

**Aus der Universitätsklinik für Neurochirurgie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Tatagiba**

**Charakterisierung der Photosensibilisatoren
Hypericin und 5-Aminolävulinsäure
für die Visualisierung von Medulloblastomen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Christian Scheidle
aus
Balingen**

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. R. Ritz

2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. A. Bornemann

1. Einleitung	1
1.1 Die Krankheit Krebs	1
1.2 Medulloblastome	4
1.2.1 Epidemiologie	4
1.2.2 Ätiologie	4
1.2.3 Ursprung	4
1.2.4 Histologie	5
1.2.5 Lokalisation, Wachstum und Metastasen.....	6
1.2.6 Stadieneinteilung und prognostische Faktoren	7
1.2.7 Klinik und Symptome	8
1.2.8 Diagnostik.....	8
1.2.9 Therapie.....	9
1.2.10 Besonderheiten.....	12
1.3 Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie	12
1.3.1 Entstehung von Fluoreszenz- und Phosphoreszenzstrahlung	12
1.3.2 Stokes shift	14
1.3.3 Quencher	15
1.3.4 Photobleaching	15
1.3.5 Fluoreszenzdiagnostik	17
1.3.6 Autofluoreszenz	18
1.3.7 Photosensibilisatoren.....	19
1.4 Der Photosensibilisator Hypericin.....	22
1.4.1 Eigenschaften von Hypericin	22
1.4.2 Inhaltsstoffe und deren pharmakologische Aktivität.....	23
1.4.2.1 Naphthodianthrone.....	23
1.4.2.2 Flavonoide.....	24
1.4.2.3 Phloroglucinderivate	24
1.4.2.4 Procyanide	25
1.4.2.5 Anthrachinonderivate und Xanthome	25
1.4.3 Geschichtliches.....	25
1.4.4 Klinische Anwendungen von Johanniskraut.....	26
1.4.4.1 Antineoplastische Eigenschaft von Hypericin.....	27
1.4.4.1.1 Inhibition der Proteinkinase C	27
1.4.4.1.2 Inhibition der Tyrosinkinase	28
1.4.4.1.3 Induktion von Apoptose und Nekrose	29
1.4.4.2 Antivirale und antibakterielle Potenz	30
1.4.4.3 Antidepressive Eigenschaften von Johanniskraut	30
1.4.5 Interaktionen mit anderen Pharmaka	31
1.5 Der Photosensibilisator 5-ALA.....	32
1.5.1 Eigenschaften von 5-ALA	32
1.5.2 5-ALA als Zwischenprodukt der Hämbiosynthese	32
1.5.3 Akkumulation von Protoporphyrin IX.....	34
1.5.4 Aufnahme, Abbau und Ausscheidung von 5-ALA	35

1.5.5 Anregung und Fluoreszenz von 5-ALA induziertem PpIX.....	36
1.5.6 Klinische Anwendung von 5-ALA induziertem PpIX.....	36
1.5.7 Endogene Porphyrine und Porphyrinerkrankungen	38
1.6 Fragestellungen der vorliegenden Dissertation	40
2. Material und Methoden	41
2.1 Zellkultur.....	41
2.1.1 Zelllinien.....	41
2.1.2 Zellkulturbedingungen.....	41
2.1.3 Kultivieren der Zellen	42
2.1.4 Zellzahlbestimmung und Wachstumskurven.....	42
2.1.5 Einfrieren der Zellen.....	43
2.2 5-ALA-Ansatz	43
2.3 Hypericinansatz.....	44
2.4 Versuchsanordnungen, Durchführungen und Auswertungen.....	46
2.4.1 Aufnahmekinetik	47
2.4.2 Konzentrationsreihen	47
2.4.3 Zeitreihen.....	48
2.4.4 Durchführung und Auswertung der Fluoreszenzmikroskopieversuche	48
2.4.5 Durchführung und Auswertung der FACS-Versuche	49
2.5 Fluoreszenzmikroskopie.....	50
2.6 FACS-Analyse.....	53
2.6.1 Prinzip.....	53
2.6.2 Lichtdetektion.....	55
2.7 Statistische Auswertung	55
2.7.1 Konzentrationsreihen der Hypericinversuche	56
2.7.2 Zeitreihen der Hypericinversuche	56
2.7.3 Vergleich von Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse	57
3. Ergebnisse	59
3.1 Wachstumskurven der Medulloblastomzelllinie D283 Med.....	59
3.2 5-ALA	60
3.2.1 Fluoreszenzmikroskopie	60
3.2.1.1 Konzentrationsreihen	60
3.2.1.2 Zeitreihen	62
3.2.2 FACS-Analyse	63
3.2.2.1 Konzentrationsreihen	63
3.2.2.2 Zeitreihen	64
3.3 Hypericin	65

3.3.1 Aufnahmekinetik und zelluläre Transportmechanismen.....	65
3.3.2 Fluoreszenzmikroskopie	67
3.3.2.1 Konzentrationsreihen	67
3.3.2.2 Vergleich der Konzentrationsreihen	70
3.3.2.3 Zeitreihen	71
3.3.2.3.1 Medulloblastomzelllinie D283 Med	72
3.3.2.3.2 Medulloblastomzelllinie D341 Med	73
3.3.2.3.3 Medulloblastomzelllinie Daoy.....	74
3.3.3 FACS	75
3.3.3.1 Konzentrationsreihen	75
3.3.3.2 Zeitreihen	80
3.4 Korrelationsvergleich von Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse	85
3.4.1 Konzentrationsreihen	85
3.4.2 Zeitreihen.....	89
4. Diskussion	92
5. Zusammenfassung.....	104
6. Anhang	107
6.1 Abbildungsverzeichnis.....	107
6.2 Tabellenverzeichnis.....	107
6.3 Literaturverzeichnis	107
6.4 Danksagung	115
6.5 Lebenslauf.....	117

Verwendete Abkürzungen

μl	Mikroliter
μM	Mikromol
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
BPD	Benzoporphyrinderivate
Ca^{2+}	Calcium
CYP3A4	Zytochrom P450 3A4
DHE	Dihämatoporphyrinäther
DMSO	Dimethylsulfoxid ($\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$)
EGF-Rezeptor	epidermal growth factor-Rezeptor
et al.	und andere
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	foetal calf serum
FI	Fluoreszenzintensität
FM	Fluoreszenzmikroskopie
g/mol	Gramm pro Mol
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
h	Stunde bzw. Stunden
HDL	High Density Lipoprotein
HpD	Hämatoporphyrinderivate
LDL	Low Density Lipoprotein
MAD	median absolute deviation; Median der absoluten Abweichung des Medians
Mg^{2+}	Magnesium
mM	Millimol
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
nm	Nanometer
PBS	Phosphate buffered saline (gepufferte Salzlösung)

Abkürzungen

PDT	Photodynamische Therapie
pH-Wert	potentia Hydrogenii-Wert ($\text{pH} = -\lg(c[\text{H}_3\text{O}^+])$)
PKC	Proteinkinase C
PNET	primitiver neuroektodermaler Tumor
PpIX	Protoporphyrin IX
PTCH Gen	patched homolog Gen
Succinyl-CoA	Succinyl-Coenzym A
w.E.	willkürliche Einheiten
WHO	World Health Organization
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Die Krankheit Krebs

Kaum eine andere Krankheit bringt die heutige Forschung an die Leistungsgrenzen wie die Krankheit Krebs. Jährlich werden in Europa über 4 Millionen neue Krebserkrankungen diagnostiziert. Bösartige Tumoren sind nach Erkrankungen des Herzkreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland, ungefähr jeder vierte Bundesbürger stirbt daran. Trotz enormer Fortschritte auf dem Gebiet der Prävention, Diagnostik und Therapie liegt die 5-Jahresüberlebensrate nach Erstdiagnose bei über 50 % [1].

Gehirntumore gehören zu den selteneren Tumorarten. Jährlich erkranken ungefähr 7 von 100 000 Deutschen an einem primären Hirntumor, wobei Frauen häufiger als Männer betroffen sind [2]. Bei Männern haben sie einen Anteil von 3,2 %, bei Frauen von 3,4 % in der Tumorstatistik. Ein rascher Anstieg der Inzidenz und Mortalität ist bei beiden Geschlechtern seit Anfang der 70iger Jahre zu verzeichnen. Es sind vor allem die über 65jährigen betroffen. Wegen des relativ geringen prozentualen Anteils an allen Tumoren gehören die Hirntumoren bei den Männern nicht zu den 10 häufigsten Tumortodesursachen, bei den Frauen liegen sie an 7. Stelle.

1. Einleitung

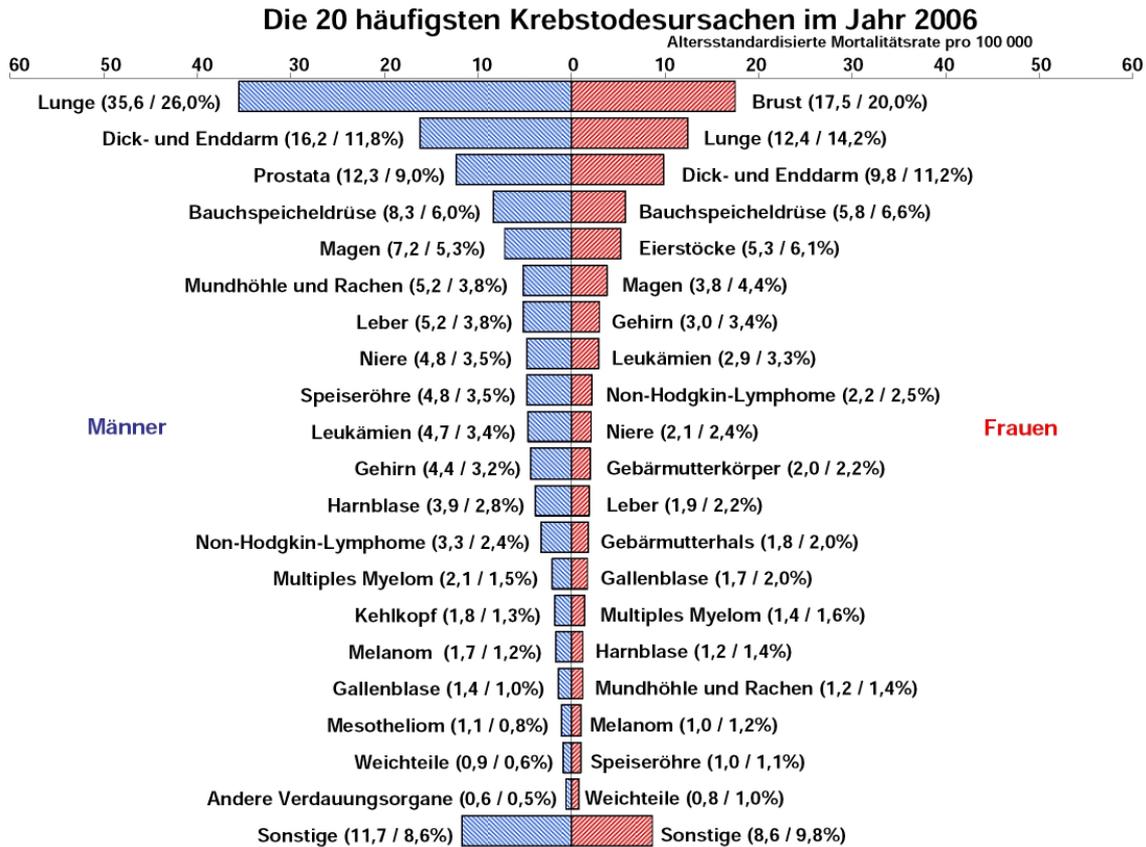


Abbildung 1: Krebssterbestatistik in der Bundesrepublik Deutschland 2006

Sehr viel häufiger als primäre Hirntumoren sind Hirnmetastasen. Etwa 30 000 Tumorpatienten entwickeln eine Hirnmetastase. Am häufigsten sind Metastasen des Bronchialkarzinoms (40-60 %), Mammakarzinoms (20 %), malignen Melanoms (10-15 %), Nierenzellkarzinoms (5 %) und gastrointestinalen Karzinoms (5 %) [3].

Primäre Hirntumore umfassen eine Reihe unterschiedlicher Tumortypen. Am häufigsten sind Gliome. Problematisch verhält es sich auch mit den gutartigen Gehirntumoren. Durch die geringe Ausweichmöglichkeit und den sehr begrenzten Platz des Gehirns im knöchernen Schädel können auch gutartige, gewebesverdrängende Tumoren eine schlechte Prognose besitzen.

Anders als bei Erwachsenen verhält es sich bei Kindern mit primären Hirntumoren. Nach Leukämien haben Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) die zweithöchste Inzidenzrate von 2,9 pro 100 000 pro Jahr bei Kindern unter 15 Jahren und stellen die zweithäufigste Krebstodesursache dar. Sie machen 22,1 % aller kindlichen Tumoren aus, von

1. Einleitung

denen 9,6 % Astrozytome, 4,9 % primitiver neuroektodermaler Tumoren (PNET) und 2,1 % Ependymome sind.

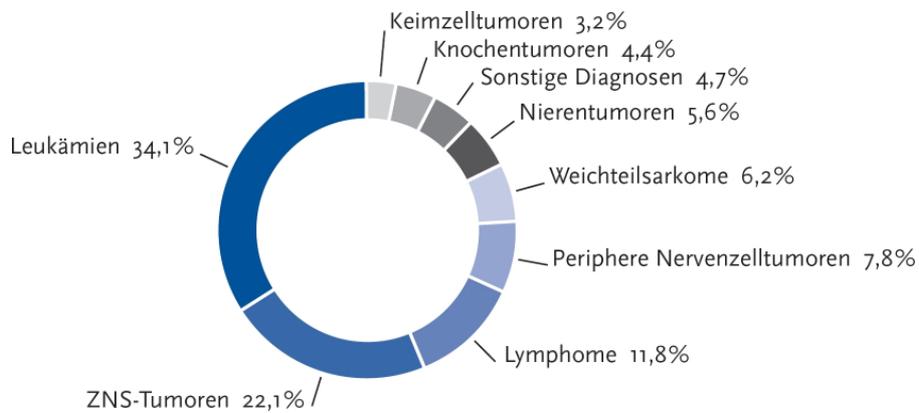


Abbildung 2: Krebs bei Kindern, ermittelt aus den Jahren 1997-2006

Durch neue Therapieansätze haben sich die Überlebensraten in den letzten Dekaden stark verbessert. Nach 5 Jahren leben noch 73 % der an einem ZNS-Tumor erkrankten Kinder [4,5].

Krebserkrankungen	Inzidenz *	Überlebensraten in Prozent		
		nach 3 Jahren	nach 5 Jahren	nach 10 Jahren
akute lymphatische Leukämie	3,9	90	87	83
akute nicht-lymphatische Leukämie	0,7	62	59	57
ZNS-Tumoren	2,9	76	73	67
Non-Hodgkin-Lymphom	0,8	88	87	86
Morbus Hodgkin	0,7	97	96	95
Neuroblastom	1,3	80	75	72
Nephroblastom	0,9	91	90	89
Keimzelltumoren	0,5	95	93	91
Knochtumoren	0,6	78	70	65
Rhabdomyosarkom	0,5	71	67	64

* bezogen auf 100.000 Kinder unter 15 Jahren, altersstandardisiert auf die westdeutsche Bevölkerung 1987, Kinder diagnostiziert 1994–2003

Abbildung 3: Inzidenz und Überlebensraten bei Krebserkrankungen von Kindern

Ein zu beobachtender Inzidenzanstieg bei ZNS-Tumoren sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern wird mit Veränderung von Umweltfaktoren in Zusammenhang gebracht. Es werden Einflüsse von elektromagnetischen

Feldern, ionisierender Strahlung oder Pestiziden kontrovers diskutiert. Auch die Ernährung oder genetische Aspekte könnten dabei eine Rolle spielen [6].

1.2 Medulloblastome

1.2.1 Epidemiologie

Der primitiv neuroektodermale Tumor ist einer der häufigsten malignen Hirntumoren im Kindesalter. Zu 85 % geht dieser Tumor vom Kleinhirn aus und wird dann von der World Health Organization (WHO) als Medulloblastom bezeichnet. Das Medulloblastom ist somit der häufigste bösartige Tumor (WHO-Grad IV) im Kindes- und Jugendalter mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 7. und 12. Lebensjahr [7]. In einzelnen Fällen tritt er auch bei jungen Erwachsenen auf, bei älteren hingegen ist er relativ selten (ca. 4,2 %) zu beobachten [8]. Jungen haben eine Prädisposition von 1,5:1 gegenüber Mädchen.

1.2.2 Ätiologie

Auf eine genetische Prädisposition bei der Entstehung von neuronalen Tumoren deutet die familiäre Häufung hin. Jedoch müssen zur eindeutigen Belegung dieser Annahme noch weitere Untersuchungen folgen [9].

Des Weiteren ist auch nicht gesichert, ob exogene Faktoren, wie z.B. chemische Substanzen, einen Risikofaktor für die Entstehung von Hirntumoren darstellen.

1.2.3 Ursprung

Ursprünglich nahm man an, dass die Medulloblastomzellen von Medulloblasten stammen. Dies sind undifferenzierte, proliferierende embryonale Zellen, welche sich potentiell in Spongioblasten oder Neuroblasten differenzieren können [10]. Danach herrschte 75 Jahre Konfusion.

Zur Zeit sind drei Hypothesen über den Ursprung von Medulloblastomen aktuell [11]:

- a) Ursprung der Zellen von der äußeren Körnerzellschicht des Zerebellums, welche normalerweise nur embryonal angelegt sind. In letzter Zeit ist diese Theorie dadurch gestützt, dass Medulloblastome Mutationen im patched homolog (PTCH) Gen aufweisen können, einem Rezeptor für sonic hedgehog, das die Proliferation von Zellen der äußeren Körnerzellschicht kontrolliert [12,13].
- b) Ursprung von subependymalen Matrixzellen (PNET-Hypothese), die überall im embryonalen ZNS, einschließlich des IV. Ventrikels, zu finden sind [14,15]. Fraglich an dieser Hypothese ist aber, dass PNET und Medulloblastome unterschiedliche genetische Veränderungen zeigen [16].
- c) Ursprung von verschiedenen Zelltypen. Bei den desmoplastischen Varianten des Medulloblastoms scheint es mittlerweile fast gesichert zu sein, dass diese Zellen von der äußeren Körnerzellschicht abstammen. Hingegen scheinen klassische Medulloblastome eher von der ventrikulären Matrixzone abzustammen [11].

1.2.4 Histologie

Wie schon erwähnt, zählen Medulloblastome zu den PNET und sind schnell wachsende, embryonale, hochmaligne, undifferenzierte Tumoren.

Laut WHO Klassifikation 2007 werden Medulloblastome eingeteilt in die klassische Form, die vom Kleinhirnwurm ausgeht, die desmoplastische, großzellige, anaplastische Variante und das Medulloblastom mit extensiver Nodularität. Das Medullomyoblastom und das melanotische Medulloblastom werden in dieser Klassifikation nicht mehr als eigenständige Entitäten aufgeführt [17]. In 50 % der Fälle ist es möglich, eine Differenzierung entlang neuronaler und selten glialer Linien nachzuweisen.

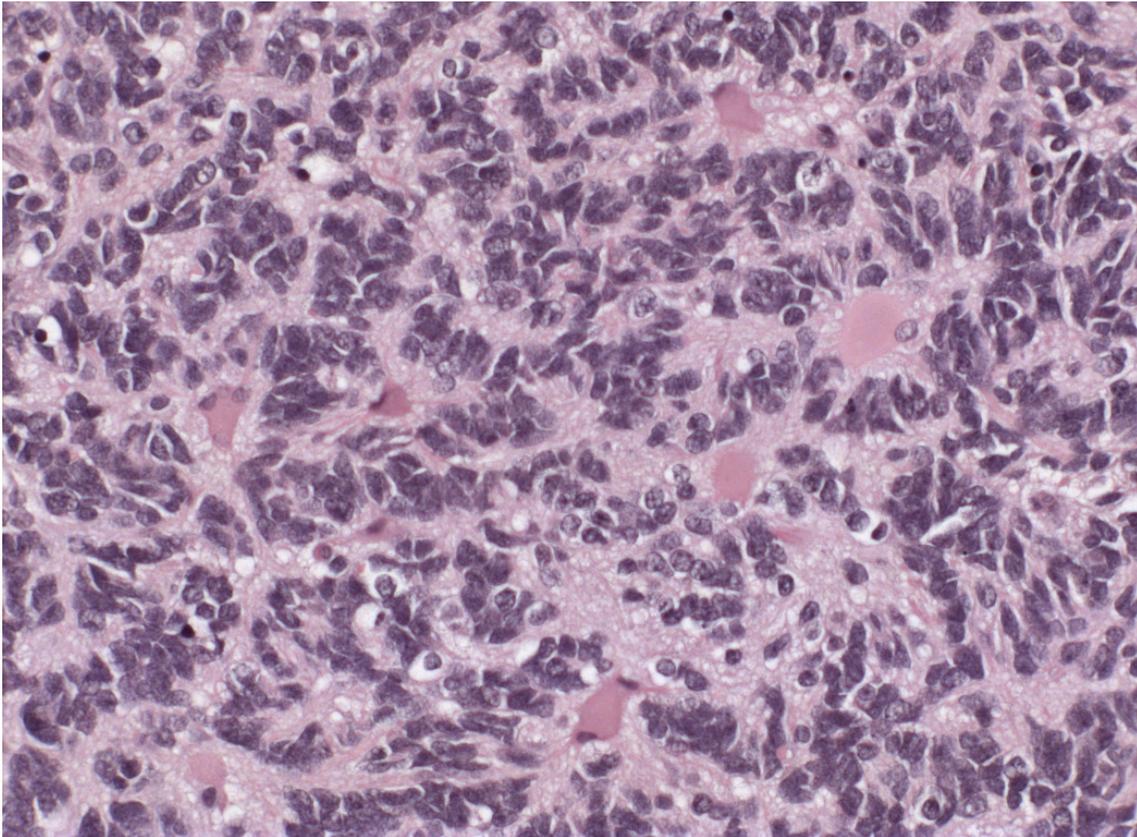


Abbildung 4: Hämatoxylin-Eosin Färbung eines Medulloblastomtumors WHO Grad IV in 20 facher Vergrößerung. Es sind zahlreiche Homer-Wright-Rosetten (kernfreies Zentrum, umgeben von Kernen) als Zeichen primitiver, aber doch typischer neuronaler Differenzierung zu sehen.

1.2.5 Lokalisation, Wachstum und Metastasen

Am häufigsten ist das Medulloblastom im Velum medullare inferior des Kleinhirns lokalisiert. Von dort aus kann es den Kleinhirnwurm durchsetzen und sich in alle Richtungen ausbreiten. Des Weiteren sind Medulloblastome häufig im IV. Ventrikel lokalisiert und können diesen vollständig ausfüllen.

Es wächst entweder lokal infiltrierend, zum Beispiel in den unteren Hirnstamm, oder aber per Aussaat über die Liquorwege. Medulloblastome haben ein schnelles Wachstum und lösen durch die Blockade des 4. Ventrikels und des Aquädukts relativ rasch einen Verschlusshydrozephalus aus [18]. Durch die schnelle Ausbreitung im Liquorraum kann man in Abhängigkeit vom Alter bereits bei bis zu einem Drittel der Erkrankten solide ZNS-Metastasen und bei einem Viertel maligne Zellen im lumbal gewonnenen Liquor nachweisen. Des

Weiteren sind Metastasen sehr häufig subarachnoidal und im Ventrikelsystem zu finden.

Metastasen außerhalb des ZNS wie Lunge, Knochen, Knochenmark und Lymphknoten werden nur in etwa 5 % der Fälle beobachtet [19].

1.2.6 Stadieneinteilung und prognostische Faktoren

Die Stadieneinteilung des Medulloblastoms nach Chang wird noch regelmäßig eingesetzt, wobei es mit den Tumorstadien T1-T4 zu einer schlechten Einschätzung der Prognose kommen kann. Dies beruht auf den heutigen modernen und wirksamen Therapien. Ein geeigneter prognostischer Faktor ist hingegen der Nachweis eines Resttumors ein oder zwei Tage nach der Operation mittels Magnetresonanztomographie (MRT). Bei Nachweis eines Resttumors sind die Überlebenschancen nur halb so hoch wie beim Patienten ohne Resttumor. Weiteren Einfluss auf eine ungünstige Prognose haben Metastasen, ein niedriges Alter der Kinder und das Nichtansprechen auf Chemotherapie [20].

Klassifikation	Tumorgröße/-ausdehnung
T1	Tumordurchmesser < 3 cm und begrenzt auf Kleinhirnwurm, Dach des 4.Ventrikels (Hirnkammer) oder Kleinhirnhemisphäre
T2	Tumordurchmesser ≥ 3 cm; dringt in eine Nachbarstruktur (z.B. Kleinhirnschenkel) ein oder füllt den 4. Ventrikel teilweise aus
T3a	Tumor dringt in 2 Nachbarstrukturen ein oder füllt den 4. Ventrikel vollständig aus mit Ausdehnung zum Aquädukt, Foramen Magendii oder Foramen Luschkae und Hydrocephalus internus
T3b	Tumor füllt den 4. Ventrikel vollständig aus und infiltriert den Hirnstamm/Boden des 4. Ventrikels
T4	Ausdehnung jenseits des Aquädukts bis ins Mittelhirn oder in den 3. Ventrikel oder Ausdehnung bis zum oberen Halsmark
M0	Kein Anhalt für Metastasen
M1	Mikroskopischer Tumorzellnachweis im Liquor (Lumbalpunktion)
M2	Makroskopische Metastasen im zerebellaren und/oder zerebralen Subarachnoidalraum und/oder in den supratentoriellen Ventrikeln
M3	Makroskopische Metastasen im spinalen Subarachnoidalraum
M4	Metastasen außerhalb des Zentralnervensystems

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Medulloblastoms nach Chang

1.2.7 Klinik und Symptome

Häufig manifestiert sich die Erkrankung durch einen Hydrocephalus occlusus mit erhöhtem Hirndruck, der sich in Kopfschmerzen, Erbrechen, Vigilanzstörungen, Stauungspapillen und Doppelbildern äußert. Hinzu kommen Hirnnervenausfälle und cerebelläre Defizite wie Rumpfataxie, Nystagmus und Intentionstremor. Des Weiteren ist bei den Erkrankten anamnestisch sehr häufig eine Nackensteife, ausgelöst durch die infratentorielle Drucksteigerung, zu beobachten. Bei Fortschreiten der Erkrankung kann es zu einer Kompression der Medulla oblongata und einer Herniation des Kleinhirns kommen [21]. Bei Kindern mit nicht verschlossenen Schädelnähten kann es anstelle eines Hydrozephalus zu einer raschen Zunahme des Kopfumfanges kommen. Die Hirndruckzeichen treten daher bei diesen Kindern relativ spät auf [18]. Jedoch ist keines dieser Zeichen pathognomonisch für ein Medulloblastom.

1.2.8 Diagnostik

Nach ausführlicher Anamnese und klinischer Untersuchung (neurologisch, ophthalmologisch) kann eine Vielzahl bildgebender diagnostischer Verfahren eingesetzt werden. Die MRT ohne und mit Gadolinium ist das Verfahren der Wahl. Mittels der MRT kann eine gute Aussage über die Ausdehnung und den Bezug zu den benachbarten Hirnstrukturen und Gefäßen sowie zu intratumoralen Komponenten wie Zysten und Einblutungen gemacht werden. Verkalkungen sind selten und eine Unterscheidung zum Ependymom ist dann schwierig. In der MRT stellt sich in der T1-Gewichtung ein signalarmer, in der T2-Gewichtung ein signalreicher Tumor dar. Ein deutlicher Anstieg des Signals ist nach Kontrastmittelgabe (Gadolinium) zu sehen [18].

Da die Tumorausbreitung über den Liquor erfolgt, sind eine MRT der gesamten Neuroachse und eine Liquorpunktion erforderlich. Dabei finden sich in der Liquorzytologie häufig Tumorzellen.

Des Weiteren kann ergänzend eine Skelettszintigraphie bei Knochenschmerzen oder eine Knochenmarksuntersuchung bei Anämie oder Thrombozytopenie indiziert sein.

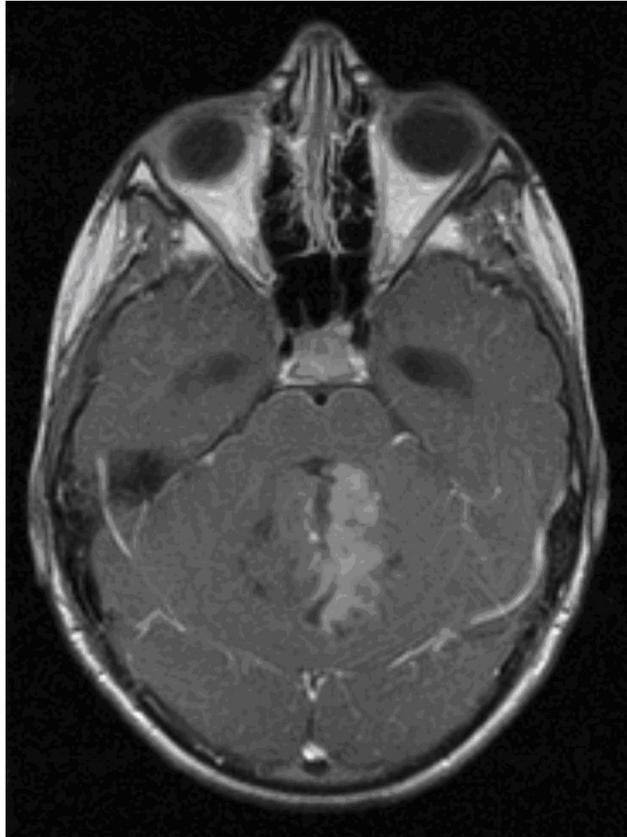


Abbildung 5: Das präoperative MRT-Bild in T1-Gewichtung nach Gadoliniumgabe zeigt ein Medulloblastom mit Verlegung des vierten Ventrikels bei einem 10 jährigen Jungen.

1.2.9 Therapie

Die Prognose des Medulloblastoms wurde durch die häufige Früherkennung, die radikale operative Tumorentfernung, eine verbesserte Strahlentherapie und durch den Einsatz von Chemotherapie in den letzten 20 Jahren deutlich verbessert.

a) operative Resektion

Die primäre totale Tumorentfernung ist sowohl prognosebestimmend als auch bei vorhandenen Liquorzirkulationsstörungen lebensrettend. Jedoch ist eine Resektion im Gesunden wegen des infiltrativen Wachstums meist nicht zu

erreichen, da das gesunde Hirngewebe vor allem im Bereich des Hirnstammes unbedingt erhalten und geschont werden muss. Im Zweifelsfall ist es möglich, Resttumor zu belassen, da dieser mittels Strahlen- und Chemotherapie erfolgreich behandelt werden kann.

Bei Liquorzirkulationsstörungen ist es in 20 % der Fälle nötig, einen ventrikulo-peritonealen Shunt anzulegen [22].

b) Strahlentherapie

Wie bereits oben erwähnt, ist eine radikale Resektion des Tumors wegen seines infiltrativen Wachstums häufig nicht zu erreichen. Deshalb ist eine Heilung ohne adjuvante Radiatio nicht möglich. Wegen der anzunehmenden okkulten Tumoraussaat über die Liquorwege ist eine kraniospinale Bestrahlung des gesamten Liquorraumes notwendig. Die Dosierung liegt zwischen 24-36 Gray bei Einzeldosen von 1,6-1,8 Gray. Im Primärtumorbereich schließt sich eine Aufsättigung bis 54 Gray an. Die Strahlentherapie hat maßgeblich zur Anhebung der Lebenszeit der Patienten beigetragen [23].

c) Chemotherapie

Da das Medulloblastom ein chemosensibler Tumor ist, bietet sich eine adjuvante Kombinationschemotherapie an. Es werden Nitroso-Harnstoffderivate (Carmustin, Lomustin), Platinderivate (Cisplatin, Carboplatin) und Vincristin kombiniert [24]. Durch die Chemotherapie werden nicht nur exzellente 5-Jahresüberlebensraten von bis zu 80 % erreicht, sondern auch die kraniospinale Bestrahlungsdosis kann bis auf 24 Gray herabgesetzt werden. Bei der neoadjuvanten Chemotherapie werden Platinderivate, alkylierende Substanzen und Alkaloide eingesetzt.

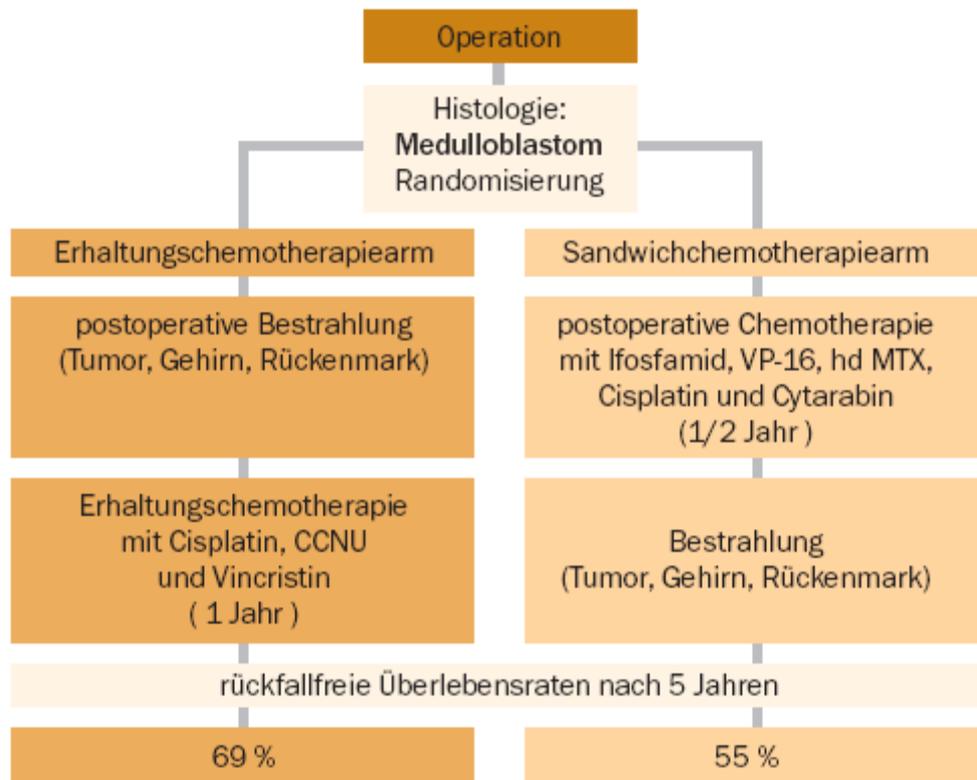


Abbildung 6: Design und Ergebnis der prospektiv randomisierten Therapiestudie HIT'91 zur Behandlung von Kindern mit bösartigen Hirntumoren

Aktuell läuft die multizentrische Therapie-Optimierungsstudie HIT 2000 zur Behandlung von Kindern und jungen Erwachsenen mit einem intrakraniell lokalisiertem Medulloblastom, PNET oder Ependymom. Diese Studie baut auf der oben erwähnten Studie HIT'91 für Kinder ab 3 Jahren auf. Für Kinder unter 3 Jahren werden die Ergebnisse der Studien HIT-SKK'87 und HIT-SKK'92 berücksichtigt. Angestrebt wird die Verbesserung der Überlebensraten im Vergleich zu den vorangegangenen HIT-Studien durch Intensivierung der Chemotherapie und / oder Bestrahlung, Nutzung der hyperfraktionierten Bestrahlung und eine exakte Risikogruppenzuordnung zu Patientengruppen. Zudem soll durch Verzicht auf Bestrahlung bei Kindern unter 4 Jahren und durch die Reduktion und Hyperfraktionierung der Strahlendosis eine Steigerung der Lebensqualität und geringere Spätfolgen bei den Patienten erreicht werden.

1.2.10 Besonderheiten

Bei erkrankten Kindern unter 3 Jahren sollte auf eine Strahlentherapie verzichtet werden, da die Myelinisierung des Gehirns noch nicht abgeschlossen ist. Dadurch ist es sehr vulnerabel und eine Bestrahlung kann möglicherweise psychomotorische, mentale und kognitive Entwicklungsstörungen nach sich ziehen. Die verbleibende Zeit bis zum dritten Lebensjahr kann durch eine Chemotherapie überbrückt werden [25].

Eine „Second-look“-Operation kann bei solitären Metastasen oder Lokalrezidiven in Betracht gezogen werden.

Dexamethason kann beim Auftreten von Hirndrucksymptomen und prophylaktisch bei der adjuvanten Chemotherapie eingesetzt werden.

1.3 Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie

1.3.1 Entstehung von Fluoreszenz- und Phosphoreszenzstrahlung

Licht bzw. Photonen können von Molekülen sowohl absorbiert als auch emittiert werden. Die dabei aufgenommene Energie kann von den Molekülen als chemische Energie, Wärme oder Lumineszenz abgegeben werden.

Die Fluoreszenz, eine Sonderform der Lumineszenz, wird definiert als Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie durch spontane Emission von Licht. Dabei wird das angeregte Photon innerhalb von ungefähr 10^{-9} bis 10^{-6} Sekunden nach dem Absorptionsprozess wieder emittiert. Der Begriff Fluoreszenz wird vom fluoreszierenden Mineral Fluorit (Flussspat, Calciumfluorid) abgeleitet.

Das Molekül befindet sich zunächst im elektronischen Grundzustand. Wird nun ein Photon geeigneter Wellenlänge absorbiert, kommt es zu einer Anhebung eines Elektrons in einen elektrisch angeregten Zustand. Dabei geht das Molekül aus seinem Grundzustand S_0 in den Singlettzustand S_1 oder bei weiterer Energieaufnahme in höhere Singlettzustände (S_2, S_3, \dots) über. Dies ist mit einer Anhebung eines Valenzelektrons von einer der inneren Bahnen auf eine weiter

außen liegende Bahn gleichzusetzen. Beim Singlettzustand haben die beiden gepaarten Elektronen einen entgegengesetzten Spin (+1/2 und -1/2) und die Summe der Spins $S = +1/2 + (-1/2)$ beträgt 0. Die Energie kann in Wärme freigesetzt werden, was auch als strahlungsloser Übergang oder innere Konversion (internal conversion) bezeichnet wird. Sie kann aber auch beim Übergang von S_1 zu S_0 durch die Emission von Licht, also Abgabe eines Photons, frei werden, wodurch es zum Phänomen der Fluoreszenz, einem strahlenden Übergang, kommt. Das Elektron kehrt danach ohne Spinumkehr in seinen Grundzustand S_0 zurück.

Moleküle haben auch die Möglichkeit von Singlettzustand S_1 in den Triplettzustand T_1 zu gelangen. Dabei geht ein Photosensibilisationsmolekül unter Umkehr des Elektronenspins strahlungslos vom Singlettzustand S_1 in den Triplettzustand T_1 über. Dieser Übergang wird als Intersystem crossing bezeichnet.

