

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Tübingen  
Abteilung Kinderchirurgie und Kinderurologie mit Poliklinik**

**Die Wirkung von Curcumin in kindlichen soliden  
Tumoren am Beispiel des hepatozellulären Karzinoms,  
des Hepatoblastoms und des Rhabdomyosarkoms**

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

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

**vorgelegt von**

**Bortel, Nicola Kanyabirunga**

**2017**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Armeanu-Ebinger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Sipos

3. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Rolle

Tag der Disputation: 19.09.2017



# Inhaltsverzeichnis

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... VI

## 1 EINLEITUNG ..... 1

1.1	HEPATOBLASTOME.....	1
1.2	PÄDIATRISCHES HEPATOZELLULÄRES KARZINOM.....	2
1.3	RHABDOMYOSARKOM.....	3
1.4	AKTUELLE THERAPIEKONZEPTE.....	4
1.5	ORTHOTOPES TUMORMODELL UND DIE ROLLE VON $\beta$ -CATENIN.....	7
1.6	CURCUMIN.....	8
1.6.1	KOMBINATIONSMÖGLICHKEITEN MIT ZYTOSTATIKA UND PHOTODYNAMISCHER THERAPIE.....	10
1.6.2	BIOVERFÜGBARKEIT.....	11
1.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	13

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN ..... 15

2.1	ZELLINIEN UND ZELLKULTUREN.....	15
2.2	ANALYSE DER LOKALISATION VON $\beta$ -CATENIN.....	19
2.3	ANALYSE DER ZELLVIABILITÄT.....	20
2.4	ANALYSEN MITTELS FLUORESZENZBASIERTER DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	22
2.5	ANALYSE DER EXTRAZELLULÄREN CUR-FLUORESZENZ.....	25
2.6	WIRKUNG UND VERTEILUNG VON ORAL APPLIZIERTEM MICC IN VIVO.....	25

## 3 ERGEBNISSE ..... 33

3.1	WIRKUNG VON CUR AUF DIE DIFFERENZIELLE SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON $\beta$ -CATENIN IN ETABLIERTEN HEPATOM-ZELLINIEN.....	33
3.2	WIRKUNG VON CUR AUF DAS ZELLÜBERLEBEN VON VERSCHIEDENEN HEPATOM-BZW. RMS-ZELLINIEN.....	36
3.2.1	SUBKONFLUENTE UND DICHTER ZELLKULTUREN.....	36
3.2.2	ZELLVIABILITÄT UNTER VERKÜRZTER INKUBATIONSDAUER.....	38
3.2.3	KOMBINATION VON CUR UND CDDP.....	39
3.2.4	KOMBINATION VON CUR UND DOXORUBICIN.....	42
3.3	WIRKUNG EINER PDT MIT CUR AUF HEPATOMZELLEN.....	45
3.3.1	ZELLVIABILITÄT NACH INKUBATION MIT CUR UND ANREGUNG MIT BLAUEM LICHT... ..	45
3.3.2	OPTIMALER ZEITPUNKT DER PDT.....	47
3.3.3	FRÜHZEITIGE STÖRUNG DER ZELLINTEGRITÄT DURCH PDT.....	48
3.3.4	INTRA- VERSUS EXTRAZELLULÄRE BELICHTUNG VON CUR.....	50
3.3.5	SAUERSTOFFRADIKALBILDUNG DURCH PDT.....	52
3.3.6	VERÄNDERUNG DER ZUSAMMENSETZUNG VON SUBPOPULATIONEN.....	54
3.3.7	ZYTOTOXIZITÄT VON CUR UND PDT AUF FIBROBLASTEN.....	56
3.4	METABOLISIERUNG VON CUR IN RMS- UND HEPATOMZELLEN.....	58
3.4.1	ZELLULÄRE AUFNAHME UND METABOLISIERUNG VON CUR.....	58
3.4.2	ABBAU VON CUR IN SUBKONFLUENTEN UND DICHTEN ZELLKULTUREN.....	61

3.4.3	ERHÖHTE AUFNAHME VON CUR NACH EXPOSITION ZU BLAUEM LICHT .....	64
3.4.4	STABILITÄT VON CUR NACH EXPOSITION ZU BLAUEM LICHT .....	67
<b>3.5</b>	<b>WIRKUNG UND BIOVERFÜGBARKEIT VON ORAL APPLIZIERTEM MICC IM ORTHOTOPEN HC-AFW1-MAUSMODELL .....</b>	<b>69</b>
3.5.1	BIOVERFÜGBARKEIT VON CUR UND DIE AUFNAHME IN ORGANE .....	69
3.5.2	ANALYSE DES TUMORWACHSTUMS ANHAND DES AFP-PLASMASPIEGELS .....	73
3.5.3	ANALYSE DES TUMORWACHSTUMS ANHAND VON TUMORANZAHL UND –GRÖÖE .....	76
3.5.4	MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DER TUMOREN UNTER MICC-THERAPIE .....	77
<b>4</b>	<b><u>DISKUSSION .....</u></b>	<b><u>81</u></b>
4.1	WIRKUNG VON CUR AUF DIE FUNKTION VON $\beta$ -CATENIN IN ETABLIERTEN HEPATOM-ZELLINIEN .....	81
4.2	WIRKUNG VON CUR AUF DAS ZELLÜBERLEBEN VON VERSCHIEDENEN HEPATOM-BZW. RMS-ZELLINIEN .....	83
4.3	WIRKUNG EINER PDT MIT CUR AUF DIE VIABILITÄT VON HEPATOMZELLEN .....	86
4.4	METABOLISIERUNG VON CUR IN RMS- UND HEPATOMZELLEN .....	93
4.5	WIRKUNG UND VERTEILUNG VON ORAL APPLIZIERTEM MICC IM ORTHOTOPEN HC-AFW1-MAUSMODELL .....	97
	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>	<b><u>102</u></b>
	<b><u>LITERATURANGABEN .....</u></b>	<b><u>104</u></b>
	<b><u>ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT .....</u></b>	<b><u>114</u></b>
	<b><u>VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGRESSTEILNAHMEN .....</u></b>	<b><u>115</u></b>
	<b><u>DANKSAGUNG .....</u></b>	<b><u>116</u></b>
	<b><u>CURRICULUM VITAE .....</u></b>	<b><u>118</u></b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-binding-cassette
ACF	<i>aberrant crypt foci</i>
AFP	Alpha-1-Fetoprotein
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
BDMC	Bisdemethoxycurcumin
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
Bel.	Belichtung
bzw.	beziehungsweise
C	Konzentration
CDDP	Cisplatin
CSC	<i>cancer stem cells, cancer stem-like cells</i>
CUR	Curcumin
DMC	Demethoxycurcumin
EGF-R	<i>epidermal growth factor receptor</i>
Em.	Emission
ERK	<i>extracellular regulated kinases</i>
Erw.	Erwachsener
et al.	<i>et alii, et aliae</i> , und andere
Ex.	Exzitation
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
g	Gramm
GSK-3 $\beta$	Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$
h	Stunde(n)
HB	Hepatoblastom
HCC	hepatozelluläres Karzinom
IGF-2	insulin-like growth factor 2
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration ( <i>half maximal inhibitory concentration</i> )
i.p.	intraperitoneal
Kg	Kilogramm

KG	Körpergewicht
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
M	molare Masse
MFI	<i>Mean fluorescence index</i>
mg	Milligramm
MicC	mizellares Curcumin
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
MDR	<i>multi-drug-resistance</i>
µg	Microgramm
µm	Micrometer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid-derived 2</i>
Obat.	Obatoclox
PDT	photodynamische Therapie
pg	Picogramm
p.o.	per os
pHCC	pädiatisches hepatozelluläres Karzinom
PRETEXT	pretreatment extent of disease scoring system
RMS	Rhabdomyosarkom
SIOPEL	Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique
s.o.	siehe oben
u.a.	unter anderem, und andere
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
λ	Anregungswellenlänge
Ø	ohne
5-ALA	5-Aminolävulinsäure

# 1 Einleitung

Malignome stellen in Deutschland die zweithäufigste Todesursache dar. Bei Kindern im Alter von eins bis vierzehn Jahren ist jeder fünfte Todesfall krebsbedingt (Statistisches Bundesamt 2013, 2012). Die meisten sind auf maligne Hirntumoren und Lymphatische Leukämien zurückzuführen. Zu den häufigsten soliden Tumoren in der Kinderchirurgie zählen Neuroblastome, Nephroblastome, Rhabdomyosarkome und Hepatoblastome [1].

