich tagtäglich meine Träume und Ziele verfolgen kann.