Energetisch ist der T_1 -Zustand niedriger als der S_1 -Zustand. Der Triplettzustand T_1 ist relativ stabil, da es sich um einen verbotenen Übergang (Spin-Verbot) handelt und der Übergang von T_1 zu S_0 dauert so relativ lange. Die T_1 -Lebensdauer liegt im Mikrosekundenbereich. Der Übergang kann entweder strahlungslos durch innere Konversion oder durch Strahlungsabgabe in Form von Phosphoreszenzstrahlung erfolgen. Diese Strahlung hat im Gegensatz zur Fluoreszenzstrahlung eine wesentlich längere Lebensdauer, die sich bis zum Sekunden- bis Minutenbereich erstrecken kann. Sowohl bei der Energieabgabe durch innere Konversion wie auch durch Strahlungsabgabe erfolgt eine Spinumkehr [26].

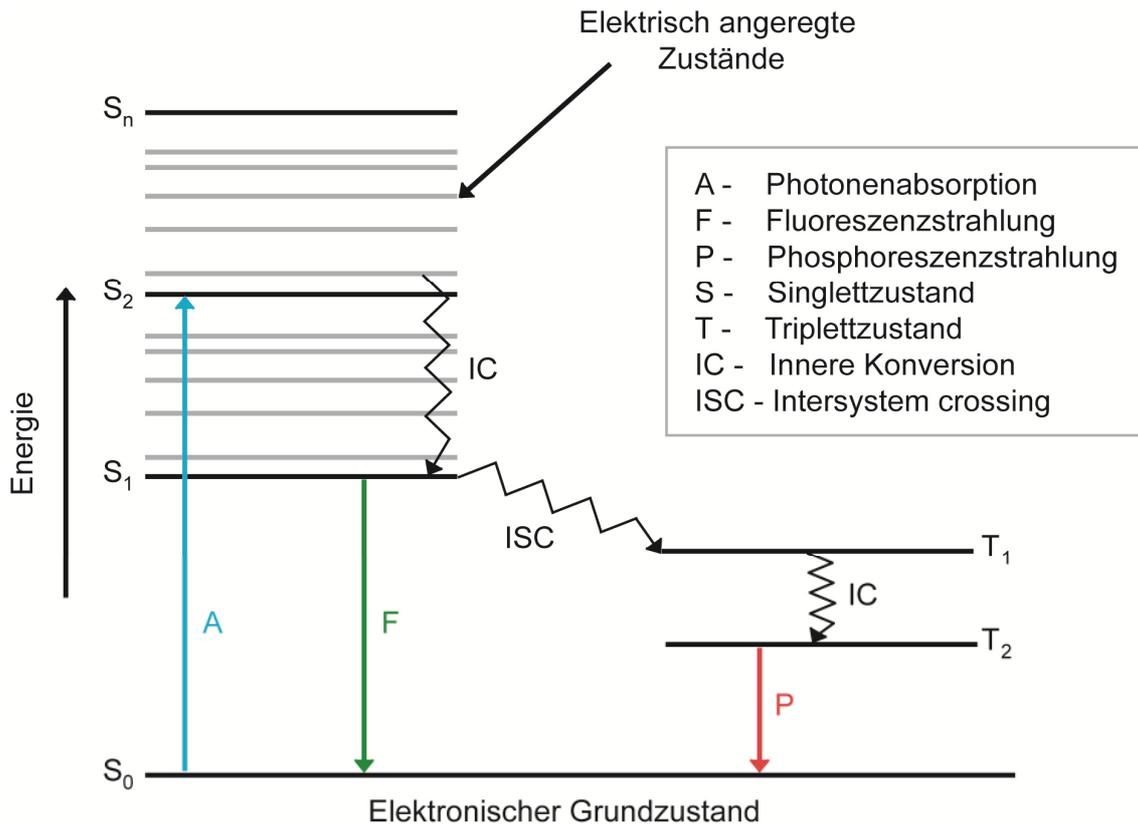


Abbildung 7: Jablonski-Diagramm: Molekulare Energieniveaus und Elektronenübergänge für die Fluoreszenzdiagnostik und die Photodynamische Therapie (PDT)

Zusammenfassend gilt somit, dass Elektronen von angeregten Zuständen unter Abgabe von Wärme (innere Konversion) oder unter Abstrahlung von Fluoreszenzlicht in den Grundzustand S_0 zurückgelangen [26].

1.3.2 Stokes shift

Die Energie des emittierten Lichts bei den Übergängen S_1 zu S_0 bzw. S_1 zu T_1 ist kleiner als die des Anregungslichts, wodurch die Wellenlänge des Fluoreszenzlichts immer größer ist als die des Anregungslichts. Durch weitere Energieverluste wird das Fluoreszenzlicht letztlich noch langwelliger und es kommt zum sogenannten Stokes shift [26].

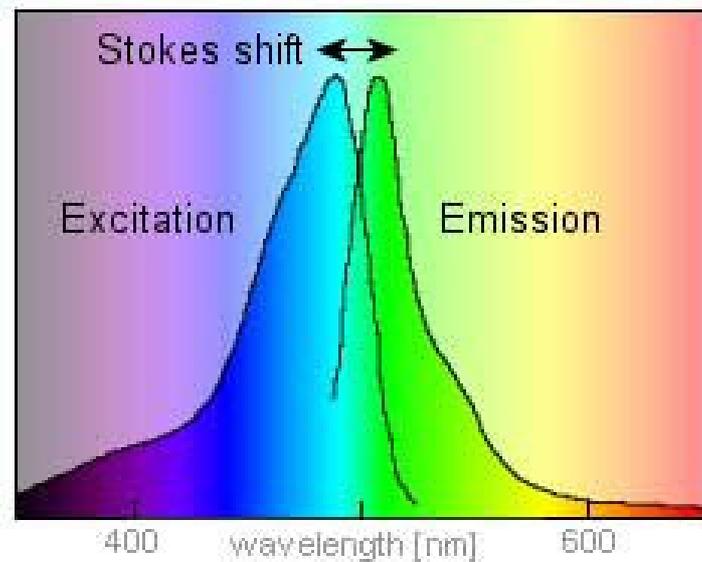


Abbildung 8: Stokes Shift

1.3.3 Quencher

Der Grund dafür, dass viele Materialien nicht lumineszieren liegt an den sogenannten Quencher, auch Tilger genannt. Dies sind eine Vielzahl von Elementen, die schon in geringer Konzentration einen strahlungslosen Übergang ermöglichen und somit die Lumineszenz verhindern. Beispiele für solche Quencher sind Fe^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} , welche häufig in Mineralien vorkommen.

1.3.4 Photobleaching

Photobleaching (auch Ausbleichen oder Fading genannt) ist bisher ein weitgehend ungeklärtes Phänomen, welches auftritt, wenn Fluoreszenzfarbstoffe ihre Fähigkeit verlieren zu fluoreszieren. Dies geschieht durch kovalente Modifikationen und chemische Schädigung durch Photonen. Beim Übergang vom angeregten Singlettzustand in den angeregten Triplettzustand interagieren die Fluoreszenzfarbstoffe wahrscheinlich mit anderen Molekülen, wodurch irreversible kovalente Modifikationen entstehen könnten [27]. Durch Reaktion von Photosensibilisator und Sauerstoffspezies kommt es unter anderem zur Bildung von Photoprodukten [28]. Es entstehen

keine oder gering fluoreszierende Oxidationspartner. Der Triplettzustand ist wie bereits erwähnt relativ langlebig im Vergleich zum Singlettzustand, wodurch die angeregten Moleküle im Triplettzustand lange Zeit haben, mit anderen Molekülen chemische Reaktionen einzugehen. Die durchschnittliche Anzahl von Anregungs- und Emissionszyklen eines bestimmten Fluoreszenzfarbstoffes, bevor es zum Photobleaching kommt, hängt von der Molekularstruktur und der Umgebung des Farbstoffes ab. Bei manchen Fluoreszenzfarbstoffen kommt es bereits nach wenigen Photonenemissionen zum Photobleaching, andere können tausende bis Millionen Zyklen durchlaufen. Die Anzahl der Anregungs- und Emissionszyklen ist für einen bestimmten Fluoreszenzfarbstoff, je nachdem ob die Anregungsenergie kontinuierlich oder impulsweise zugeführt wird, konstant [27]. Durch Reduktion der Belichtungszeit oder der Anregungszeit kann das Photobleaching von Fluoreszenzfarbstoffen vermindert werden [29]. In der klinischen Praxis entsteht durch das Photobleaching das Problem der zeitlich begrenzten Fluoreszenzdiagnostik. Bei systemischer Applikation eines Photosensibilisators kann man sich das Photobleaching jedoch zum Vorteil machen, indem sich durch moderate Lichtexposition die kutane Photosensibilisierung verkürzen lässt [30].

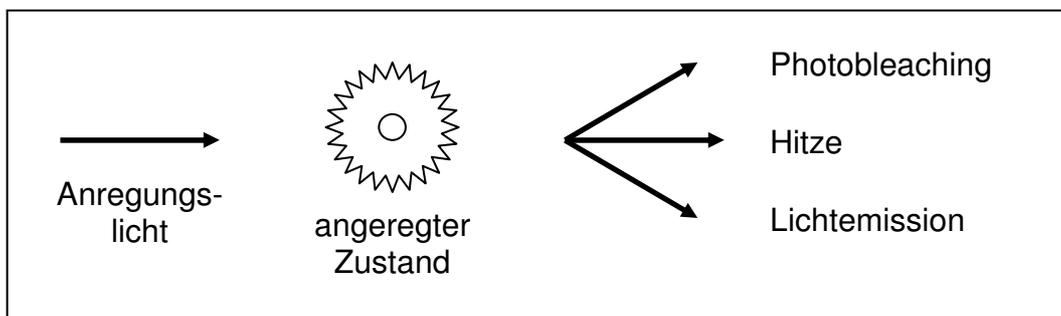


Abbildung 9: Nach Anregung eines Moleküls kann dieses entweder durch Photobleaching, Hitzeentwicklung oder Lichtemission seinen Relaxationszustand annehmen.

1.3.5 Fluoreszenzdiagnostik

Dem Operateur stehen intraoperativ bislang nur wenige Hilfsmittel wie zum Beispiel der intraoperative Ultraschall oder die intraoperative MRT zur Lokalisierung eines Tumors zur Verfügung. Eine genaue Unterscheidung und Abgrenzung zwischen tumorösem Gewebe und Normalgewebe ist oft schwierig oder gar unmöglich. Vor allem Frühkarzinome und unscharf abgrenzbar wachsende Tumoren bereiten in der Erkennung große Schwierigkeiten.

Für die angesprochenen Probleme konnte durch die Fluoreszenzdiagnostik eine elegante und potente Lösung in die medizinische Diagnostik eingeführt werden. Wie bereits beschrieben, kommt es beim Übergang eines Moleküls aus dem Singlettzustand S_1 in den Grundzustand S_0 zur Emission von Fluoreszenzlicht. Genau dieses Phänomen wird bei der Fluoreszenzdiagnostik genutzt. Das emittierte Fluoreszenzlicht kann durch optische Systeme dargestellt und der Tumor somit sichtbar gemacht und lokalisiert werden.

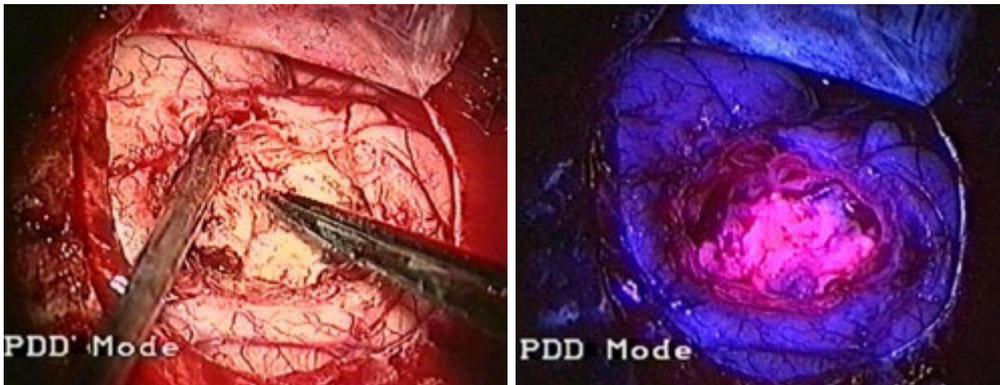


Abbildung 10: Auf den Bildern ist jeweils derselbe Hirntumor zu erkennen. Links die Ansicht bei weißer Beleuchtung, rechts bei blauer Beleuchtung. Die rote Fluoreszenz des Tumorgewebes des rechten Bildes entsteht durch 5-ALA induziertes PpIX nach präoperativer Gabe von 5-ALA. Dadurch kann die vollständige Entfernung des Tumors bei gleichzeitiger Schonung des Normalgewebes erreicht werden.

Ein störender Prozess stellt der Übergang des Singlettzustandes in den Triplettzustand bei der Fluoreszenzdiagnostik dar. Dabei kommt es zur Bildung von reaktivem Singlett-Sauerstoff, was wiederum eine Phototoxizität zur Folge hat und bei der Fluoreszenzdiagnostik unerwünscht ist [31]. Eine gute Lösung dieses Problems bieten Fluoreszenzmarker, welche die Eigenschaft einer

hohen Fluoreszenz-Quantenausbeute besitzen und dadurch seltener in den Tripletzustand übergehen. Da ein Großteil der Photosensibilisatoren diese Eigenschaft besitzt, können viele Fluoreszenzmarker zur kontrastreichen Visualisierung von Tumorgewebe eingesetzt werden [32]. Auch durch eine geringe Intensität des Anregungslichts kann der Tripletzustand weitgehend vermieden werden [33].

Bei der Fluoreszenzdiagnostik sind die Autofluoreszenzdiagnostik, welche auf der endogenen Fluoreszenz von Geweben basiert, und die exogene Fluoreszenzdiagnostik, bei welcher ein Fluoreszenzfarbstoff verabreicht wird, zu unterscheiden. Bei letzterer Methode wird die selektive Anreicherung des Photosensibilisators im Tumorgewebe ausgenutzt.

Mit der Fluoreszenzdiagnostik ist es somit möglich, gezielte Biopsien zu entnehmen und bei Resektionen eine genaue Abgrenzung des Tumors vom Normalgewebe durch Darstellung der Tumorränder zu erhalten. Durch die digitale Bildverarbeitung können des Weiteren auch Informationen über die Dignität der Läsion gewonnen werden [34].

1.3.6 Autofluoreszenz

Durch Anregung von endogenen Fluorophoren kommt es zur Eigenfluoreszenz des Gewebes. Dies wird als Autofluoreszenz bezeichnet. Einen Überblick über die wichtigsten endogenen Fluorophore gibt die nachfolgende Tabelle.

Fluorophor	Anregung (nm)	Emission (nm)	Herkunft
NADH	340	470	Atmungskette
FAD	450	520	Atmungskette
Porphyrine	405	635	Hämbiosynthese, bakterielle Infektionen
Tryptophan	275	350	Proteine
Kollagen	335	390	Bindegewebe
Elastin	360	410	Bindegewebe
Melanin	UV-VIS	>540	Melanozyten

Tabelle 2: Endogene Fluorophore des Menschen

Für die Autofluoreszenzdiagnostik ist das Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Molekül (NADH) der Atmungskette von entscheidender Bedeutung, da über seine Fluoreszenz Gewebehypoxie nachgewiesen werden kann [35]. Hierdurch

gelang es in mehreren Versuchen, Tumorgewebe von Normalgewebe zu differenzieren [36]. Ähnliche Eigenschaften zeigen auch Flavin-Adenin-Dinukleotid-Moleküle (FAD).

Tumorgewebe unterscheidet sich vom Normalgewebe in der strukturellen Kollagen- und Elastinzusammensetzung [37], der Konzentration von Porphyrinen [38], Tryptophan [39], NADH und FAD [40] als auch in physiologischen Merkmalen, wie zum Beispiel Gewebsverdickung und verändertes Blutvolumen. Dies führt zu einem Unterschied der Fluoreszenzintensität zwischen Tumor- und Normalgewebe. Dadurch eignet sich die Autofluoreszenz zur Diagnostik.

1.3.7 Photosensibilisatoren

Anfang der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts gelang es die Struktur von Hämatoporphyrin, welches Meyer-Betz schon 1912 in einem heroischen Selbstversuch nutzte, darzustellen. Ausgehend von diesem sogenannten Photosensibilisator der ersten Generation wurden weitere Photosensibilisatoren der zweiten Generation entwickelt. Im Idealfall sollten diese Photosensibilisatoren folgende Eigenschaften erfüllen:

- chemisch stabile Reinsubstanz
- sehr gute Absorptionseigenschaften und dadurch langwelliges Absorptionsmaximum und hohen Absorptionskoeffizient
- hohe Fluoreszenz-Quantenausbeute bei diagnostischer Anwendung
- hohe Sauerstoff-Quantenausbeute bei therapeutischer Anwendung
- sehr gute pharmakokinetische Eigenschaften in Bezug auf hohe Tumorselektivität und schnelle Ausscheidung
- geringe Zytotoxizität

Durch diese Eigenschaften werden auch die Nebenwirkungen wie lang anhaltende Photosensibilisation der Haut deutlich reduziert, was die Photosensibilisatoren der zweiten Generation deutlich von denen der ersten Generation abhebt [41]. Beispiel für die Besserung der pharmakokinetischen

Eigenschaften ist die Modifizierung von Substituenten oder Liganden bei Metallkomplexen, wodurch hydrophile Eigenschaften des Photosensibilisators verändert werden. Die Sauerstoff-Quantenausbeute kann zum Beispiel durch Einbau von Zinn, ein diamagnetisches Metallion, verbessert werden. Probleme ergeben sich bisweilen noch in der Gewebselektivität.

Photosensibilisatoren reichern sich sowohl im malignen als auch gesunden Gewebe an. Das Verhältnis der Aufnahme im Normalgewebe zur Aufnahme im Tumorgewebe wird mit dem sogenannten Akkumulationsindex beschrieben.

$$\text{Akkumulationsindex} = \frac{\text{Akkumulation im Tumorgewebe}}{\text{Akkumulation im Normalgewebe}}$$

Dieser liegt für die meisten Photosensibilisatoren im Bereich zwischen 2:1 und 5:1. Es werden unterschiedliche Mechanismen bezüglich der selektiven Anreicherung von Photosensibilisatoren im Tumorgewebe diskutiert [42,43].

- Aufnahme durch Endozytose ins Tumorgewebe durch die Affinität vieler Sensibilisatoren zu Low-density-Lipoproteinen
- erhöhte Anreicherung durch Makrophagen und Tumor-assoziierte Monozyten
- gesteigerte Aufnahme durch hohe Tumorneovaskularisierung
- geringere Löslichkeit in saurer Umgebung des Tumorgewebes, deshalb vermehrte Retention
- durch geringer ausgeprägtes Tumorlymphsystem geringere Ausschleusung aus der Zelle

In Tierversuchen konnte durch passives Targeting mittels Nanopartikeln oder Polymeren die erhöhte Permeabilität der Tumorgefäße für eine höhere Tumorselektivität genutzt werden [44].

Ein entscheidender Aspekt bei der Entwicklung von Photosensibilisatoren der zweiten Generation ist deren Absorptionsspektrum, welches sich innerhalb des therapeutischen Fensters befinden sollte. Da Hämoglobin Licht im Bereich von

1. Einleitung

380 nm bis 620 nm und Wasser vor allem unterhalb 300 nm und oberhalb 1200 nm absorbiert, liegt dieses zwischen 620 nm und 1200 nm bzw. auch zwischen 300 nm und 380 nm. Innerhalb dieses Fensters kann die maximale Eindringtiefe von Licht ins Gewebe erreicht werden, was für den Einsatz der PDT von Wichtigkeit ist. Die tumorizide Eindringtiefe des Anregungslichts beträgt bei den Photosensibilisatoren der 2. Generation 4-9 mm [45]. Widersprüchlich hierzu sind die Angaben von Ell et al. [46], welche von einer Eindringtiefe des Anregungslichts bei 5-ALA induziertem PpIX von etwa 2 mm ausgehen.

In folgender Tabelle sind Photosensibilisatoren der ersten und zweiten Generation und deren Eigenschaften aufgeführt.

1. Generation	2. Generation
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hämatoporphyrinderivate (HpD) oder Photofrin I ➤ Dihämatoporphyrinester sowie Dihämatoporphyrinäther (DHE) oder Photofrin II 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Benzoporphyrinderivate (BPD) ➤ Zink ➤ Aluminiumchlorsulfophtalozyanin ➤ Meso-Tetraphenolporphyrine ➤ Chlorine ➤ Purpurine ➤ Kationische Farbstoffe
Eigenschaften	Eigenschaften
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Absorptionsmaximum bei ca. 400 nm 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ raschere Akkumulation im Tumorgewebe (im Vergleich zu HpD und DHE)
<ul style="list-style-type: none"> ➤ weitere Maxima mit abnehmender Intensität bei 500, 525, 560 und 630 nm => PDT bei 630 nm, da Penetrationstiefe von 1-6 mm 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Absorptionsbanden im langwelligen Bereich => Penetrationstiefe von 4-9 mm
<ul style="list-style-type: none"> ➤ langanhaltende Photosensibilisierung der Cutis (6-8 Wochen) => klinische Anwendung der PDT begrenzt 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Photosensibilisierung der Cutis von nur 1-2 Tagen

Tabelle 3: Vergleich von Photosensibilisatoren der 1. und 2. Generation

Zur Zeit befinden sich viele unterschiedliche Photosensibilisatoren in präklinischen Studien. Hierunter befinden sich neben Rhodamin 123, Xanthine, Chlorophyll-A-Derivat-Photosensitizer, Bakterienchlorine, Anthraquinone auch Hypericin und verschiedene Porphyrine wie kationische Porphyrine und synthetische Isomere von Porphyrinen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Photosensibilisatoren der zweiten Generation große Fortschritte bei den Eigenschaften, den Anwendungen und den Nebenwirkungen erzielt wurden. Jedoch sind die Anwendungen durch die Penetrationstiefe der Absorptionsmaxima auf Läsionen bis zu einer Dicke von etwa 9 mm begrenzt [32].

1.4 Der Photosensibilisator Hypericin

1.4.1 Eigenschaften von Hypericin

Name: *Hypericum perforatum*

Synonyme: Echtes Johanniskraut, St John's wort, Tüpfel-Johanniskraut, Jageteufel, Konradskraut, Hexenkraut und viele mehr

Familie: Hypericaceae (Johanniskrautgewächse)

Vorkommen: in Europa und Westasien auf Wiesen, an Wegrändern und Gebüschern mit eher trockenen Böden



Beschreibung: Bis 80 cm hoch werdende, mehrjährige Pflanze mit eiförmigen Blättern, die beim Halten gegen Licht von winzigen Löchern durchsetzt scheinen. Zwischen Juni und August erscheinen die in einer Trugdolde stehenden Blüten, die beim Zerreiben zwischen den Fingern roten Farbstoff absondern [47].

Abbildung 11: Johanniskraut

In Deutschland unterscheidet man vier Varietäten:

- a) gewöhnliches Tüpfel-Johanniskraut (*Hypericum perforatum*)
- b) schmalblättriges Tüpfel-Johanniskraut (*Hypericum angustifolium*)
- c) breitblättriges Tüpfel-Johanniskraut (*Hypericum latifolium*)
- d) kleinblättriges Tüpfel-Johanniskraut (*Hypericum microphyllum*)

Chemische Bezeichnung: 10,11-Dimethyl-1,3,4,6,8,12-Hexahydroxynaphthodianthron ($C_{30}H_{16}O_8$) [48]

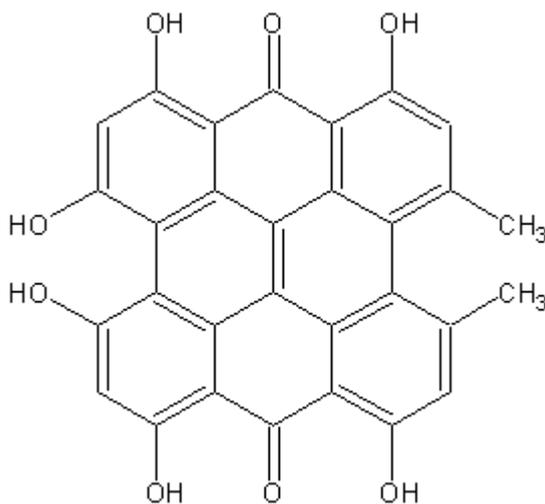


Abbildung 12: Hypericinmolekül

Molekulargewicht: 504,45 g/mol [48]

Eigenschaften: geruchloses, schwarzes Pulver [48]

Löslichkeit: gut löslich in Dimethylsulfoxid (DMSO) und Aceton, da lipophile Substanz, wenig löslich in Wasser und Alkohol [48]

Fluoreszenzspektrum: Hypericin fluoresziert im roten Spektralbereich. Sein Anregungsmaximum liegt bei 488 nm, sein Emissionsmaximum bei 595 nm [49].

1.4.2 Inhaltsstoffe und deren pharmakologische Aktivität

1.4.2.1 Naphthodianthrone

Naphthodianthrone bzw. Hypericine sind die charakteristischen Inhaltsstoffe für die Gattung *Hypericum*. Auch in der Medizin haben sie die größte Bedeutung. Hypericin kommt in Blüten und Blättern mit einem Gehalt von 0,03 bis 0,3 % vor und bildet blutrote Pigmente [50]. Neben Hypericin und Pseudohypericin, die den größten Anteil ausmachen, kommen noch deren Vorstufen Protohypericin

und Protopseudohypericin vor. Sie sind für die phototoxischen Reaktionen verantwortlich, welche schon in der Antike bei Schafen, Rindern und Pferden, die Johanniskraut in großen Mengen gefressen hatten, beobachtet wurden [51]. Auf die antineoplastische und antidepressive Wirkung von Hypericin wird im Folgenden noch genauer eingegangen.

Lavie et al. [52] wiesen 1995 durch pH-abhängige Untersuchungen des Hypericinspektrums nach, dass es sich um eine saure Verbindung handelt. Des Weiteren treten Interaktionen von Hypericin mit verschiedenen Proteinen wie zum Beispiel mit den Lipoproteinen High Density Lipoprotein (HDL) und Low Density Lipoprotein (LDL) und auch humanem Serumalbumin auf. Mit den Lipoproteinen geht es ein starkes Bindungsverhältnis ein. Durch diese Bindungseigenschaften und durch die Lipophilie von Hypericin nimmt man zudem eine Bindungsfähigkeit mit Phospholipidmembranen an.

1.4.2.2 Flavonoide

Vor allem die Flavonole bestimmen das Flavonoidspektrum in Johanniskraut. Laut Hänsel et al. [53] haben sie antiphlogistische, antiallergische, antivirale, antimikrobielle, antioxidative, antiproliferative und antikarzinogene Wirksamkeit. Möglicherweise besitzen sie auch eine antidepressive Wirkung, da sie *in vitro* Mono-Amino-Oxidase (MAO) und Catecholamin-O-Methyl-Transferase (COMT) hemmen [54].

1.4.2.3 Phloroglucinderivate

Hauptvertreter ist das Hyperforin. *In vitro* kann ein Eingriff in den Neurotransmitterstoffwechsel beobachtet werden [55]. Es soll auch für Nebenwirkungen, wie Plasmaspiegelsenkung von oralen Kontrazeptiva und Cyclosporin, durch Expression von Cytochrom P450 von Johanniskraut verantwortlich sein [56].

1.4.2.4 Procyanide

Sie haben eine kardiovaskuläre Aktivität [57]. Zusätzlich tragen sie indirekt zur antidepressiven Wirkung des Johanniskrauts bei [58].

1.4.2.5 Anthrachinonderivate und Xanthome

Des Weiteren sind Anthrachinonderivate [59] und Xanthome [60] in sehr geringen Mengen in Johanniskraut enthalten. Aufgrund des sehr geringen Gehalts spielen diese beiden Verbindungen wahrscheinlich nur eine sehr geringe bzw. keine Bedeutung in der antidepressiven Wirksamkeit der Pflanze [59,61]. Genauere Untersuchungen zur Relevanz bezüglich der antidepressiven Wirkung der Biflavonoide stehen noch aus.

1.4.3 Geschichtliches

Der deutsche Name Johanniskraut leitet sich vom am 24. Juni gefeierten Johannistag ab, da die Pflanze in Mitteleuropa um diese Zeit zu blühen beginnt. Das lateinische Synonym *Hypericum perforatum* leitet sich von der Morphologie der Blätter der Pflanze ab. Wie schon erwähnt, scheinen die eiförmigen Blätter beim Halten gegen Licht von winzigen Löchern durchsetzt zu sein.

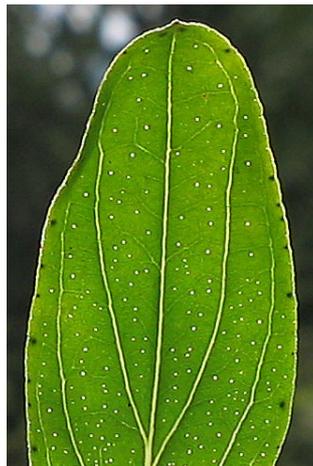


Abbildung 13: eiförmiges, von winzigen Löchern durchsetztes Hypericinblatt

Medizinische Verwendung fand Johanniskraut bereits in der Antike. Nikandros berichtete schon im zweiten Jahrhundert vor Christus über die Anwendung von

Johanniskraut zur Verhinderung von Vergiftungen, die durch Tiere verursacht wurden [47].

Im 16. Jahrhundert erkannte Paracelsus die Wirkung von Johanniskraut bei der Therapie unterschiedlichster Erkrankungen. Er setzte die Extrakte nicht nur zur Behandlung von Wunden und Verbrennungen ein, sondern nutzte diese auch erfolgreich bei Erkrankungen wie Depression, Neurosen und bei Beschwerden des Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts [62,63].

Zu Beginn des letzten Jahrhunderts wurde der Begriff des Hypericismus, auch Lichtkrankheit genannt, geprägt. Darunter wird eine erhöhte Lichtempfindlichkeit der Haut nach Einnahme von Johanniskraut verstanden. Die Krankheit zeichnet sich durch Ödeme, Brandblasen, Erythem und im schlimmsten Fall Nekrosen der lichtexponierten Haut aus [64]. Nach Einnahme größerer Mengen von Hypericin kann das Phänomen durch ein- bis zweiwöchiges Vermeiden von Sonnenlicht umgangen werden, da Hypericin keine Dunkeltoxizität aufweist. Wie bereits erwähnt, wurde dies schon in der Antike bei Weidetieren beobachtet [65].

Erste Laborversuche erfolgten 1942 an weißen Kaninchen durch Pace et al., die nachweisen konnten, dass für die durch Hypericin induzierte Photosensibilität Sauerstoff notwendig ist [66,67].

Durch die genannten Zusammenhänge konnte das Syndrom Hypericismus dem Begriff der Photodynamik zugeordnet werden.

Auch heutzutage ist Hypericin ein wichtiges Arzneimittel in der Medizin. Neben topischer Anwendung bei Verbrennungen ersten Grades und Behandlung von Entzündungen wird Hypericin auch zur verbesserten Wundheilung eingesetzt. Einen zunehmenden Stellenwert nimmt Hypericin als Antidepressivum in der Behandlung von leichten bis mittelschweren Depressionen, Angstzuständen und nervöser Unruhe ein [68].

1.4.4 Klinische Anwendungen von Johanniskraut

Im Folgenden sollen verschiedene Eigenschaften und Wirkmechanismen des Johanniskraut besprochen werden. In Bezug auf diese Arbeit wird vor allem speziell auf einen Bestandteil des Johanniskraut, das Hypericin, eingegangen.

Es ist maßgeblich an der antineoplastischen, antiviralen und antibakteriellen Wirkung beteiligt. Bei der antidepressiven Wirkung spielen verschiedene Johanniskrautbestandteile eine Rolle.

1.4.4.1 Antineoplastische Eigenschaft von Hypericin

Die antineoplastische Wirksamkeit von Hypericin hängt vor allem von der Inhibition der Proteinkinase C (PKC), der Tyrosinkinase und der Induktion von Apoptose und Nekrose ab. In vielen *in vitro* wie auch *in vivo* Experimenten konnte dies bei verschiedenen Tumorzellarten gezeigt werden [69,70,71,72,73,74]. Zudem reichert es sich in höheren Konzentrationen selektiver in Tumorgeweben als in Normalgeweben an [75]. Die Zytotoxizität des Hypericin hängt im wesentlichen von seiner Photoaktivierung durch Lichtexposition ab. Ohne diese Aktivierung erreicht man nur geringfügige Zytotoxizität, der zytostatische Effekt steht im Vordergrund [76].

Vor allem durch die photosensibilisierende Eigenschaft, aber auch durch Mechanismen wie Hemmung von PKC und Tyrosinkinase sowie Apoptose- und Nekroseinduktion, ist Hypericin eine vielversprechende Substanz zur palliativen oder auch kurativen Therapie bei Malignomen [77].

1.4.4.1.1 Inhibition der Proteinkinase C

Die PKC gehört in die Gruppe der Phospholipid-aktivierten Proteinkinasen, welche Funktionen von Proteinen durch Phosphorylierung an Serin- und Threonin-Positionen ändern. Sie besitzt eine zentrale Bedeutung bei der Signaltransduktion [78]. Über eine kovalente Bindung an die regulatorische Domäne der PKC hemmt Hypericin diese irreversibel [79]. Da die Aktivität von PKC eine wichtige Rolle im Zellwachstum spielt, kommt es durch deren Inhibition zu einer Wachstumshemmung der Zellen. Hierfür ist vor allem die partielle Aktivität der PKC, die membrangebunden ist, entscheidend. Die sogenannte Totalaktivität, die sich auf die Aktivität der PKC im Plasma bezieht, hat dabei nur einen geringen Effekt [80]. Auch bei Medulloblastomzellen konnte von Adesina et al. 1998 [81] eine Wachstumshemmung durch PKC-Inhibition

beobachtet werden. Bei malignen Gliomzellen konnte eine wesentlich höhere Aktivität der PKC nachgewiesen werden als bei ursprünglichen Gliazellen, was sich *in vitro* in einem raschen Wachstum widerspiegelt [73]. Zhang et al. [74] induzierten bei Neuroblastomkulturen nach Zugabe von Hypericin eine deutliche Wachstumsreduktion.

Es kann angenommen werden, dass durch die irreversible Hemmung der PKC durch Hypericin eine Wachstumsverzögerung oder gar komplette Wachstumshemmung von Zellen erreicht wird. Das würde besonders maligne Tumorzellen betreffen, da, wie schon erwähnt, bei vielen eine erhöhte Aktivität der PKC vorhanden ist. Wegen der irreversiblen Hemmung gehen Takahashi et al. davon aus, dass schon eine geringe Menge an Hypericin für die PKC-Inhibition ausreichend ist [79].

Ebenfalls soll die PKC-Inhibition durch Hypericin bei der Bestrahlung mittels Gamma-Strahlung eine Rolle spielen. Zhang et al. [82] beobachteten hierzu eine erhöhte Radiosensibilität von Glioblastomzellen bei *in vitro* Experimenten. Weller et al. fanden heraus, dass trotz potenter PKC-Inhibition keine Korrelation zur Zytotoxizität besteht [83].

1.4.4.1.2 Inhibition der Tyrosinkinase

Die Tyrosinkinase greift an vielen Rezeptoren an und spielt daher eine wichtige Rolle bei mannigfaltigen intrazellulären Signalübertragungen. Zu den Rezeptoren, an denen die Tyrosinkinase angreift, gehören unter anderem der Insulinrezeptor, der Insulin-like-growth-factor-Rezeptor (IGF-Rezeptor) und der epidermal growth factor-Rezeptor (EGF-Rezeptor). De Witte et al. zeigten, dass Hypericin einen irreversiblen inhibitorischen Effekt auf den EGF-Rezeptor hat. Dieser hemmende Effekt konnte aber nur in Verbindung mit einer Photoaktivierung erreicht werden [84]. Durch diesen Effekt könnte vielleicht die Wirkung einzelner Signalkaskaden unterbrochen werden, und dadurch wiederum eine Wachstumsinhibition erreicht werden. Jedoch scheint EGF und dessen Rezeptor nur von geringer Bedeutung in der Entwicklung von Medulloblastomen zu sein [85].

1.4.4.1.3 Induktion von Apoptose und Nekrose

Hypericin induziert bei Vorhandensein von Licht Zellapoptose und Zellnekrose. Diese sollen über die Freisetzung von Cytochrom C und die Aktivierung der Kaspase 3 hervorgerufen werden [86]. Die durch photoaktiviertes Hypericin ausgelöste Apoptose wird allem Anschein nach über den Tumor-Necrosis-Factor-Related-Apoptosis-Inducing-Ligand (TRAIL), auch Todesrezeptor genannt, mit nachfolgender Kaspasenaktivierung vermittelt [87].

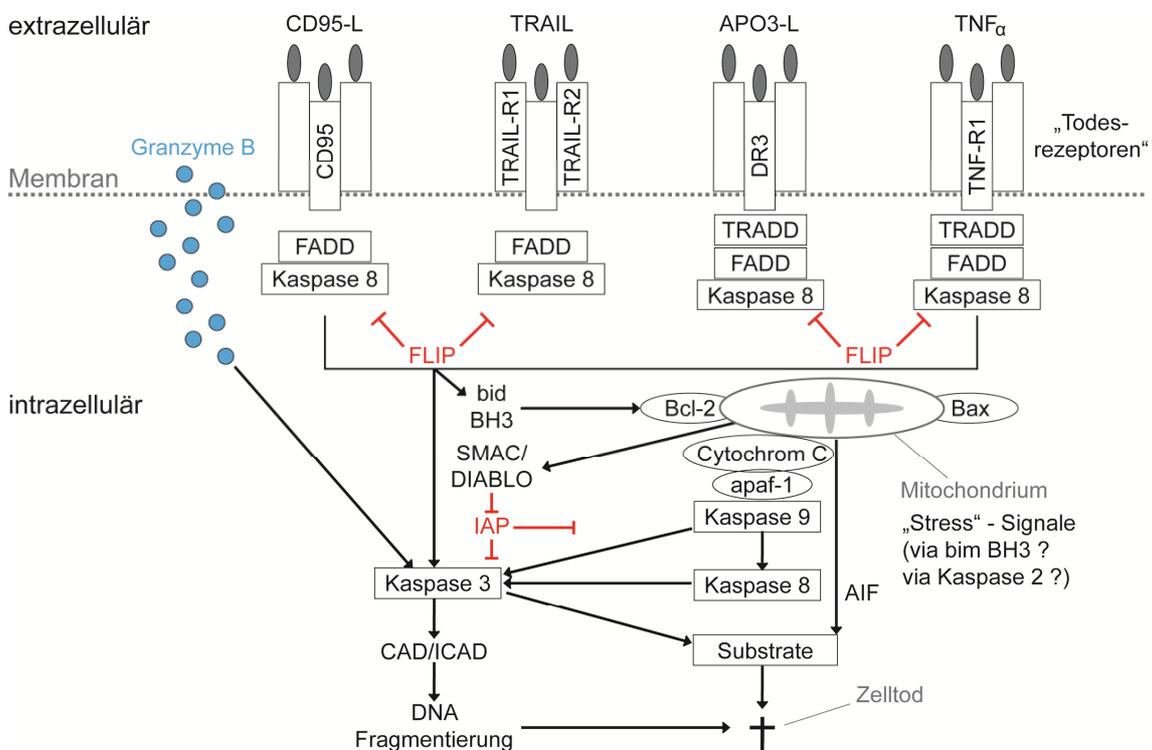


Abbildung 14: Ereignisse, die den programmierten Zelltod auslösen. Rezeptoren in der Plasmamembran (CD95, TRAIL-R1/R2, DR3, Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 (TNF-R1)) empfangen Signal von außerhalb der Zelle. Durch die Aktivierung der Rezeptoren kommt es über Zwischenschritte (Fas-associating protein with death domain (FADD), TNFRSF1A-associated via death domain (TRADD), Kaspase 8) zur Aktivierung von Kaspase 3 und der Freisetzung von Cytochrom C, wodurch Zellapoptose und Zellnekrose induziert wird.