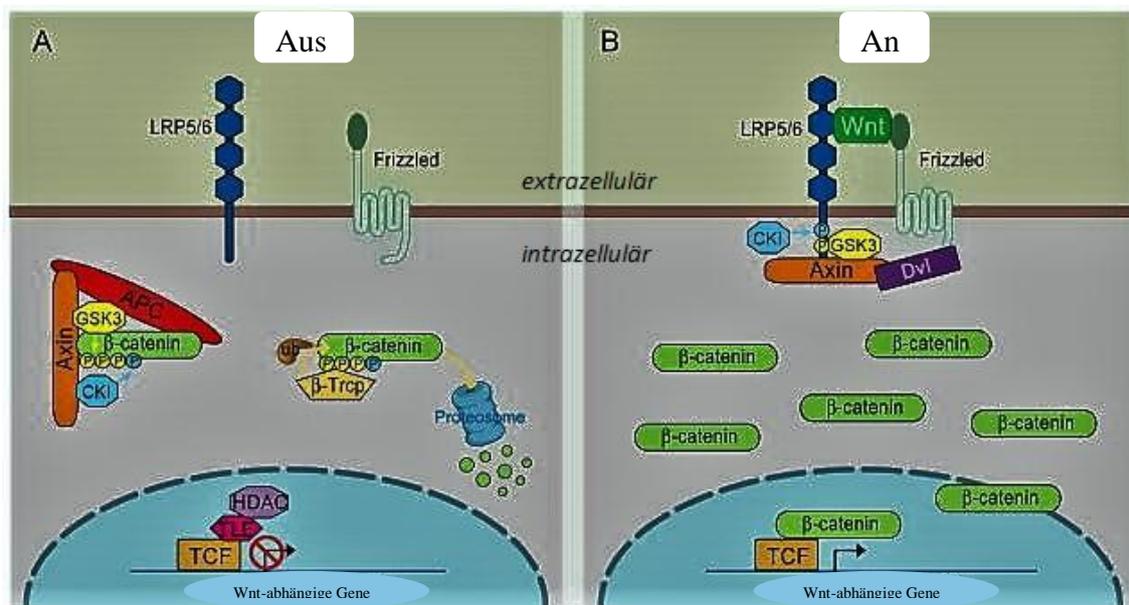
## 1.1 Hepatoblastome

Hepatoblastome (HB) sind die häufigsten Lebertumoren im Kindesalter (Inzidenz 0,6/100.000 Kinder) und weisen in der Standard-Risikogruppe eine 3-Jahres-Überlebensrate von über 90 % auf. Unter Einteilung in die Hoch-Risikogruppe fällt sie auf 50 – 65 % [2]. Die Einstufung als Hoch-Risiko-HB erfolgt bei Befall aller vier chirurgischen Lebersektoren, Fernmetastasen, vaskulärer Mitbeteiligung, Invasion extrahepatischer Strukturen und/oder einem Plasma-AFP (Alpha-1-Fetoprotein) < 100 ng/ml [3]. Das häufigste Erkrankungsalter liegt zwischen sechs Monaten und drei Jahren [4]. Jungen sind etwas häufiger betroffen als Mädchen [5]. Bisher konnten keine Umweltfaktoren als Ursache für das HB bewiesen werden. Es ist jedoch mit Frühgeburtlichkeit und einem geringen Geburtsgewicht assoziiert [6]. Außerdem besteht eine erhöhte Prädisposition für Patienten mit einem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) und familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) [7, 8].

Ishak und Glunz erstellten 1967 eine Einteilung für Hepatoblastome in epitheliale und gemischt-epitheliale Typen [9]. Der häufigere epitheliale Typ weist histologisch zwei Hauptgruppen von HB-Zellen auf: Ein embryonaler Typ mit geringer Differenzierung und kleinen, spindeligen Zellen und ein fötaler Typ, der eine höhere Differenzierung und größere Zellen aufweist. Je höher die Differenzierung, desto effektiver wirken die aktuellen Therapien. Beide Typen gehen aus pluripotenten hepatischen Stammzellen hervor. Da die Tumorzellen wie die Stammzellen sich sowohl in Hepatozyten als auch in biliäre Epithelzellen ausdifferenzieren können, wird das Hepatoblastom als embryonaler Tumor eingestuft [10].

Ein einheitliches Muster chromosomaler Aberrationen konnte noch nicht entschlüsselt werden. Eine wichtige Rolle spielt jedoch der Genabschnitt 11q5, der unter anderem für

den insulin-like growth factor 2 (IGF-2) kodiert, welcher in HBs häufig überexprimiert ist [11]. Dies führt zu einer verminderten Expression des Tumorsuppressorgens *RASSF1A* und somit zur Progression des Tumors [12]. Einen weiteren Anteil zur Entartung können Mutationen innerhalb der Wnt-Signalkaskade beitragen. Hierbei ist vor allem das *CTNNB1*-Gen, welches für das Protein  $\beta$ -Catenin codiert, von Relevanz. Normalerweise wird  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma durch einen Abbaukomplex aus verschiedenen Proteinen gebunden, anschließend durch die Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) phosphoryliert und im Proteasom fragmentiert. In Anwesenheit des Moleküls Wnt ist die Phosphorylierung gehemmt, wodurch größere Mengen an  $\beta$ -Catenin akkumulieren, in den Kern transloziert werden und dort als Transkriptionsfaktor für die Wnt-Kaskade wirken (s. Abbildung 1) [13].



**Abbildung 1: Die Rolle von  $\beta$ -Catenin in der Wnt-Signalkaskade**

Im „Aus-Modus“ wird  $\beta$ -Catenin durch einen Destruktionskomplex aus verschiedenen Proteinen gebunden, phosphoryliert und im Proteasom abgebaut (A). Aktiviert Wnt den Frizzled-Rezeptor, werden Teile des Destruktionskomplexes membranös gebunden, wodurch sich  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma anreichert, in den Kern transloziert wird und als Transkriptionsfaktor wirkt (B) (Abbildung entnommen und modifiziert von MacDonald et al. (2009) [13]).

## 1.2 Pädiatrisches hepatozelluläres Karzinom

Eng verwandt mit dem HB ist das pädiatrische hepatozelluläre Karzinom (pHCC). Es basiert häufig auf anderen Vorerkrankungen wie beispielsweise einer Infektion mit

Hepatitis B und C oder Stoffwechselerkrankungen wie zum Beispiel einer Tyrosinämie. Im Gegensatz zum HCC des erwachsenen Alters resultiert jedoch das pHCC meistens nicht aus einer Leberzirrhose [14]. Das Durchschnittsalter des HCCs liegt deutlich höher als beim Hepatoblastom und tritt als pädiatrische Form sehr selten auf. Dennoch ist es die zweithäufigste maligne Lebererkrankung im Kindesalter mit einer Inzidenz von 0,5 – 1 pro einer Million Kinder [15]. Das größte Risiko trägt die Altersgruppe zwischen zehn und vierzehn Jahren. Risikofaktoren stellen, zusätzlich zu den oben genannten Vorerkrankungen, auch Behandlungen der Kinder mit Steroiden, oralen Kontrazeptiva und Methotrexat dar [16]. Eine Metastasierung von pHCC in regionale Lymphknoten, Lunge und Knochen ist häufig [17].