1.4.4.2 Antivirale und antibakterielle Potenz

Die antivirale Potenz von Hypericin wurde 1988 zum ersten Mal von Meruelo et al. beim murinen Friend-Leukämie-Virus beschrieben [88]. Es folgten Arbeiten mit equinem infektiösem Anämie-Virus [89], HIV-1 [90], Herpes simplex Virus, Influenza A Virus [91] und murinem Cytomegalievirus [92], bei denen ein starker antiviraler Effekt bei nur geringer Toxizität nachzuweisen war. Pseudohypericin zeigte auch eine gute antivirale Potenz [93]. Dieser antivirale Effekt kann mittels Lichtexposition deutlich verstärkt werden [94]. Der genaue Wirkmechanismus ist noch umstritten. Diskutiert werden die Inhibition der Proteinkinase [90] bzw. der reversen Transkriptase [79], Interaktionen von Hypericin mit der Virusreplikation [95] sowie direkt viruzide Effekte [96]. Bisherige erste klinische Studien mussten wegen schweren Nebenwirkungen abgebrochen werden. Zudem zeigte sich in den Studien keine signifikante antivirale Wirksamkeit [97,98].

Für die Inhaltsstoffe des Johanniskrauts, darunter auch Hypericin und Hyperforin, konnten des Weiteren antibakterielle Eigenschaften bei Experimenten mit grampositiven Bakterien, darunter auch multiresistenter *Staphylokokkus aureus* [99], nachgewiesen werden [100,101]. Das Wachstum der Bakterien wurde durch Zugabe von Hypericin signifikant gehemmt.

1.4.4.3 Antidepressive Eigenschaften von Johanniskraut

In mehreren klinischen Studien konnte für Johanniskraut eine Überlegenheit zu Placebo bei der Behandlung von leichten bis mittelschweren Depressionen nachgewiesen werden. Auch zu Standardpräparaten wie Imipramin (Tofranil[®]), Sertralin (Zoloft[®]), Amitriptylin (Elavil[®]) und Fluoxetin (Prozac[®]) ist Johanniskraut ein gut wirksames und alternatives Medikament. Eine Therapie der „major depression“ ist jedoch nicht möglich [102]. Die antidepressive Potenz wird vor allem durch das Phloroglucinderivat Hyperforin [55] vermittelt. Flavonoide [54] und indirekt Procyanide [58] tragen zudem bei.

Die Wirkungsweise von Hyperforin basiert auf einer Hemmung der Wiederaufnahme von Serotonin, Dopamin, Gamma-Aminobuttersäure (GABA),

L-Glutamat und Norepinephrin, welche bei Depression in verminderter Konzentration vorliegen [103]. Hochdosiertes Hypericin hemmt die Monoaminoxidase A und B, wodurch es zu einer Erhöhung der Noradrenalin-Konzentration im synaptischen Spalt kommt [104]. Jedoch werden die geforderten Dosen zum Erreichen dieses Effektes bei der Depressionsbehandlung mit Johanniskraut bei weitem nicht erreicht [54].

Wie schon angesprochen, hemmen auch Flavonoide *in vitro* die Monoaminoxidase und des Weiteren die Catecholamin-O-Methyl-Transferase (COMT), wodurch sie eine antidepressive Wirkung aufweisen könnten [54]. Weitere Erklärungsansätze für den Wirkmechanismus von Johanniskraut bei Depression sind eine Downregulation der β -Adrenorezeptor-Dichte und eine Upregulation der 5-Hydroxytryptamin-2-Rezeptordichte (5-HT₂-Rezeptor), die an Rattenhirnen durch längerfristige Gabe von LI-160-Extrakt (entspricht Johanniskrautextrakt) [105] nachgewiesen wurden. Auch die Hemmung von Interleukin-6, welche bei *in vitro* Versuchen festgestellt wurde, spielt möglicherweise eine Rolle [106,107].

1.4.5 Interaktionen mit anderen Pharmaka

Bei Einnahme von Johanniskraut steigt vor allem die Expression von Zytochrom P450 3A4 (CYP3A4) und P-Glykoprotein um bis zu 50 % an [108]. Da ca. 60 % aller Pharmaka über CYP3A4 und viele von diesen des Weiteren über das P-Glykoprotein verstoffwechselt werden, kommt es zu einer Wirkungsabschwächung dieser. Diese Wirkungsabschwächung sollte besonders bei der Einnahme von oralen Kontrazeptiva beachtet werden, um Zwischenblutungen und vor allem eine Schwangerschaft zu vermeiden. Bei gleichzeitiger Einnahme von Johanniskraut mit Serotoninwiederaufnahmehemmern kann ein Serotoninsyndrom ausgelöst werden [109].

1.5 Der Photosensibilisator 5-ALA

1.5.1 Eigenschaften von 5-ALA

Name: 5-Aminolävulinsäure(hydrochlorid), 5-ALA, d-ALA

Chemische Bezeichnung: 5-Amino-4-oxo-pentansäurehydrochlorid

(C₅ H₁₀ Cl N O₃)

Molekulargewicht: 167,59 g/mol

Aussehen: weißes bis bräunlich weißes Pulver

Schmelzpunkt: 151-154 °C

pH-Wert (1 Prozent in Wasser): 2,2 - 3,2

Löslichkeit: löslich in Wasser, wenig löslich in Ethanol und Methanol

Formulierung: steriles, pyrogenfreies Lyophilisat in lichtgeschützter Flasche

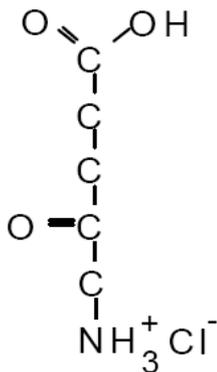


Abbildung 15: 5-ALA-Molekül

1.5.2 5-ALA als Zwischenprodukt der Hämbiosynthese

Da prinzipiell fast jede Zelle fähig ist, aus Succinyl-Coenzym A (Succinyl-CoA) und Glycin mit Hilfe der 5-ALA-Synthetase 5-ALA herzustellen, kann dieses in fast allen Zellen von Säugetieren, besonders im Knochenmark und der Leber, gefunden werden. Es ist zudem das erste Zwischenprodukt in der Hämbiosynthese. Diese besteht aus acht Enzym-katalysierten Schritten. Der erste Schritt und die drei letzten Schritte finden in der Mitochondrien statt, die restlichen vier im Zytoplasma.

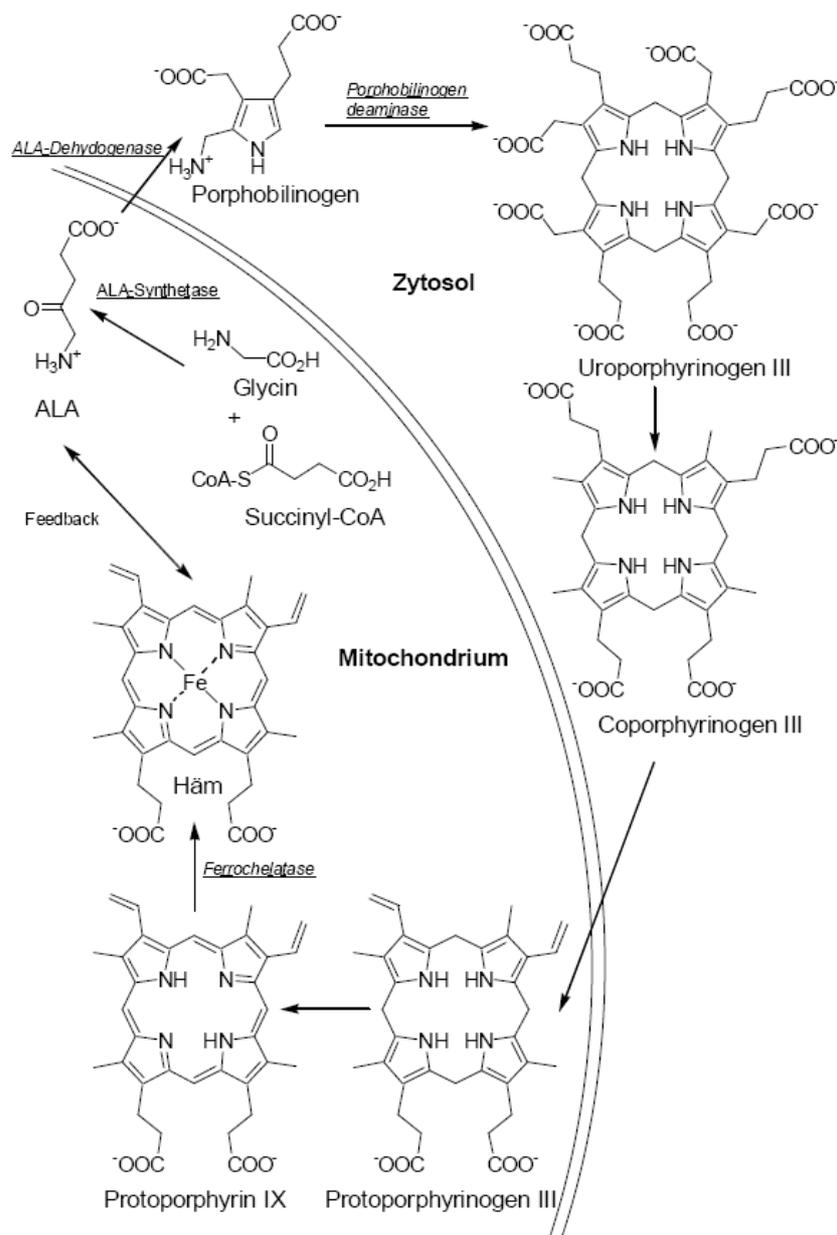


Abbildung 16: Zwischenprodukte und Enzyme der Hämbiosynthese

Deshalb bleibt die Hämsynthese in Zellen ohne Mitochondrien, wie zum Beispiel in Erythrozyten, aus, da die für die Hämsynthese notwendigen Enzyme fehlen [110]. Häm, ein Protoporphyrin IX Eisenchelate, spielt eine zentrale Rolle bei allen biologischen Oxidationen, bei vielen vitalen Funktionen (Sauerstofftransport, Sauerstoffspeicherung), Detoxifikationsreaktionen, Biosynthese unterschiedlicher Steroide, Erzeugung zellulärer Energie und der Regulation der Proteinsynthese und Zellentwicklung [111]. Auch seine

Vorstufen nahmen in der Evolution eine wichtige Bedeutung ein. Da sich im Laufe der Zeit die Wertigkeit der Metall-Chelat-Komplexe änderte und diese so zur Elektronenübertragung fähig waren, trug dies wesentlich zur Entwicklung des Lebens an Land bei. Dadurch konnte die Effizienz von Redoxreaktionen erheblich gesteigert werden [112].

1.5.3 Akkumulation von Protoporphyrin IX

Häm, das Endprodukt der Synthese, wirkt hemmend auf die Transkription, Translation und die Aktivität der 5-ALA-Synthetase [113]. Des Weiteren hemmt Häm auch die Aufnahme von 5-ALA-Synthetase in Mitochondrien [114], wodurch weniger 5-ALA aus Succinyl-CoA und Glycin produziert werden kann. Dieses negative Feedback hängt von der intrazellulären Hämkonzentration ab. Durch exogene 5-ALA-Gabe wird dieser Kontrollmechanismus jedoch sowohl *in vivo* als auch *in vitro* umgangen und es kommt zur starken PpIX-Produktion [115]. Positiv zur PpIX-Akkumulation trägt auch die langsame Umwandlung von PpIX in Häm durch Einbau von Eisen bei. Es kommt so vor allem in Tumorzellen zu einer PpIX-Akkumulation, jedoch sind noch nicht alle Fragen bezüglich dieser tumorselektiven Anreicherung geklärt. Als Ursachen werden angenommen:

a) Ferrochelatase-Aktivität

Eine herabgesetzte Ferrochelatase-Aktivität, möglicherweise bedingt durch ein Eisendefizit und eine gesteigerte Porphobilinogendeaminase-Aktivität, kann als Hauptursachen angenommen werden [116].

b) Veränderung der Zellmembran

Eine weitere Ursache könnte in der Veränderung der Zellmembran und dadurch einer Herabsetzung der Diffusionsbarriere [117] liegen.

c) Enzymaktivität

Navone konnte eine erhöhte Aktivität der Enzyme, welche an der Synthese der Zwischenprodukte von PpIX beteiligt sind, in entarteten Zellen durch *in vitro*-Experimente nachweisen [118].

d) LDL-Rezeptoraktivität

Lipoproteine, vor allem LDL, spielen eine wichtige Rolle beim Transport von Hämatoporphyrin im Blutstrom [119]. Da viele Tumorzelltypen mehr LDL-Rezeptoraktivität als normale Zellen aufweisen, kommt es zu einer verstärkten Aufnahme von LDL und dem daran gebundenen Hämatoporphyrin [120].

Aus oben genannten Ursachen könnten eine unterschiedliche 5-ALA-Aufnahme, PpIX-Bildung und PpIX-Ausschleusung resultieren und so eine vermehrte Akkumulation erklärt werden.

1.5.4 Aufnahme, Abbau und Ausscheidung von 5-ALA

Der Aufnahme von 5-ALA in die Zelle liegt ein aktiver Transport durch beta- und GABA-Carrier zugrunde. Zudem ist die Aufnahme Natrium- und gering Chlorid-abhängig [121]. Es konnte durch Aufnahmekinetikversuche mit radioaktiv markiertem 5-ALA jedoch gezeigt werden, dass die intrazelluläre PpIX-Konzentration nicht wesentlich vom 5-ALA-Transport durch die Zellmembran beeinflusst wird. Trotz vergleichbarer intrazellulärer 5-ALA-Mengen in verschiedenen Zelllinien von Adenokarzinomen und einer Kolonfibroblasten-Zelllinie kam es zu deutlichen unterschiedlichen zelllinienspezifischen PpIX-Leveln. Daraus kann man schließen, dass die tumorselektive PpIX-Akkumulation nicht von der 5-ALA-Aufnahme selbst, sondern von der PpIX-Synthese abhängt. Dies konnte durch den Nachweis einer gesteigerten Porphobilinogendeaminase-Aktivität von Fibroblasten und einer erniedrigten Ferrochelatase-Aktivität von Adenokarzinomen bestätigt werden [122].

5-ALA wird vom Körper vollständig abgebaut, kann aber auch direkt aus dem Körper über die Nieren ausgeschieden werden. Die 5-ALA-Clearance korreliert eng mit der von Kreatinin. Es wird glomerulär filtriert und nur gering tubulär rückresorbiert [123].

1.5.5 Anregung und Fluoreszenz von 5-ALA induziertem PpIX

Im Allgemeinen sind die aus 5-ALA bzw. Succinyl-CoA und Glycin im Körper hergestellten Porphyrine sehr photoreaktiv und fluoreszieren sehr intensiv. Dadurch werden hoch aktive Sauerstoffradikale intrazellulär gebildet, welche zytotoxisch auf die Zelle wirken [124]. Vor allem PpIX hat eine sehr ausgeprägte Fluoreszenz und lässt sich mit einer Wellenlänge um 405 nm anregen. Dabei wird ein Teil der Energie der absorbierten Photonen als rote Fluoreszenz emittiert. Der Peak der PpIX-Fluoreszenz liegt im Gewebe bei ca. 635 nm, ein weiterer kleinerer Peak liegt bei ungefähr 700 nm [125].

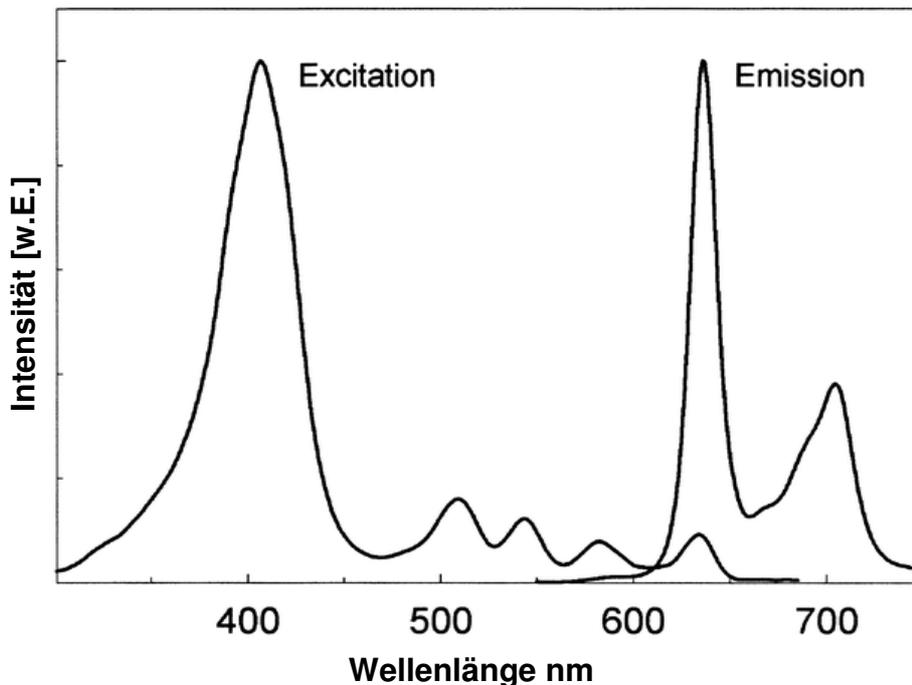


Abbildung 17: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von 5-ALA induziertem PpIX

1.5.6 Klinische Anwendung von 5-ALA induziertem PpIX

1955 wurde erstmals von Scott [126] eine vorübergehende Hypersensibilität auf Sonnenlicht nach exogener Verabreichung von 5-ALA beobachtet und publiziert. Bestätigt wurde diese Beobachtung 1956 von Jarret et al. [127] durch subkutane 5-ALA-Injektion an Ratten. 1990 behandelten Kennedy et al. [128]

nach Vorarbeiten durch Malik und Lugaci [129] als erste Arbeitsgruppe eine neoplastische Hautläsion mit topisch appliziertem 5-ALA als Photosensibilisator. 5-ALA an sich ist jedoch kein Photosensibilisator, sondern wird im Zielgewebe zu Porphyrinen, vor allem PpIX, umgewandelt. PpIX stellt den eigentlichen Photosensibilisator dar. Das entstehende PpIX reichert sich selektiv in Tumoren an und besitzt sehr gute Fluoreszenzeigenschaften. Es ist ein optimaler Photosensibilisator, der im Gegensatz zu Photofrin sehr rasch aus dem Körper eliminiert werden kann. Durch die selektive und schnelle Anreicherung im Tumorgewebe, der schnellen Elimination und der Eigenschaft, dass PpIX keine Dunkeltoxizität aufweist, kommt es nur für etwa 24 Stunden (h) zu einer geringen Photosensibilisierung des gesunden Gewebes, vor allem der Haut [130]. So ist es teilweise möglich, okkulte Tumoren über die PpIX-Fluoreszenz zu lokalisieren oder diffuse maligne Prozesse genauer einzugrenzen. Die ausgelöste Photosensibilisation von Tumoren in den verschiedenen Geweben kann für die selektive Zerstörung maligner Zellen durch die Photodynamische Therapie genutzt werden [131]. Divaris et al. [132] zeigten, dass sich nach intraperitonealer Zufuhr von 5-ALA bei der Maus PpIX sowohl in der Haut, im Blasenurothel und im Uterusendometrium stark anreichert und diese Gewebe sehr photosensibel werden. Die tieferliegenden Schichten dieser Gewebe besitzen jedoch nur eine geringe Photosensibilität, wodurch eine selektive Zerstörung oberflächlicher Tumoren ohne Perforationen der Organe durchgeführt werden kann.

5-ALA kann oral eingenommen werden und nach ungefähr vierstündiger Inkubationszeit zur Diagnostik von gastrointestinalen Präkanzerosen und Tumoren genutzt werden [133]. 5-ALA und seine Derivate werden des Weiteren in Form von Salben bei nichtkanzerösen Hauterkrankungen wie Akne, Schuppenflechte und Warzen therapeutisch eingesetzt [134]. Außerdem kann die PpIX-Fluoreszenz intraoperativ bei der Resektion von Hirntumoren genutzt werden. Hierbei wird eine vollständige Entfernung des Tumors ermöglicht und das gesunde Hirngewebe nicht geschädigt [135].

1.5.7 Endogene Porphyrine und Porphyrinerkrankungen

Photosensibilisation kann nicht nur nach Zugabe oder topischer Applikation eines Photosensibilisators auftreten, sondern auch durch endogene Bildung und Akkumulation von Photosensibilisatoren bei einigen Erkrankungen. Porphyrine sind die einzigen im Organismus selbst hergestellten Photosensibilisatoren. Bestes Beispiel hierfür sind die unterschiedlichen Porphyrinzwischenprodukte bei verschiedenen Porphyrinerkrankungen. Meist liegt eine hereditäre Störung der Hämbiosynthese vor und es kommt so zur Akkumulation des entsprechenden Porphyrinmetaboliten vor dem Enzymdefekt. Klinisch äußern sich diese häufig in einer Fotodermatose, Juckreiz und Dunkelfärbung des Urins. Außerdem können auch neurologische Symptome auftreten. Die Fotodermatose tritt vor allem bei der Porphyria cutanea tarda und der kongenitalen erythropoetischen Porphyrie auf [136].

McCall-Anderson [137] berichtete 1898 über zwei Brüder, die beide eine Sonnenlichtempfindlichkeit und Hämatoporphyrin im Urin hatten. Er vermutete, dass es einen Zusammenhang zwischen der Hautempfindlichkeit auf Licht und den Pigmenten im Urin gab.

Als erster klassifizierte Günther die Porphyrie in zwei Arbeiten [138,139], die 1911 und 1922 erschienen sind.

In nachfolgender Tabelle sind die verschiedenen Porphyrien mit den zugehörigen Enzymdefekten aufgeführt.

Enzym	Metabolit	Porphyrieerkrankung
	Glycin + Succinyl-CoA	
δ-Aminolävulinsäure-Synthetase	↓	Sideroblastische Anämie
	δ-Aminolävulinsäure	
δ-Aminolävulinsäure-Dehydratase	↓	ALS-Dehydratasedefekt-Porphyrie
	Porphobilinogen	
Porphobilinogen-Desaminase	↓	akute intermittierende Porphyrie
	Hydroxymethylbilan	
Uroporphyrinogen-III-Synthase	↓	congenitale erythropoetische Porphyrie
	Uroporphyrinogen III	
Uroporphyrinogen-Decarboxylase	↓	Porphyria cutanea tarda
	Koproporphyrinogen III	
Koproporphyrinogen-Oxidase	↓	hereditäre Koproporphyrie
	Protoporphyrinogen IX	
Protoporphyrinogen-Oxidase	↓	Porphyria variegata
	Protoporphyrin IX	
Ferrochelatase	↓	erythropoetische Protoporphyrie
	Häm	

Tabelle 4: Enzyme, Metabolite und Porphyrieerkrankungen bei entsprechenden Enzymdefekten

1.6 Fragestellungen der vorliegenden Dissertation

Mit vorliegender Dissertation sollen folgende Fragestellungen zu Hypericin und 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) erörtert und geklärt werden:

1. 5-ALA induziertes Protoporphyrin IX (PpIX)

- Charakterisierung der Aufnahmekinetik und des Metabolismus von 5-ALA induziertem PpIX in Medulloblastomzellen
- Bestimmung der Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Inkubationskonzentrationen und Inkubationszeiten
- Bestimmung der optimalen Inkubationskonzentration und Inkubationszeit

2. Hypericin

- Charakterisierung der Aufnahmekinetik bei Medulloblastomzellen
- Bestimmung der Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Inkubationskonzentrationen und Inkubationszeiten
- Bestimmung der optimalen Inkubationskonzentration und Inkubationszeit

3. Vergleich von Hypericin und 5-ALA induziertem PpIX

- Unterschied der benötigten Konzentrationen (Mikromol (μM) versus Millimol (mM))
- Vergleich der Fluoreszenzintensitäten bei verschiedenen Inkubationskonzentrationen und Inkubationszeiten

4. Vergleich der Methoden Fluoreszenzmikroskopie und Fluorescence activated cell sorting (FACS) anhand der Aufnahme von Hypericin bei Medulloblastomzellen

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Die verwendeten Medulloblastomzelllinien D283 Med, Daoy und D341 Med wurden bei der American Type Culture Collection, VA, USA erworben.

Name	D283 Med	Daoy	D341 Med
Bestellnummer	HTB-185	HTB-186	HTB-187
Herkunft	Homo sapiens (human)	Homo sapiens (human)	Homo sapiens (human)
Organ	Gehirn (Kleinhirn)	Gehirn (Kleinhirn)	Gehirn (Kleinhirn)
Morphologie	epithelial	polygonal	spheroid
Wachstum	multizelluläre Aggregate, Suspension, adhärenente Zellen	adhärent	Suspension
zelluläre Produkte	Neurofilament-Proteine (NFP)		Neurofilament-Proteine (NFP)

Tabelle 5: Eigenschaften der erworbenen Medulloblastomzelllinien

Je nach Versuch wurden eine oder drei verschiedene Zelllinien vergleichend untersucht.

2.1.2 Zellkulturbedingungen

Für die sterile Kultivierung der verschiedenen Zelllinien war es notwendig, die unterschiedlichen Arbeitsschritte unter der Sterilbank mit „laminar flow“ durchzuführen. Die Arbeitsflächen wurden vor Arbeitsbeginn mit Descosept AF von Dr. Schumacher GmbH/Germany gründlich gereinigt. Zum Pipettieren dienten sterile Einmalpipettenspitzen und Plastikpipetten. Es wurde ein spezielles Nährmedium (Minimum Essential Medium Eagle von ATCC/USA) verwendet, das mit 10 % fetalem Kälberserum (foetal calf serum, FCS)

(Biochrom AG Berlin) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin (10 000 IU/ml Penicillin und 10 000 µg/ml Streptomycin) von Invitrogen ergänzt wurde.

2.1.3 Kultivieren der Zellen

Die verschiedenen Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert. Zur Kultivierung wurden diese zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in eine T25 Zellkulturflasche (25 ml Tissue Culture Flask Falcon/Becton Dickinson/France) überführt und mit 5 ml Nährmedium versetzt. Die Zellen wuchsen dann im Brutschrank (Cellstar, NUNC, Wiesbaden, Germany) bei 5 % Kohlendioxid (CO₂) gesättigter Wasserdampfatmosfera und einer Temperatur von 37 °C innerhalb von 24 h adhären an. Nach spätestens 24 h Inkubationszeit wurde das mit Einfriermedium versetzte Nährmedium gewechselt, um den geringen Anteil an DMSO (Sigma-Aldrich Chemie/Germany) zu entfernen. Nach fünf bis sechs Tagen Wachstum bildeten die Zellen einen dichten Zellrasen und wurden dann in eine T75 Zellkulturflasche (Corning Incorporated/USA) mit 15 ml Nährmedium umgesetzt. Alle zwei Tage wurde das Nährmedium durch frisches Nährmedium, das zuvor auf 37 °C erwärmt wurde, ersetzt.

Nach vier bis fünf Tagen bildete sich ein gerade konfluierender Zellrasen aus. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen einmal mit 2 ml gepufferter Salzlösung (PBS) ohne Mg²⁺/Ca²⁺ gewaschen und mit 1 ml Accutase (PAA Laboratories GmbH, A-4061 Pasching, Austria) versetzt. Die Zellen wurden für 6 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die abgelösten Zellen mit 5 ml Nährmedium durch dreimal Auf- und Abpipettieren suspendiert. Die Zellen wurden dann im Verhältnis 1:2 aufgeteilt.

2.1.4 Zellzahlbestimmung und Wachstumskurven

Zur Beobachtung des Zellwachstums wurde die Zelllinie D283 Med verwendet. Mit Hilfe der Wachstumskurve konnte die optimale Wachstumsphase nach Aussaat der Medulloblastomzellen für die folgenden Versuche ermittelt werden. Es wurden 288 000 Zellen in eine kleine Gewebekulturschale (Cellstar von

Greiner bio-one/Germany), welche eine Fläche von 960 mm² hat, ausgesät. Dies entspricht 300 Zellen/mm². Die Zellen wurden dann über 6 Tage alle 24 h mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Aus vier aufeinander folgenden, unabhängigen Versuchen mit jeweiliger Doppelbestimmung wurden Wachstumskurven für die Medulloblastomzelllinie erstellt.

2.1.5 Einfrieren der Zellen

Zuerst wurde das Einfriermedium aus 5,1 ml Nährmedium, 0,6 ml FCS und 0,3 ml DMSO hergestellt und auf 4 °C gekühlt.

Ein dichter Zellrasen einer T75 Kulturflasche wurde mit 2 ml PBS ohne Mg²⁺/Ca²⁺ gewaschen und mit 1 ml Accutase abgelöst. Die Zellen wurden mit 5 ml Nährmedium suspendiert und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen (Greiner bio-one/Germany) überführt, 10 min bei 1000 Umdrehungen pro min zentrifugiert (Varifuge K von Heraeus Christ/Germany) und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit 6 ml 4 °C kaltem Einfriermedium resuspendiert. Damit wurden fünf Einfriertubes mit jeweils 1 ml Einfriermedium (enthält ungefähr 1x10⁶ Zellen) beladen. Die Einfriertubes wurden zunächst eine Stunde bei -20 °C, anschließend weiter 24 h bei -80 °C und schließlich in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

2.2 5-ALA-Ansatz

Für die Versuche 3.2.1.1, 3.2.1.2, 3.2.2.1 und 3.2.2.2 wurde 5-ALA der Firma medac GmbH (Deutschland) verwendet. Diese in Pulverform vorliegende Substanz besitzt ein Molekulargewicht von 167,59 g/mol.

Die gewünschten Konzentrationen wurden vor jedem Versuch neu angesetzt. Zuerst wurde eine 20mM Lösung mit Hilfe der folgenden Formel hergestellt.

$$\frac{\text{mg 5-ALA}}{\text{-----}} * 50\text{ml PBS} \rightarrow 20\text{mM 5-ALA-Lösung}$$

167,59 g/mol

2. Material und Methoden

Aus der 20 mM Lösung wurden schließlich mit Hilfe der folgenden Formel die in Tabelle 9 aufgeführten Konzentrationen hergestellt.

$$\frac{k}{20 \text{ mM}} * 5 \text{ ml} \rightarrow x \text{ ml 5-ALA} + 5 \text{ ml} - x \text{ ml DMSO}$$

k: gewünschte 5-ALA-Konzentration

x: errechneter Wert

Konzentration mM	0,6	1,2	3	6	9	12	15
5-ALA [ml]	0,15	0,3	0,75	1,5	2,25	3	3,75
PBS [ml]	4,85	4,7	4,25	3,5	2,75	2	1,25

Tabelle 6: Herstellung der 5-ALA-Konzentrationen aus der 20 mM Lösung

Für die Konzentrationsreihen wurden pro Konzentration 5 ml 5-ALA-Lösung hergestellt. Bei den Zeitreihen wurden je 25 ml der benötigten Konzentrationen bereitgehalten.

Zuletzt wurde der pH-Wert der einzelnen Verdünnungen mit Hilfe von pH-Fix Indikatorstäbchen (Grobabstimmung mit pH-Fix 0-14, Feinabstimmung mit pH-Fix 6,0-7,7, beide von Roth, Deutschland) auf 7,4 eingestellt.

2.3 Hypericinansatz

Für die Versuche 3.3.1, 3.3.2.1, 3.3.2.3, 3.3.3.1 und 3.3.3.2 wurde Hypericin der Firma Phytochem (Deutschland) verwendet. Dieses liegt in Pulverform mit 95 % Reinheit vor und besitzt ein Molekulargewicht von 504,45 g/mol.

Zunächst wurde eine 1 mM und 2 mM Stammlösung hergestellt. Dafür wurde das lipophile Hypericin in einer entsprechenden Menge DMSO gelöst und die Stammlösung wurde lichtgeschützt bei -20 °C gelagert.

Formel zur Herstellung der 1 mM bzw. 2 mM Lösung:

$$\frac{\text{mg Hypericin}}{504,45 \text{ g/mol}} * 1000 \text{ ml (500 ml) DMSO} \rightarrow 1 \text{ mM (2 mM) Stammlösung}$$

2. Material und Methoden

Die für die Versuche notwendigen Konzentrationen wurden kurz vor Versuchsbeginn aus den Stammlösungen mit folgender Formel hergestellt.

$$\frac{k}{1 \text{ mM}} * 150 \mu\text{l} \rightarrow x \mu\text{l Hypericin} + 150 \mu\text{l} - x \mu\text{l DMSO}$$

k: gewünschte Hypericinkonzentration

x: errechneter Wert

Für die Konzentrationsreihen wurden pro Konzentration 5 ml Hypericinlösung hergestellt. Bei den Zeitreihen wurden je 25 ml der benötigten Konzentrationen bereitgehalten.

Zuerst wurde die entsprechende Menge an DMSO in ein Eppendorftube (Eppendorfreaktionsgefäß, 1,5 ml, Nunc, Dänemark) vorgelegt und die zugehörige Menge der Stammlösung unter mehrmaligem resuspendieren zugegeben. Dadurch wurden jeweils 150 μl der gewünschten Konzentrationen der folgenden Tabelle erhalten.

Konzentration mM	Stammlösung = 1 mM					Stammlösung = 2 mM	
	0,1	0,2	0,25	0,5	1	1,5	2
Hypericin [ml]	15	30	37,5	75	150	112,5	150
DMSO [ml]	135	120	112,5	75	0	37,5	0

Tabelle 7: Herstellung der Hypericinkonzentrationen aus der Stammlösung

Im nächsten Verdünnungsschritt wurden 50 μl jeder Konzentration entnommen und jeweils in 0,5 ml FCS unter mehrfacher Resuspension in einem 15 ml Tube (Cellstar PP-Tubes 15 ml von Greiner bio-one, Deutschland) gelöst. Dieser Schritt sollte zu einer optimalen Löslichkeit der Hypericin-DMSO-Lösung führen. Schließlich wurden noch 4,5 ml Nährmedium unter mehrfacher Resuspension zugegeben. Damit wurden die gewünschten Konzentrationen von 1 μM , 2 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM und 20 μM erhalten.

2.4 Versuchsanordnungen, Durchführungen und Auswertungen

Die im Folgenden beschriebenen Versuchsanordnungen 2.4.1, 2.4.2, 2.4.3, 2.4.4 und 2.4.5 wurden in Dunkelheit durchgeführt, um Photobleaching und Phototoxizität zu vermeiden.

Sowohl die Konzentrationsreihen als auch die Zeitreihen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop und zur Bestätigung mit dem FACS-Gerät durchgeführt. Die Aufnahmekinetikversuche wurden ausschließlich mit dem FACS-Gerät untersucht.

Die zu messenden Zellen wurden zwei Tage vor Versuchsdurchführung für die Versuche 3.2.1.1, 3.2.1.2, 3.3.2.1 und 3.3.2.3 in 4 Well-Objektträger (4 Well Lab-Tek II Chamber Slide w/Cover RS Glass von Nunc/Dänemark) und für die Versuche 3.2.2.1, 3.2.2.2, 3.3.1, 3.3.3.1 und 3.3.3.2 in 24 Wellplatten (24 Well Cell Culture Cluster, Flat Bottom with Lid, Corning Incorporated, USA) ausgesät. Nach zwei Tagen wurde das Nährmedium gründlich abgesaugt und die Zellen durch zweimaliges Spülen mit je 1 ml PBS gewaschen um anschließend das Inkubationsmedium mit dem entsprechenden Photosensibilisator auf die Zellen zu pipettieren.

Mittels Kontrollproben, welche ohne Zugabe der Fluoreszenzstoffe 5-ALA bzw. Hypericin bei jedem Fluoreszenzmikroskopie- und FACS-Versuch zeitgleich inkubiert wurden, konnte die Autofluoreszenz der Zellen ermittelt werden. Diese Autofluoreszenzwerte von 5-ALA bzw. Hypericin stellen den Startpunkt der Kurven zum Zeitpunkt 0 dar.

Aus den gemessenen Hypericinwerten wurden zuerst mathematische Modelle generiert. Mit Hilfe der Statistiksoftware JMP 7 von SAS wurden die zugehörigen Kurven und die statistische Auswertung berechnet und erstellt. Über diese Software wurden auch die zwei Methoden Fluoreszenzmikroskopie und FACS miteinander verglichen.

Bei den 5-ALA-Werten wurde mit Hilfe der Software Microsoft[®] Excel 2000 zuerst der MAD berechnet, um mit Hilfe dieses Wertes die zugehörigen Kurven zu erstellen.

2.4.1 Aufnahmekinetik

Zur Untersuchung des Aufnahmeprozesses von Hypericin in die Medulloblastomzelle wurde ein „warm-kalt“ Versuch mit der Zelllinie D283 Med durchgeführt. Durch die Versuchsanordnung sollten Rückschlüsse auf eine aktive, passive oder gemischt aktiv-passive Hypericinaufnahme in die Zelle erfolgen. Der Versuch wurde mit einer 2,5 µM Hypericinlösung durchgeführt. Die Medulloblastomzellen wurden zwei Tage vor Versuchsbeginn in 24 Wellplatten angesetzt. Für den Kaltversuch wurden die Zellen, die Hypericinlösung und das PBS 1 h vor Versuchsbeginn im Kühlschrank auf 4 °C heruntergekühlt. Die Zellen, die Hypericinlösung und das PBS für den Warmversuch wurden im Brutschrank bzw. im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Hypericinlösung wurde bei Versuchsbeginn auf die Medulloblastomzellen pipettiert und dann für 2 h im Kühlschrank oder Brutschrank inkubiert. Nach 2 h wurden die Zellen des Kaltversuchs und die Zellen des Warmversuchs für weitere 2 h im Brutschrank inkubiert. Mit dieser Versuchsanordnung sollte gezeigt werden, dass die Zellen des Kaltversuchs nach zweistündiger Inkubation bei 4 °C noch vital sind. Die Messungen der Hypericinaufnahme erfolgten mittels FACS-Analyse nach 1, 2, 3 und 4 h. Die Messung der Autofluoreszenz erfolgte nach zweistündiger Inkubation ohne Photosensibilisator.