Histologisch geht das HCC aus differenzierten Hepatozyten hervor und ist ein rein epithelialer Tumor. Ursächlich sind mehrere genetische und epigenetische Faktoren, die in unkontrolliertem Zellwachstum münden. Hierzu gehören die Signalwege p53/ARF, RB/INK4A und auch Wnt/ $\beta$ -Catenin [18-20]. Mutationen in der Wnt Signalkaskade führen, wie beim Hepatoblastom, schlussendlich zu einer nukleären Akkumulation von  $\beta$ -Catenin mit der Folge einer gesteigerten Transkriptionsfaktoraktivität.

Beide Tumorentitäten, sowohl das HB als auch das pHCC können durch den hoch sensitiven, wenn auch gering spezifischen, Tumormarker Alpha-1-Fetoprotein (AFP) charakterisiert werden [15, 21].

### **1.3 Rhabdomyosarkom**

Rhabdomyosarkome (RMS), die häufigsten Weichteilmalignome im Kindesalter (Inzidenz 1/244.000 Kinder) nehmen ca. 5 % aller pädiatrischen bösartigen Tumoren ein. Die durchschnittliche Überlebensrate nach 5 Jahren liegt bei 70 % [22]. Für metastasierte RMS sinkt sie auf 20 -30 % (AWMF-Leitlinien Rhabdomyosarkom). Erstsymptome richten sich nach der Lokalisation des Tumors. RMS können urogenital (29 %), parameningeal (24 %), an den Extremitäten (15 %), retroperitoneal (13 %), orbital (8 %) oder an weiteren Stellen des Körpers (11 %) auftreten. Die meisten RMS kommen sporadisch, ohne assoziierte Erkrankungen vor [23]. Zu den assoziierten Risikofaktoren zählen unter anderem Neurofibromatose [24], Li-Fraumeni-Syndrom

[25], BWS [26] sowie der maternale Gebrauch von Kokain und Marihuana während der Schwangerschaft [27].

Histologisch kann eine Unterteilung in einen embryonalen und einen alveolären Typ vorgenommen werden, wobei das alveoläre RMS mit einer höheren Mortalität verknüpft ist. Embryonale RMS sind generell häufiger und treten vermehrt bei Kindern auf. Sie sind gekennzeichnet durch Spindelzellen und eine myxoide Struktur [23]. Alveoläre RMS treten eher an den Extremitäten und im Erwachsenenalter auf. Sie besitzen lose, runde bis ovale Tumorzellaggregate, die durch Bindegewebssepten voneinander getrennt sind [28]. Außerdem existiert eine solide alveoläre Variante [29]. Explizite Ursachen des RMS konnten bisher nicht identifiziert werden. Jedoch können in mehr als 75 % aller alveolären RMS die Translokationen t (1; 13) und t (2; 13) nachgewiesen werden, die zu einer Fusion der Gene *PAX7* bzw. *PAX3* mit *FOXO1α* führen [23]. Für den embryonalen Typ wurde ein Verlust der Heterozygotie auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 (11p15.5) festgestellt, was mit einer Ausschaltung von Tumorsuppressorgenen einhergeht [30].

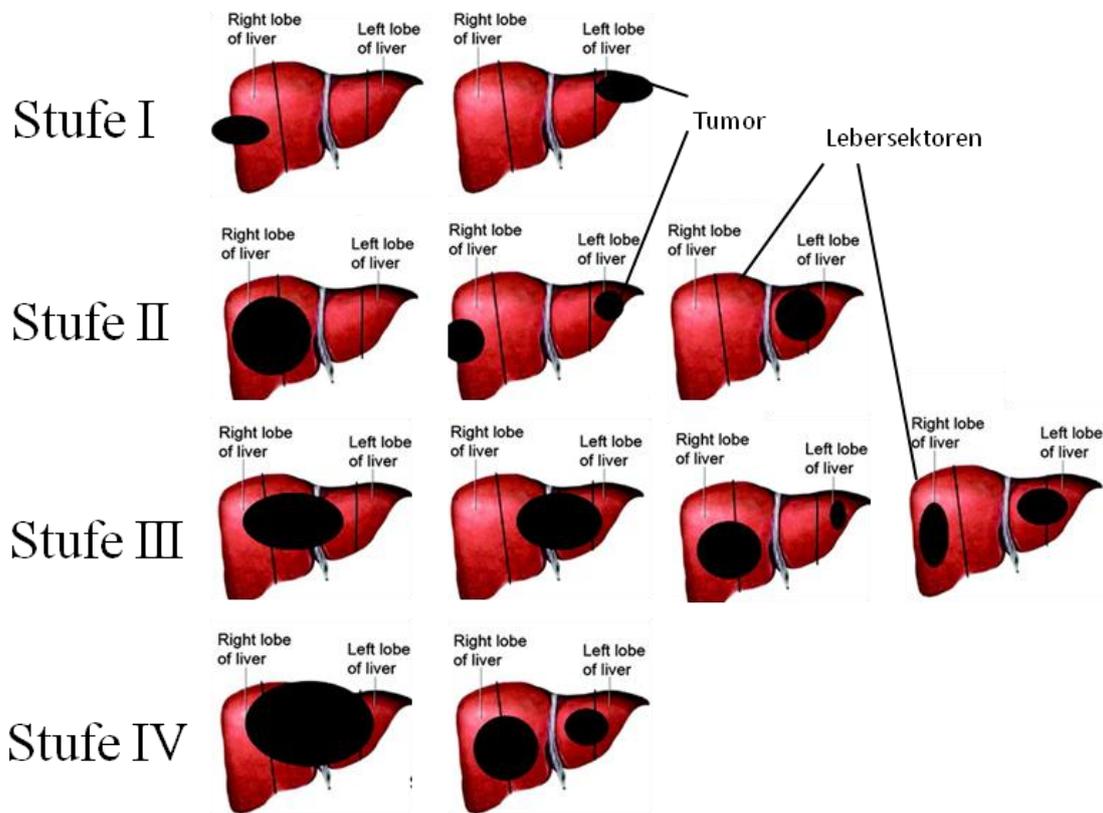
Die Diagnostik basiert auf positiven Muskelmarkern (Myogenin, MyoD1, muskelspezifisches Aktin, Myoglobin, Desmin) [31, 32] und dem Nachweis von Translokationen. Differenzialdiagnostisch können Lymphome, Ewing-Sarkome und Neuroblastome vom RMS durch immunhistochemische Untersuchungen abgegrenzt werden [23].

## **1.4 Aktuelle Therapiekonzepte**

Die Therapien von HB, pHCC und RMS weisen Ähnlichkeiten auf und bestehen, sofern möglich, aus einer operativen Komplettresektion. Bei großen und die Operationskriterien nicht einhaltenden Tumoren wird eine neoadjuvante und eventuell adjuvante Chemotherapie durchgeführt.

Für die präoperative Einstufung von HB und pHCC existiert ein von der *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* (SIOPEL) erstelltes Staging-System, das PRETEXT (PRETreatment EXTent of disease scoring system), welches die Leber in vier Sektoren unterteilt (s. Abbildung 2) [33]. Die Stufen I, II, III und IV sind durch einen Tumorbefall von einem, zwei, drei oder allen Leberabschnitten gekennzeichnet.

Ein Buchstabensystem beschreibt die extrahepatische Ausdehnung des Hepatoms. Hierauf basierend können Einschätzungen bezüglich Überlebensraten und Therapieempfehlungen geäußert werden.