2.4.2 Konzentrationsreihen

Bei den Versuchen 3.2.1.1, 3.2.2.1, 3.3.2.1 und 3.3.3.1 wurde die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der Stoffe 5-ALA bzw. Hypericin von der zugegebenen Konzentration untersucht. Bei 5-ALA wurden die Konzentrationen 0,3 mM, 0,6 mM, 1,2 mM, 3 mM, 6 mM, 9 mM, 12 mM und 15 mM verwendet, bei Hypericin die Konzentrationen 1 µM, 2 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM und 20 µM. Die Zellen wurden mit den aufgeführten 5-ALA- bzw. Hypericinkonzentrationen für exakt 2 h inkubiert, um anschließend die Fluoreszenzintensität mit dem Fluoreszenzmikroskop bzw. FACS-Gerät zu messen.

2.4.3 Zeitreihen

Bei den Versuchen 3.2.1.2, 3.2.2.2, 3.3.2.3 und 3.3.3.2 wurde die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der Stoffe 5-ALA bzw. Hypericin bei ansteigenden Inkubationszeiten untersucht. Die Inkubationszeiten betragen 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min und 360 min. Bei 5-ALA wurden die Zeitreihen mit einer Konzentration von 6 mM durchgeführt, bei Hypericin wurden drei Konzentrationen (2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M) untersucht.

2.4.4 Durchführung und Auswertung der Fluoreszenzmikroskopieversuche

Pro Well wurde zunächst 1 ml des entsprechenden 5-ALA- bzw. Hypericin-Inkubationsmediums pipettiert. Nach Erreichen der Inkubationszeit wurde die Inkubationslösung zügig abgesaugt und die Zellen durch zweimaliges Spülen mit je 1 ml PBS gewaschen. Nach Ablösen des Objektträgerrahmens wurden vier Tropfen Eindeckmedium (DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium, DakoCytomation, USA) auf den Objektträger gegeben und die Zellen mit einem Deckglas (24 x 60 mm, Glasdicke 0,13-0,17 mm von R. Langenbrinck, Deutschland) abgedeckt. Nach 24 stündiger Aushärtung in einer Präparate-Mappe wurden je Konzentration bzw. Inkubationszeit 20 Zellen mittels Fluoreszenzmikroskop (BX60 von Olympus, Deutschland) mit 60-facher Vergrößerung (Objektiv Olympus PlanApo 60x/1,40 Oil) fotografiert und gemessen. Alle Fluoreszenzmikroskopieversuche wurden mit einer Belichtungszeit von 100 ms durchgeführt. Für die digitalen Bildaufnahmen diente die schwarz-weiß Digitalkamera U-CMAD-2 von Olympus. Bei den Hypericinversuchen wurde der Filterblock Olympus U-MWG2 verwendet, für die 5-ALA-Versuche der Filterblock F11-011 in einem Olympus U-MF2 Gehäuse von der Firma AHF Analysentechnik. Die Auswertung erfolgte mit der Software analySIS (Soft Imaging Systems, Deutschland). Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche durchgeführt.

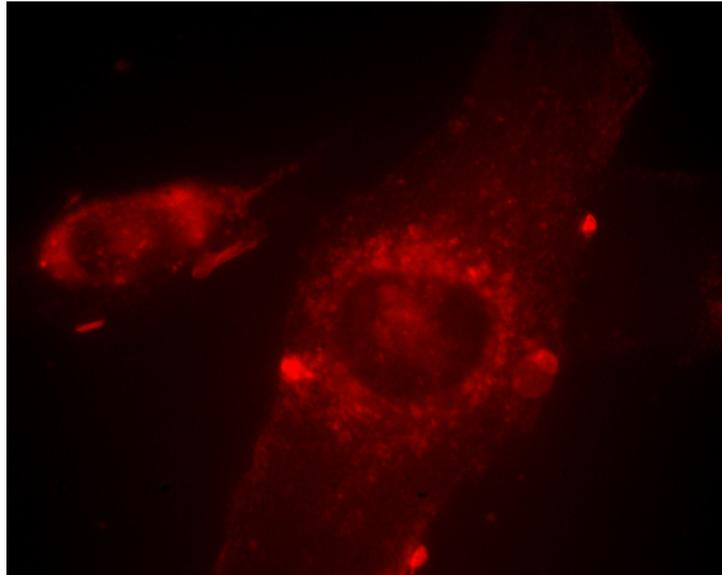


Abbildung 18: Fluoreszenzaufnahme von zwei Medulloblastomzellen nach Inkubation mit 20 μM Hypericin über 2 h. Die Hypericinfluoreszenz ist überwiegend im Zytoplasma lokalisiert, der Zellkern zeigt hingegen kaum Fluoreszenz.

2.4.5 Durchführung und Auswertung der FACS-Versuche

Pro Well wurde zunächst je 0,5 ml des entsprechenden 5-ALA- bzw. Hypericin-Inkubationsmediums pipettiert. Nach Erreichen der entsprechenden Inkubationszeit wurde die Inkubationslösung zügig abgesaugt und die Zellen durch zweimaliges Spülen mit je 1 ml PBS gewaschen. Zum Lösen der Zellen wurde pro Well 300 μl Accutase pipettiert und 6 min im Brutschrank inkubiert. Ein FACS-Röhrchen (FACS-Röhrchen 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube von BD Falcon, USA) wurde dann mit Zellen aus 4 Wells, die zuvor mehrmals resuspendiert wurden, beladen. Zur Vermeidung einer fehlerhaften FACS-Messung durch Zellkonglomerate wurden die Zellen vorsichtig durch ein feinmaschiges Metallgitter (Porengröße 100-112 μm ; Haver & Boecker, Oelde, Deutschland) in die FACS-Röhrchen gedrückt und somit voneinander getrennt. Die anschließende FACS-Analyse der Fluoreszenzintensitäten wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC) und Fluoreszenzkanal FL2 (585 nm). Für die Identifizierung der Zellpopulation wurde ein Punkthistogramm erstellt. Hierbei wurde das SSC-Signal (Granularität) gegen das FSC-Signal (Zellgröße) aufgetragen. Der

Fluoreszenzkanal FL2 diente als Parameter für die Hypericinaufnahme in die Zelle. Bei höchstmöglicher Durchflussgeschwindigkeit (high = 6 µl/min) des FACS-Gerätes wurden 2×10^5 Events erfasst. Folgende Geräteparameter wurden für Hypericin und 5-ALA verwendet.

Kanal	Verstärkung/Voltage	Modus
FSC	E-00	linear
SSC	358 V	linear
FL 1	150 V	linear
FL 2	400 V	logarithmisch
FL 3	400 V	logarithmisch

Tabelle 8: Geräteparameter des FACS-Gerätes

Unter Verwendung der Software CellQuest (BD CellQuest™ Software Version 4.0.2., Beckton Dickinson, Deutschland) wurde eine Region (gate) festgelegt, in welche die zu messende Medulloblastomzellpopulation eingegrenzt wurde. Events außerhalb dieses Bereiches wurden aus der Auswertung ausgeschlossen, da es sich hierbei um Zelltrümmer, wie zum Beispiel Zellorganellen, handelte. Bei der Messung wurden zwar alle Events gezählt, bei der Auswertung aber nur die Zellen berücksichtigt, die sich in dem festgelegten gate befanden.

2.5 Fluoreszenzmikroskopie

Seit die Fluoreszenzmikroskopie 1911 von Carl Friedrich Wilhelm Reichert (1851-1922) entwickelt wurde, erlebt diese seit ungefähr 15 Jahren wieder neuen Aufschwung. Diese erneute Blüte verdankt die Fluoreszenzmikroskopie zum einen zahlreich neuentwickelten, hochspezifischen Fluorochromen, zum anderen erfolgreich angewendeten neuen Ansätzen, wie beispielsweise der indirekten Fluoreszenzmikroskopie. Zudem wurden leistungsfähige Filter entwickelt und der Mikroskopaufbau verbessert. Die Durchlichtfluoreszenzmikroskope wurden von den Auflichtfluoreszenzmikroskopen abgelöst und

haben nur noch bei schwach vergrößernden Objektiven eine Bedeutung. Heute ist dieses Verfahren kaum mehr aus der *in vitro* Diagnostik weg zu denken.

Das Kernstück des Fluoreszenzmikroskops ist eine Konstruktion zwischen Objektiv und Okular. Diese besteht aus Anregungsfilter, dichromatischem Spiegel, auch Reflexions-Kurzpassfilter genannt, und Sperrfilter. Als Weißlichtquelle dient eine Xenon- oder Quecksilberhochdrucklampe.

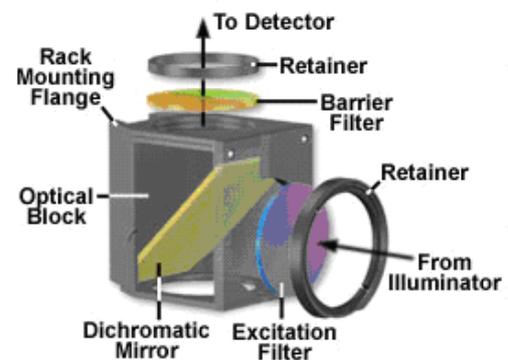
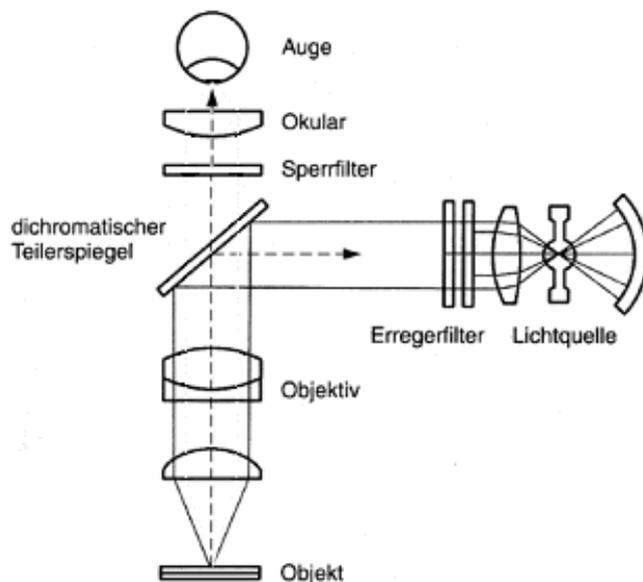


Abbildung 20: Fluoreszenzfilterblock

Abbildung 19: Strahlengang beim Auflichtfluoreszenzmikroskop

Durch den hinter der Lichtquelle montierten Anregungsfilter wird die zur Anregung des Fluorochroms benötigte Wellenlänge aus dem weißen Licht herausgefiltert, die restlichen Wellenlängen werden hingegen nicht durchgelassen. Das nächste Bauteil, der dichromatische Spiegel, besitzt eine kritische Wellenlänge. Das bedeutet, er reflektiert das kurzwelligere Anregungslicht vollständig zum Präparat hin, lässt aber das vom Präparat kommende längerwellige Fluoreszenzlicht Richtung Okular passieren. Die kritische Wellenlänge wird so gewählt, dass sie zwischen dem Anregungs- und Emissionsmaximum des Fluorochroms liegt. Letztlich wird durch den Sperrfilter nur der für das Fluorochrom spezifische Wellenlängenbereich zum Okular durchgelassen. Vom Präparat reflektiertes Anregungslicht und andere Fluoreszenzspektren werden zurückgehalten [140].

2. Material und Methoden

Zur Bildaufnahme dient eine Bildverstärker- oder CCD-Kamera, deren Detektorschicht direkt in die Bildebene des Fluoreszenzmikroskops eingebracht ist.

In der medizinischen Diagnostik erreicht die Fluoreszenzmikroskopie eine sehr hohe Nachweisempfindlichkeit und Spezifität. Nachteilig wirken sich die unspezifische Autofluoreszenz und das Photobleaching aus.

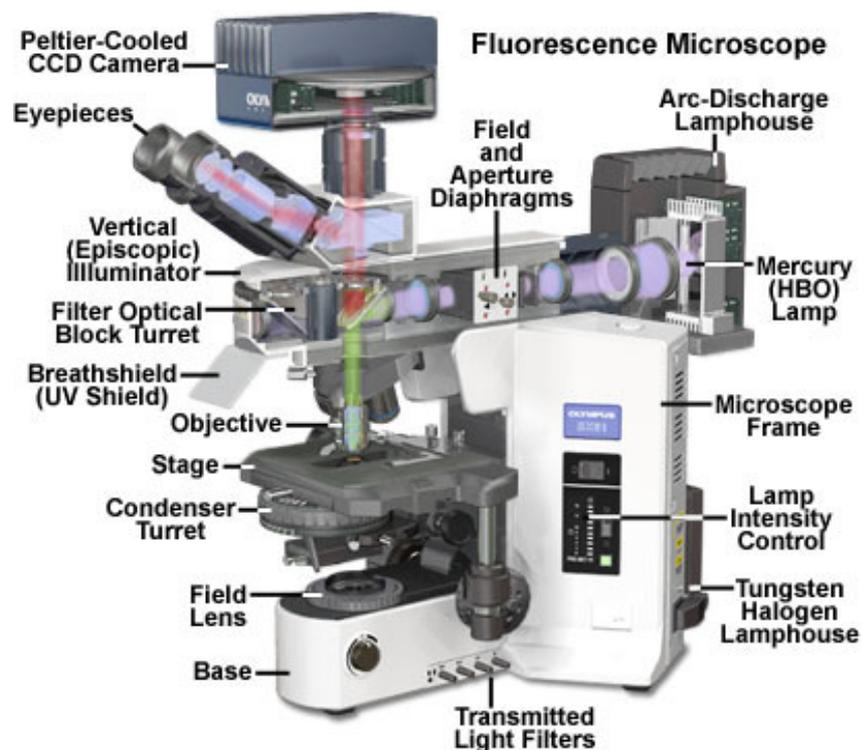
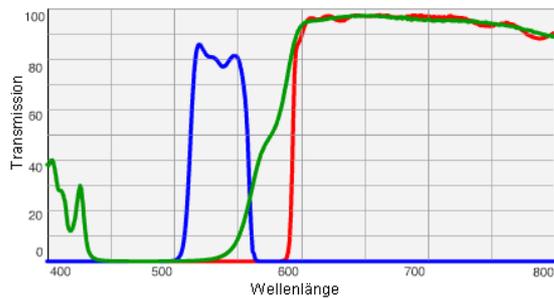


Abbildung 21: Verwendetes Fluoreszenzmikroskop BX60 mit 60-facher Vergrößerung und Objektiv Olympus PlanApo 60x/1,40 Oil

Bei den Hypericinversuchen wurde der Filterblock Olympus U-MWG2 verwendet.



Anregungsfilter:
Bandpassfilter (BP) 510-550 nm

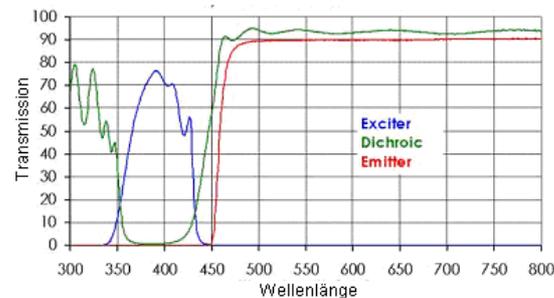
Dichromatischer Spiegel:
Reflektionskurzpassfilter (DS) 570 nm

Sperrfilter:
Langpassfilter (LP) 590 nm

■ BP 510-550 nm ■ DS 570 nm ■ LP 590 nm

Abbildung 22: Transmission und Wellenlänge des Hypericinfilters U-MWG2

Für die 5-ALA-Versuche wurde der Filterblock AHF Analysetechnik F11-011 in einem Olympus U-MF2 Gehäuse verwendet.



Anregungsfilter:
Bandpassfilter (BP) 340-440 nm

Dichromatischer Spiegel:
Reflektionskurzpassfilter (DS) 440 nm

Sperrfilter: Langpassfilter (LP) 460 nm

■ BP 340-440 nm ■ DS 440 nm ■ LP 460 nm

Abbildung 23: Transmission und Wellenlänge des 5-ALA-Filters F11-011

2.6 FACS-Analyse

2.6.1 Prinzip

FACS steht für Fluorescence activated cell sorting und beschreibt ein Verfahren, das sowohl in der Medizin als auch in der Biologie eingesetzt wird. Der Ausdruck "FACS" ist eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson. Synonym wird das Verfahren auch als Durchflusszytometrie bezeichnet. Das Prinzip der FACS-Analyse beruht auf der Emission von optischen Signalen der Zelle beim Durchlaufen eines Laserstrahls.

Die Ansaugung und Beschleunigung der Zellsuspension erfolgt über eine Kapillare. Anschließend passieren die Zellen einzeln den Laserstrahl in

konstantem Fluss. Zuvor erfolgt eine Vereinzelung der Zellen über den Geschwindigkeitsgradienten. Dabei emittiert die Zelle Streulicht, abhängig von Zellgröße, Zellwandstruktur und intrazellulären Bestandteilen. Somit kann Information über die unterschiedlichen Eigenschaften der Zelle gewonnen werden. Des Weiteren können die Zellen so in unterschiedliche Fraktionen getrennt werden.

Das Licht wird in zwei verschiedene Richtungen gestreut, die als Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) ermittelt werden können, wobei über FCS die Zellgröße und über SSC die Granularität der Zelle bestimmt wird.

Über Fluoreszenzkanäle können des Weiteren angeregte Fluoreszenzfarbstoffe erfasst werden. Diese Fluoreszenz kann durch zelleigene Proteine, markierte Antikörper oder angefärbte Zellbestandteile bedingt sein. Aufgrund dieser weiteren Eigenschaft ist auch eine Trennung der Zellen möglich.

Das bei den einzelnen Experimenten verwendete Durchflusszytometer FACSSort (Becton Dickinson, San Jose CA, USA) regt mit einem Argon-Ionen-Laser (Excitation=488 nm, 15 mW) an.

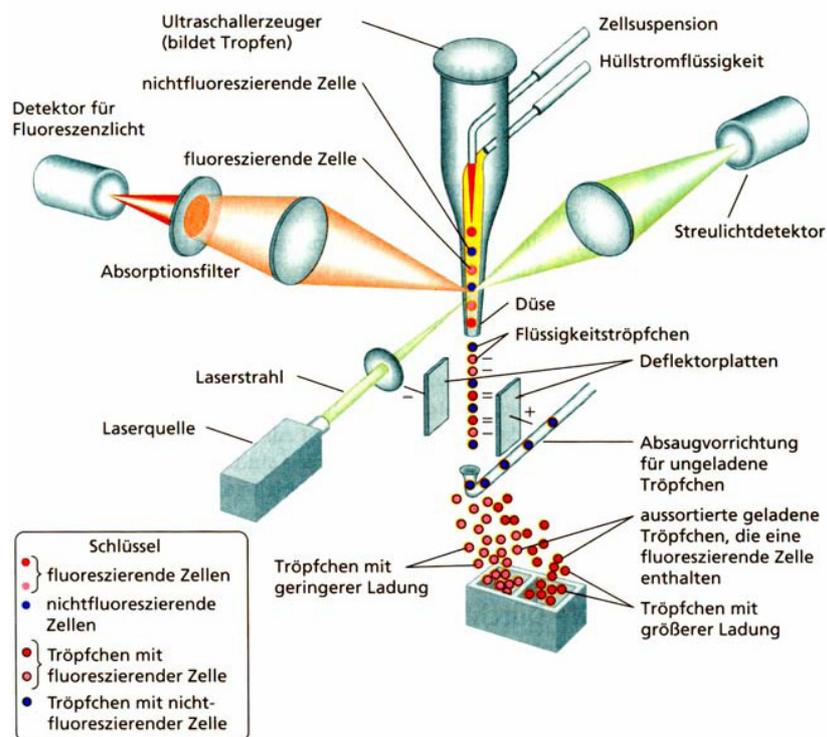


Abbildung 24: Schematische Darstellung eines FACS-Gerätes

2.6.2 Lichtdetektion

Bei Passage des Laserstrahls wird ein Teil des Anregungslichts in zwei Richtungen gestreut. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter light, FSC, 488 +/- 5 nm) wird in Richtung (1,5-10°) des Laserstrahls von einem Festkörpersiliziumdetektor und das Seitwärtsstreulicht (side scatter light, SSC, 488 +/- 5 nm) wird senkrecht (90°) zum Laserstrahl vom einem Photomultiplier erfasst und verstärkt.

Auch das Fluoreszenzsignal wird in der 90°-Richtung detektiert. Über dichroitische Spiegel und Strahlenteiler wird dieses Signal vom SSC separiert und weiter getrennt. Eine Messung des Signals erfolgt nun an den drei Fluoreszenzkanälen FL1-3 und eine Verstärkung wird über einen gekoppelten Photomultiplier erreicht.

Die Fluoreszenzkanäle des verwendeten FACS hatten folgenden Eigenschaften:

- Fluoreszenz 1 (FL1): 530 +/- 15 nm Bandpass
- Fluoreszenz 2 (FL2): 585 +/- 21 nm Bandpass
- Fluoreszenz 3 (FL3): 670 nm Langpass

Die erfassten Parameter (SSC, FSC, FL1-3) wurden dann an einen Computer übermittelt und über eine zugehörige Software ausgewertet [141].

2.7 Statistische Auswertung

Die Vergleiche der verschiedenen Methoden Fluoreszenzanalyse und FACS-Analyse wurden durch die Bestimmung der Korrelation der verschiedenen Modelle erreicht. Sowohl für die statistischen Berechnungen als auch für die graphischen Darstellungen wurde die Software JMP 7 von SAS verwendet. Für die Auswertung und graphische Darstellung der Daten, die bei den Konzentrationsreihen und Zeitreihen mit 5-ALA gewonnen wurden, wurde die Software Microsoft® Excel 2000 verwendet. Ebenfalls wurde diese Software bei den Wachstumskurven und den Aufnahmekinetikversuchen verwendet. Mit

Hilfe dieser Software wurde aus den gemessenen Daten der Median berechnet, um anschließend die zugehörigen Verlaufskurven graphisch darzustellen. Zudem wurde zur Bestimmung des Fehlerquotienten der Median der absoluten Abweichung des Medians (MAD) (englisch: median absolute deviation) jedes Wertes in Bezug zum Median errechnet und hiervon wiederum der Median gebildet. Der Median des +/- MAD wurde dann bei den Verlaufskurven parallel zur y-Achse als Balken aufgetragen.

2.7.1 Konzentrationsreihen der Hypericinversuche

Zur Berechnung der konzentrationsabhängigen Kurven wurde mit Hilfe der Statistiksoftware JMP 7 von SAS ein nichtlineares Modell mit drei Parametern erstellt:

$$FI(k) = b + (A - b)(1 - \exp^{-ak})$$

Modell 1a: FI entspricht der Fluoreszenzintensität [w.E.] in Abhängigkeit der Hypericinkonzentration k , b der zellulären Autofluoreszenz [w.E.] und A der Asymptote, welcher sich die Kurve annähert. α beschreibt die Anstiegsrate der Fluoreszenzintensität.

Anschließend wurden über die geometrischen Mittelwerte die Daten in Abhängigkeit von der Hypericinkonzentration graphisch in einem Schaubild dargestellt. Parallel zur y-Achse wurden mittels Balken die 95 % Vertrauensintervalle der Mittelwerte aufgetragen.

2.7.2 Zeitreihen der Hypericinversuche

Für die Auswertung und graphische Darstellung der Daten, die bei den Hypericin-Zeitreihen mittels FACS-Analyse gewonnen wurden, wurde Modell 1b verwendet werden.

$$FI(t) = b + (A - b)(1 - \exp^{-at})$$

Modell 1b: FI entspricht der Fluoreszenzintensität [w.E.] in Abhängigkeit der Inkubationszeit t , b der zellulären Autofluoreszenz [w.E.] und A der Asymptote, welcher sich die Kurve annähert. α beschreibt die Anstiegsrate der Fluoreszenzintensität.

Bei den Fluoreszenzmikroskopieversuchen der Hypericin-Zeitreihen erstellten wir zur Berechnung der Kurven mit Hilfe der Statistiksoftware JMP 7 von SAS ein Kompartiment-Modell mit vier Parametern, um dem möglichen zeitabhängigen Fluoreszenzabfall gerecht zu werden:

$$FI(t) = \frac{\alpha * B}{\alpha - \gamma} * (\exp(-(\gamma * t)) - \exp(-\alpha * t)) + b$$

Modell 2: FI entspricht der Fluoreszenzintensität [w.E.] in Abhängigkeit der Zeit t [min], α der Anstiegsrate der Fluoreszenzintensität, γ der Abfallsrate der Fluoreszenzintensität (z.B. durch Photobleaching) und b der Autofluoreszenz. B stellt einen Skalierungsfaktor dar.

Anschließend wurden über die geometrischen Mittelwerte die Daten in Abhängigkeit von der Zeit graphisch in einem Schaubild dargestellt. Parallel zur y-Achse wurden mittels Balken die 95 % Vertrauensintervalle der Mittelwerte aufgetragen.

2.7.3 Vergleich von Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse

Für den Vergleich der Methoden Fluoreszenzmikroskopie und FACS bei der Hypericinaufnahme in Medulloblastomzellen wurden sowohl bei den Konzentrationsversuchen als auch bei den Zeitversuchen die Anstiegsraten α

beider Methoden miteinander verglichen. Diese Anstiegsraten α wurden über das Modell 1a bei den Konzentrationsreihen bzw. über das Modell 1b und Modell 2 bei den Zeitreihen berechnet. Die konzentrationsabhängigen bzw. die zeitabhängigen Kurven beider Methoden wurden graphisch in einem Schaubild aufgetragen.

3. Ergebnisse

3.1 Wachstumskurven der Medulloblastomzelllinie D283 Med

Zur Beobachtung des Wachstumsverhaltens der Medulloblastomzellen wurde die Zelllinie D283 Med verwendet und an über 6 aufeinander folgenden Tagen ausgezählt. Am Tag 0 wurden 300 Zellen/mm² ausgesät. Aus vier aufeinander folgenden, unabhängigen Versuchen mit jeweiliger Doppelbestimmung wurde eine Wachstumskurve aus dem Median der einzelnen Versuche für die Medulloblastomzelllinie erstellt. Anhand der Wachstumskurve konnte der optimale Zeitpunkt für die Versuchsdurchführung ermittelt werden.

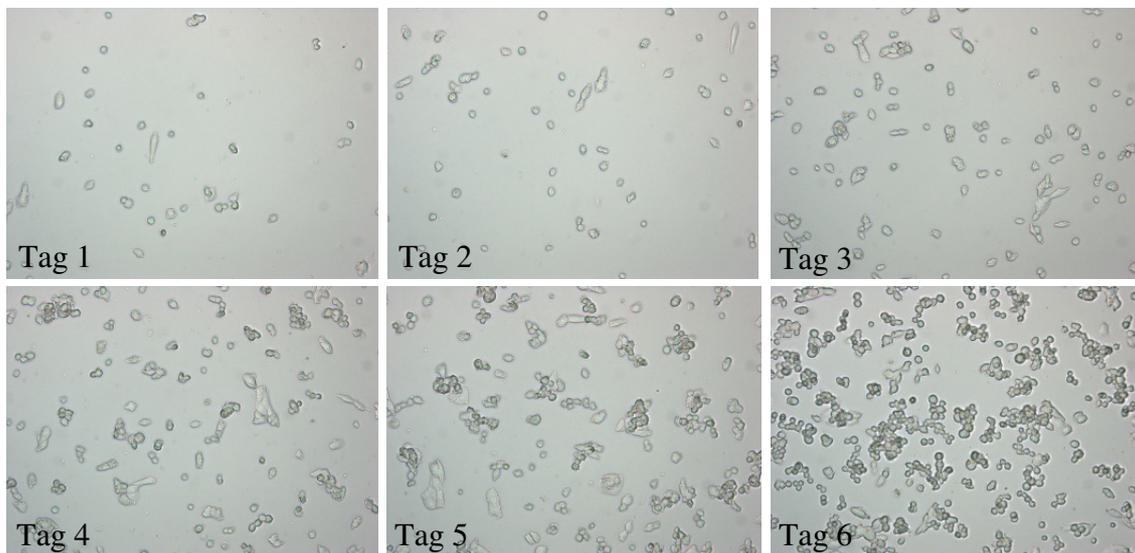


Abbildung 25: Dargestellt ist das Zellwachstum der Zelllinie D283 Med. Mittels Fluoreszenzmikroskop BX60 von Olympus ist alle 24 h über 6 Tage ein Bild (von links nach rechts und von oben nach unten) mit zwanzigfacher Vergrößerung aufgenommen worden.

Tage	0	1	2	3	4	5	6
Zellzahl/mm ²	300	618	1009	1768	3167	6048	7113

Tabelle 9: Die Zellzahl/mm² wurde aus dem Median der vier unabhängig durchgeführten Experimente mit Doppelbestimmung berechnet. Am Tag 0 wurden jeweils 300 Zellen/mm² ausgesät.

3. Ergebnisse

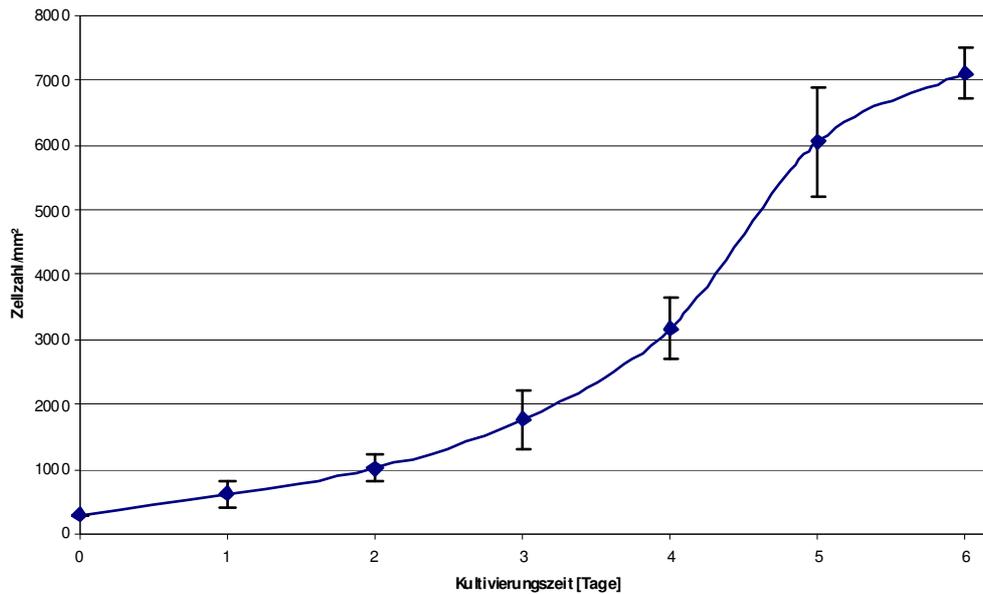


Abbildung 26: Das Schaubild zeigt die zeitabhängige Wachstumskurve der Medulloblastomzelllinie D283 Med, welche aus den Median der vier unabhängigen Versuche in Doppelbestimmung berechnet wurde. Zum Zeitpunkt 0 wurden jeweils 300 Zellen/mm² ausgesät. Die +/- MADs sind als parallele Balken zur y-Achse aufgetragen.

Als optimalen Zeitpunkt für die Versuchsdurchführung wählten wir eine Kultivierungszeit von 5 Tagen, da zu diesem Zeitpunkt ungefähr das Maximum der Proliferationsrate der Zellen erreicht wurde.

3.2 5-ALA

3.2.1 Fluoreszenzmikroskopie

3.2.1.1 Konzentrationsreihen

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde die konzentrationsabhängige 5-ALA induzierte PpIX-Fluoreszenzintensität bei der Zelllinie D283 Med in drei unabhängigen Versuchen mit jeweiliger Doppelbestimmung ermittelt. Die Zellen wurden mit aufsteigenden 5-ALA-Konzentrationen von 0,3 mM, 0,6 mM, 1,2 mM, 3 mM, 6 mM, 9 mM, 12 mM und 15 mM über 2 h bei 37 °C inkubiert.

Bei allen folgenden Versuchen wurde die Autofluoreszenz der Zellen bestimmt. Dazu wurden parallel zu allen Versuchen Zellen ohne Zusatz von 5-ALA inkubiert und jeweils nach zweistündiger Inkubation mittels

3. Ergebnisse

Fluoreszenzmikroskopie bzw. FACS-Analyse gemessen. Die erhaltenen Werte stellten die Autofluoreszenz zum Zeitpunkt 0 dar.

Bei den 5-ALA-Konzentrationsreihen konnte eine Zunahme der Fluoreszenzintensität um 20 % bis zu einer Konzentration von 1,2 mM 5-ALA gezeigt werden. Höhere Konzentrationen führten zu keinem weiteren nennenswerten Anstieg der Fluoreszenzintensität.

5-ALA-Konz [mM]	0	0,3	0,6	1,2	3	6	9	12	15
FI [w.E.]	204	226	243	247	250	253	253	254	255

Tabelle 10: Mediane Fluoreszenzintensitäten (FI) [w.E.] von 5-ALA induziertem PpIX in der Medulloblastomzelllinie D283 Med in Abhängigkeit der 5-ALA-Konzentration (Konz) bei einer Inkubationszeit von 2 h.

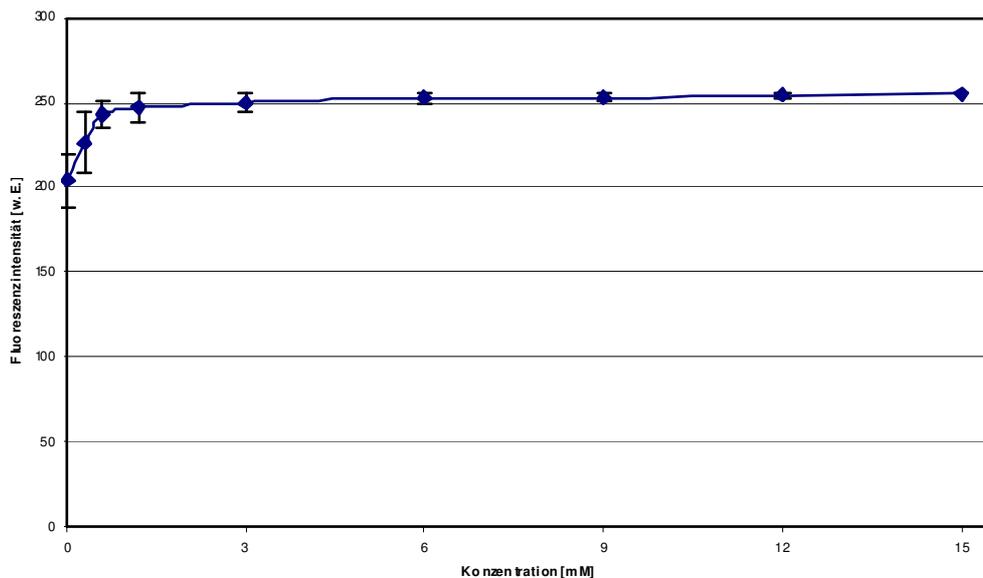


Abbildung 27: Mediane Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von 5-ALA induziertem PpIX in der Medulloblastomzelllinie D283 Med in Abhängigkeit der 5-ALA-Konzentration bei einer Inkubationszeit von 2 h. Die parallel zur y-Achse aufgetragenen Balken entsprechen den \pm MADs. Die Daten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie gewonnen.

3.2.1.2 Zeitreihen

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde die zeitabhängige 5-ALA induzierte PpIX-Fluoreszenzintensität bei der Zelllinie D283 Med in drei unabhängigen Versuchen mit jeweiliger Doppelbestimmung ermittelt. Die Zellen wurden für 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min und 360 min mit 6 mM 5-ALA bei 37 °C inkubiert.

Dabei zeigte sich eine Zunahme der Fluoreszenzintensität um maximal 10 % bei 10 min Inkubationszeit. Bei längerer Inkubationszeit zeigte sich ein leichter Abfall der Fluoreszenzintensität. Nach 360 min lag die Fluoreszenzintensität nur noch ca. 5 % über der Autofluoreszenz. Zudem ergab sich eine große Streuung der einzelnen MADs.

Zeit [min]	0	5	10	15	30	60	90	120	180	240	360
FI [w.E.]	453	485	502	496	498	495	492	490	487	494	477

Tabelle 11: Mediane Fluoreszenzintensitäten (FI) [w.E.] von 5-ALA induziertem PpIX in der Medulloblastomzelllinie D283 Med in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei einer 5-ALA-Konzentration von 6 mM.

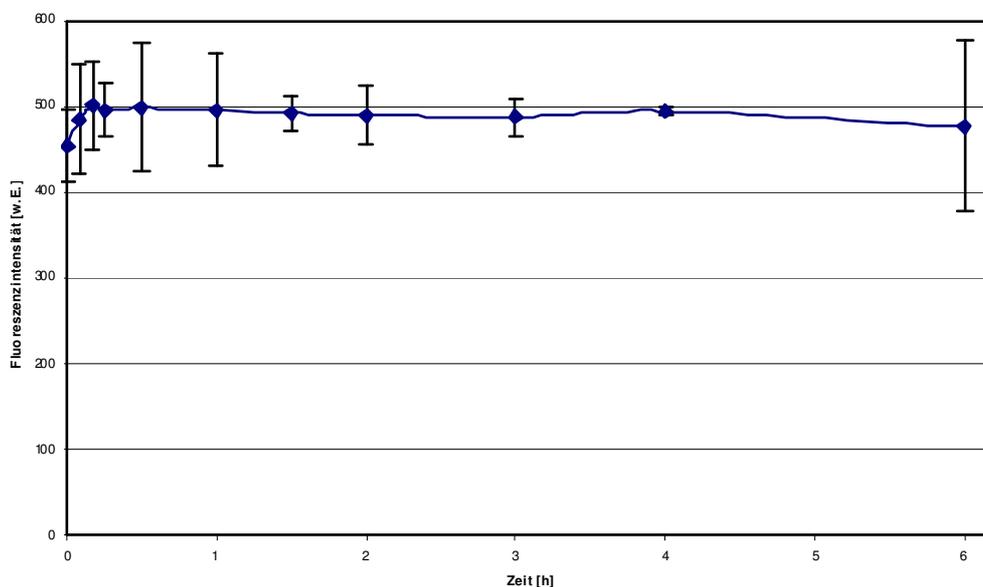


Abbildung 28: Mediane Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von 5-ALA induziertem PpIX in der Medulloblastomzelllinie D283 Med in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei einer 5-ALA-Konzentration von 6 mM. Die parallel zur y-Achse aufgetragenen Balken entsprechen den +/- MADs. Die Daten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie gewonnen.

3.2.2 FACS-Analyse

3.2.2.1 Konzentrationsreihen

Mit Hilfe der FACS-Analyse wurde die konzentrationsabhängige 5-ALA induzierte PpIX-Fluoreszenzintensität bei der Zelllinie D283 Med in drei unabhängigen Versuchen mit jeweiliger Doppelbestimmung ermittelt. Die Zellen wurden mit aufsteigenden 5-ALA-Konzentrationen von 0,6 mM, 1,2 mM, 3 mM, 6 mM, 9 mM, 12 mM und 15 mM über 2 h bei 37 °C inkubiert.

Bei den 5-ALA-Konzentrationsreihen konnte eine Zunahme der Fluoreszenzintensität um ca. 10 % bis zu einer Konzentration von 1,2 mM 5-ALA gezeigt werden. Höhere Konzentrationen führten zu keinem weiteren signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität. Weiterhin zeigten sich große Schwankungen der MADs. Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch bei der Fluoreszenzmikroskopie erzielt.

Konz [mM]	0	0,6	1,2	3	6	9	12	15
FI [w.E.]	1,98	2,19	2,28	2,23	2,24	2,30	2,20	2,22

Tabelle 12: Mediane Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von 5-ALA induziertem PpIX in der Medulloblastomzelllinie D283 Med in Abhängigkeit der 5-ALA-Konzentration (Konz) bei einer Inkubationszeit von 2 h.

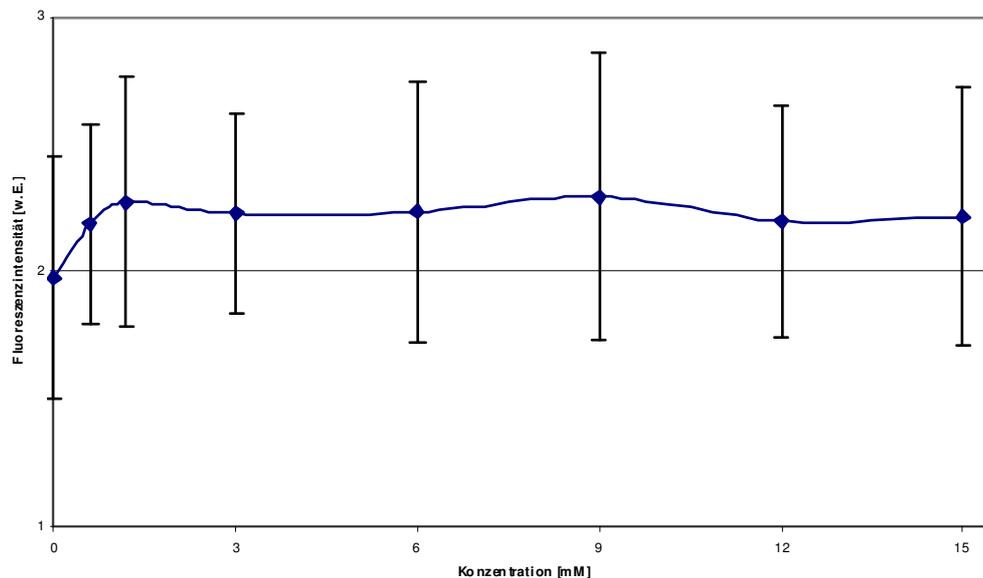


Abbildung 29: Mediane Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von 5-ALA induziertem PpIX in der Medulloblastomzelllinie D283 Med in Abhängigkeit der 5-ALA-Konzentration bei einer Inkubationszeit von 2 h. Die parallel zur y-Achse aufgetragenen Balken entsprechen den +/- MADs. Die Daten wurden mittels FACS-Analyse gewonnen.

3.2.2.2 Zeitreihen

Mit Hilfe der FACS-Analyse wurde die zeitabhängige 5-ALA induzierte PpIX-Fluoreszenzintensität bei der Zelllinie D283 Med in drei unabhängigen Versuchen mit jeweiliger Doppelbestimmung ermittelt. Die Zellen wurden für 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min und 360 min mit 6 mM 5-ALA bei 37 °C inkubiert.

Dabei kam es bis 15 min Inkubationszeit zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität um ca. 10 %. Zwischen 30 und 90 min kam es zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität unter das Autofluoreszenzniveau, um dieses wieder bei 120 min zu erreichen. Die höchste Fluoreszenzintensität wurde bei 360 min erreicht. Diese lag ca. 13 % über der Autofluoreszenz. Insgesamt zeigte sich ein wellenförmiger Kurvenverlauf ohne eindeutige Tendenz. Wiederum ergab sich eine große Streuung der MADs. Ähnliche Ergebnisse, besonders bei der maximalen Fluoreszenzintensität, erbrachte die Fluoreszenzmikroskopie.

Zeit [min]	0	5	10	15	30	60	90	120	180	240	360
FI [w.E.]	2,06	2,21	2,19	2,28	2,00	1,91	2,04	2,08	2,32	2,17	2,37

Tabelle 13: Mediane Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von 5-ALA induziertem PpIX in der Medulloblastomzelllinie D283 Med in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei einer 5-ALA-Konzentration von 6 mM.

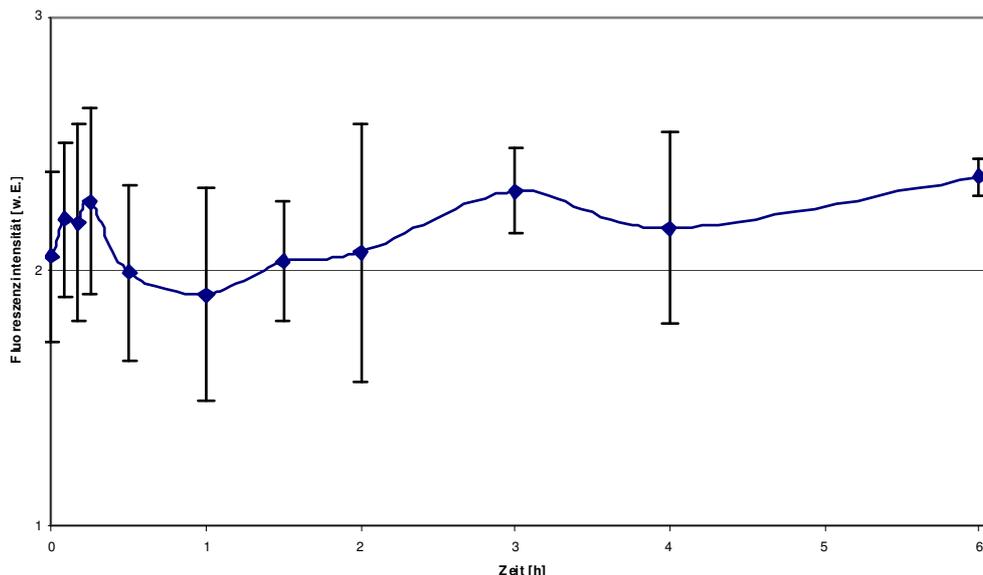


Abbildung 30: Mediane Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von 5-ALA induziertem PpIX in der Medulloblastomzelllinie D283 Med in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei einer 5-ALA-Konzentration von 6 mM. Die parallel zur y-Achse aufgetragenen Balken entsprechen den +/- MADs. Die Daten wurden mittels FACS-Analyse gewonnen.

3.3 Hypericin

3.3.1 Aufnahmekinetik und zelluläre Transportmechanismen

Zur Untersuchung des Aufnahmeprozesses von Hypericin in Medulloblastomzellen wurde ein „warm-kalt“ Versuch mit der Zelllinie D283 Med durchgeführt. Mit dieser Versuchsanordnung wurde der Transportmechanismus von Hypericin in die Zelle untersucht. Geklärt werden sollte, ob es sich um einen aktiven oder passiven Transport handelt.

Die durch die FACS-Analyse gemessene Fluoreszenzintensität des Kaltversuchs wurde mit der Fluoreszenzintensität des Warmversuchs ins prozentuale Verhältnis gesetzt. Dabei erreichten die Zellen beim Kaltversuch bei einstündiger Inkubation nur 17 % bzw. bei zweistündiger Inkubation nur 19 % der Fluoreszenzintensität der Zellen des Warmversuchs. Um zu beweisen, dass die Zellen nach einer zweistündigen Inkubationszeit noch vital waren, wurden die Zellen anschließend weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Dabei erreichten die Zellen des Kaltversuchs nach 3 h 56 % bzw. nach 4 h 90 % der Fluoreszenzintensität der Zellen, welche die komplette Zeit bei 37 °C inkubiert wurden.

Aufgrund der Beobachtungen, dass beim Kaltversuch nur ca. 1/5 der Fluoreszenzintensität des Warmversuchs erreicht wurde, kann von einem überwiegend aktiven Transport von Hypericin in Medulloblastomzellen ausgegangen werden. Der deutliche Anstieg der Fluoreszenzintensität bei Erhöhung der Inkubationstemperatur nach 2 h ist durch den wieder in Gang kommenden aktiven Aufnahmetransport von Hypericin zu erklären. Damit ist die Vitalität der Zellen bewiesen.

3. Ergebnisse

	Warmversuch 4 h bei 37 °C	Kaltversuch 2 h bei 4 °C und 2 h bei 37 °C	
Zeit	Fluoreszenzintensität [w.E.]	Fluoreszenzintensität [w.E.]	Prozent [%]
0	9	7	
1	355	61	17 %
2	670	128	19 %
3	901	505	56 %
4	1022	918	90 %

Tabelle 22: Mediane Fluoreszenzintensität der mit Hypericin inkubierten Zellen bei 37 °C und 4 °C. Die Fluoreszenzintensität des Kaltversuchs wurde in das prozentuale Verhältnis [%] zur Fluoreszenzintensität des Warmversuchs gesetzt. Die Daten wurden mittels FACS-Analyse gewonnen.

In der folgenden Abbildung sind die beiden Kurven des „warm-kalt“ Versuchs dargestellt. Die blaue Kurve spiegelt die Fluoreszenzintensität des Kaltversuchs wider. Während der zweistündigen Inkubation bei 4 °C hat die Kurve einen flachen Verlauf. Nach 2 h ist ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität zu sehen. Wie schon erwähnt, ist dies durch die Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 37 °C und den dadurch wieder in Gang kommenden aktiven Aufnahmetransport von Hypericin zu erklären.

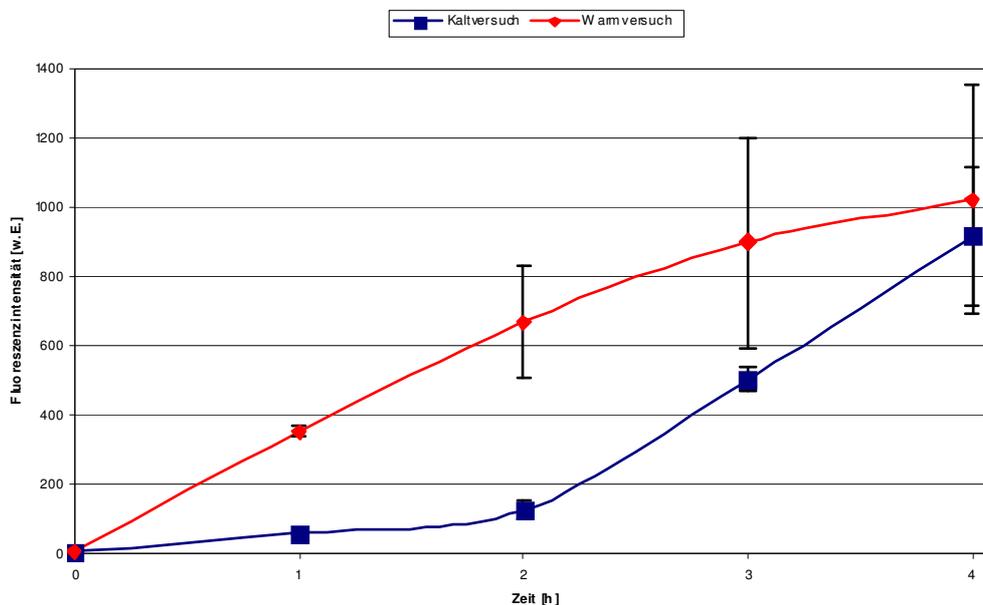


Abbildung 31: Aufnahmekinetik der Zelllinie D283 Med. Die blaue Kurve stellt die zweistündige mediane Hypericinaufnahme bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C dar. Nach 2 h wurden die Zellen für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Die rote Kurve stellt die mediane Hypericinaufnahme bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C dar. Die Daten wurden mittels FACS-Analyse gewonnen.

3.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

3.3.2.1 Konzentrationsreihen

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde die konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensität bei den Zelllinien D283 Med, D341 Med und Daoy in drei unabhängigen Versuchen mit jeweiliger Doppelbestimmung ermittelt. Die Zellen wurden mit aufsteigenden Hypericinkonzentrationen von 1 μM , 2 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM und 20 μM über 2 h bei 37 °C inkubiert.

Dabei zeigte sich ein schneller und signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität bis zu einer Konzentration von 10 μM , um dann bei höheren Konzentrationen in einen etwas flacheren Kurvenverlauf der Fluoreszenzintensität überzugehen. Bei 10 μM wurde im Schnitt eine Zunahme der Fluoreszenzintensität um etwa das 5-fache, bei 20 μM eine 7 bis 8-fache Zunahme der Fluoreszenzintensität im Verhältnis zur Autofluoreszenz gemessen.

In folgender Tabelle sind die geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von Hypericin der drei Medulloblastomzelllinien D283 Med, D341 Med und Daoy in Abhängigkeit der Hypericinkonzentration aufgetragen. Die Daten wurden mit Hilfe der FACS-Analyse gewonnen.

Konz [μM]	FI [w.E.]		
	D283 Med	D341 Med	Daoy
0	93	93	90
1	186	168	155
2	255	216	200
2,5	282	218	237
5	390	334	381
10	516	476	504
15	711	595	624
20	800	698	697

Tabelle 14: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von Hypericin der drei Medulloblastomzelllinien D283 Med, D341 Med und Daoy in Abhängigkeit der Hypericinkonzentration (Konz) bei einer Inkubationszeit von 2 h.

3. Ergebnisse

Über das nichtlineare Modell 1a (siehe Kapitel 2.7.1) wurden die einzelnen Kurven der drei Zelllinien berechnet und in den folgenden drei Schaubildern dargestellt.

$$FI(k) = b + (A - b)(1 - \exp^{-ak})$$

Modell 1a: FI entspricht der Fluoreszenzintensität [w.E.] in Abhängigkeit der Hypericinkonzentration k , b der zellulären Autofluoreszenz [w.E.] und A der Asymptote, welcher sich die Kurve annähert. α beschreibt die Anstiegsrate der Fluoreszenzintensität.

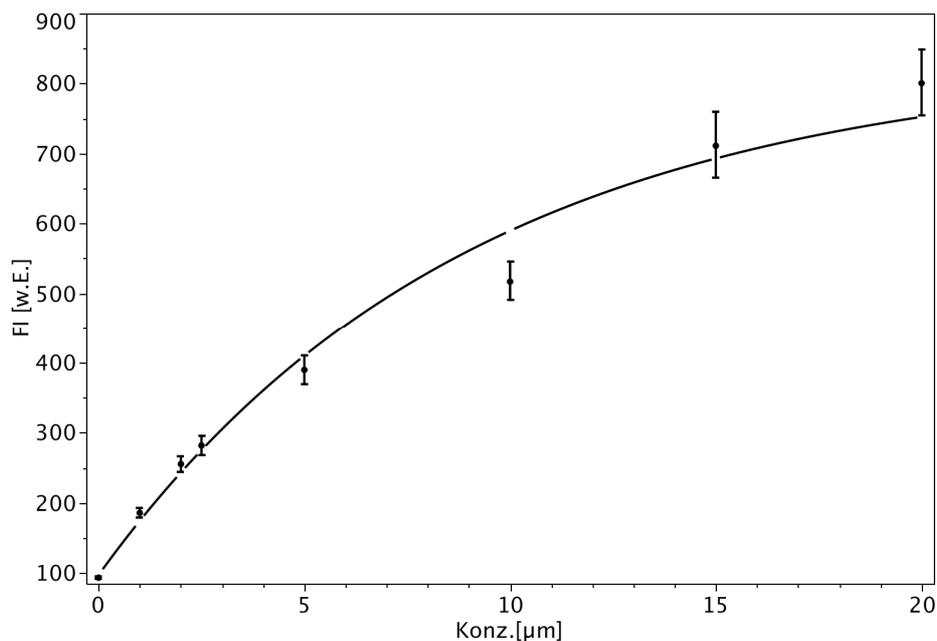


Abbildung 32: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von Hypericin in der Medulloblastomzelllinie D283 Med in Abhängigkeit der Hypericinkonzentration (Konz) bei einer Inkubationszeit von 2 h. Die parallel zur y-Achse aufgetragenen Balken entsprechen den 95 % Vertrauensintervallen der Mittelwerte. Die Daten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie gewonnen.

3. Ergebnisse

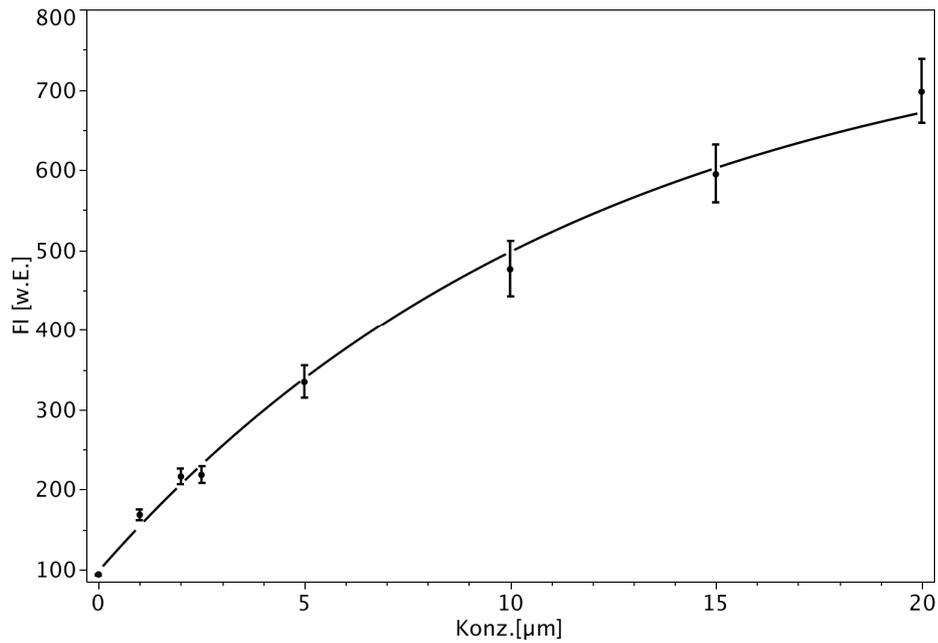


Abbildung 33: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von Hypericin in der Medulloblastomzelllinie D341 Med in Abhängigkeit der Hypericinkonzentration (Konz) bei einer Inkubationszeit von 2 h. Die parallel zur y-Achse aufgetragenen Balken entsprechen den 95 % Vertrauensintervallen der Mittelwerte. Die Daten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie gewonnen.

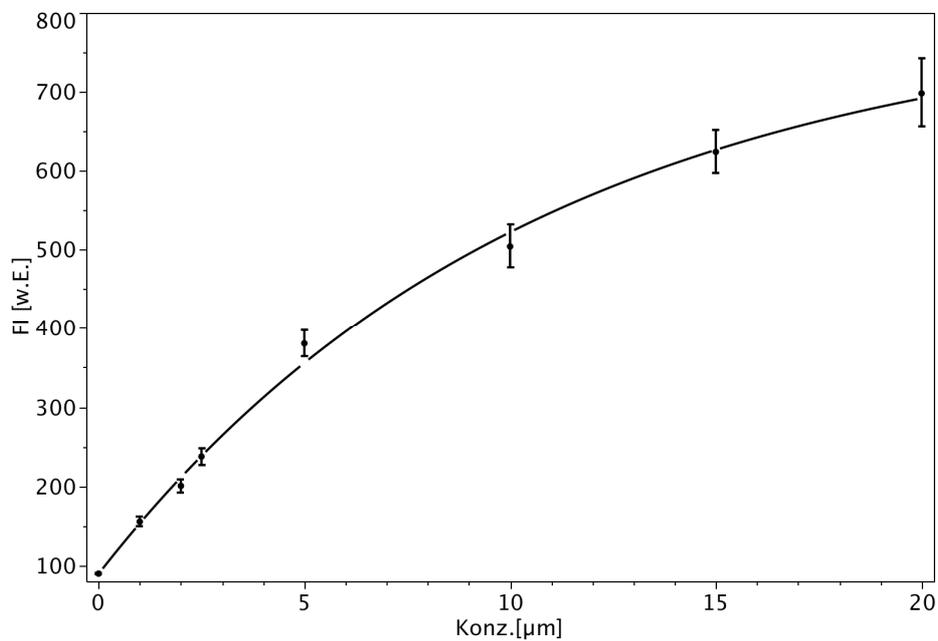


Abbildung 34: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von Hypericin in der Medulloblastomzelllinie Daoy in Abhängigkeit der Hypericinkonzentration (Konz) bei einer Inkubationszeit von 2 h. Die parallel zur y-Achse aufgetragenen Balken entsprechen den 95 % Vertrauensintervallen der Mittelwerte. Die Daten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie gewonnen.

3.3.2.2 Vergleich der Konzentrationsreihen

Zum Vergleich der drei Zelllinien D283 Med (rote Kurve), D341 Med (grüne Kurve) und Daoy (blaue Kurve) wurden diese in einem Schaubild aufgetragen. Dabei fällt die stärkere Zunahme der Fluoreszenzintensität der Zelllinie D283 Med im Vergleich zu den Zelllinien D341 Med und Daoy auf. Die Fluoreszenzintensität lag dabei ca. 10 % über der Fluoreszenzintensität der beiden anderen Zelllinien. Die Zelllinien D341 Med und Daoy zeigten hingegen einen fast identischen Kurvenverlauf.

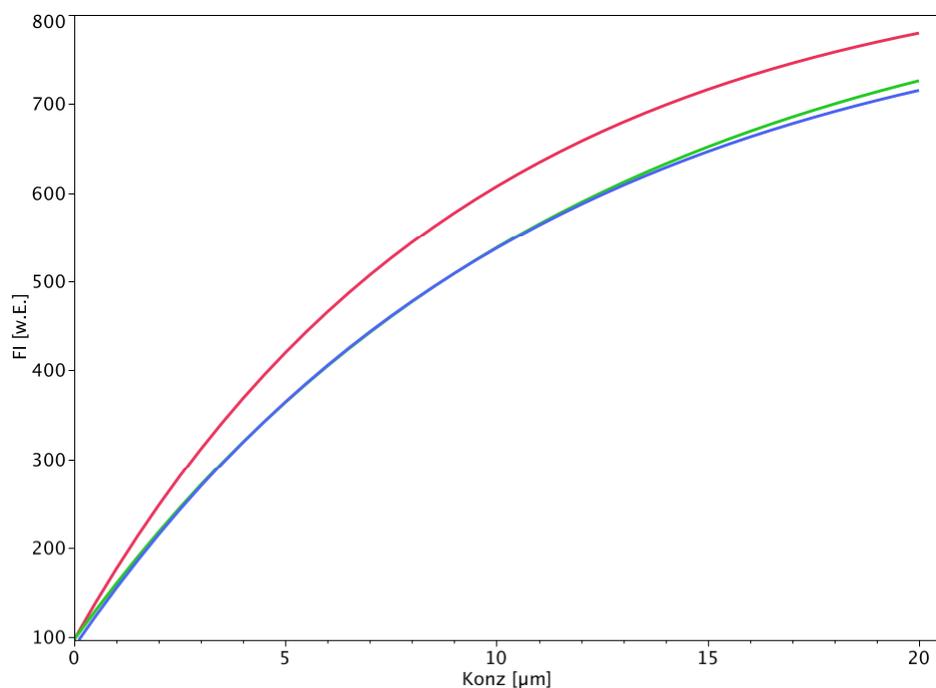


Abbildung 35: Vergleich der geometrischen Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von Hypericin in den drei Medulloblastomzelllinien D283 Med (rote Kurve), D341 Med (grüne Kurve) und Daoy (blaue Kurve) in Abhängigkeit der Hypericinkonzentration (Konz) bei einer Inkubationszeit von 2 h. Die Daten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie gewonnen.

3.3.2.3 Zeitreihen

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde die zeitabhängige Fluoreszenzintensität bei den Zelllinien D283 Med, D341 Med und Daoy in drei unabhängigen Versuchen mit jeweiliger Doppelbestimmung ermittelt. Die Zellen wurden für 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min und 360 min mit Konzentrationen von 2,5 µM, 5 µM und 10 µM Hypericin bei 37 °C inkubiert.

Eine Hypericinkonzentration von 10 µM führte zu einem sehr schnellen und signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität. Das Maximum der Fluoreszenzintensität wurde zwischen 2 und 4 h erreicht. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 6 h führte zu keinem weiteren Anstieg der Fluoreszenzintensität. Bei der Zelllinie D283 Med kam es zwischen 2 und 6 h sogar zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität um ca. 15 % bezogen auf den Maximalwert. Niedrige Hypericinkonzentrationen wie 2,5 und 5 µM führten bis 2 h ebenfalls zu einem schnellen und signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität. Zwischen 2 und 6 h zeigte sich nur noch ein geringer Anstieg der Fluoreszenzintensität. Dabei wurde bei 2,5 µM maximal 50 bis 60 %, bei 5 µM maximal 70 bis 80 % der Fluoreszenzintensität von 10 µM erreicht.

Über das Modell 2 (siehe Kapitel 2.7.2) wurden die einzelnen Kurven der drei Zelllinien berechnet und in den folgenden drei Schaubildern dargestellt.

$$FI(t) = \frac{\alpha * B}{\alpha - \gamma} * (\exp(-(\gamma * t)) - \exp(-\alpha * t)) + b$$

Modell 2: FI entspricht der Fluoreszenzintensität [w.E.] in Abhängigkeit der Zeit t [min], α der Anstiegsrate der Fluoreszenzintensität, γ der Abfallsrate der Fluoreszenzintensität (z.B. durch Photobleaching) und b der Autofluoreszenz. B stellt einen Skalierungsfaktor dar.

3.3.2.3.1 Medulloblastomzelllinie D283 Med

Zeit [min]	Fluoreszenzintensität [w.E.]		
	Konzentration [μM]		
	2,5	5	10
0	93	93	93
5	102	117	170
10	118	143	209
15	127	179	237
30	164	224	343
60	203	297	463
90	231	324	587
120	251	356	557
180	256	387	539
240	275	418	531
360	278	418	469

Tabelle 15: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von Hypericin bei der Medulloblastomzelllinien D283 Med in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei Hypericinkonzentrationen von 2,5 μM , 5 μM und 10 μM . Die Daten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie gewonnen.

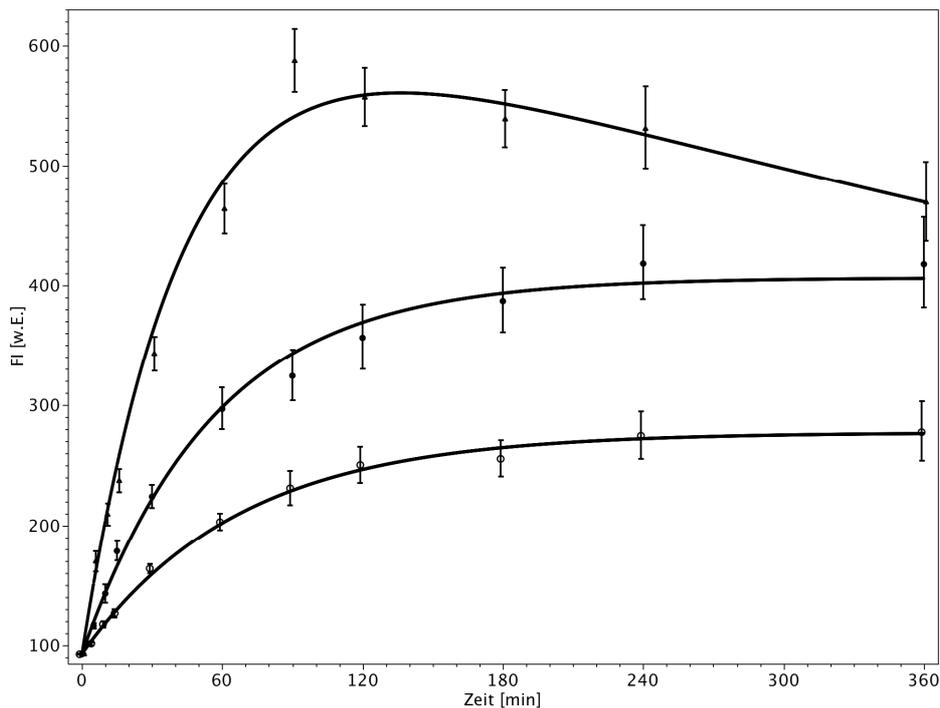


Abbildung 36: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von Hypericin bei der Medulloblastomzelllinie D283 Med in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei Hypericinkonzentrationen von 2,5 μM (O), 5 μM (●) und 10 μM (▲). Die parallel zur y-Achse aufgetragenen Balken entsprechen den 95 % Vertrauensintervallen der Mittelwerte. Die Daten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie gewonnen.

3.3.2.3.2 Medulloblastomzelllinie D341 Med

Zeit [min]	Fluoreszenzintensität [w.E.]		
	Konzentration [μM]		
	2,5	5	10
0	91	91	91
5	115	127	157
10	131	146	191
15	143	165	218
30	207	207	271
60	218	269	353
90	230	311	409
120	247	363	476
180	282	403	496
240	294	395	504
360	327	436	444

Tabelle 16: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von Hypericin bei der Medulloblastomzelllinien D341 Med in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei Hypericinkonzentrationen von 2,5 μM , 5 μM und 10 μM . Die Daten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie gewonnen.

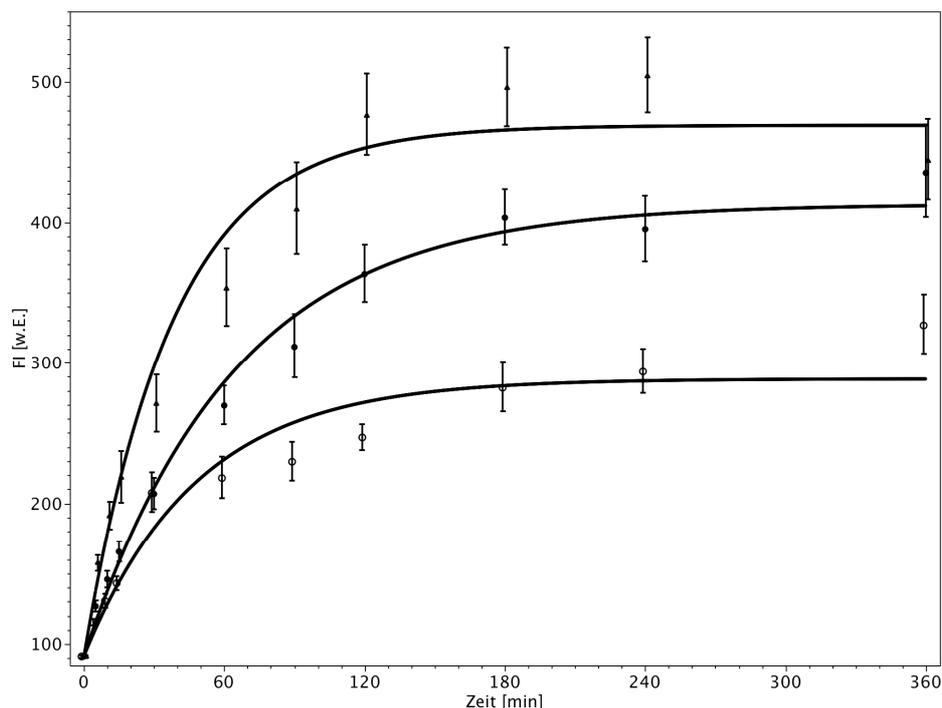


Abbildung 37: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von Hypericin bei der Medulloblastomzelllinie D341 Med in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei Hypericinkonzentrationen von 2,5 μM (O), 5 μM (●) und 10 μM (▲). Die parallel zur y-Achse aufgetragenen Balken entsprechen den 95 % Vertrauensintervallen der Mittelwerte. Die Daten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie gewonnen.

3.3.2.3.3 Medulloblastomzelllinie Daoy

Zeit [min]	Fluoreszenzintensität [w.E.]		
	Konzentration [μM]		
	2,5	5	10
0	93	93	93
5	110	119	154
10	131	141	213
15	139	159	291
30	257	221	364
60	226	294	459
90	238	355	536
120	259	367	591
180	294	418	570
240	319	452	599
360	359	481	618

Tabelle 17: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von Hypericin bei der Medulloblastomzelllinie Daoy in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei Hypericinkonzentrationen von 2,5 μM , 5 μM und 10 μM . Die Daten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie gewonnen.

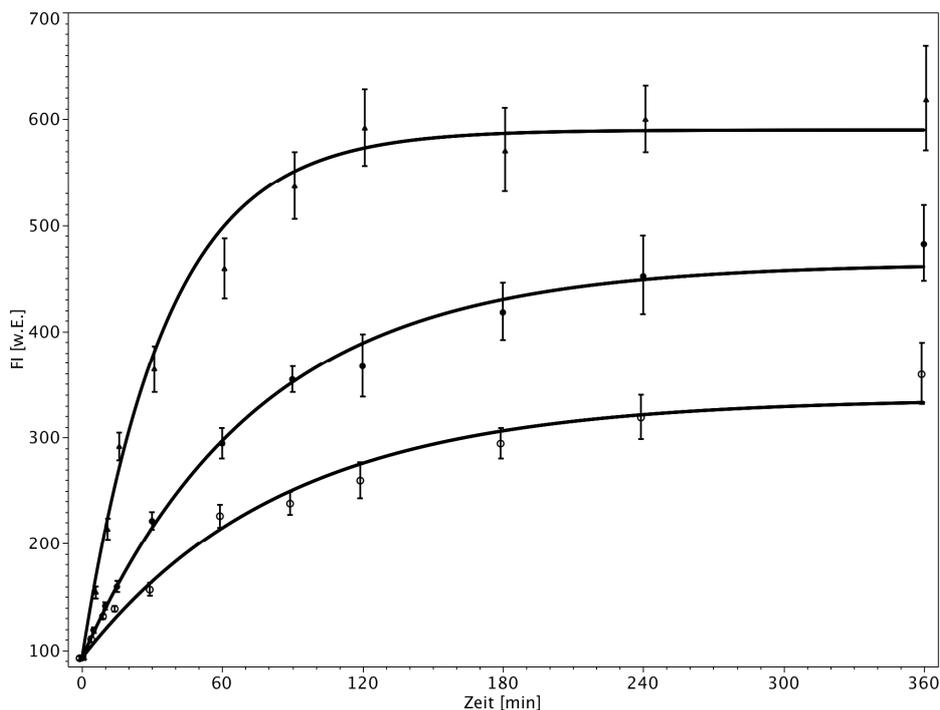


Abbildung 38: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von Hypericin in der Medulloblastomzelllinie Daoy in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei Hypericinkonzentrationen von 2,5 μM (O), 5 μM (●) und 10 μM (▲). Die parallel zur y-Achse aufgetragenen Balken entsprechen den 95 % Vertrauensintervallen der Mittelwerte. Die Daten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie gewonnen.

3.3.3 FACS

3.3.3.1 Konzentrationsreihen

Mit Hilfe der FACS-Analyse wurde die konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensität bei der Zelllinie D283 Med in drei unabhängigen Versuchen mit jeweiliger Doppelbestimmung ermittelt. Die Zellen wurden mit aufsteigenden Hypericinkonzentrationen von 1 μM , 2 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM und 20 μM über 2 h bei 37 °C inkubiert.

Dabei kam es zu einem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität bis 10 μM , um dann in einen etwas flacheren Kurvenverlauf überzugehen. Zur Berechnung der Verlaufskurve wurde das nichtlineare Modell 1a (siehe Kapitel 2.7.1) verwendet.

$$FI(k) = b + (A - b)(1 - \exp^{-\alpha k})$$

Modell 1a: FI entspricht der Fluoreszenzintensität [w.E.] in Abhängigkeit der Hypericinkonzentration k , b der zellulären Autofluoreszenz [w.E.] und A der Asymptote, welcher sich die Kurve annähert. α beschreibt die Anstiegsrate der Fluoreszenzintensität.

3. Ergebnisse

Konz [μM]	0	1	2	2,5	5	10	15	20
FI [w.E.]	5	285	560	687	1322	2075	2308	2288

Tabelle 18: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von Hypericin bei der Medulloblastomzelllinien D283 Med in Abhängigkeit der Hypericinkonzentration (Konz). Die Daten wurden mittels FACS-Analyse gewonnen.

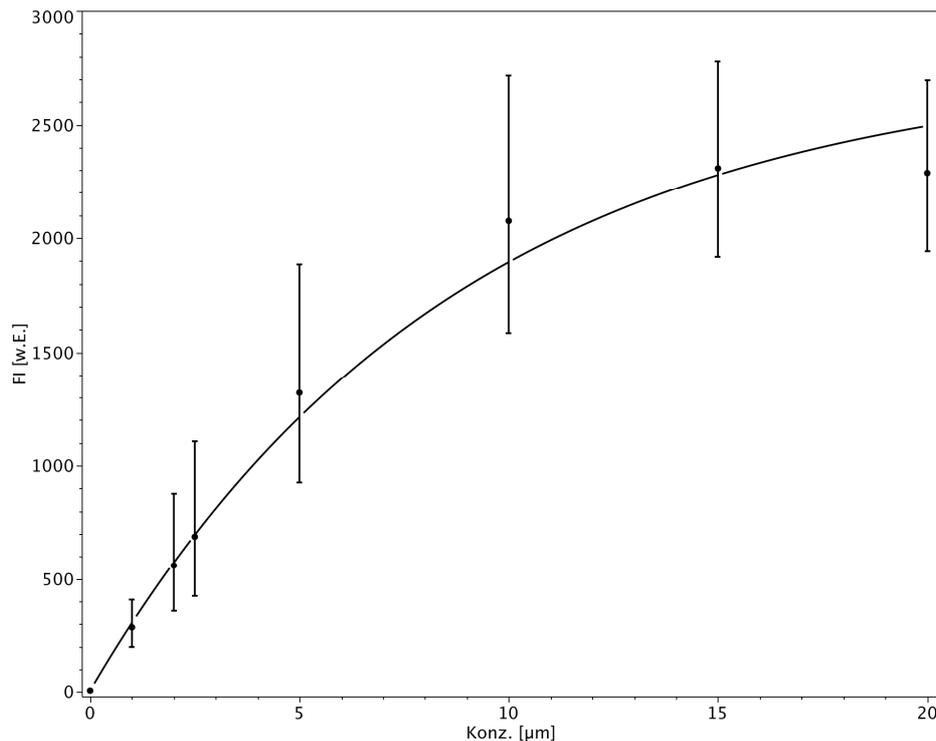


Abbildung 39: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von Hypericin in der Medulloblastomzelllinie D283 Med in Abhängigkeit der Hypericinkonzentration bei einer Inkubationszeit von 2 h. Die parallel zur y-Achse aufgetragenen Balken entsprechen den 95 % Vertrauensintervallen der Mittelwerte. Die Daten wurden mittels FACS-Analyse gewonnen.