**Abbildung 2: PRETEXT-Staging-System primär hepatischer Tumor**

Mittels Bildgebung wird präoperativ die Ausdehnung des Tumors begutachtet und das weitere therapeutische Verfahren festgelegt. Die Leber wird in vier Segmenten unterteilt. Die einzelnen Stufen beschreiben die Anzahl der vom Tumor befallenen Leberabschnitte. (Abbildung entnommen und modifiziert von Litten et al. (2008) [33]).

Die erfolgversprechendste Therapie von HB und pHCC stellt die operative Entfernung dar [33]. Sofern die Umstände den Einsatz von Zytostatika erzwingen, ist Cisplatin (CDDP) das Medikament der Wahl, welches oft mit Doxorubicin kombiniert wird. Für die Behandlung der Hoch-Risikogruppe kommt zusätzlich Carboplatin hinzu. CDDP entfaltet seine Wirkung durch Querverknüpfung zweier nebeneinander liegender Guaninbasen eines DNA-Stranges, was schlussendlich zur Apoptose führen kann. Die Zytotoxizität besteht nicht nur für schnellwachsende Tumorzellen, sondern auch für gesunde Körperzellen. Eine Radiotherapie ist bei HB und pHCC nicht indiziert, da die Empfindlichkeit des Leberparenchyms hohe Strahlendosen verbietet [34].

Bei der RMS-Therapie kommt eine Kombinationsbehandlung aus mehreren Zytostatika zum Einsatz, die abhängig ist von der Tumorgröße, der Tumorausdehnung, der Lokalisation und der Histologie. Zu den verwendeten Medikamenten gehören: Dactinomycin, Vincristin, Alkylantien und Anthrazykline. Einen wichtigen Vertreter stellt Doxorubicin dar. Doxorubicin gehört zur Stoffgruppe der Anthrazykline und hemmt die DNA- und RNA-Synthese indem es, zum einen, die Topoisomerase II inhibiert und, zum anderen, als Interkalans wirkt. Zusätzlich wird bei der RMS-Therapie teilweise auch auf eine Radiotherapie zurückgegriffen. Für das metastasierte RMS wird eine intensiviert Chemotherapie aus vier bis sechs Medikamenten verwendet und dabei auf weitere Zytostatika wie VP-16 und Platin-Derivate zurückgegriffen (AMWF-Leitlinien Rhabdomyosarkom).

Das Langzeitüberleben von Patienten mit kindlichen malignen Tumoren hat sich in den vergangenen 60 Jahren von 10 - 15 auf 80 % verbessert [35]. Während für die Standard-Risikogruppen weitreichende Therapieerfolge erzielt werden konnten, stagnierten jedoch die Überlebensraten der HB-Hochrisiko-Gruppe, pHCCs und metastasierten RMS. Für Hepatoblastome konnte Prof. Fuchs zeigen, dass eine komplette Tumoresektion zu den wichtigsten prognostischen Faktoren zählt [36]. Eine alleinige Resektion von RMS ohne (neo-)adjuvante Chemotherapie wies eine Überlebensrate auf 8 – 22 % auf (AWMF-Leitlinien Rhabdomyosarkom). Eine Chemotherapie für eine bessere Tumorkontrolle und Tumorabgrenzung vom Parenchym sowie die Eliminierung okkult Metastasen ist somit in vielen Fällen unerlässlich. Dennoch besitzt selbst die intensiviert Chemotherapie zur Behandlung des metastasierten RMS ein schlechtes *Outcome*. Bei vorangeschrittenen und metastasierten Tumoren liegt das Problem häufig, aufgrund der vielen Behandlungszyklen der intensivierten Therapie, an den Resistenzen gegen die angewandten Chemotherapeutika [36, 37]. Sogenannte Tumorstammzellen (CSC, *cancer stem cells*, *cancer stem-like cells*) spielen, laut neueren Studien, eine Schlüsselrolle hinsichtlich dem Auftreten von Rezidiven und der Entwicklung von Resistenzen [38, 39]. Ein diskutierter Faktor bezüglich der Malignität von CSCs ist die Überexpression von ABC-Proteinen (*ATP-binding-cassette*) in solchen Zellen. Sie stellen eine Gruppe von Membranproteinen dar, die spezifische Substanzen unter ATP-Verbrauch über die Zellmembran transportieren. So werden beispielsweise Zytostatika aktiv aus der Zelle herausgepumpt, was zu weitreichenden Resistenzen gegenüber

verschiedenen Medikamenten führen kann [40]. Weitere wichtige Signalwege für die Entwicklung und Selbsterneuerung von CSCs stellen die Wnt-, Hedgehog- und Notch-Kaskaden dar [41]. Für eine effizientere Therapie mit einem besseren Überleben von Hochrisiko-Gruppen mit fortgeschrittenen Malignomen sind deshalb erweiterte Therapiekonzepte nötig, die zusätzlich das Problem der CSCs und der Multi-Drug-Resistance (MDR) bekämpfen.

### **1.5 Orthotopes Tumormodell und die Rolle von $\beta$ -Catenin**

Die Forschungsgruppe der Kinderchirurgie in Tübingen widmet sich der Erforschung von neuen bzw. modifizierten Therapiestrategien sowohl auf zellulärer Ebene als auch in vivo an Mäusen.

Für eine Überprüfung der Therapieansätze sind Tumormodelle erforderlich, wobei humane Tumorzelllinien der Maus intravenös, intraperitoneal oder subkutan injiziert werden können und solide Tumoren bilden. Für HB-Zelllinien konnte zunächst lediglich ein subkutanes Tumorstadium erreicht werden. Subkutan können die Tumorzellen leicht implantiert und der Wachstumsfortschritt nicht-invasiv kontrolliert werden [42]. Allerdings weichen die Charakteristika gegenüber orthotopen Modellen deutlich ab. Für die zwei definierten humanen HB-Zelllinien HuH6 und HepT1 [43, 44] wurde in NOD.Cg-Prkdcscid IL2rgtmWjl/Sz (NOD) Mäusen ein orthotopes Tumormodell etabliert [45]. Für ein multifokales Anwachsen der Tumorzellen in der Leber werden diese in die Milz injiziert und somit über die Portalvene zum Zielort transportiert. Um ein Tumorstadium in der Milz zu verhindern, erfolgt anschließend eine Splenektomie. Die Tumorstadiumswachstumsrate liegt bei 50 % für HepT1- und 85 % für HuH6-Zellen. Zur Überwachung kann das im Plasma vorhandene, für HB typische Tumormarkerprotein AFP verwendet werden, welches zuverlässig mit Tumorstadiumgröße bzw. der Anzahl der multifokal wachsenden Tumoren korreliert.

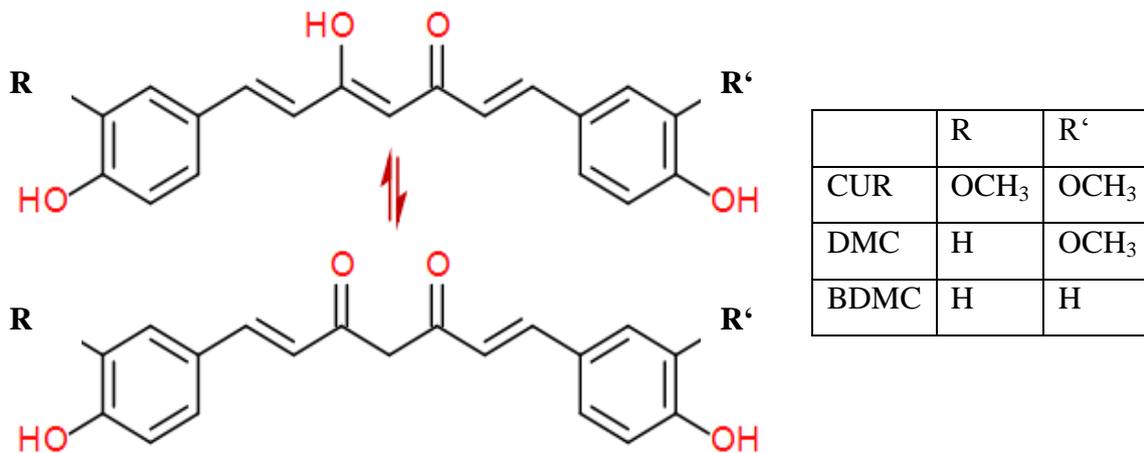
Einen Unterschied zwischen subkutanen und orthotopen HB-Tumormodellen verdeutlicht die Funktion des Proteins  $\beta$ -Catenin. In subkutanen Modellen zeigt sich eine vorwiegend membran- und zytoplasmaständige  $\beta$ -Catenin-Verteilung. Im Gegensatz dazu weist das verwendete orthotope HB-Modell eine vorwiegend nukleäre Translokation des Proteins nach, welcher beim Menschen eine Schlüsselrolle in der