Zur Veranschaulichung der FACS-Ergebnisse sind in folgender Abbildung 41 acht Histogramme aus einer Konzentrationsreihe der Medulloblastomzelllinie D283 Med dargestellt. Das erste Histogramm oben links stellt die Autofluoreszenzmessung nach zweistündiger Inkubation ohne Zusatz von Hypericin dar. In den folgenden sieben Histogramme (von links nach rechts) wurden die Zellen für 2 h mit Hypericinkonzentrationen von 1 μM , 2 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM und 20 μM inkubiert. Der Peak ist Ausdruck der

Hypericinaufnahme bei 585 nm. Zur Identifizierung der Zellpopulation wurde die Zellgröße auf der y-Achse (SSC-Signal) gegen die Zellgranularität auf der x-Achse (FSC-Signal) aufgetragen und in einem Punktdiagramm dargestellt. Somit konnten vitale Zellen von Zellfragmenten differenziert und die Zellfragmente bei der Fluoreszenzintensitätsmessung ausgeschlossen werden. Diese Punktdiagramme sind in den folgenden Histogrammen oben rechts bzw. links integriert.

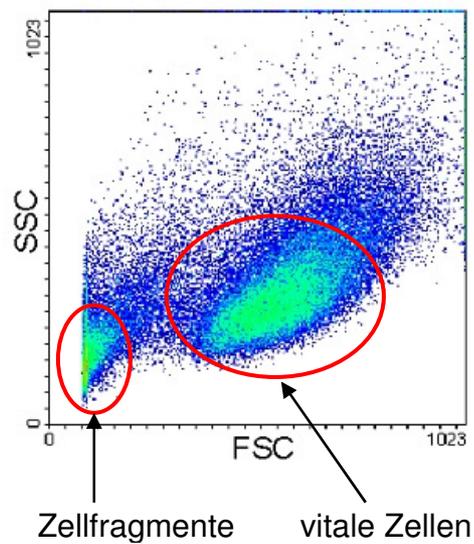
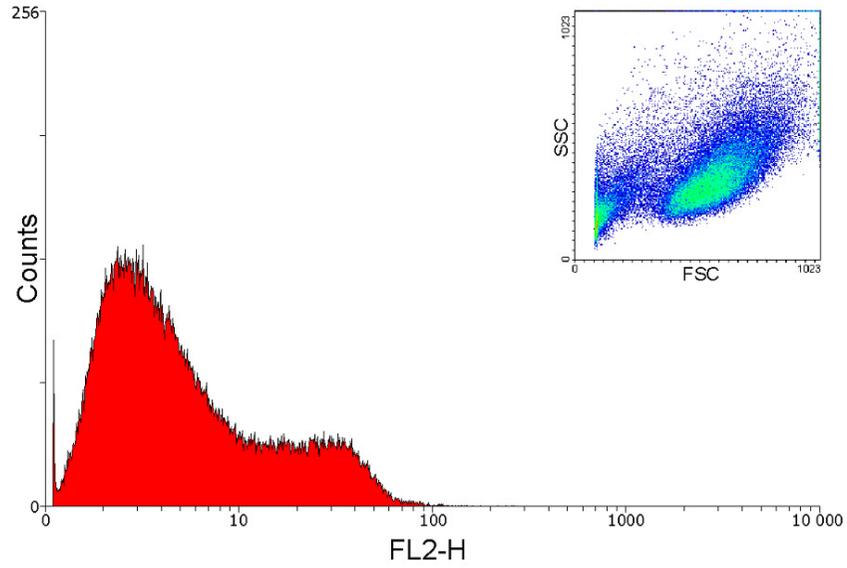


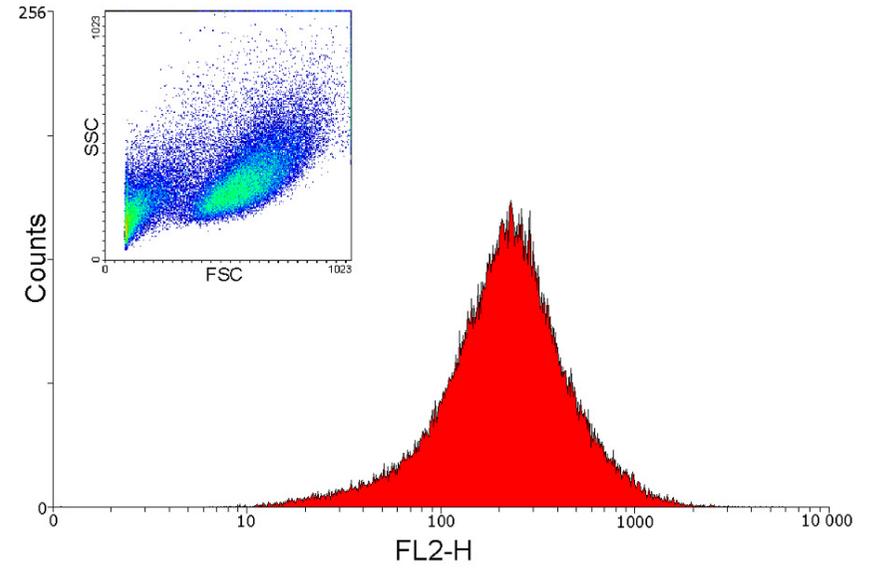
Abbildung 40: Punktdiagramm bei der FACS-Analyse zur Differenzierung von vitalen Zellen und Zellfragmenten. Die Zellgröße wurde auf der y-Achse (SSC-Signal) gegen die Zellgranularität auf der x-Achse (FSC-Signal) aufgetragen.

3. Ergebnisse

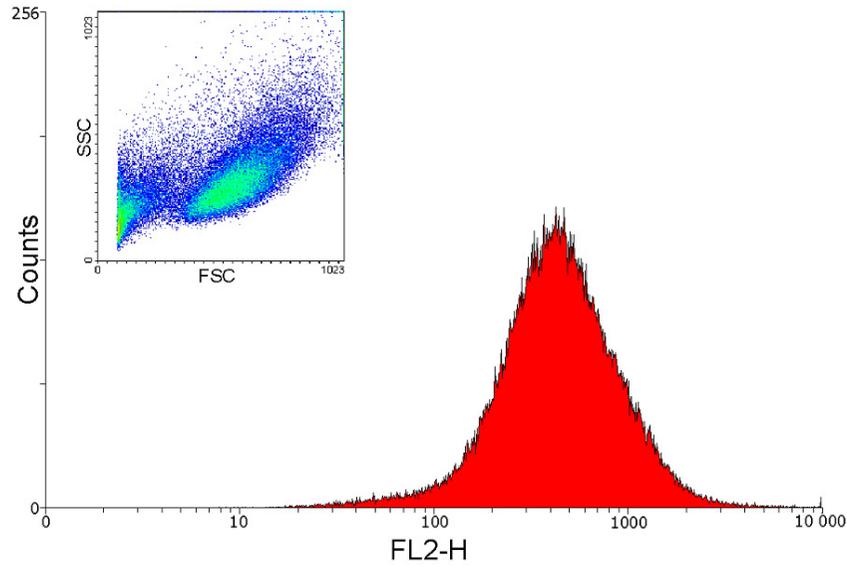
Autofluoreszenz



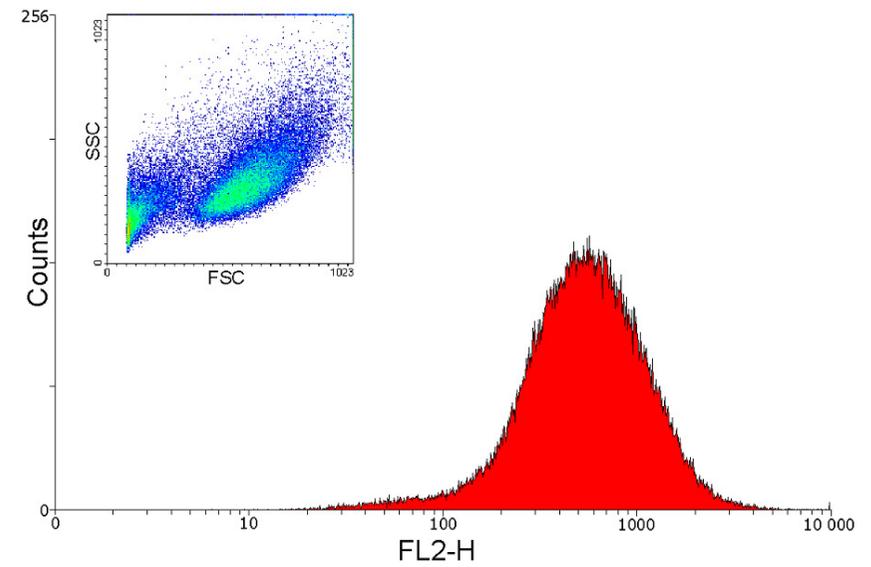
1 μM Hypericin



2 μM Hypericin

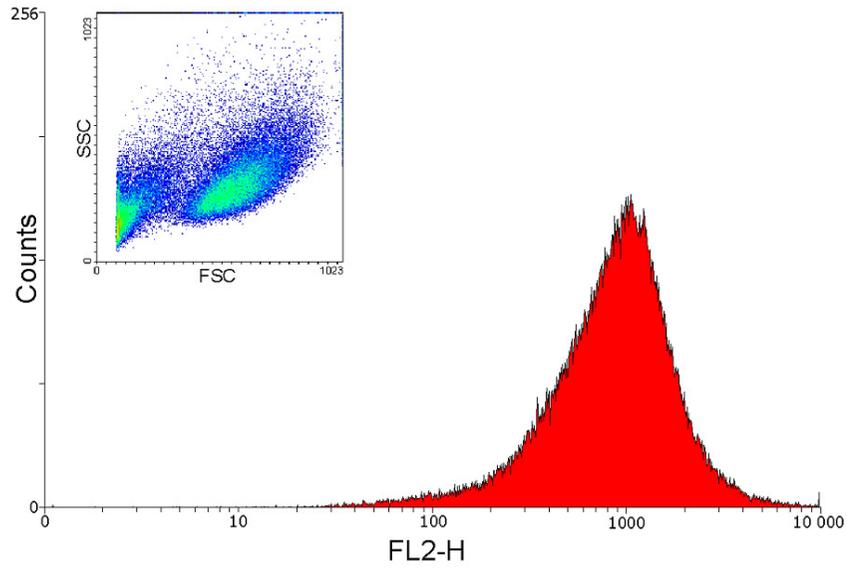


2,5 μM Hypericin

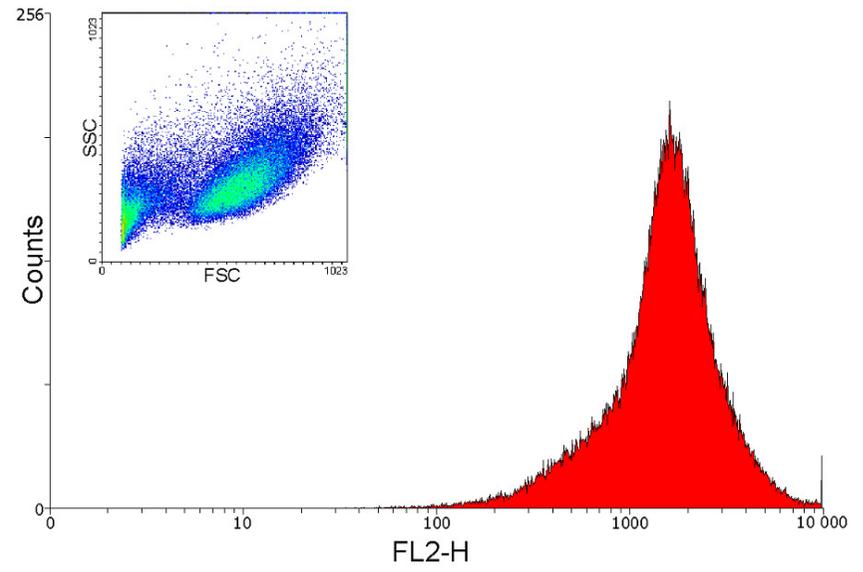


3. Ergebnisse

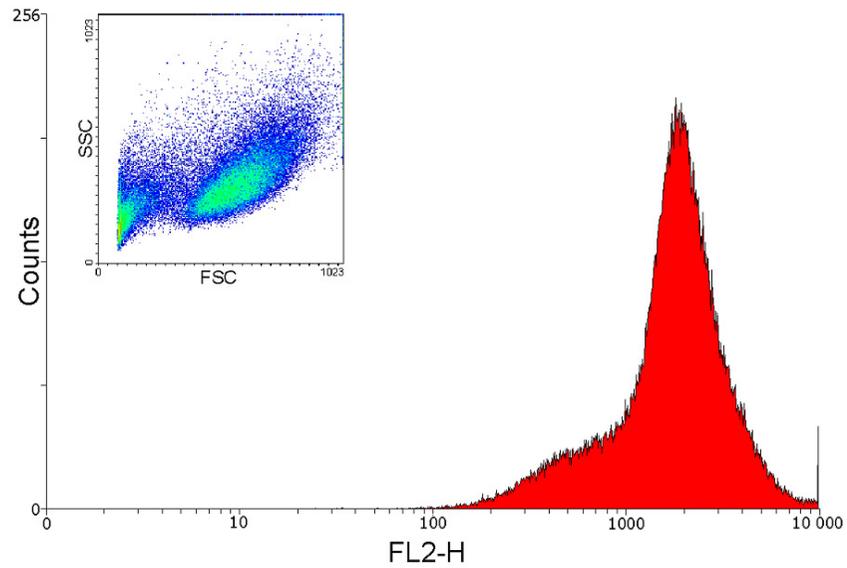
5 μ M Hypericin



10 μ M Hypericin



15 μ M Hypericin



20 μ M Hypericin

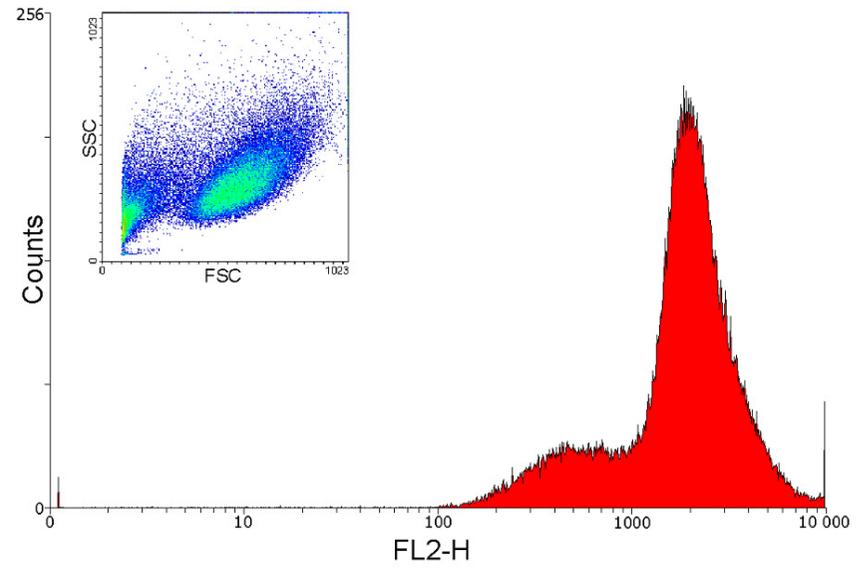


Abbildung 41 (vorherige zwei Seiten): FACS-Analyse der Medulloblastomzelllinie D283 Med bei Inkubation mit Hypericin. Die zugehörigen Inkubationskonzentrationen sind oberhalb der Schaubilder aufgeführt. Zur Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (w.E.) erfolgte die Erstellung eines Histogramms, bei welchem die Events der FL2-H (Parameter für Hypericinaufnahme in Zelle) auf der y-Achse gegen die Fluoreszenzintensität (w.E.) auf der x-Achse aufgetragen wurden. Die jeweils zugehörigen Punktdiagramme sind oben rechts bzw. links dargestellt. SSC ist ein Maß für die Zellgröße, FSC für die Zellgranularität.

3.3.3.2 Zeitreihen

Mit Hilfe der FACS-Methode wurde die zeitabhängige Fluoreszenzintensität bei der Zelllinie D283 Med in drei unabhängigen Versuchen mit jeweiliger Doppelbestimmung ermittelt. Die Zellen wurden für 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min und 360 min mit Hypericinkonzentrationen von 2,5 μM , 5 μM und 10 μM bei 37 °C inkubiert. Eine Hypericinkonzentration von 10 μM führte zu einem sehr schnellen und signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität bis 2 h. Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 6 h führte bei 10 μM nur noch zu einem geringen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Dabei wurde eine 500-fache Zunahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Autofluoreszenz erreicht. Bei einer Hypericinkonzentration von 5 μM konnte ebenfalls ein schneller Anstieg der Fluoreszenzintensität bis 2 h beobachtet werden. Danach kam es zu einer leichten Abnahme des Kurvenanstiegs bis 6 h. Maximal wurde eine Fluoreszenzintensität von ca. 80 % im Vergleich zu 10 μM erreicht. Eine Hypericinkonzentration von 2,5 μM führte zu einem konstanten Anstieg der Fluoreszenzintensität bis 6 h. Dabei wurde eine maximale Fluoreszenzintensität von ca. 50 % der Konzentration von 10 μM erreicht. Zur Berechnung der Kurven wurde das Modell 1b (siehe Kapitel 2.7.1) verwendet.

$$FI(t) = b + (A - b)(1 - \exp^{-\alpha t})$$

Modell 1b: FI entspricht der Fluoreszenzintensität [w.E.] in Abhängigkeit der Inkubationszeit t , b der zellulären Autofluoreszenz [w.E.] und A der Asymptote, welcher sich die Kurve annähert. α beschreibt die Anstiegsrate der Fluoreszenzintensität.

Zeit [min]	Fluoreszenzintensität [w.E.]		
	Konzentration [μM]		
	2,5	5	10
0	3	4	5
5	38	85	221
10	73	164	427
15	107	239	611
30	204	421	1073
60	384	806	1680
90	585	1180	2144
120	703	1390	2243
180	954	1652	2496
240	1143	1825	2542
360	1312	1993	2434

Tabelle 19: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten [w.E.] von Hypericin bei der Medulloblastomzelllinie D283 Med in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei Hypericinkonzentrationen von 2,5 μM , 5 μM und 10 μM . Die Daten wurden mittels FACS-Analyse gewonnen.

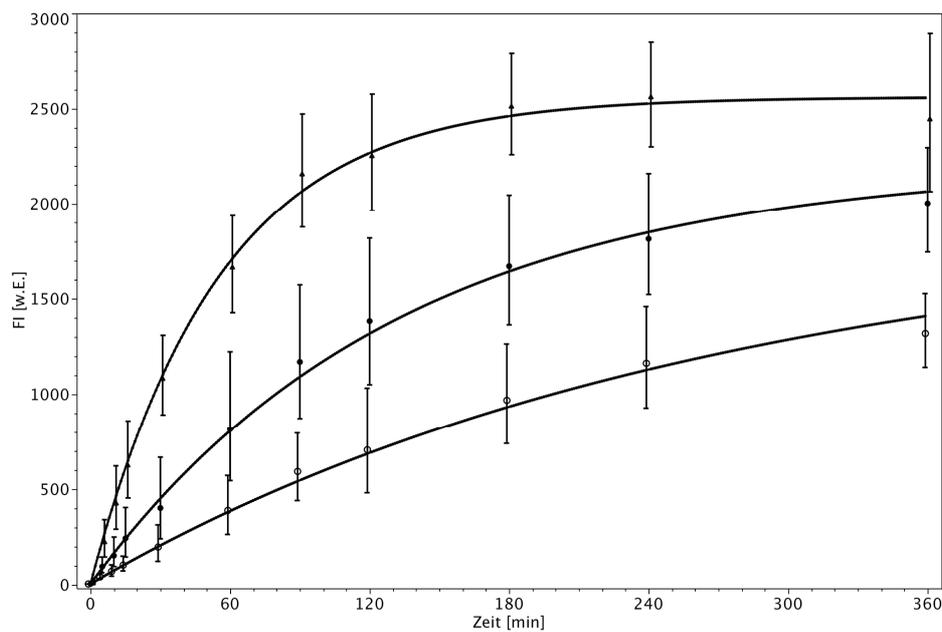
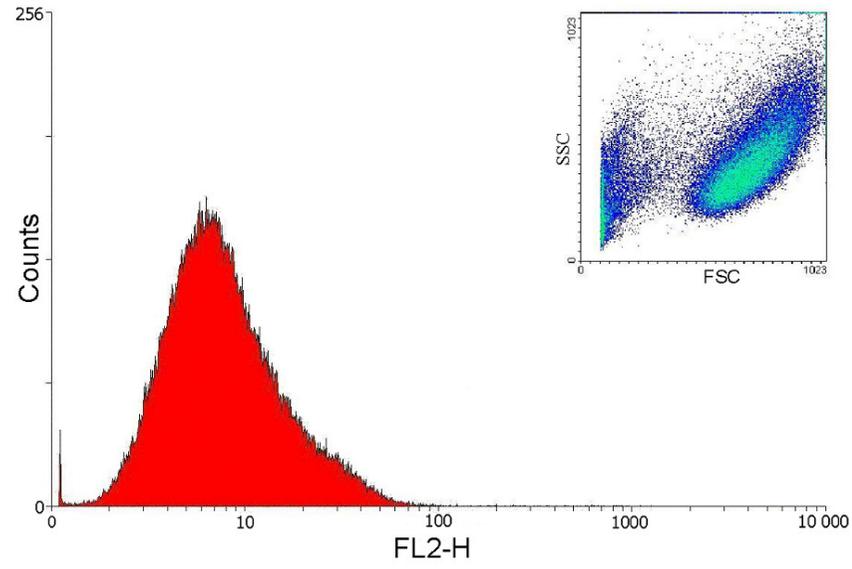


Abbildung 42: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensität [w.E.] von Hypericin in der Medulloblastomzelllinie D283 Med in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei Hypericinkonzentrationen von 2,5 μM (O), 5 μM (●) und 10 μM (▲). Die parallel zur y-Achse aufgetragenen Balken entsprechen den 95 % Vertrauensintervallen der Mittelwerte. Die Daten wurden mittels FACS-Analyse gewonnen.

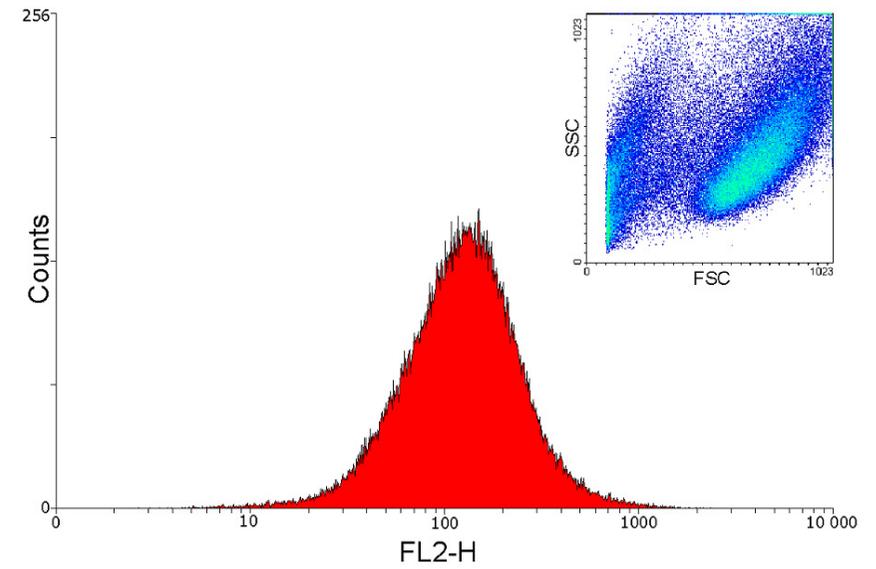
Zur Veranschaulichung der FACS-Ergebnisse sind in Abbildung 43 sechs Histogramme aus einer Zeitreihe dargestellt. Das erste Histogramm oben links stellt die Autofluoreszenzmessung nach zweistündiger Inkubation ohne Zusatz von Hypericin dar. Die folgenden sechs Histogramme (von links nach rechts) wurden mit 2,5 μM Hypericin für 15 min, 30 min, 90 min, 180 min und 360 min inkubiert. Der Peak ist Ausdruck der Hypericinaufnahme bei 585 nm. In einem Punktdiagramm wurde die Zellpopulation dargestellt. Die Zellgröße wurde auf der y-Achse (SSC-Signal) gegen die Zellgranularität auf der x-Achse (FSC-Signal) aufgetragen (siehe Abbildung 43). Diese Punktdiagramme sind in den folgenden Histogrammen oben rechts bzw. links integriert.

3. Ergebnisse

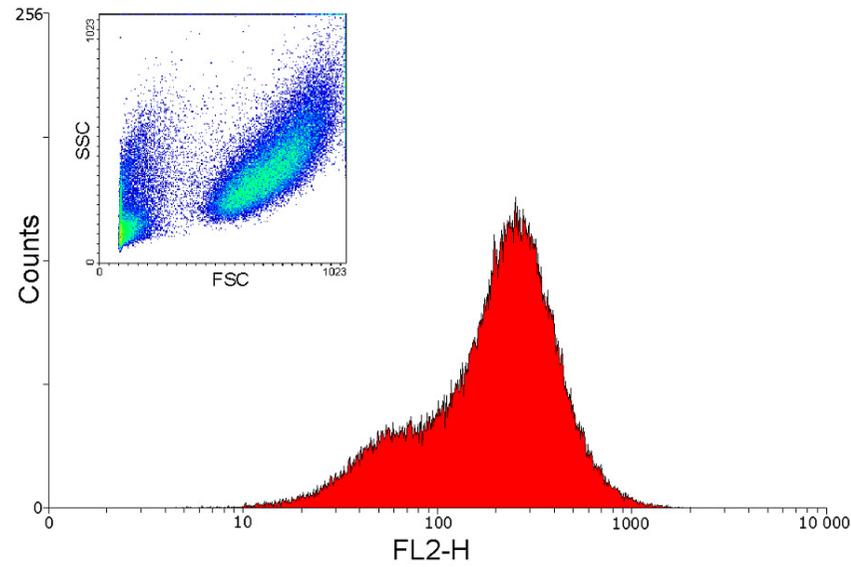
Autofluoreszenz



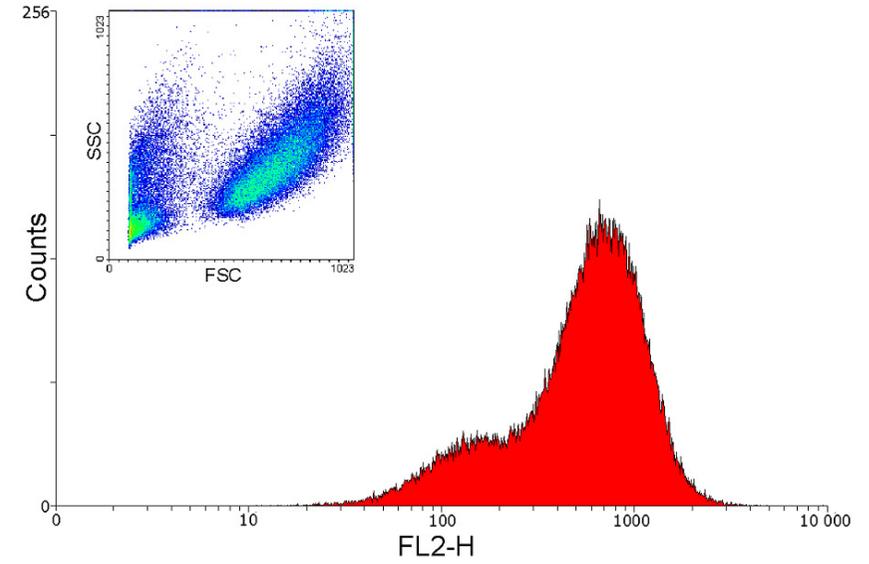
Inkubation 15 min



Inkubation 30 min

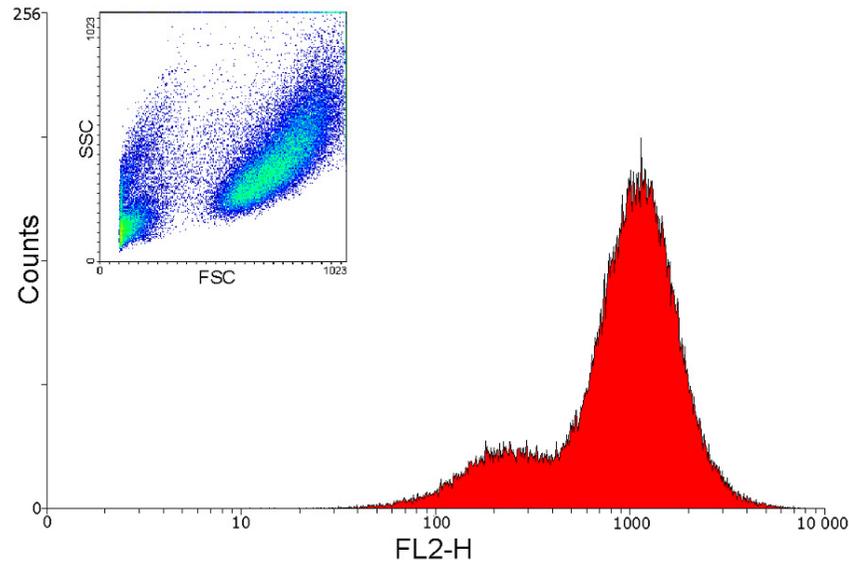


Inkubation 90 min



3. Ergebnisse

Inkubation 180 min



Inkubation 360 min

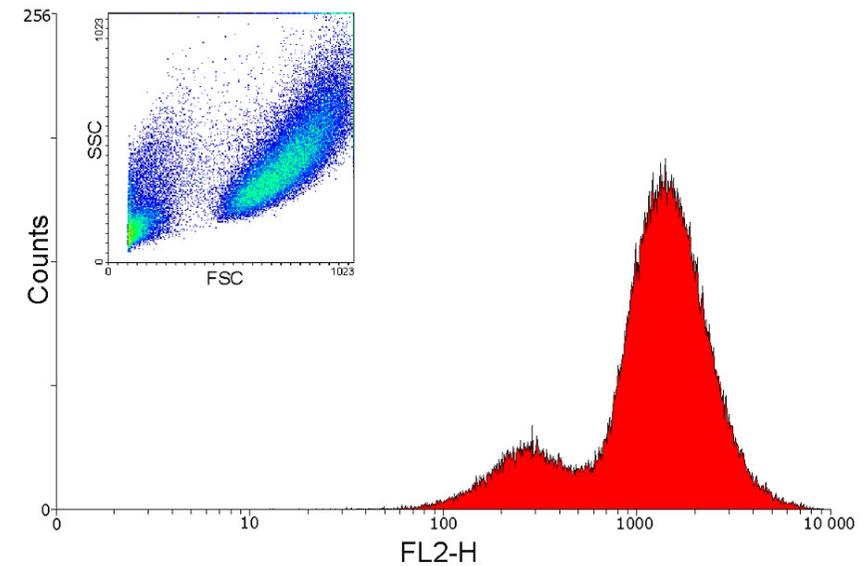


Abbildung 43: FACS-Analyse der Medulloblastomzelllinie D283 Med bei Inkubation mit Hypericin. Die zugehörigen Inkubationszeiten sind oberhalb der Schaubilder aufgeführt. Zur Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (w.E.) erfolgte die Erstellung eines Histogramms, bei welchem die Events der FL2-H (Parameter für Hypericinaufnahme in Zelle) auf der y-Achse gegen die Fluoreszenzintensität (w.E.) auf der x-Achse aufgetragen wurden. Die jeweils zugehörigen Punktdiagramme sind oben rechts bzw. links dargestellt. SSC ist ein Maß für die Zellgröße, FSC für die Zellgranularität.

3.4 Korrelationsvergleich von Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse

3.4.1 Konzentrationsreihen

Verglichen wurden die Methoden Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse bei der konzentrationsabhängigen Hypericinaufnahme der Medulloblastomzelllinie D283 Med.

Es sollte gezeigt werden, dass mit der Methode Fluoreszenzmikroskopie und mit der FACS-Analyse übereinstimmende Ergebnisse bei der Messung von konzentrationsabhängigen Fluoreszenzintensitäten von Hypericin erzielt werden können. Hierfür wurden mit Hilfe des Modell 1a (siehe Kapitel 2.7.1) die Anstiegsraten α der einzelnen Kurven beider Methoden berechnet und verglichen.

$$FI(k) = b + (A - b)(1 - \exp^{-ak})$$

Modell 1a: FI entspricht der Fluoreszenzintensität [w.E.] in Abhängigkeit der Hypericinkonzentration k , b der zellulären Autofluoreszenz [w.E.] und A der Asymptote, welcher sich die Kurve annähert. α beschreibt die Anstiegsrate der Fluoreszenzintensität.

Dabei ergab sich bei den Konzentrationsreihen bei beiden Methoden ein Mittelwert der Anstiegsrate α von 0,11.

Der p-Wert für den Vergleich der zwei Mittelwerte mit dem Zweistichproben-t-Test unter der Annahme gleicher Streuungen in den beiden Stichproben betrug 0,871.

FM-Ergebnisse Konzentrationsreihen	
Versuchs-Nr.	α
1	0,09
2	0,12
3	0,12
Mittelwert	0,11

FACS-Ergebnisse Konzentrationsreihen	
Versuchs-Nr.	α
1	0,07
2	0,17
3	0,10
Mittelwert	0,11

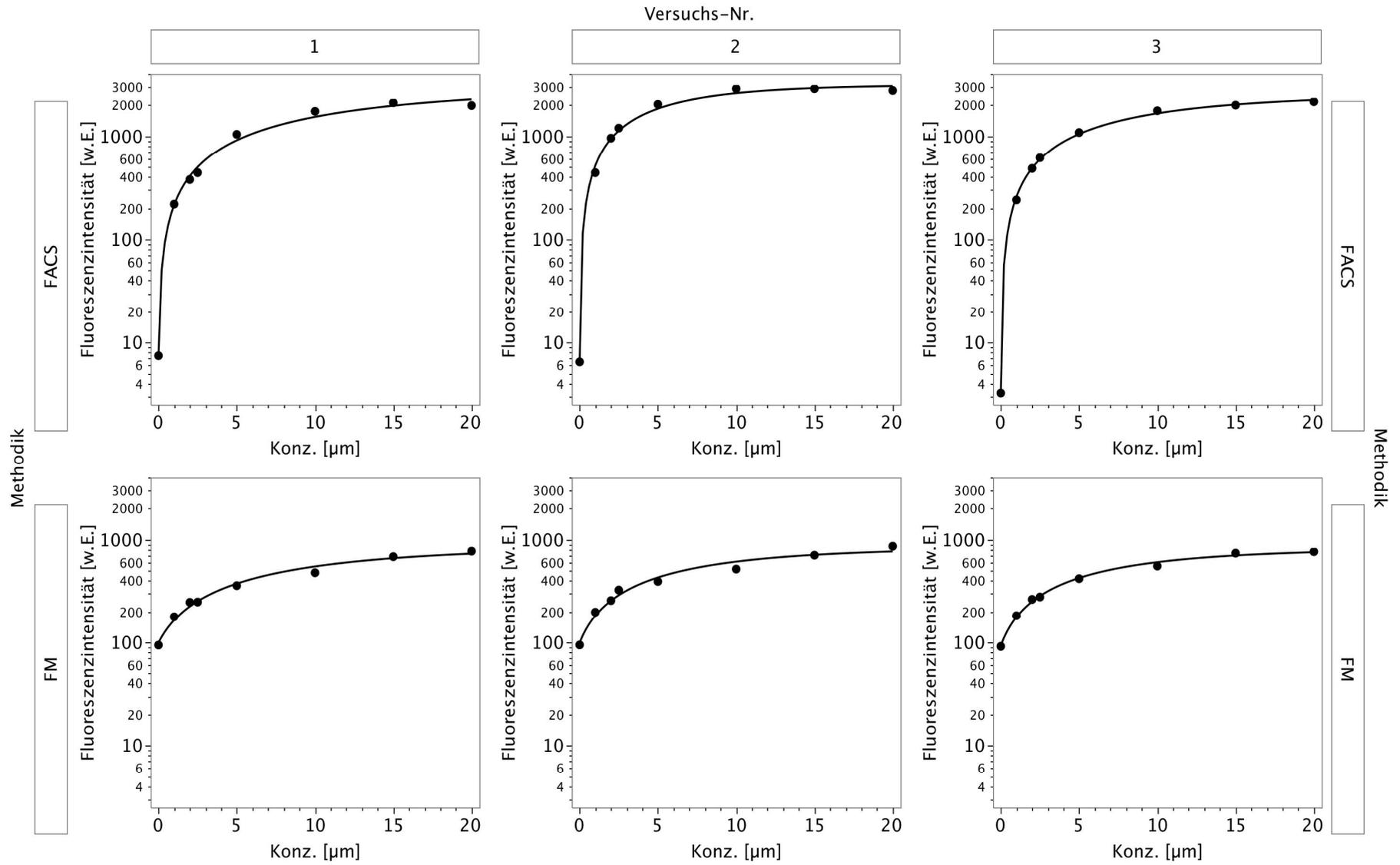
Tabelle 20: Berechnet wurde der Mittelwert der Anstiegsraten α der drei unabhängigen Konzentrationsreihenversuche der Methoden Fluoreszenzmikroskopie (FM) und FACS.

Die folgenden sechs Schaubilder wurden mit dem Modell 1a (siehe Kapitel 2.7.1) berechnet.

$$FI(k) = b + (A - b)(1 - \exp^{-ak})$$

Modell 1a: FI entspricht der Fluoreszenzintensität [w.E.] in Abhängigkeit der Hypericinkonzentration k , b der zellulären Autofluoreszenz [w.E.] und A der Asymptote, welcher sich die Kurve annähert. α beschreibt die Anstiegsrate der Fluoreszenzintensität.

3. Ergebnisse



3. Ergebnisse

Abbildung 44 (vorherige Seite): Dargestellt sind die drei Einzelkurven der Konzentrationsreihen bei den Methoden FACS und Fluoreszenzmikroskopie (FM) der Zelllinie D283 Med. Die Inkubationszeit betrug 2 h. Die Versuchsnummer (Versuchs-Nr.) entspricht den drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Im folgenden Schaubild wurden die oben berechneten Kurven der jeweiligen Methode über die geometrischen Mittelwerte zusammengefasst und zur besseren Veranschaulichung graphisch in einem Schaubild dargestellt. Dabei zeigten sich bei den Konzentrationsreihen mit Hypericin fast identische Kurvenverläufe bei den beiden Methoden Fluoreszenzmikroskopie und FACS. Zuvor wurde diese Übereinstimmung über die identischen Anstiegsraten α beschrieben.

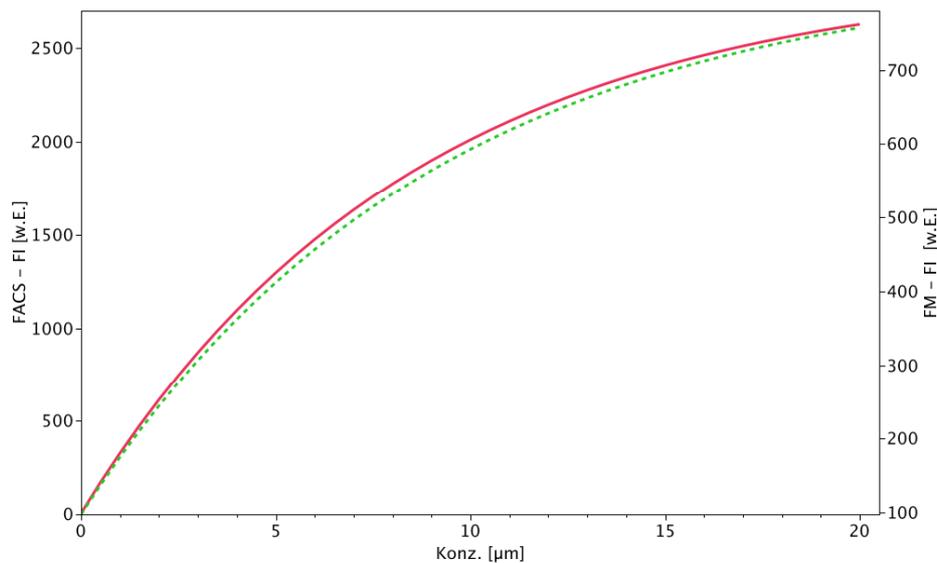


Abbildung 45: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten (FI) von Hypericin in der Medulloblastomzelllinie D283 Med in Abhängigkeit der Hypericinkonzentration bei einer Inkubationszeit von 2 h. Die grüne Kurve entspricht der Methode Fluoreszenzmikroskopie, die rote Kurve der Methode FACS. Auf der linken y-Achse ist die FI [w.E.] der Methode FACS aufgetragen, auf der rechten y-Achse die FI [w.E.] der Fluoreszenzmikroskopie (FM).

3.4.2 Zeitreihen

Verglichen wurden die Methoden Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse bei der zeitabhängigen Hypericinaufnahme der Medulloblastomzelllinie D283 Med.

Es sollte gezeigt werden, dass mit der Methode Fluoreszenzmikroskopie und mit der FACS-Analyse übereinstimmende Ergebnisse bei der Messung von zeitabhängigen Fluoreszenzintensitäten von Hypericin erzielt werden können.

Die beiden Methoden wurden über die Anstiegsraten α der Kurven miteinander verglichen. Bei der FACS-Analyse wurde zur Berechnung der Anstiegsraten α Modell 1b (siehe Kapitel 2.7.1) benutzt.

$$FI(t) = b + (A - b)(1 - \exp^{-\alpha t})$$

Modell 1b: FI entspricht der Fluoreszenzintensität [w.E.] in Abhängigkeit der Inkubationszeit t , b der zellulären Autofluoreszenz [w.E.] und A der Asymptote, welcher sich die Kurve annähert. α beschreibt die Anstiegsrate der Fluoreszenzintensität.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wurde zur Berechnung der Anstiegsraten α Modell 2 benutzt, um der möglichen zeitabhängigen Fluoreszenzintensitätsabnahme gerecht zu werden.

$$FI(t) = \frac{\alpha * B}{\alpha - \gamma} * (\exp(-(\gamma * t)) - \exp(-\alpha * t)) + b$$

Modell 2: FI entspricht der Fluoreszenzintensität [w.E.] in Abhängigkeit der Zeit t [min], α der Anstiegsrate der Fluoreszenzintensität, γ der Abfallsrate der Fluoreszenzintensität (z.B. durch Photobleaching) und b der Autofluoreszenz. B stellt einen Skalierungsfaktor dar.

3. Ergebnisse

Die berechneten Anstiegsraten α der Fluoreszenzintensität der einzelnen Kurven wurden dann miteinander verglichen.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie ergaben sich vor allem bei 2,5 und 5 μM deutlich schnellere Anstiegsraten verglichen mit der FACS-Analyse. Bei 2,5 μM zeigte sich bei der Fluoreszenzmikroskopie eine über das 3-fach höhere Anstiegsrate als bei der FACS-Analyse. Bei 5 μM betrug diese ca. das 2,5-fache, bei 10 μM nur noch ca. das 1,3-fache der FACS-Anstiegsrate.

FM-Ergebnisse Zeitreihen	
Konzentration [μM]	Mittelwert von α
2,5	0,0134
5	0,0175
10	0,0228

FACS-Ergebnisse Zeitreihen	
Konzentration [μM]	Mittelwert von α
2,5	0,0037
5	0,0075
10	0,018

Tabelle 21: Berechnet wurden die Mittelwerte der Anstiegsraten α bei den drei verschiedenen Konzentrationen der Zeitreihenversuche der Methoden Fluoreszenzmikroskopie (FM) und FACS. Jeder Mittelwert α besteht aus drei Einzelwerten, die über drei unabhängige Versuche ermittelt wurden.

3. Ergebnisse

Zur besseren Veranschaulichung wurden die Daten der Methoden Fluoreszenzmikroskopie (grüne Kurven) und FACS (rote Kurven) graphisch in einem gemeinsamen Schaubild dargestellt. Bei der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich bis 2 h ein schneller Anstieg der Fluoreszenzintensität. Bei längeren Inkubationszeiten kam es zu keiner weiteren Fluoreszenzintensitätszunahme. Bei 10 μM zeigte sich sogar ein Abfall der Fluoreszenzintensität. Bei der FACS-Analyse kam es initial vor allem bei 2,5 und 5 μM zu einer deutlich langsameren Fluoreszenzintensitätszunahme im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie. Im Gegensatz zu Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich bei 2,5 und 5 μM auch bei längeren Inkubationszeiten ein relativ konstanter Anstieg der Fluoreszenzintensität. Bei 10 μM führte eine Verlängerung der Inkubationszeit über 3 h zu keiner weiteren nennenswerten Fluoreszenzintensitätszunahme.

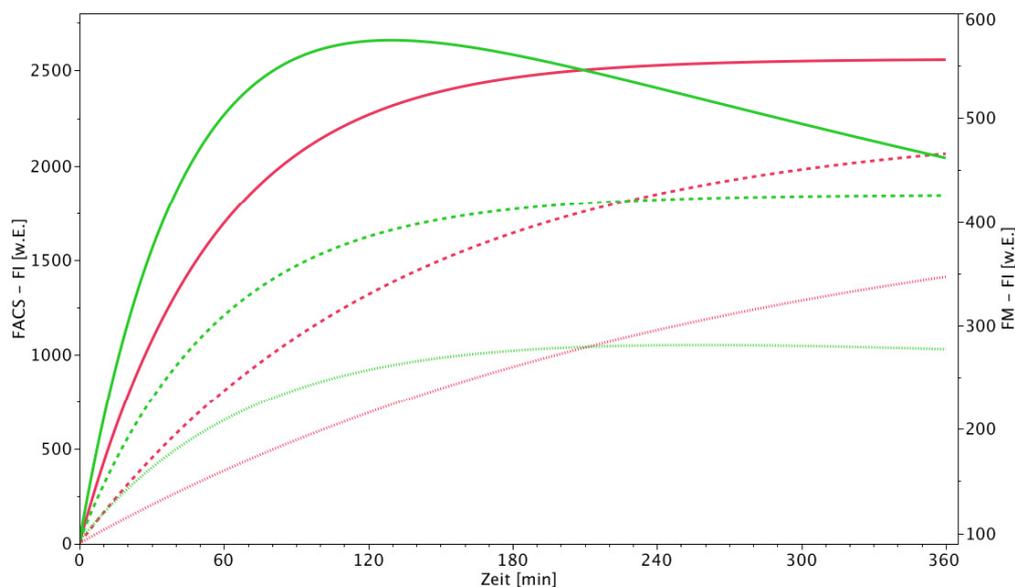


Abbildung 46: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensität [w.E.] von Hypericin in der Medulloblastozelllinie D283 Med in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei Zugabe von 2,5 μM (feingepunktete Linie), 5 μM (grobgepunktete Linie) und 10 μM (durchgezogene Linie) Hypericin. Die grüne Kurve entspricht der Methode Fluoreszenzmikroskopie (FM), die rote Kurve der Methode FACS. Auf der linken y-Achse ist die Fluoreszenzintensität [w.E.] der Methode FACS aufgetragen, auf der rechten y-Achse die Fluoreszenzintensität [w.E.] der Methode Fluoreszenzmikroskopie (FM).

4. Diskussion

Das Medulloblastom ist ein neuroepithelialer Tumor des Kleinhirns und der häufigste maligne ZNS-Tumor im Kindesalter [7]. Medulloblastome treten auch im Erwachsenenalter, selten im höheren Alter, auf. Die Therapieoptionen für das Medulloblastom umfassen die Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie. Allerdings sprechen ein Drittel der Patienten mit Standardrisiko nicht auf die zur Verfügung stehenden Therapieoptionen an und nur ein Viertel der Hochrisikopatienten können geheilt werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Standardrisikopatienten, die operativ und mit einer kombinierten Radiochemotherapie behandelt werden, liegt bei ungefähr 70 %. Hochrisikopatienten haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur 25 % [142].

Neue Therapieansätze sind nötig, um die Prognose von Patienten mit Medulloblastomen zu verbessern. Die Chance eines besseren Ansprechens auf eine adjuvante Therapie in der Behandlung von Medulloblastompatienten liegt in der Durchführung einer radikalen Resektion. Dies könnte durch die intraoperative Visualisierung des Tumors mittels Fluorophoren wie 5-ALA oder Hypericin erreicht werden. Eventuell kann durch eine zusätzliche intraoperative PDT, ebenfalls mit Hilfe von 5-ALA oder Hypericin, eine Überlebensverlängerung erreicht werden. Bei Patienten mit Rezidivtumoren eröffnet sich dadurch auch die Möglichkeit einer weiteren Therapiemodalität. 5-ALA induziertes PpIX hat sich in der intraoperativen Visualisierung beim Glioblastom bereits erfolgreich etabliert [143].

Hypericin, ein natürlich vorkommender Photosensibilisator, hat mehrere biologische Vorteile gegenüber anderen Photosensibilisatoren. Beispielsweise inhibiert Hypericin die Zellproliferation und die Signaltransduktion. Zudem besitzt Hypericin, vor allem in niedriger Dosis, eine sehr geringe Zytotoxizität im Dunkeln [143]. Kürzlich erschienene *in vitro* und *in vivo* Studien haben die hohe Effizienz von Hypericin in der PDT bei verschiedenen Tumorentitäten gezeigt [144,145,146,147].

Da es bisher keine Daten zur Visualisierung von Medulloblastomen gibt, lag es nahe, Hypericin für die Visualisierung *in vitro* an drei unterschiedlichen

Medulloblastomzelllinien zu untersuchen. Die Möglichkeit 5-ALA für die Visualisierung zu nutzen, untersuchten wir an einer Medulloblastomzelllinie. Für beide Fluorophore wurden sowohl konzentrationsabhängige als auch zeitabhängige Experimente durchgeführt. Des Weiteren wurden die Methoden Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse bei der Messung der Fluoreszenzintensität von Hypericin in einer Medulloblastomzelllinie miteinander verglichen.

5-ALA induzierte PpIX-Fluoreszenzintensität

Die konzentrationsabhängige 5-ALA induzierte PpIX-Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und der FACS-Analyse in der Zellreihe D283 Med gemessen. Nach Inkubation mit Konzentrationen von bis zu 1,2 mM 5-ALA stieg die Fluoreszenzintensität bei der Fluoreszenzmikroskopie um 20 % an. Bei der FACS-Analyse betrug der Fluoreszenzintensitätsanstieg nur ca. 10 % bei 1,2 mM. Höhere Konzentrationen führten bei beiden Methoden zu keinem weiteren nennenswerten Anstieg der Fluoreszenzintensität.

In den zeitabhängigen Versuchen wurde bei der Fluoreszenzmikroskopie ein ca. 10 %iger Anstieg der Fluoreszenzintensität nach 10 min und bei der FACS-Analyse nach 15 min bei einer Inkubationskonzentration von 6 mM 5-ALA erreicht. Bei der Fluoreszenzmikroskopie kam es bei längeren Inkubationszeiten zu einem leichten Abfall der Fluoreszenzintensität. Bei der FACS-Analyse zeigte sich bei längeren Inkubationszeiten ein wellenförmiger Kurvenverlauf der Fluoreszenzintensität ohne eindeutige Tendenz.

Moan et al. [148] untersuchten in WiDr-Zellen, eine Zelllinie von primären humanen Adenokarzinomen des rektosigmoidalen Kolons, Aufnahmekinetiken und photodynamische Eigenschaften von 5-ALA induziertem PpIX. Sie fanden ansteigende PpIX-Konzentrationen zwischen 0,2 und 1 mM 5-ALA, bei über 1 mM kam es zur Sättigung. Außerdem zeigten sie einen zeitabhängigen linearen Anstieg von PpIX durch Inkubation von WiDr-Zellen mit 1 mM 5-ALA bei einer Inkubationszeit von 0 bis 8 h. Bei unseren Experimenten erhielten wir bei den Konzentrationsreihen vergleichbare Ergebnisse. Wie bereits erwähnt,

stieg bei den Fluoreszenzmikroskopieversuchen und bei den FACS-Versuchen die Fluoreszenzintensität bis 1,2 mM an. Danach konnte bei beiden Methoden kein weiterer nennenswerter Anstieg der Fluoreszenzintensität verzeichnet werden.

Eléouet et al. [149] inkubierten aus Patienten entnommene Glioblastomzellen mit 100 µg/ml ($\approx 0,6$ mM) 5-ALA und verglichen die Zellen mit Glioblastomzellen aus chirurgischen Biopsien von Gliompatienten nach systemischer Infusion von 100 mg/kg KG (600 mM KG) 5-ALA. Die Glioblastomzellen von den Patienten, die eine systemische Gabe von 5-ALA erhalten hatten, zeigten eine 10-fach höhere PpIX-Fluoreszenzintensität verglichen mit den *in vivo* entnommenen und dann *in vitro* inkubierten Zellen. Jedoch zeigten sich große Fluoreszenzintensitätsunterschiede sowohl innerhalb der Patientengruppe mit systemischer 5-ALA-Gabe als auch bei den entnommenen Glioblastomzellen, die anschließend *in vitro* mit 100 µg/ml ($\approx 0,6$ mM) 5-ALA inkubiert wurden. Die *in vitro* PpIX-Synthese reichte von 0 bis 3580 Zählern, gemessen mit der konfokalen Lasermikrospektrofluorometrie. Zusätzlich untersuchte der Autor die PpIX-Synthese in Blutlymphozyten von Leukämiepatienten. Hierbei wurden ähnliche Ergebnisse wie bei den Glioblastomzellen gefunden. Die Fluoreszenzintensität reichte von 0 bis 480 Zählern und der Anteil der fluoreszierenden Zellen variierte sowohl mit der Zeit als auch von Patient zu Patient. Zusammenfassend ergaben sich bei diesen Experimenten große Unterschiede in der PpIX-Synthese. Diese reichten von nicht messbarer Synthese bis zu einer hohen Synthese.

Carre et al. [150] wiesen einen Anstieg der PpIX-Synthese in C6 Gliomzellen nach, erhielten bei ihren Experimenten aber auch eine hohe Variabilität der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Zellen derselben Zellpopulation.

Vergleichbare Ergebnisse wie bei Eléouet und Carre zeigten sich bei unseren Experimenten mit 5-ALA bei der Fluoreszenzmikroskopie und der FACS-Analyse. Auch wir erhielten bei den Messungen große Streuungen der Fluoreszenzintensitäten sowohl innerhalb des gleichen Versuches wie auch zwischen den einzelnen Versuchen.

Wyss-Desserich et al. [151] inkubierten humane Adenokarzinomzellen des Endometriums mit 0,01 mg/ml ($\approx 0,06$ mM), 0,1 mg/ml ($\approx 0,6$ mM), 1 mg/ml (≈ 6 mM) und 10 mg/ml (≈ 60 mM) 5-ALA für 3, 6 und 24 h. Sie fanden eine bis zu vierfach höhere Fluoreszenzintensität in malignen Zellen verglichen mit normalen Zellen. Die höchste intrazelluläre PpIX-Akkumulation wurde bei 5-ALA-Konzentrationen von 6 mM in HEC-Zellen (humane Adenokarzinomzellen des Endometriums) und 0,6 und 6 mM in KLE-Zellen (humane Adenokarzinomzellen des Endometriums) mittels FACS-Analyse gemessen. Die Zellen, die bei diesen 5-ALA-Konzentrationen über 24 h inkubiert wurden, zeigten eine höhere Fluoreszenzintensität verglichen mit Inkubationszeiten über 3 und 6 h. Höhere Konzentrationen (12 mM und 30 mM) zeigten niedrigere Fluoreszenzintensitäten.

Die in der zuletzt erwähnten Studie verwendeten 5-ALA-Konzentrationen und Inkubationszeiten stimmen mit den Bedingungen unserer Experimente gut überein. Sowohl bei unseren Versuchen als auch bei den Versuchen von Wyss-Desserich et al. [150] wurden die Proben mittels FACS-Analyse gemessen. Die Anregungswellenlänge betrug in beiden Studien 488 nm. Ähnliche Bedingungen liegen auch bei den Inkubations- und Messzeiten vor (3 und 6 h vs. 2, 4 und 6 h). Bei unseren Versuchen zeigten Medulloblastomzellen der Zelllinie D283 Med im Gegensatz zu Adenokarzinomzellen bei den Konzentrationsreihen und bei den Zeitreihen einen nur geringen Anstieg der Fluoreszenzintensität um etwa 10 % in der FACS-Analyse. Einen etwas stärkeren Anstieg von etwa 20 % erhielten wir bei den Fluoreszenzmikroskopieversuchen. Die höhere Fluoreszenzintensität bei den Experimenten von Wyss-Desserich im Vergleich zu unseren Experimenten führen wir auf die unterschiedlichen Karzinomzellen (Adenokarzinomzellen des Endometriums vs. Medulloblastomzellen) zurück.

Steinbach et al. [152] gelang es 1995 *in vitro* zu zeigen, dass die Fluoreszenzintensität von 5-ALA induziertem PpIX in humanen Blasenkarzinomzellen bei Konzentrationen zwischen 0,18 bis 1,8 mM linear bis 4 h ansteigt. Durch Verlängerung der Inkubationszeit wurde eine Sättigung erreicht. Die Messungen wurden mittels FACS-Analyse durchgeführt. Die Einstellungen

entsprechen denen unserer Arbeit. Eine Erklärung für diesen Anstieg über 4 h im Gegensatz zu unseren Versuchen mit kurzen Anstiegszeiten von nur 10 min können wir auch hier nur an den unterschiedlichen Karzinomzellen festmachen. Einen linearen Anstieg der PpIX-Fluoreszenzintensität konnten Stummer et al. [153] durch Inkubation von C6 Gliomzellen *in vitro* mit 1 mM 5-ALA ($\approx 0,16$ mg/ml) zeigen. Gemessen wurde mit Fluoreszenzspektroskopie über eine Zeitspanne von 5 bis 85 min.

Noch nicht publizierte eigene Daten (Ritz und Strauss) zeigen, dass Medulloblastomzellen zumindest genügend 5-ALA induziertes PpIX für die erfolgreiche Durchführung einer PDT produzieren. Zunächst erscheinen diese Beobachtungen der PDT widersprüchlich zu den im Rahmen der Visualisierung erhaltenen Resultate. Ein Erklärungsansatz für diese widersprüchlichen Resultate könnte die vor allem perinukleäre Lokalisation von PpIX sein [154]. Medulloblastomzellen haben einen großen Zellkern und nur einen geringen Zytoplasmaanteil, was zu einer geringeren PpIX-Synthese führen könnte. Eine weitere Erklärung für den fehlenden bzw. sehr geringen Anstieg der Fluoreszenzintensität könnten nicht-fluoreszierende Aggregate sein. Laut Schneckenburger et al. [155] neigen Porphyrine dazu, in Lösungen und in Zellen zu aggregieren. Durch diese Aggregate kommt es zu einer verminderten Menge an Fluorophoren und somit zu einer geringeren Fluoreszenzintensität. Durch diese zwei Eigenschaften von PpIX, die perinukleäre Lokalisation und die Aggregation, befindet sich die PpIX-Produktion möglicherweise unter der Nachweisgrenze der FACS-Analyse. Somit wäre ein Fluoreszenzanstieg mittels FACS-Analyse nicht ausreichend nachweisbar.

Eine weitere denkbare Erklärung wäre eine limitierte Enzymkapazität zur Produktion von genügend PpIX oder eine limitierte Aufnahme von 5-ALA in die Medulloblastomzelle.

Aufnahme von Hypericin in Medulloblastomzellen

Zur Untersuchung der Aufnahmekinetik von Hypericin in die Medulloblastomzelle wurde, wie bereits in Kapitel 2.4.1 beschrieben, ein „warm-kalt“ Versuch

mit der Zelllinie D283 Med durchgeführt. Nach zweistündiger Inkubationszeit bei 4 °C ergab sich nur ein geringer Anstieg der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu einer zweistündigen Inkubationszeit bei 37 °C (siehe Abbildung 31). Da bei einer Temperatur von 4 °C der zelluläre Metabolismus und somit aktive Prozesse stark eingeschränkt sind, muss man bei unseren Versuchen vor allem von einem energieabhängigen, sprich aktiven Transportmechanismus ausgehen. Bei Annahme eines passiven Transports wäre eine weitgehend gleiche Fluoreszenzintensität bei beiden Inkubationstemperaturen zu erwarten. Somit ist ein aktiver Transportmechanismus bewiesen. Wir gehen am ehesten von einer rezeptorvermittelten Endo- oder Pinozytose bei geringer passiver Diffusion von Hypericin in die Medulloblastomzellen aus.

Sattler et al. [156] konnten 1997 in einem vergleichbaren Experiment mit Caco-2-Zellen ebenfalls einen aktiven Hypericinaufnahmemechanismus zeigen. Die Hypericinaufnahme in die Zellen war bei 4 °C wesentlich geringer als bei einer Temperatur von 37 °C. Bei gleichzeitiger Untersuchung des Bindungsverhaltens von Hypericin an die Caco-2-Zellen ergab sich eine niedrige Affinitätskonstante von 0,1 mM. In Anbetracht dieser Daten kann man von einem aktiven Transportmechanismus von Hypericin in die Caco-2-Zelle ausgehen. Wegen der niedrigen Affinität kann darüber hinaus eine nicht-spezifische Bindung an Membranlipide angenommen werden.

Weitere Hinweise für einen aktiven Aufnahmetransportmechanismus von Hypericin lieferten Weber et al. [157]. Sie zeigten, dass Veränderungen verschiedener Schritte der Endozytose und des Membranzyklus eine Änderung der intrazellulären Lokalisation von Hypericin zur Folge hatte. Dies wiederum lässt auf einen energieabhängigen Prozess bei der Hypericinaufnahme in die Zelle und Hypericinverteilung innerhalb der Zelle schließen.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen fanden Uzdensky et al. [158] keinen signifikanten Unterschied im Fluoreszenzverhalten von WiDr-Zellen (humane Kolonkarzinom-Zellen) bei Untersuchungen der Fluoreszenzintensität bei Inkubationstemperaturen von 4 °C und Raumtemperatur über eine Stunde. Als Ergebnis wurde vor allem eine passive Diffusion von der Arbeitsgruppe postuliert. Natürlich kann der

Aufnahmemechanismus bei verschiedenen Zellarten variieren, womit sich verschiedene Aufnahmemechanismen erklären lassen. Jedoch sollte darauf hingewiesen werden, dass ein rechtzeitiges Kühlen der Zellen und des Inkubationsmediums auf 4 °C von großer Relevanz ist. Nur so kann der aktive Aufnahmetransport inhibiert werden. Daher haben wir die Zellen und das Inkubationsmedium, wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben, frühzeitig vor Versuchsbeginn auf 4 °C gekühlt.

Konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensität von Hypericin in Medulloblastomzellen

Die konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensität von Hypericin wurde bei den Zelllinien D283 Med, D341 Med und Daoy nach 2 h Inkubationszeit mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Dabei zeigte sich ein schneller und signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität bis zu einer Konzentration von 10 µM, um dann bei höheren Konzentrationen in einen etwas flacheren Kurvenverlauf der Fluoreszenzintensität überzugehen. Bei 10 µM wurde im Schnitt eine Zunahme der Fluoreszenzintensität um etwa das 5-fache, bei 20 µM eine 7 bis 8-fache Zunahme der Fluoreszenzintensität im Verhältnis zur Autofluoreszenz bei allen drei oben genannten Zelllinien gemessen (siehe Abbildung 35).

Mittels FACS-Analyse konnten die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie mit der Zelllinie D283 Med verifiziert werden. Beide Messmethoden lieferten sehr gut übereinstimmende Ergebnisse (siehe Abschnitt „Vergleich von Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse“, Seite 99). Für den Vergleich der zwei Mittelwerte der beiden Methoden mit dem Zweistichproben-t-Test unter der Annahme gleicher Streuungen in den beiden Stichproben betrug der p-Wert 0,871.

Weiterhin stimmen diese Ergebnisse mit Fluoreszenzmikrostudiestudien an Glioblastomzellen und Neuronen [159] sowie FACS-Studien an Glioblastomzellen [143] sehr gut überein. Der geringe Anstieg der Fluoreszenzintensität bei Konzentrationen über 10 µM kann eventuell durch Aggregation von Hypericin

und damit einer geringeren Fluoreszenzquantenausbeute erklärt werden. Solche intrazellulären Hypericinaggregate wurden in Versuchen mit PAM-212-Zellen (murinen Keratinozyten) ebenfalls angenommen [160].

Eine weitere Erklärung wäre der gesättigte aktive Aufnahmeprozess von Hypericin in die Zellen. Ritz et al. [144] zeigten für die Aufnahme von Hypericin in Glioblastomzellen einen energieabhängigen aktiven Transport. Auch wir konnten mittels Versuchen zur Aufnahmekinetik auf einen aktiven Aufnahmemechanismus von Hypericin in Medulloblastomzellen schließen.

Zeitabhängige Fluoreszenzintensität von Hypericin in Medulloblastomzellen

Die zeitabhängige Fluoreszenzintensität von Hypericin wurde mit den Zellreihen D283 Med, D341 Med und Daoy mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht (siehe Abbildungen 36, 37, 38). Hohe Konzentrationen von 10 μM führten zu einem schnellen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Das Maximum der Fluoreszenzintensität wurde zwischen 2 und 4 h erreicht. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 6 h führte zu keinem weiteren signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität. Es kam zu einer Sättigung im Kurvenverlauf. Bei der Zelllinie D283 Med kam es sogar zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität um ca. 15 % zwischen 2 und 6 h. Niedrige Hypericin-konzentrationen wie 2,5 und 5 μM führten ebenfalls zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität bis 2 h. Zwischen 2 und 6 h kam es ebenfalls zu einer Sättigung im Kurvenverlauf. Dabei wurde bei Inkubation mit 2,5 μM Hypericin eine maximale Fluoreszenzintensität von 50 bis 60 %, bei 5 μM von 70-80 % im Vergleich zu einer Inkubationskonzentration von 10 μM erreicht.

Bei den Messungen der zeitabhängigen Fluoreszenzintensität mittels FACS-Analyse konnten grundsätzlich übereinstimmende Ergebnisse und Kurvenverläufe bei der Zelllinie D283 Med erzielt werden. Unterschiede zwischen beiden Methoden ergaben sich bei den initialen Anstiegsgeschwindigkeiten der Fluoreszenzintensität und bei der Fluoreszenzintensitätszunahme bei längeren Inkubationszeiten (siehe Abschnitt „Vergleich

von Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse“, Seite 99). Prinzipiell konnten die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie mittels FACS-Analyse verifiziert werden.

Bei Untersuchungen zur Aufnahme von Hypericin in CNE2 und TWO-1 Zellen zeigten Ali et al. [161] mit unseren Versuchen gut übereinstimmende Ergebnisse. Sie inkubierten CNE2-Zellen mit 1,25 μM und TWO-1-Zellen mit 2,5 μM Hypericin. Während der ersten 2 bis 3 h wurde ein Anstieg der Hypericinfluoreszenz gemessen, gefolgt von abnehmender Intensität bei Inkubationszeiten länger als 4 h.

Dies ist, wie bereits erwähnt, möglicherweise durch die Aggregation von Hypericin und eine dadurch verringerte Fluoreszenzquantenausbeute zu erklären [160]. Zudem könnten Umverteilungsprozesse von Hypericin in hydrophile Räume ebenfalls zu einer verminderten Fluoreszenzquantenausbeute beitragen.

Eine weitere Erklärung für die Abnahme der Intensität könnte die Ausschleusung von Hypericin aus der Zelle nach einer gewissen Inkubationszeit sein. Jedoch fehlen zum Metabolismus sowie zur Elimination von Hypericin in Zellen weiterführende Untersuchungen, da bisher die therapierelevanten Metabolite von Hypericin noch nicht eindeutig identifiziert werden konnten [157].

Vergleich von Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse

Über ein nichtlineares Modell wurde bei den Konzentrationsreihen die Anstiegsrate α der Fluoreszenzintensität der beiden Methoden Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse berechnet und verglichen. Der Mittelwert der Anstiegsrate α betrug bei den Konzentrationsreihen bei beiden Methoden 0,11. Somit konnte gezeigt werden, dass zur Messung der Fluoreszenzintensität bei Konzentrationsversuchen von Hypericin in Medulloblastomzellen beide Methoden, Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse, sehr gute übereinstimmende Messergebnisse liefern. Erwähnenswert ist, dass sich bei der FACS-Analyse eine größere, jedoch nicht signifikant verschiedene Streuung der einzelnen Anstiegsraten α ergab. Bei der Fluoreszenzmikroskopie waren

die einzelnen Anstiegsraten α sehr konstant. Eine Ursache für die größere Streuung bei der FACS-Analyse konnte nicht eruiert werden.

Bei den Zeitreihenversuchen wurden die beiden Methoden ebenfalls über die Anstiegsrate α verglichen. Bei der FACS-Analyse wurde das nichtlineare Modell 1b, bei der Fluoreszenzmikroskopie das Modell 2, ein Kompartimentmodell, verwendet. Dabei betrug die Anstiegsrate α bei 2,5 μM Hypericin 0,0134 bei der Fluoreszenzmikroskopie vs. 0,0037 bei der FACS-Analyse, bei 5 μM 0,0175 vs. 0,0075 und bei 10 μM 0,0228 vs. 0,018.

Im Gegensatz zu den Konzentrationsreihen ergab sich bei diesem Vergleich der zwei Methoden vor allem bei 2,5 μM und 5 μM unterschiedlich hohe Anstiegsraten α . Bei 2,5 μM war diese bei der Fluoreszenzmikroskopie 3-fach höher, bei 5 μM 2,5-fach höher als bei der FACS-Analyse. Bei 10 μM betrug der Unterschied nur noch das 1,3-fache. Bis etwa 2 h zeigte sich bei beiden Methoden ein ähnlicher Kurvenverlauf. Bei Inkubationszeiten über 2 h konnte bei der Fluoreszenzmikroskopie keine weitere signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensität gemessen werden. Bei 10 μM kam es sogar zum Abfall der Fluoreszenzintensität. Bei der FACS-Analyse kam es bei 2,5 und 5 μM selbst bei Inkubationszeiten über 2 h noch zu einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenzintensität. Bei 10 μM ging die Fluoreszenzintensität bei ungefähr 3 h in eine Sättigung über. Ein Abfall wie bei der Fluoreszenzmikroskopie wurde nicht gemessen.

Aus den Beobachtungen der Konzentrationsreihen lässt sich schlussfolgern, dass Messungen von Fluoreszenzintensitäten bei Hypericin in Medulloblastomzellen zu übereinstimmenden Ergebnissen führen und beide Methoden verwendet werden können. Welche Methode für ein Experiment schließlich verwendet wird, hängt aufgrund der Vor- und Nachteile der jeweiligen Methode von der Fragestellung ab.

Bei den Zeitreihen ergaben sich für die Anstiegsraten α unterschiedliche Werte. Graphisch hingegen zeigte sich vor allem bis 2 h ein ähnlicher Kurvenverlauf der einzelnen Konzentrationen. Während dieser Inkubationszeit kam es bei beiden Methoden zu einem raschen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Bei der Fluoreszenzmikroskopie kam es bei Inkubationszeiten über

2 h zur Sättigung bzw. sogar zur Fluoreszenzintensitätsabnahme, bei der FACS-Methode stieg die Fluoreszenzintensität hingegen weiter an. Mit Einschränkungen können somit beide Methoden zu zeitabhängigen Fluoreszenzintensitätsmessungen verwendet werden.

Auch Seitz et al. [162] konnten sowohl mit der FACS-Analyse als auch mit der Fluoreszenzmikroskopie gut übereinstimmende Ergebnisse bei der Aufnahme von Hypericin bei kindlichen Rhabdomyosarkomen bei einer Inkubationszeit von 2 h erzielen.

Damit stehen zwei unterschiedliche Methoden zur Messung der Fluoreszenzintensität zur Verfügung, deren entscheidende Vor- und Nachteile im Folgenden kurz erläutert werden. Die FACS-Analyse weist den Vorteil der quantitativen Messung auf, da eine große Anzahl von Zellen und deren Fluoreszenzintensität gemessen werden können. Als nachteilig ist die größere Streuung der einzelnen Versuche festzuhalten. Die Fluoreszenzmikroskopie bietet den Vorteil der genauen Betrachtung und Beurteilung der Zellen und Untersuchung der Lokalisation eines Fluorophors. So können auch intraoperativ Tumorzellen visualisiert werden und dem Operateur einen entscheidenden Vorteil bei der Beurteilung der Tumorausdehnung bzw. Tumorgrenzen geben. Hierdurch kann wiederum gesundes Gewebe geschont werden. Als nachteilig anzusehen ist, im Vergleich zur FACS-Analyse, die nur geringe Anzahl von Zellen, die mit dem selben Zeitaufwand erfasst und gemessen werden können.

Letztendlich ist die Entscheidung für eine der beiden Methode von der Fragestellung bzw. vom Einsatzgebiet (Forschung, Operation) abhängig. Beide Methoden sollten ergänzend genutzt werden.

Schlussfolgerung

Aufgrund der erhaltenen Daten bei den 5-ALA-Versuchen ist dieser Fluoreszenzmarker für die Visualisierung von Medulloblastomzellen nur bedingt geeignet, da ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität nicht gemessen werden konnte. Ob 5-ALA jedoch für die PDT bei Medulloblastomen eine geeignete Substanz ist, werden die noch nicht publizierten aber in

kürze erscheinenden Daten von Ritz (Klinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum in Tübingen) und Strauss (ILM Ulm) zeigen.

Hingegen konnte eindeutig gezeigt werden, dass Hypericin ein potenter und vielversprechender Fluoreszenzmarker für die Visualisierung von Medulloblastomzellen ist. Sowohl bei den Konzentrationsreihen als auch bei den Zeitreihen konnten überzeugende Ergebnisse bei der Visualisierung von Medulloblastomzellen geliefert werden. Diese Resultate konnten mit der Methode der Fluoreszenzmikroskopie und mit der FACS-Analyse erbracht werden. Beim Vergleich beider Methoden ergaben sich bei den konzentrationsabhängigen und eingeschränkt bei den zeitabhängigen Versuchen gut übereinstimmende Messwerte und Kurvenverläufe.

Diese *in vitro* gewonnenen Resultate geben Anlass für weitere Experimente mittels PDT *in vitro* und im Rahmen von Tierexperimenten mit dem Fluoreszenzmarker Hypericin zur Etablierung der Visualisierung und PDT bei Medulloblastomen.

5. Zusammenfassung

Medulloblastome sind die häufigsten malignen Tumoren im Kindes- und Jugendalter. Der genaue histopathologische Ursprung von Medulloblastomen konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Die Therapie besteht aus Resektion, Radiatio und Chemotherapie. Ein ungünstiger prognostischer Faktor ist das Verbleiben von Resttumor nach der Operation. Um das Verbleiben eines Resttumors zu verhindern, ist eine genaue intraoperative Tumoridentifizierung und -lokalisation erforderlich, um so die notwendige Radikalität des operativen Eingriffes zu verbessern.

Die fluoreszenzbasierte Visualisierung von Tumorgewebe ermöglicht unter Verwendung eines geeigneten Fluoreszenzmarkers Tumorgewebe von normalem Gewebe zu differenzieren. Dadurch wird eine vollständige Tumorresektion ermöglicht. Diese Methode stellt somit eine vielversprechende Ergänzung der operativen Therapie dar.

Hypericin ist ein natürlich vorkommender Fluoreszenzmarker und Photosensibilisator aus dem Johanniskraut, der in den vergangenen Jahren in der onkologischen Forschung, Diagnostik und Therapie zunehmend an Relevanz gewonnen hat. In den Fachbereichen Urologie und Dermatologie wurde Hypericin bereits in ersten klinischen Studien mit vielversprechenden Ergebnissen angewandt.

In vitro konnten ausgezeichnete photosensibilisierende Eigenschaften von Hypericin bei Glioblastomzelllinien nachgewiesen werden. Die antineoplastischen Eigenschaften durch Inhibition der Proteinkinase C, Inhibition der Tyrosinkinase und Induktion von Apoptose und Nekrose sind ebenso erwähnenswert und machen Hypericin auch für neuroonkologische Therapieansätze interessant.

Der Fluoreszenzmarker 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) wird heutzutage ebenfalls in mehreren klinischen Fachbereichen zur Forschung, Diagnostik und Therapie eingesetzt. Vor allem in der Dermatologie und Urologie hat sich 5-ALA zur Detektion und Photodynamischen Therapie von Tumoren etabliert. Erste Erfolge wurden auch bereits in der Neurochirurgie erzielt. Die 5-ALA

fluoreszenzbasierte Resektion von Glioblastomen hat die Prognose dieser Patientengruppe signifikant verbessert.

Die Anwendbarkeit von Hypericin und 5-ALA zur Visualisierung von Medulloblastomen *in vitro* wurde in dieser Arbeit unter Anwendung qualitativer (Fluoreszenzmikroskopie) und quantitativer Messverfahren (Durchflusszytometrie/FACS-Analyse) an drei Medulloblastomzelllinien untersucht. Die beiden Messverfahren Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse wurden anhand von mathematischen Modellen verglichen. Des Weiteren wurde der Aufnahmemechanismus von Hypericin in die Medulloblastomzelle untersucht.

Durch die *in vitro* Versuche konnte gezeigt werden, dass 5-ALA kein geeigneter Marker für die intraoperative Visualisierung von Medulloblastomzellen ist, da nur ein geringer Anstieg der Fluoreszenzintensität mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse detektiert werden konnte. Dies lässt sich möglicherweise auf den geringen Zytoplasmaanteil zugunsten eines großen Zellkerns zurückführen. Eine weitere Ursache könnte die Bildung nicht-fluoreszierender Aggregate oder eine PpIX-Produktion unter der Nachweisgrenze, vor allem bei der FACS-Analyse, sein. Eine limitierte Enzymkapazität der Zellen oder eine limitierte 5-ALA-Aufnahme in die Zellen sind als weitere Gründe aufzuführen.