malignen Entartung von Leberzellen zugeschrieben wird [46, 47]. Da HB eine hohe Anzahl an  $\beta$ -Catenin-Mutationen aufweisen, welche mit aggressivem Tumorstadium korrelieren [47, 48], stellt das orthotope Tumormodell ein gutes Modell vor allem für Hochrisiko-HB dar.

Da  $\beta$ -Catenin eines der Schlüsselproteine in der Entartung von Leberzellvorläuferzellen ist, wird in vitro fortlaufend nach selektiven  $\beta$ -Catenin-Inhibitoren gesucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine  $\beta$ -Catenin-Inhibition durch verschiedene Substanzen möglich ist [49, 50]. Beispielsweise äußerten sich die Auswirkungen in HB- und pHCC-Zellkulturen nach Behandlungen mit dem selektiven Cyclooxygenase-2-Hemmer Celecoxib und dem Wnt-Inhibitor ICG-001 durch Zellviabilitätsabnahme und verminderter nukleärer  $\beta$ -Catenin-Lokalisation. Celecoxib wird bereits im Zuge metronomischer Therapien bei refraktären soliden Tumoren angewandt [51]. Für andere selektive  $\beta$ -Catenin-Inhibitoren wie ICG-001 offenbart die hohe Nebenwirkungsrate ein Problem:  $\beta$ -Catenin besitzt keine Enzymaktivität und entfaltet seine Wirkungen deshalb weitläufiger und teilweise in Interaktion mit der DNA [52].

## **1.6 Curcumin**

Ein weiterer Inhibitor von  $\beta$ -Catenin mit kaum relevanten Nebenwirkungen ist Curcumin (CUR,  $M_{\text{CUR}} = 368,39 \text{ g/mol}$ ) [53]. CUR (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione), auch bekannt als Diferuloylmethan, wird aus der Gelbwurzel (*Curcuma longa*) gewonnen. Aus den Pflanzen wird vorwiegend CUR (50 – 60 %), in geringen Mengen jedoch auch Demethoxycurcumin (DMC, 20 – 30 %) und Bisdemethoxycurcumin (BDMC, 7 – 20 %) extrahiert [54]. In wässrigen Lösungen liegt CUR, aufgrund der höheren Stabilität, meistens in der Enolform vor. Die Strukturformel der Curcuminoiden ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Chemische Struktur der Curcuminoide**

Dargestellt sind die Keto-Form (untere Abbildung) und die Enol-Form (obere Abbildung) der Curcuminoide sowie die Strukturformeln von CUR, DMC und BDMC.

Es ist seit viertausend Jahren Bestandteil der ayurvedischen Medizin, wo es vorwiegend zur Behandlung von Akne, Psoriasis und Dermatitis herangezogen wurde [50]. Als Gewürz findet es heutzutage Anwendung in der Lebensmittelbranche wo es, synthetisch hergestellt, auch als Farbstoff unter dem Namen E100 zur Färbung von Senf, Konfitüre, Margarine u.a. eingesetzt wird. In den letzten 30 Jahren entwickelte sich CUR zu einem der am intensivsten beforschten Therapeutika der onkologischen Komplementärmedizin. In zahlreichen präklinischen Studien wurden antioxidative, antibakterielle, antimykotische, antivirale, anti-inflammatorische, antiproliferative, proapoptotische, antiangiogenetische und -sklerotische Effekte nachgewiesen [55-57]. Es wurde gezeigt, dass CUR an etliche unterschiedliche Strukturen bindet, wie zum Beispiel Transportproteine, Enzymen, Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, Zytokinen, Proteinkinasen und -reduktasen, wo es mittels Inhibition oder Aktivierung vielseitige Effekte hervorruft [58-69]. Außerdem wurden erste vielversprechende Ergebnisse zu Mamma-, Rectum- und Pankreas-Karzinom aus klinischen Studien (Phase I und Phase II) veröffentlicht [70-73]. CUR stellte zusätzlich zu chemoprotektiven und resistenzvorbeugenden Eigenschaften auch seine Funktion als sicheres Agens unter Beweis. Nebenwirkungen von CUR sind nur spärlich beschrieben. Unter hohen Dosen bis zu 8 g am Tag wurde teilweise über Übelkeit, Durchfall, Bauchschmerzen sowie eine Erhöhung der Aktivitäten im Blut der Alkalischen Phosphatase und der

Laktatdehydrogenase berichtet. In vitro und in Tiermodellen wurde darüber hinaus eine Hemmung von Medikamenten metabolisierenden Enzymen und ein Abfall der Blutkonzentration von Eisen, aufgrund der chelatkomplexbildenden Eigenschaften von CUR, festgestellt [50]. Dennoch, bisher ca. 65 abgeschlossene am Menschen durchgeführte Studien beschreiben CUR als nebenwirkungsarme und sichere Substanz [72-76].

### **1.6.1 Kombinationsmöglichkeiten mit Zytostatika und photodynamischer Therapie**

Einen weiteren Vorteil von CUR stellen die Kombinationsmöglichkeiten mit verschiedenen Therapiekonzepten wie beispielsweise Chemo- oder einer photodynamischen Therapie (PDT) dar, wodurch eine bessere Therapieeffizienz und höhere Überlebensraten erreicht werden sollen. Es wurde gezeigt, dass CUR in Kombination mit Standardchemotherapeutika chemoprotektive, resistenzvorbeugende und synergistische Wirkungen auf Tumoren aufweist [67, 68, 77-79]. In Zelllinien aus Ovarialtumoren wurde festgestellt, dass hierbei die Reihenfolge der Behandlungen und der Zeitabstand dazwischen relevant sind. Der Viabilitätsverlust war am größten wenn zuerst CUR und 2 h später CDDP zu den Zellkulturen hinzugegeben wurde [80].