Bei Hypericin zeigte sich bei jeder der drei untersuchten Medulloblastomzelllinien eine konzentrations- und zeitabhängige intrazelluläre Hypericinaufnahme durch einen aktiven Transportmechanismus. Es konnte bewiesen werden, dass bereits mittels sehr geringer Hypericindosen (im Mikromolarbereich) und kurzen Inkubationszeiten eine starke Zunahme der Fluoreszenzintensität bei Medulloblastomzellen erreicht wird.

Aufgrund der sehr guten Fluoreszenzintensität bei Hypericinkonzentrationen von nur 2,5 bis 5 μM kann voraussichtlich mit niedrigen Konzentrationen gearbeitet werden. Dadurch können Nebenwirkungen, wie zum Beispiel eine Dunkelzytotoxizität bei höheren Dosen, vermieden werden. Jedoch wurden bei den durchgeführten Versuchen selbst bei hohen Konzentrationen und langen Inkubationszeiten keine erheblichen Zellveränderungen mit dem

Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Aufgrund dieser Beobachtung ist von einer geringen Zytotoxizität von Hypericin auszugehen.

Bei Hypericin ergab sich bei niedrigen Konzentrationen (2,5 bis 5 μM) eine ideale Inkubationszeit von 2 bis 4 h, bei höheren Konzentrationen (10 μM) eine ideale Inkubationszeit von 2 h. Während dieser Inkubationsphase kam es zu einem steilen Anstieg der Fluoreszenzintensität, danach konnte bei allen Konzentrationen keine weitere signifikante Fluoreszenzintensitätszunahme gemessen werden. Bei der Zelllinie D283 Med kam es bei einer Konzentration von 10 μM zwischen 2 und 6 h sogar zu einem leichten Abfall der Fluoreszenzintensität.

Aus den Daten der konzentrations- und zeitabhängigen Experimente mit Hypericin wurden zwei mathematische Modelle berechnet. Mit Hilfe eines nichtlinearen Modells bzw. Kompartiment-Modells wurden aus den Daten die zugehörigen Kurven berechnet und graphisch dargestellt.

Des Weiteren konnte mit Hilfe der Modelle gezeigt werden, dass sich sowohl die Fluoreszenzmikroskopie als auch die FACS-Analyse zur Fluoreszenzintensitätsbestimmung eignen. Dies gilt vor allem bei konzentrationsabhängigen Experimenten.

Letztlich konnte über einen „warm-kalt“ Versuch nachgewiesen werden, dass es sich bei der Hypericinaufnahme bei Medulloblastomzellen um einen energieabhängigen und somit aktiven Aufnahmetransport handelt. Am ehesten ist von einer Endo- oder Pinozytose auszugehen.

Diese überzeugenden *in vitro* Resultate lassen ein hohes Potential für die intraoperative Visualisierung und die Photodynamische Therapie von Medulloblastomzellen mit Hypericin annehmen. Hypericin könnte die first-line Therapie von Medulloblastomen erweitern und erbringt neue therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung von Rezidiven.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Deutsches Krebsforschungszentrum (www.dkfz.de)
Abbildung 2: Robert Koch Institut (www.rki.de)
Abbildung 3: Robert Koch Institut (www.rki.de)
Abbildung 4: Institut für Hirnforschung, Universität Tübingen
Abbildung 5: Klinik für Neuroradiologie, Universität Tübingen
Abbildung 6: Zeitschrift WIR 4/2001
Abbildung 7: ChemieCool (www.chemicool.com)
Abbildung 8: Olympus Microscopy Resource Center (www.olympusmicro.com)
Abbildung 10: Klinikum Großhadern Ludwig-Maximilians-Universität München
(<http://laser.klinikum.uni-muenchen.de>)
Abbildung 11: Royal College of Physicians (<http://www.rcplondon.ac.uk>)
Abbildung 13: Gasperl, Michael; Photographie
Abbildung 17: A.Juzeniene et al.: Photochem. Photobiol. 2002, 76: 329-334.
Abbildung 19: Schöneborn PW: Effekte der UVA1- und UVB-Strahlung: Apoptose- und Nekroseinduktion humaner T-Lymphozyten in vitro und Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung. Dissertation 2002, Ruhr-Universität Bochum.
Abbildung 20: Olympus (www.olympusmicro.com)
Abbildung 21: Olympus (www.olympusmicro.com)
Abbildung 22: Olympus (<http://microscope.olympus.com>)
Abbildung 23: AHFAnalysetechnik (www.ahf.de)
Abbildung 24: Lodish et al., 2001

6.2 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 2: Stepp H, Sroka R, Baumgartner R. Endoscopy. Fluorescence endoscopy of gastrointestinal diseases: basic principles, techniques, and clinical experience. 1998 May;30(4):379-86.
Tabelle 3: In Anlehnung an Eckardt A: Inkohärente Lichtsysteme für die Fluoreszenzdiagnostik und die PDT. Dissertation, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München, 2005.
Tabelle 4: Stryer Biochemie 6. Aufl., 2007.
Tabelle 5: American Type Culture Collection, VA, USA (www.lgcstandards-atcc.org)

6.3 Literaturverzeichnis

1. Robert Koch Institut (www.rki.de)
2. Radhakrishnan K, Bohnen NI, Kurland LT. Epidemiology of brain tumors. In: Brain tumor. A comprehensive Text. Morantz R, Walsh JW (Eds.). Marcel Dekker: New York 1994;1-18.
3. Posner JB: Intracranial metastases. In Posner JB: Neurologic complications of cancer. FA Davis, Philadelphia PA. 1995;77-110.
4. Kaatsch P, Spix J. German Childhood Cancer Registry – Annual Report 2004 (1980-2003). Jahresbericht 2004 (1980-2003) des Deutschen Kinderkrebsregisters. Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik, 2004, Universität Mainz.
5. Kaatsch P: Das Deutsche Kinderkrebsregister im Umfeld günstiger Rahmenbedingungen. Bundesgesundheitsblatt 47, 2004, Heft 5.

6. Preston-Martin S, Mack W, Henderson BE. Risk factors for gliomas and meningiomas in males in Los Angeles County. *Cancer Res.* 1989 Nov 1;49(21):6137-43.
7. Choux M, Lena G, Alfonsi S, Bernard JL, Clement R, Elbaze F, Gambarelli D, Hassoun J, Lerpiniere JP, Lucas C, Pinsard N, Raybaud C, Raybaud C, Rigaud F, Ruffo M, Tapounie E. Medulloblastoma. *Neurochirurgie.* 1982;28 Suppl 1:1-229.
8. Schiffer D, Cravioto H, Giordana MT, Migheli A, Pezzulo T, Vigliani MC. Is polar spongioblastoma a tumor entity? *J Neurosurg.* 1993 Apr;78(4):587-91.
9. Dold U, Hermanek P, Höffken K, Sack H: Allgemeine Prinzipien der Tumorthherapie. In Dold U et al: *Praktische Tumorthherapie.* Thieme Stuttgart 1993; 49-108.
10. Bailey P, Cushing H. Medulloblastoma cerebelli. A common type of midcerebellar glioma in childhood. *Arch Neurol Psychiatr.* 1925;14:192–224.
11. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee W. The WHO Classification of Tumors of the Nervous System. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.* 2002 Mar;61(3):215-25; discussion 226-9.
12. Wechsler-Reya RJ, Scott MP. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by sonic hedgehog. *Neuron.* 1999 Jan;22(1):103-14.
13. Marino S, Vooijs M, van Der GH, Jonkers J, Berns A. Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev.* 2000 Apr 15;14(8):994-1004.
14. Huang H, Mahler-Araujo BM, Sankila A et al. APC mutations in sporadic medulloblastomas. *Am J Pathol.* 2000 Feb;156(2):433-7.
15. Frühwald MC, O'Dorisio MS, Dai Z, Rush LJ, Krahe R, Smiraglia DJ, Pietsch T, Elsea SH, Plass C. Aberrant hypermethylation of the major breakpoint cluster region in 17p11.2 in medulloblastomas but not supratentorial PNETs. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001; Jan;30(1):38-47.
16. Jakacki RI. Pineal and nonpineal supratentorial primitive neuroectodermal tumors. *Childs Nerv Syst.* 1999; Oct;15(10):586-91.
17. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007 Aug;114(2):97-109. Epub 2007 Jul 6.
18. Neundörfer B, Schneider E, Dittmann V, Pödingner W. *Atlas der Nervenheilkunde.* G. Braun Fachverlage GmbH & Co. KG, 1996;208.
19. Frankel A, Lau Q, Olson S. Lymph node metastasis of medulloblastoma in a young adult. *J Clin Neurosci.* 2009 Nov;16(11):1485-6. Epub 2009 Jul 5.
20. Kühl J, Müller HL, Berthold F, Kortmann RD, Deinlein F, Maass E, Graf N, Gnekow A, Scheurlen W, Göbel U, Wolff JE, Bamberg M, Kaatsch P, Kleihues P, Rating D, Sörensen N, Wiestler OD. Preradiation chemotherapy of children and young adults with malignant brain tumors: results of the German pilot trial HIT'88/'89. *Klin Padiatr.* 1998 Jul-Aug;210(4):227-33.
21. Chumas P, Condon B, Oluoch-Olunya D, Griffiths S, Hadley D, Teasdale G. Early changes in peritumorous oedema and contralateral white matter after dexamethasone: a study using proton magnetic resonance spectroscopy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997; Jun;62(6):590-5.
22. Kühl J. Therapie von Kindern mit einem Medulloblastom. *Blickpunkt: Schmerzen Medizin und Wissenschaft: Therapie von Kindern mit einem Medulloblastom.* WIR 4/2001; 8-12.
23. Kortmann RD, Timmermann B, Kuhl J, Willich N, Flentje M, Meisner C, Bamberg M: HIT '91 (prospective, co-operative study for the treatment of malignant brain tumors in childhood): accuracy and acute toxicity of the irradiation of the craniospinal axis. Results of the quality assurance program. *Strahlenther Onkol.* 1999 Apr;175(4):162-9.
24. Kortmann RD, Kühl J, Timmermann B, Mittler U, Urban C, Budach V, Richter E, Willich N, Flentje M, Berthold F, Slavc I, Wolff J, Meisner C, Wiestler O, Sörensen N, Warmuth-Metz M, Bamberg M. Postoperative neoadjuvant chemotherapy before radiotherapy as compared to immediate radiotherapy followed by maintenance chemotherapy in the treatment of medulloblastoma in childhood: results of the german prospective randomized trial HIT '91. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000 Jan 15;46(2):269-79.
25. Duffner PK, Horowitz ME, Krischer JP, Friedman HS, Burger PC, Cohen ME, Sanford RA, Mulhern RK, James HE, Freeman CR, et al. Postoperative chemotherapy and delayed

- radiation in children less than three years of age with malignant brain tumors. *N Engl J Med.* 1993 Jun 17;328(24):1725-1731.
26. Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M. *Klinische Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie*, Blackwell Verlag.
 27. Hirschfeld T. Fluorescence background discrimination by prebleaching. *J Histochem Cytochem.* 1979 Jan;27(1):96-101.
 28. Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M. *Klinische Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie*, Blackwell Verlag, 24-25.
 29. Gordon MP, Ha T, Selvin PR. Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 27;101(17):6462-5. Epub 2004 Apr 19.
 30. Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M, *Klinische Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie*, Blackwell Verlag, 31-32.
 31. Griffiths DJ. *Introduction to Quantum Mechanics (2nd ed.)*. Prentice Hall 2004.
 32. Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M. *Klinische Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie*, Blackwell Verlag, 32-37.
 33. Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M. *Klinische Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie*, Blackwell Verlag, 73.
 34. Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M. *Klinische Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie*, Blackwell Verlag, 79-80.
 35. Horvath KA, Torchiana DF, Daggett WM, Nishioka NS. Monitoring myocardial reperfusion injury with NADH fluorometry. *Lasers Surg Med.* 1992;12(1):2-6.
 36. Lohmann W, Paul E. In situ detection of melanomas by fluorescence measurements. *Naturwissenschaften.* 1988 Apr;75:201-2.
 37. Lam S, Becker HD. Future diagnostic procedures. *Chest Surg Clin N Am* 1996 May;6(2):363-80.
 38. Harris DM, Werkhaven J. Endogenous porphyrin fluorescence in tumors. *Laser Surg Med.* 1987;7(6): 467-72.
 39. Pradhan A, Pal P, Durocher G, Villeneuve L, Balassy A, Babai F, Gaboury L, Blanchard L. Steady-state and time-resolved fluorescence properties of metastatic and non-metastatic malignant cells from different species. *J Photochem Photobiol B.* 1995 Dec; 31(3): 101-12.
 40. Schneckenburger H, Gschwend MH, Strauss WS, Sailer R, Kron M, Steeb U, Steiner R. Energy transfer spectroscopy for measuring mitochondrial metabolism in living cells. *Photochem Photobiol* 1997 Jul;66(1): 34-41.
 41. Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M. *Klinische Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie*, Blackwell Verlag, 22-25.
 42. Pass HI. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Mar 17;85(6):443-456.
 43. Wolf P. Photodynamische Therapie (PDT). *Der Hautarzt* 1997; 48(2): 137-148.
 44. Konan YN, Gurny R, Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2002 Mar;66(2):89-106.
 45. Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M, *Klinische Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie*, Blackwell Verlag: 22-23.
 46. Ell C, May A, Gossner L, Pech O, Gunter E, Mayer G, Henrich R, Vieth M, Muller H, Seitz G, Stolte M. Endoscopic mucosal resection of early cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2000 Apr;118(4):670-7.
 47. Roth L. Hypericum-Hypericin. Botanik, Inhaltsstoffe, Wirkung., In: Editor. *Ecomed Arzneipflanzen-Monographie*, ed. Series. Landsberg/Lech 1990: Ecomed.
 48. Reference Substance-Masterfile – Phytochem – Natural Compounds – 2005. *Phytochem Referenzsubstanzen GbRmbH.*
 49. Ehrenberg B, Anderson JL, Foote CS: Kinetics and yield of singlet oxygen photosensitized by hypericin in organic and biological media. *J. Photochem Photobiol.* 1998 Aug;68(2): 135-40.
 50. Nahrstedt A., Butterweck V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry.* 1997 Sep;30 Suppl 2:129-34.
 51. Kümper H. Hypericismus bei Schafen. *Tierärztliche Praxis* 1998;17:257-261.
 52. Lavie G, Mazur Y, Lavie D, Meruelo D. The chemical biological properties of hypericin- a compound with a broad spectrum. *Med Res Rev.* 1995 Mar;15(2):111-19.

53. Hänsel R., Sticher O., Steinegger E. *Pharmakognosie – Phytopharmazie* 6. Aufl. 1999, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio.
54. Thiede HM, Walper A. Inhibition of MAO and COMT by hypericum extracts and hypericin. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 1994 Oct;7 Suppl 1:S54-6.
55. Chatterjee SS, Bhattacharya SK, Wonnemann M, Singer A, Müller WE. Hyperforin as a possible antidepressant compound of *Hypericum* extracts. *Life Sci.* 1998;63(6):499-510.
56. Moore LB, Goodwin B, Jones SA, Wisely GB, Serabjit-Singh CJ, Willson TM, Collins JL, Klierer SA. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 20;97(13):7500-2.
57. Melzer R, Fricke U, Hölzl J. Vasoactive properties of procyanidins from *Hypericum perforatum* L. in isolated porcine coronary arteries. *Arzneimittelforschung.* 1991 May;41(5):481-3.
58. Butterweck V, Petereit F, Winterhoff H, Nahrstedt A. Solubilized Hypericin and Pseudohypericin from *Hypericum perforatum* Exert Antidepressant Activity in the Forced Swimming Test. *Planta Med.* 1998 May;64(4):291-4.
59. Wirz A, Simmen U, Heilmann J, Calis I, Meier B, Sticher O. Bisanthraquinone glycosides of *Hypericum perforatum* with binding inhibition to CRH-1 receptors. *Phytochemistry.* 2000 Dec;55(8):941-7.
60. Frohne D, Jensen U. *Systematik des Pflanzenreichs - unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen.* Wiss. Verl. Ges. mbH 1998, Stuttgart.
61. Wohlfahrt R, Hänsel R, Schmidt H. Nachweis sedativ-hypnotischer Wirkstoffe im Hopfen - 4. Mitteilung: Die Pharmakologie des Hopfeninhaltsstoffes 2-Methyl-3-buten-2-ol. *Planta Medica.* 1983; 48:120-123.
62. Durán N, Song PS. Hypericin and its photodynamic action. *Photochem Photobiol.* 1986 Jun;43(6):677-80.
63. Knox JP, Dodge AD. Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry.* 1985; 24:889-896.
64. Giese AC. Hypericium. *Photochem Photobiol Rev.* 1980; 5:229-255.
65. Blum HF. *Photodynamic Action and diseases caused by light.* Hafner New York 1964.
66. Pace N. The etiology of Hypericium, a photosensitivity produced by St. Johnswort. *Am J Physiol.* 1942; 136:650-656.
67. Pace N, MacKinney G. Hypericin. The Photodynamic Pigment from St. John's Wort. *J Am Chem Soc.* 1941;63:2570-2574.
68. Harrison P. Herbal medicine takes root in Germany. *CMAJ.* 1998 Mar 10;158(5):637-9.
69. Ali SM, Chee SK, Yuen GY, Olivo M. Hypericin and hypocrellin induced apoptosis in human mucosal carcinoma cells. *J Photochem Photobiol B.* 2001 Dec 1;65(1):59-73.
70. Colasanti A, Kisslinger A, Liuzzi R, Quarto M, Riccio P, Roberti G, Tramontano D, Villani F. Hypericin photosensitization of tumor and metastatic cell lines of human prostate. *J Photochem Photobiol B.* 2000 Feb;54(2-3):103-7.
71. Blank M, Mandel M, Hazan S, Keisari Y, Lavie G. Anti-cancer activities of hypericin in the dark. *Photochem Photobiol.* 2001 Aug;74(2):120-5.
72. Thomas C, Pardini RS. Oxygen dependence of hypericin-induced phototoxicity to EMT6 mouse mammary carcinoma cells. *Photochem Photobiol.* 1992 Jun;55(6):831-7.
73. Couldwell WT, Uhm JH, Antel JP, Yong VW. Enhanced Protein kinase C activity correlates with the growth rate of malignant gliomas in vitro. *Neurosurgery.* 1991 Dec;29(6):880-6; discussion 886-7.
74. Zhang W, Lawa RE, Hinton DR, Su Y, Couldwell WT. Growth inhibition and apoptosis in human neuroblastoma SK-N-SH cells induced by hypericin, a potent inhibitor of protein kinase C. *Cancer Lett.* 1995 Sep 4;96(1):31-5.
75. Chung PS, Saxton RE, Paiva MB, Rhee CK, Soudant J, Mathey A, Foote C, Castro DJ. Hypericin uptake in rabbits and nude mice transplanted with human squamous cell carcinomas: study of a new sensitizer for laser phototherapy. *Laryngoscope.* 1994 Dec;104(12):1471-6.
76. Blank M, Lavie G, Mandel M, Keisari Y. Effects of photodynamic therapy with hypericin in mice bearing highly invasive solid tumors. *Oncol Res.* 2000;12(9-10):409-18.
77. Koren H, Schenk GM, Jindra RH, Alth G, Ebermann R, Kubin A, Koderhold G, Kreitner M. Hypericin in phototherapy. *J Photochem Photobiol B.* 1996 Nov;36(2):113-9.
78. Giese AC. Hypericium. *Photochem Photobiol Rev.* 1980;5:229-255.

79. Takahashi I, Nakanishi S, Kobayashi E, Nakano H, Suzuki K, Tamaoki T. Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: possible relation to their antiretroviral activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Dec 29;165(3):1207-12.
80. Nishizuka Y. The Albert Lasker Medical Awards. The family of protein kinase C for signal transduction. *JAMA*. 1989 Oct 6;262(13):1826-33.
81. Adesina AM, Dooley N, Yong VW, Nalbantoglu J. Differential role for protein kinase C-mediated signaling in the proliferation of medulloblastoma cell lines. *Int J Oncol*. 1998 Apr;12(4):759-68.
82. Zhang W, Anker L, Law RE, Hinton DR, Gopalakrishna R, Pu Q, Gundimeda U, Weiss MH, Couldwell WT. Enhancement of radiosensitivity in human malignant glioma cells by hypericin in vitro. *Clin Cancer Res*. 1996 May;2(5):843-6.
83. Weller M, Trepel M, Grimm C, Schabet M, Bremen D, Krajewski S, Reed JC. Hypericin-induced apoptosis of human malignant glioma cells is light-dependent, independent of bcl-2 expression, and does not require wild-type p53. *Neurol Res*. 1997 Oct;19(5):459-70.
84. de Witte P, Agostinis P, Van Lint J, Merlevede W, Vandenheede JR. Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by hypericin. *Biochem Pharmacol*. 1993 Dec 3;46(11):1929-36.
85. Goumnerova LC. Growth factor receptors and medulloblastoma. *J Neurooncol*. 1996 Jul;29(1):85-9.
86. Vantieghem A, Assefa Z, Vandenabeele P, Declercq W, Courtois S, Vandenheede JR, Merlevede W, de Witte P, Agostinis P. Hypericin-induced photosensitization of HeLa cells leads to apoptosis or necrosis. Involvement of cytochrome c and procaspase-3 activation in the mechanism of apoptosis. *FEBS Lett*. 1998 Nov 27;440(1-2):19-24.
87. Schempp CM, Simon-Haarhaus B, Termeer CC, Simon JC. Hypericin photo-induced apoptosis involves the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and activation of caspase-8. *FEBS Lett*. 2001 Mar 23;493(1):26-30.
88. Meruelo D, Lavie G, Lavie D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jul;85(14):5230-4.
89. Kraus GA, Pratt D, Tossberg J, Carpenter S. Antiretroviral activity of synthetic hypericin and related analogs. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Oct 15;172(1):149-53.
90. Schinazi RF, Chu CK, Babu JR, Oswald BJ, Saalman V, Cannon DL, Eriksson BF, Nasr M. Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus. *Antiviral Res*. 1990 May;13(5):265-72.
91. Tang J, Colacino JM, Larsen SH, Spitzer W. Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. *Antiviral Res*. 1990 Jun;13(6):313-25.
92. Hudson JB, Lopez-Bazzocchi I, Towers GH. Antiviral activities of hypericin. *Antiviral Res*. 1991 Feb;15(2):101-12.
93. Lavie G, Valentine F, Levin B, Mazur Y, Gallo G, Lavie D, Weiner D, Meruelo D. Studies of the mechanisms of action of the antiretroviral agents hypericin and pseudohypericin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Aug;86(15):5963-7.
94. Hudson JB, Harris L, Towers GH. The importance of light in the anti-HIV effect of hypericin. *Antiviral Res*. 1993 Feb;20(2):173-8.
95. Lavie G, Valentine F, Levin B, Mazur Y, Gallo G, Lavie D, Weiner D, Meruelo D. Studies of the mechanisms of action of the antiretroviral agents hypericin and pseudohypericin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Aug;86(15):5963-7.
96. Hudson JB, Lopez-Bazzaocchi I, Towers GH. Antiviral activities of hypericin. *Antiviral Res*. 1991 Feb;15(2):101-12.
97. Jacobson JM, Feinman L, Liebes L, Ostrow N, Koslowski V, Tobia A, Cabana BE, Lee D, Spritzler J, Prince AM. Pharmacokinetics, safety, and antiviral effects of hypericin, a derivative of St. John's wort plant, in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Feb;45(2):517-24.
98. Gulick RM, McAuliffe V, Holden-Wiltse J, Crumpacker C, Liebes L, Stein DS, Meehan P, Hussey S, Forcht J, Valentine FT. Phase I studies of hypericin, the active compound in St. John's Wort, as an antiretroviral agent in HIV-infected adults. *AIDS Clinical Trials Group Protocols 150 and 258. Ann Intern Med*. 1999 Mar 16;130(6):510-4.

99. Schempp CM, Pelz K, Wittmer A, Schopf E, Simon JC. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *Lancet*. 1999 Jun 19;353(9170):2129.
100. Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nor C, Sarmiento L, Lamb L, Hass M, von Poser G, Schapoval EE. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*. 2003;10(6-7):511-6.
101. Avato P, Raffo F, Guglielmi G, Vitali C, Rosato A. Extracts from St John's Wort and their antimicrobial activity. *Phytother Res*. 2004 Mar;18(3):230-2.
102. Lawvere S, Mahoney M. St. John's wort. *Am Fam Physician*. 2005 Dec 1;72(11):2249-54.
103. Müller WE, Singer A, Wonnemann M, Hafner U, Rolli M, Schäfer C. Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of hypericum extract. *Pharmacopsychiatry*. 1998 Jun;31 Suppl 1:16-21.
104. Suzuki O, Katsumata Y, Oya M, Bladt S, Wagner H. Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med*. 1984 Jun;50(3):272-4.
105. Müller WE, Rolli M, Schäfer C and Hafner U. Effects of hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry*. 1997 Sep;30 Suppl 2:102-7.
106. Thiele B, Brink I, Ploch M. Modulation of cytokine expression by hypericum extract. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 1994 Oct;7 Suppl 1:S60-2.
107. Calapai G, Crupi A, Firenzuoli F, Inferrera G, Ciliberto G, Parisi A, De Sarro, G, Caputi AP. Interleukin-6 involvement in antidepressant action of *Hypericum perforatum*. *Pharmacopsychiatry*. 2001 Jul;34 Suppl 1:S8-10.
108. Dürr D, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Rentsch KM, Steinert HC, Meier PJ, Fattinger K. St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther*. 2000 Dec;68(6):598-604.
109. Fattinger K, Meier-Abt A. [Interactions of phytotherapeutic drugs, foods and drinks with medicines]. *Ther Umsch*. 2002 Jun;59(6):292-300.
110. Williams W.J. (ed.). *Hematology*, 1990; 4th ed. McGraw-Hill: New York.
111. Batell AM. Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy – a model for carcinogenesis. *J Photochem Photobiol B*. 1993 Sep;20(1):5-22.
112. Mercer-Smith JA, Mauzerall DC. Molecular hydrogen production by uroporphyrin and coproporphyrin. A model for the origin of photosynthetic function. *Photochem Photobiol*. 1987 ;34:407-410.
113. Moore MR, McColl KEL, Rimington C, Goldberg A. *Disorders of Porphyrin Metabolism*. Plenum New York. 1987: 21-116.
114. Hayashi N, Watanabe N, Kikuchi G. Inhibition by hemin of in vivo translocation of chicken liver 5-aminolaevulinic acid synthase into mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983 Sep 15;115(2):700-6.
115. Bedwell J, MacRobert AJ, Phillips D, Bown SG. Fluorescence distribution and photodynamic effect of ALA-induced PP IX in the DMH rat colonic tumour model. *Br J Cancer*. 1992 Jun;65(6):818-24.
116. Rasetti L, Rubino GF, Drago W. Ferrochelatase, ALA-dehydrase and ALA synthetase activity in human tumour tissue. *Panminerva Med*. 1967 Apr;9(4):132-5.
117. Kennedy JC, Pottier RH. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 1992 Jul 30;14(4):275-92.
118. Navone NM, Polo CF, Frisardi AL, Andrade NE, Battle AM. Heme biosynthesis in human breast cancer--mimetic "in vitro" studies and some heme enzymic activity levels. *Int J Biochem*. 1990;22(12):1407-11.
119. Jori G, Beltramini M, Reddi E, Salvato B, Pagnan A, Ziron L, Tomio L, Tsanov T. Evidence for a major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carriers in vivo. *Cancer Lett*. 1984 Oct;24(3):291-7.
120. Norata G, Canti G, Ricci L, Nicolin A, Trezzi E, Catapano AL. In vivo assimilation of low density lipoproteins by a fibrosarcoma tumour line in mice. *Cancer Lett*. 1984 Dec;25(2):203-8.
121. Rud E, Gederaas O, Høgset A, Berg K. 5-aminolevulinic acid, but not 5-aminolevulinic acid esters, is transported into adenocarcinoma cells by system BETA transporters. *Photochem Photobiol*. 2000 May;71(5):640-7.

122. Krieg RC, Messmann H, Rauch J, Seeger S, Knuechel R. Metabolic characterization of tumor cell-specific protoporphyrin IX accumulation after exposure to 5-aminolevulinic acid in human colonic cells. *Photochem Photobiol.* 2002 Nov;76(5):518-25.
123. Gorchein A, Webber R. delta-Aminolaevulinic acid in plasma, cerebrospinal fluid, saliva and erythrocytes: studies in normal, uraemic and porphyric subjects. *Clin Sci (Lond).* 1987 Jan;72(1):103-12.
124. Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res.* 1976 Jul;36(7 PT 1):2326-9.
125. Lam S, MacAulay C, Hung J, LeRiche J, Profio AE, Palcic B. Detection of dysplasia and carcinoma in situ with a lung imaging fluorescence endoscope device. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993 Jun;105(6):1035-40.
126. Scott JJ: *The Biosynthesis of Porphyrins and Porphyrin metabolism*, Ciba foundation Symposium, London, Churchill. 1955; p43.
127. Jarrett A, Rimington C, Willoughby DA. Delta-Aminolaevulinic acid and porphyria. *Lancet.* 1956 Jan 21;270(6908):125-7.
128. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B.* 1990 Jun;6(1-2):143-8.
129. Malik Z, Lugaci H: Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins. *Br J Cancer.* 1987 Nov;56(5):589-95.
130. Marcus SL, Sobel RS, Golub AL, Carroll RL, Lundahl S, Shulman DG. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): current clinical and development status. *J Clin Laser Med Surg.* 1996 Apr;14(2):59-66.
131. Kennedy JC, Pottier RH. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 1992 Jul 30;14(4):275-92.
132. Divaris DX, Kennedy JC, Pottier RH. Phototoxic damage to sebaceous glands and hair follicles of mice after systemic administration of 5-aminolevulinic acid correlates with localized protoporphyrin IX fluorescence. *Am J Pathol.* 1990 Apr;136(4):891-7.
133. Mlkvy P, Messmann H, Regula J, Conio M, Pauer M, Millson CE, MacRobert AJ, Bown SG. Sensitization and photodynamic therapy (PDT) of gastrointestinal tumors with 5-aminolaevulinic acid (ALA) induced protoporphyrin IX (PPIX). A pilot study. *Neoplasma.* 1995;42(3):109-13.
134. Hirth A, Michelsen U, Wöhrle D. *Chemie in unserer Zeit.* 1999; 32-84.
135. Stummer W, Stocker S, Wagner W, Stepp H, Fritsch C, Goetz C, Goetz AE, Kiefmann R, Reulen HJ. Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence. *Neurosurgery.* 1998 Mar;42(3):518-25; discussion 525-6.
136. Herold G et al. *Innere Medizin.* 2004; 577-580.
137. McColl-Anderson T. Hydroa aestivale in two brothers complicated with the presence of hematorporphyrin in the urine. *Br J Dermatol.* 1898; 10:1-4.
138. Günther H. Die Haematoporphyrie. *Deutsche Arch Klin Med.* 1911; 105:89-146.
139. Günther H. Die Bedeutung der Haematoporphyrinurie in der Physiologie und Pathologie. *Ergeb Allgemein Pathol Pathologisch Anat.* 1922; 20:608-764.
140. Ploem JS, Taube HJ. *Introduction to Fluorescence Microscopy.* Oxford University Press 1987.
141. Radbruch A. *Flow Cytometry and Cell Sorting.* Springer Verlag Heidelberg 2000.
142. Ellison D. Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2002 Aug;28(4):257-82.
143. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ; ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 2006 May;7(5):392-401.
144. Ritz R, Wein HT, Dietz K, Schenk M, Roser F, Tatagiba M, Strauss WS. Photodynamic therapy of malignant glioma with hypericin: comprehensive in vitro study in human glioblastoma cell lines. *Int J Oncol.* 2007 Mar;30(3):659-67.
145. Delaey EM, Obermuëller R, Zupkó I, De Vos D, Falk H, de Witte PA. In vitro study of the photocytotoxicity of some hypericin analogs on different cell lines. *Photochem Photobiol.* 2001 Aug;74(2):164-71.

146. Blank M, Kostenich G, Lavie G, Kimel S, Keisari Y, Orenstein A. Wavelength-dependent properties of photodynamic therapy using hypericin *in vitro* and in an animal model. *Photochem Photobiol.* 2002 Sep;76(3):335-40.
147. Couladis M, Badisa RB, Baziou P, Chaudhuri SK, Pilarinou E, Verykokidou E, Harvala C. Antioxidant and cytotoxic activities of *Hypericum* sp. on brine shrimps and human cancer cell lines. *Phytother Res.* 2002 Dec;16(8):719-22.
148. Moan J, Bech O, Gaullier JM, Stokke T, Steen HB, Ma LW, Berg K. Protoporphyrin IX accumulation in cells treated with 5-aminolevulinic acid: dependence on cell density, cell size and cell cycle. *Int J Cancer.* 1998 Jan 5;75(1):134-9.
149. Eléouet S, Rousset N, Carré J, Vonarx V, Vilatte C, Louët C, Lajat Y, Patrice T. Heterogeneity of delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in human glioma cells and leukemic lymphocytes. *Neurol Res.* 2000 Jun;22(4):361-8.
150. Carre J, Eleouet S, Rousset N, Vonarx V, Heyman D, Lajat Y, Patrice T. Protoporphyrin IX fluorescence kinetics in C6 glioblastoma cells after delta-aminolevulinic acid incubation: effect of a protoporphyrinogen oxidase inhibitor. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1999 Jun;45(4):433-44.
151. Wyss-Desserich MT, Sun CH, Wyss P, Kurlawalla CS, Haller U, Berns MW, Tadir Y. Accumulation of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in normal and neoplastic human endometrial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Jul 25;224(3):819-24.
152. Steinbach P, Weingandt H, Baumgartner R, Kriegmair M, Hofstädter F, Knüchel R. Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *Photochem Photobiol.* 1995 Nov;62(5):887-95.
153. Stummer W, Stocker S, Novotny A, Heimann A, Sauer O, Kempfski O, Plesnila N, Wietzorrek J, Reulen HJ. *In vitro* and *in vivo* porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol B.* 1998 Sep;45(2-3):160-9.
154. Uberriegler KP, Banioghal E, Krammer B. Subcellular damage kinetics within co-cultivated WI38 and VA13-transformed WI38 human fibroblasts following 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX formation. *Photochem Photobiol.* 1995 Dec;62(6):1052-7.
155. Schneckenburger H, Rück A, Bartos B, Steiner R. Intracellular distribution of photosensitizing porphyrins measured by video-enhanced fluorescence microscopy. *J Photochem Photobiol B.* 1988 Nov;2(3):355-63.
156. Sattler S, Schaefer U, Schneider W, Hoelzl J, Lehr CM. Binding, uptake, and transport of hypericin by Caco-2 cell monolayers. *J Pharm Sci.* 1997 Oct;86(10):1120-6.
157. Weber ND, Murray BK, North JA, Wood SG. The antiviral agent hypericin has *in vitro* activity against HSV-1 through nonspecific association with viral and cellular membranes. *Antivir Chem Chemother.* 1994; 5:83-90.
158. Uzdensky AB, Ma LW, Lani V, Hjortland GO, Steen HB, Moan J. Intracellular localisation of hypericin in human glioblastoma and carcinoma cell lines. *Lasers Med Sci.* 2001;16(4):276-83.
159. Ritz R, Müller M, Weller M, Dietz K, Kuci S, Roser F, Tatagiba M. Hypericin: a promising fluorescence marker for differentiating between glioblastoma and neurons *in vitro*. *Int J Oncol.* 2005 Dec;27(6):1543-9.
160. Theodossiou T, Spiro MD, Jacobson J, Hothersall JS, MacRobert AJ. Evidence for intracellular aggregation of hypericin and the impact on its photocytotoxicity in PAM 212 murine keratinocytes. *Photochem Photobiol.* 2004 Nov-Dec;80(3):438-43.
161. Ali SM, Olivo M. Bio-distribution and subcellular localization of Hypericin and its role in PDT induced apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol.* 2002 Sep;21(3):531-40.
162. Seitz G, Warmann SW, Armeanu S, Heitmann H, Ruck P, Hoffman RM, Fuchs J, Wessels JT. *In vitro* photodynamic therapy of childhood rhabdomyosarcoma. *Int J Oncol.* 2007 Mar;30(3):615-20.

6.4 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Marcos Tatagiba, Chefarzt der Klinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Tübingen, danke ich für die Ermöglichung meiner Promotion in seiner Abteilung.

Herrn PD Dr. med. Rainer Ritz, Oberarzt in der Klinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Tübingen, danke ich für die Konzeption und Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die gute Betreuung und Beratung während meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Klaus Dietz, ehemaliger Direktor des Instituts für medizinische Biometrie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, danke ich für die exzellente statistische Auswertung der Fluoreszenz- und FACS-Daten und Erstellung der Modelle und Schaubilder.

Herrn Wolfgang Strauss, Diplomchemiker am ILM Ulm, danke ich für sehr gute Anregungen, Ideen und Vorschläge. Durch sein fundiertes Wissen in der klinischen Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamischen Therapie konnte diese Arbeit an Wert gewinnen.

Danke an Hannah Teresa Wein für die sehr gute Einführung in Laborabläufe und für die Unterstützung bei Fragestellungen und Versuchsdurchführungen.

Annelie Gruber, medizinisch-technische Assistentin der Neurochirurgie Tübingen, danke ich für die angenehme und abwechslungsreiche Laboratmosphäre sowie für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung während meiner Arbeit.

Bei Herrn Dr. Martin Schenk und Herrn Roland Klaffschenkel aus der Abteilung für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie am UKT Tübingen

bedanke ich mich für die schnelle und kompetente Hilfe bei Fragestellungen und Problemen bezüglich des FACS-Gerätes.

Danke an Thomas Freudenmann für die Bearbeitung diverser Schaubilder und die langjährige Freundschaft.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mir bei meinem Medizinstudium immer die nötige Unterstützung und den nötigen Rückhalt gegeben haben.

6.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Christian Scheidle
geb. am 1. März 1979 in Balingen

Vater Dr. med. Karl-Heinz Scheidle
geb. am 7. Januar 1945, Arzt

Mutter Monika Scheidle, geb. Kienzle
geb. am 6. Mai 1950, Bekleidungstechnikerin

Schwester Julia Jahr, geb. Scheidle
geb. am 23. November 1980, Arzthelferin

Schulischer Werdegang

1986-1990 Grundschohle in Albstadt Peffingen

1990-1999 Gymnasium in Albstadt Ebingen
Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Sonstiger Werdegang

1999-2000 Ableistung des Wehrdienstes in Sigmaringen

2000-2001 Freiwilliges Soziales Jahr in der
Thoraxklinik Heidelberg

Studium

April 2001 Beginn des Medizinstudiums an der
Eberhard Karls Universität Tübingen

28. März 2003 Ärztliche Vorprüfung in Tübingen

März 2005 - Dez 2009 Dissertation in der Klinik für Neurochirurgie
am Universitätsklinikum Tübingen

Feb 2006 – Jan 2007 Praktisches Jahr in Tübingen (Wahlfach Anästhesie),
Australien (Innere Medizin) und Südafrika (Chirurgie)

6. Nov 2007 2. Staatsexamen in Tübingen (Ärztliche Prüfung)

seit Jan 2008 Assistenzarzt in der Fachabteilung für Innere Medizin
am Zollernalbklinikum