Eine andere Kombinationsmöglichkeit besteht in der Verwendung von CUR als Photosensitizer im Zuge einer PDT. Bei einer PDT werden Zellen, welche zuvor mit einem Photosensibilisator behandelt wurden, mit einer geeigneten Wellenlänge ( $\lambda_{\text{CUR}} = 480 \text{ nm}$ ), belichtet um selektiv tumoröses, malignes Gewebe zu zerstören. Der durch die Belichtung angeregte Photosensitizer bewirkt vor allem die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die die Zelle mittels verschiedener Mechanismen in die Apoptose leiten. In der Fachliteratur weisen einige Studien eine photoaktivierte Zytotoxizität von CUR durch ROS-Produktion, DNA-Fragmentierung und Apoptoseaktivierung auf [81-84]. Der in der Klinik meist benutzte Photosensibilisator ist Photofrin, welches effiziente Wirkungen bei soliden Malignomen bewiesen hat (Dt Ärztebl 2000; 97: A 3337–3343 [Heft 49]). Die entsprechende Verwendung von Curcumin ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

## 1.6.2 Bioverfügbarkeit

Ein großes Problem einer Therapie mit CUR stellt die geringe orale Bioverfügbarkeit dar [85]. Hierfür existieren mehrere Gründe. Zum einen weist CUR eine geringe intestinale Resorption auf. Als lipophiles Molekül, ist CUR darauf angewiesen durch konjugierte Gallensäuren in physiologische, hydrophile Mischmizellen eingeschlossen zu werden. Mizellen sind amphiphile Aggregate aus konjugierten Gallensäuren, Phospholipiden, Fettsäuren, Monoglyceriden, Cholesterin, fettlöslichen Vitaminen und Antioxidantien, die hydrophoben Nahrungsbestandteilen den Transport über den sogenannten „unstirred water layer“, einer relativ konstanten Wasserphase auf der luminalen Seite des Dünndarmepithels, ermöglicht. In humanen Studien konnten damit bisher unerreichte Blutkonzentrationen von CUR nachgewiesen werden [86]. Die Bildung von physiologischen Mischmizellen ist abhängig von der Verfügbarkeit konjugierter Gallensäuren, der Menge an produzierter Gallenflüssigkeit und des pH-Wertes im Duodenum. Wird die benötigte Konzentration konjugierter Gallensäuren beispielsweise nicht erreicht („kritische Mizellenbildungskonzentration“), können keine Mizellen gebildet werden [87].

Zum anderen fällt die intravasale Konzentration von CUR rasant ab. Ursächlich sind vor allem zwei Gründe: Erstens wird CUR schnell durch die hepatische und intestinale Metabolisierung abgebaut. Das erfolgreich resorbierte CUR wird sowohl in den Darmzellen als auch in der Leber mittels Phase-I-Metabolismuswege in Hydrocurcuminoide reduziert und anschließend in Phase-II-Reaktionen mit Sulfaten und Glucuroniden konjugiert [88, 89]. Shoba et al. konnte messbare CUR-Konzentrationen im Serum lediglich für eine kurze Dauer nach oraler Gabe nachweisen [90]. Die Ausscheidung erfolgt dabei vorwiegend biliär. Zweitens besitzt CUR in wässrigen Lösungen eine sehr geringe chemische Stabilität, welche eine pH- und Zeitabhängigkeit aufweist. Ein alkalisches Milieu fördert die Degradation von CUR stärker als ein saures. Auch sichtbares Licht unterstützt den chemischen Zerfall. Fötale Kälberserum oder Humanblut hingegen stabilisieren CUR [91].

Das Problem der geringen Bioverfügbarkeit von CUR ist Gegenstand aktueller Forschung. Es existieren mehrere unterschiedliche Lösungsansätze, die entweder an der verminderten Resorption oder am erhöhten hepatischen bzw. intestinalen Abbau von CUR ansetzen. Darunter fallen Studien zur Applikationsform beispielsweise intravenös

oder inhalativ [92], zur Hemmung der hepatischen Metabolisierung zum Beispiel mittels Piperin [54, 90] und zur Galenik von CUR in Form von Nanopartikeln und mizellaren Lösungen [86, 92].

Unter den verschiedenen Forschungsansätzen zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit, stellen in der Pädiatrie mizellare Lösungen einen besonders interessanten Ansatz dar. Sie können nicht-invasiv, peroral verabreicht werden, greifen nicht zu stark in die bestehenden physiologischen Vorgänge ein und beinhalten körpereigene, gut verträgliche Strukturen. Sie sind abzugrenzen von sogenannten Nanopartikeln, die gehäuft in beispielsweise Sonnencremes und technischen Anwendungen zum Einsatz kommen. Die synthetisch hergestellten Mizellen gleichen den intestinal gebildeten Mizellen in ihrer Zusammensetzung, sind jedoch unabhängig von limitierenden Faktoren der Mizellenbildung im Körper. Mehrere humane Studien konnten die gesteigerte Bioverfügbarkeit nach Gabe mizellarer CUR-Lösungen belegen (s. Tabelle 1:) [86, 93, 94].

Galenik	Handelsname	Dosis (g/Erw.)	C <sub>max</sub> [nmol/l]	Nachweis in x von n
CUR nativ		12	8415 ± 1629	1 von 6
CUR + Piperine		2	489 ± 434	10 von 10
CUR Öl	BCM-95TM BiocurcumaxTM	2	1240	11 von 11
CUR-Lipid-Nanopartikel (60%)	LongvidaTM	4	111 ± 24	11 von 11
Phosphatidylcholine-CUR-Komplex	MerivaTM	0,376	1765 ± 34	9 von 9
CUR-Submicron (nano)-Suspension	TheracurminTM	0,21	747 ± 182	6 von 6
CUR-Mizellen	NovasolTM	0,5	3228 ± 1408	23 von 23

**Tabelle 1: Orale Bioverfügbarkeit von Curcumin**

Die bisher in vielen Studien schlechte orale Bioverfügbarkeit von Curcumin (C<sub>max</sub>[nmol/l]) konnte mithilfe einer mizellaren Galenik deutlich verbessert werden (Tabelle angelehnt an Schiborr et al. (2014) [86]).

Aufgrund der simplen, peroralen Verabreichungsform ist mit mizellarem CUR (MicC) auch eine Überprüfung der Wirkung von CUR auf Hepatom- und RMS-Zellen, an einem orthotopen Tumormodell in der Maus, realistisch und vielversprechend.

## **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Im Gegensatz zur Erwachsenenonkologie existieren in der pädiatrischen Onkologie, insbesondere die soliden Tumoren betreffend, nur wenige veröffentlichte Untersuchungen in Bezug auf CUR. Tumorchemmende Eigenschaften von CUR konnten für Retinoblastomzellen [95], Medulloblastomzellen [96, 97], Neuroblastomzellen [98, 99], Rhabdoidzellen [97] und an in vivo Modellen für Medulloblastome [100] gezeigt werden. Gerade in der Pädiatrie wäre eine Verwendung von CUR, aufgrund seines vielseitigen Wirkungsspektrums und der kaum vorhandenen Nebenwirkungen außerordentlich interessant.

Ziel meiner Arbeit ist es die Wirksamkeit von CUR in vitro auf HB- (HuH6, HepT1, HepG2), pHCC (HC-AFW1) und RMS-Zelllinien (RD, RH30, A204) zu untersuchen und die Ergebnisse in vivo an einem orthotopen Tumormodell zu überprüfen. Für HepG2 wurden bereits Sauerstoffradikal (ROS) generierende, antiproliferative und antiangiogenetische Effekte nachgewiesen [101]. Für die restlichen Zelllinien wurden bisher kaum Ergebnisse unter einer CUR-Behandlung publiziert.

Wie Marvin Xuejun Xu et al. zeigen konnte, inhibiert CUR in erwachsenen HCC-Zellen die  $\beta$ -Catenin-Aktivität und reduziert die Zellviabilität [102]. Interessant ist eine Überprüfung dieser Beobachtung in kindlichen soliden Tumorzellen. Der erste Schritt meiner Arbeit ist es daher die  $\beta$ -Catenin-Verteilung in der Zelle und die Zellviabilität unter CUR-Behandlung zu untersuchen.

Zur Steigerung der Wirksamkeit unter niedrigen CUR-Dosen sollen die Kombinationsmöglichkeiten von CUR mit anderen Therapiekonzepten betrachtet werden. Hierfür wurden die Standardchemotherapeutika bei HB und RMS Cisplatin und Doxorubicin herangezogen. Neben den chemoprotektiven und resistenzvorbeugenden Eigenschaften könnte CUR so zu einer Reduktion der momentan angewandten Chemotherapeutika-Dosen in der Klinik beitragen.

Zum anderen bietet sich die Verwendung von CUR im Zuge einer PDT an. Das Konzept mit anderen Substanzen wird bei soliden Tumoren bereits erfolgreich angewandt und CUR weist in der Fachliteratur vielversprechende Ergebnisse als Photosensitizer auf. Im Zuge der näheren Betrachtung der PDT sind für uns die ROS-Produktion und der Einfluss auf den Stammzellanteil der Tumorzellkulturen von Interesse.

Für eine bessere Interpretation und Auswertung der Ergebnisse stellt auch die Analyse der zellulären Aufnahme, Metabolisierung und chemischen Degradation von CUR einen Teil dieser Arbeit dar.

Nach Abschluss der *in vitro* Versuche soll die CUR-Behandlung im orthotopen Tumormodell getestet werden. Verwendet wird hierfür die pHCC-Zelllinie HC-AFW1, über die nichtpublizierte, vielversprechende Daten zum Tumoruptake nach intrasplenischer Injektion existieren. Gute Resultate bezüglich der Tumoraufnahme wurden bereits mit den HB-Zelllinien HuH6 und HepT1 veröffentlicht [45]. Das oral applizierte mizellare CUR wird dafür sowohl als Monotherapie als auch als Kombinationstherapie mit Cisplatin verabreicht.

Eine Erforschung der vielfältigen Wirkungen von CUR auf pädiatrische solide Tumoren soll eine Aufnahme dieses komplementärmedizinischen Agens in neue Therapiekonzepte ermöglichen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Zelllinien und Zellkulturen

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich etablierte und immortalisierte Tumorzelllinien verwendet.

- Hepatomzelllinien: HC-AFW1, HuH6, HepT1, HepG2
- RMS-Zelllinien: RH30, RD, A204

Für den PDT-Versuch mit Fibroblasten wurde die primäre Zelllinie Fib3 genutzt.

**HC-AFW1:** Diese Zelllinie wurde vom wissenschaftlichen Labor der Kinderchirurgie und –urologie Tübingen unter Leitung von Prof. Fuchs, nach operativer Entfernung aus einem fünfjährigen Jungen, isoliert und etabliert [103]. Die Zellen weisen eine Vielzahl an numerischen und chromosomalen Aberrationen auf. Histologische Untersuchungen führten, aufgrund der ursprünglichen pädiatrischen, epithelialen Charakteristika zur Einstufung als pädiatrisches hepatozelluläres Karzinom (pHCC). Die Verdopplungszeit beträgt 40 h. Eine erfolgreiche Inokulation in NOD/SCID-Mäuse wurde nachgewiesen. Die Einbindung in das orthotope Tumormodell fand in dieser Arbeit das erste Mal statt.

**HuH6:** HuH6 wurde erstmals von Doi und Sato im Jahre 1976 beschrieben. Die Zellen wurden bioptisch aus dem rechten Leberlappen eines einjährigen Jungen gesichert. Das Primärgewebe zeigte eine gut differenzierte noduläre Zellstruktur mit einem Kern-Plasma-Verhältnis von 1:1 bis 1:2. Ihre Morphologie gleicht der von Epithelzellen. Der Nukleolus der Zellen ist, gemessen am kondensierten Chromatin, relativ groß, was auf differenzierte Kerne hinweist. Histologisch wurde der Tumor deshalb als Hepatoblastom (HB) vom gemischten Typ klassifiziert. Die Kerne besitzen einen aneuploiden Karyotyp mit zwei zusätzlichen Chromosomen (48, XY). Die Verdopplungszeit liegt bei ungefähr 35 h. [44]

**HepT1:** HepT1 wurde im Jahre 1996 von Pietsch et al. etabliert. Die Zellen entstammen aus einem multinodulären und invasiv wachsenden Tumor eines dreijährigen Mädchens. Er besitzt einen tetraploiden Karyotyp mit etlichen numerischen und strukturellen genetischen Aberrationen. Histologisch wies der Tumor polymorphe epitheliale Zellen auf, die embryonalen Hepatozyten ähnelten. Sie enthielten granulär eosinophiles

Zytoplasma und pleomorphe, oft gespaltene Kerne mit irregulärem Chromatin. Das Kern-Plasma-Verhältnis war hoch. Der Tumor wurde deshalb als embryonales HB eingestuft. Die AFP-Produktion ist gering. Die Verdopplungszeit liegt zwischen 24 und 48 h. [43]

**HepG2:** Die Zellen wurden 1975 aus einem gut differenzierten hepatozellulären Karzinom (trabekulärer Typ) eines 15-Jahre alten argentinischen Jungens entnommen und 1979 durch Aden et al. etabliert [104]. Sie besitzen eine epitheliale Morphologie und sezernieren mehrere Plasmaproteine wie beispielsweise AFP, Albumin, Transferrin und Akute-Phase-Proteine. Der Karyotyp ist polyploid mit 50 – 56 Chromosomen. Das Hepatitis-B-Antigen HBsAg wird auf den Zellen exprimiert. Die Verdopplungszeit beträgt 50 – 60 Stunden. Aufgrund einer morphologischen Ähnlichkeit zu Leberparenchymzellen, werden HepG2-Zellen in der aktuellen Fachliteratur und in dieser Arbeit als HB klassifiziert [105].

**RH30:** Die RH-30-Zelllinie wurde aus einer Knochenmetastase eines 17-jährigen Jungens mit unbehandeltem alveolärem RMS isoliert. Die Zellen besitzen eine p53-Mutation und ein Pax3/FKHR-Fusionsprotein aufgrund einer Translokation t(2;13). Die Chromosomenanzahl beträgt zwischen 51 und 87 [106]. Die Verdopplungszeit liegt bei ca. 35 h.

**RD:** Diese RMS-Zellen entstammen einer Biopsie aus dem Beckenbereich eines bereits behandelten, rückfälligen siebenjährigen Mädchens. Die Histologie weist auf einen embryonalen Typ mit spindeligen, mehrkernigen Zellen hin. Der Karyotyp beinhaltet 51 Chromosomen. Es sind mehrere Mutationen bekannt, unter anderem im MYC-Onkogen und TP53 [106].

**A204:** Diese Zelllinie wurde aus einem einjährigen Mädchen entnommen. Beschrieben wurde sie erstmals von Giard im Jahre 1973 [107]. Die Zellen besitzen einen epithelialen Charakter. Sie werden dem embryonalen RMS-Typ zugeordnet.

**Fib3:** Die primären Fibroblasten-Kulturen stammen von einem fünfjährigen Jungen. Sie wurden aus dem Restgewebe einer operativ entfernten Vorhaut in der Abteilung Kinderchirurgie und –urologie des Universitätsklinikums Tübingen im Februar 2011 entnommen und in Kultur aufgenommen (Verwendete Passagen: 5 und 8).

Alle Zelllinien wurden auf Zellkulturschalen (Rundschalen 100 x 20 mm, Sarstedt AG & Co, Nürnberg) kultiviert und im Inkubator (Brutschrank, BBD 6220, Heraeus Holding GmbH, Hanau) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt gelagert. Das Zellkulturmedium setzte sich zusammen aus 88 % DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Biochrom AG, Berlin), 10 % Fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom AG, Berlin), und je 1 % L-Glutamin (L-Glutamin, 200 mM, Biochrom AG, Berlin) und Antibiotika (Penicillin / Streptomycin, 10.000 IU/ml / 10 mg/ml, Biochrom AG, Berlin). Alle verwendeten Substanzen zur Erhaltung und Behandlung der Zellkulturen wurden vor Zugabe auf die Zellen im Wasserbad (Typ 1003, GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel) bei 37°C erwärmt. Die Arbeit erfolgte mit Handschuhen (Pehasoft® nitrile white, Paul Hartmann AG, Heidenheim) unter einer Laminar-Flow-Sterilbank (Msc Advantage, Fisher Scientific GmbH, Schwerte) die vor und nach Benutzung mit Desinfektionsspray (Descosept AF, Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld) und UV-Licht desinfiziert wurde. Die verwendeten Materialien waren steril filtriert oder autoklaviert und steril abgepackt.

Zur Kontrolle der Zelldichte auf den Kulturschalen und um Zellen für Versuche zu entnehmen, wurden diese passagiert. Hierzu wurde das Medium mittels Pasteurpipettenspitzen (Pasteur-Kapillarpipetten, 230 mm, WU, Mainz) abgesaugt. Zur Reinigung von im Medium enthaltenen Magnesium und Calcium, wurde mit 1x PBS (Biochrom AG, Berlin) gewaschen, da sonst die anschließende Trypsinierung gehemmt wäre. 1 ml Trypsin-EDTA (Trypsin / Ethylendiamintetraacetat-Lösung (10x), PAA Laboratories, Pasching, Österreich) wurde hinzugegeben und für 2-5 min im Brutschrank inkubiert, da die Proteinase bei 37 °C am effizientesten arbeitet. Für die Zelllinie HC-AFW1 wurde hier und bei allen Versuchen stattdessen Accutase (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) verwendet, da sie empfindlich auf Trypsin reagiert. Leichtes Klopfen erleichterte das Loslösen des Zellrasens. 4 ml Medium wurden hinzugegeben, mit dem Trypsin und den Zellen vermischt und wieder per Pipettierhilfe (Pipetboy acu, Integra Bioscience AG, Chur) und den entsprechenden serologischen Pipetten (BD Falcon™ Serologische Pipette, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) aufgezogen. 1 ml wurde in die Schale zurückpipettiert, mit 7-8 ml Medium vermischt und in den Brutschrank gestellt. Die restlichen Zellen konnten für Versuche oder weitere Kulturschalen genutzt werden.

Zur Verwendung der Zellen für Versuche, müssen diese quantifiziert werden. Dies erfolgte mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer Zählkammer, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Ein Deckglas (24 x 60 mm, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen) wurde unter leichtem Druck auf die Kammer aufgebracht. Nach Passage der Zellen in 10 ml Falcon-Röhrchen (Falcon™-Tubes, Cellstar® mit konischem Boden, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen), wurden 10 µl hiervon auf den Rand der Neubauer-Platte gegeben, mit 10 µl Trypanblau (0,5%, Biochrom AG, Berlin) vermischt und ohne Luftblasen zwischen Deckglas und Zählplatte pipettiert (Pipette, Eppendorf Reference® (verstellbar), Eppendorf AG, Hamburg, Pipettenspitzen, 0,5 – 10 µl Kristall E, Ratiolab GmbH, Dreieich). Die Färbung mit Trypanblau dient der Kennzeichnung toter Zellen. Die Zählung erfolgte in allen vier großen Eckquadranten, die auch für die Leukozytenzählung Anwendung finden. Um einen Mittelwert für einen Eckquadrant zu erhalten, wurde die Gesamtzellzahl durch vier geteilt und, aufgrund der Verdünnung (1:1) mit Trypanblau, mit zwei multipliziert. Die Zählkammer besitzt ein Volumen von 0,1 µl. Um die Zellanzahl in 1 ml zu erhalten, wurde das Ergebnis mit Zehntausend multipliziert. Nach Gebrauch wurde die Kammer mit Desinfektionsspray gereinigt.

Um genügend Zellen vorrätig zu besitzen, wurden niedrige Passagen der Zelllinien teilweise eingefroren und im Flüssigstickstofftank bei -196°C gelagert. Dazu wurden die Zellen, wie bei der Zellpassage, gewaschen, trypsiniert, in Medium resuspendiert und zentrifugiert (1500 U/min; Multifuge 1S-R, Heraeus, Hanau). Der Überstand wurde abgesaugt, 3 ml Einfriermedium (80 % Medium inkl. Zusätze, zusätzlich 10 % FCS und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid, AppliChem GmbH, Darmstadt)) hinzu gegeben und auf zwei 1,5 ml Kryoröhrchen (Cryo.s™, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) verteilt. Diese wurden in einen Gefrierbehälter (5100 Cryo 1°C Freezing Container, “Mr. Frosty”, Nalgene® Labware, Thermo Scientific, Roskilde, Dänemark) gestellt um eine kontinuierliche Abkühlung von 1°C pro Minute zu gewährleisten. Ab einer Temperatur von -80°C (nach mindestens 12 h) wurden sie in den Stickstofftank überführt. Bei Bedarf wurden die Zellen, unter Gebrauch von Schutzkleidung, aus dem Stickstofftank geholt und im Wasserbad bei 37°C kurz angetaut. Die Zellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) und 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, 7 ml Medium hinzu pipettiert und in eine beschriftete

Zellkulturschale gegeben. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 3 ml PBS gewaschen um tote Zellen zu entfernen und 7 ml frisches Medium hinzugegeben.

## **2.2 Analyse der Lokalisation von $\beta$ -Catenin**

Um den Einfluss von CUR auf die  $\beta$ -Catenin-Verteilung mikroskopisch darzustellen, bietet sich die Kultivierung und Behandlung von Zellkulturen auf Objektträgern an. Nach der Inkubation mit CUR kann, mittels zwei Antikörpern,  $\beta$ -Catenin am konfokalen Fluoreszenzmikroskop detektiert und fotografiert werden.

Die zur Kultivierung verwendeten sterilen Objektträger (SuperFrost® Plus, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen) wurden in Kammern unterteilt und für 30 min mit Poly-D-Lysin hydrobromide (mol wt 70,000-150,000, Sigma-Aldrich, Spruce St., St. Louis, MO 63103, USA) vorbehandelt um ein Anhaften der Zellen zu ermöglichen. Anschließend wurden sie, nach Absaugen des Poly-D-Lysins, für 45 min unter der Sterilbank trocknen gelassen. Pro Kammer wurden  $3 \cdot 10^4$  Zellen (HepT1:  $5 \cdot 10^4$  Zellen) in 100  $\mu$ l Medium eingesetzt und über Nacht in den Brutschrank gestellt. 10  $\mu$ l CUR (Curcumin 95 % nativ, AquaNova® AG, Darmstadt) bzw. MicC (NovaSOL CURCUMIN, 6%iges Curcumin-Solubilisat, AquaNova® AG, Darmstadt) wurde in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgesogen und die Objektträger in einen mit PBS gefüllten Färbeständer gestellt. Für die Fixierung wurden sie für 15 min in einen Ständer mit -20 °C kalten Aceton (Aceton for analysis, Merck KGaA, Darmstadt) / Methanol (VWR, Darmstadt) transferiert. Nach Umrandung der Zellkulturen mit einem Fettstift (DAKO Cytomation Pen, DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) erfolgten drei Waschgänge à 3 min mit PBS/ 2 % Tween20 (Tween® 20, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim). Um die unspezifische Antikörperbindung zu blocken, wurde PBS/ Tween20 mit 3 % Ziegen Serum (Goat Serum (Normal), DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) hinzugegeben und 1 h inkubiert. Die Lösung wurde abgekippt und die Objektträger für 30 min bei RT mit polyklonalen Antikörpern (Rabbit catenin (beta) concentrate, Zytomed Systems GmbH, Berlin), 1:500 mit PBS/ Tween verdünnt, versetzt. Nach einem dreifachen PBS/ Tween -Waschgang erfolgte die einstündige Inkubation mit dem Cy3 goat anti-rabbit Antikörper (Jackson ImmunoResearch,

Laboratories, Inc, PA, USA), verdünnt 1:200 mit PBS/ Tween. Gleichzeitig wurde DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, > 98%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in einer Konzentration von 1:2000 (Stockkonzentration: 1 mg/ml in Ethanol gelöst) hinzugegeben. Es folgte der dreifache Waschgang für 3 min mit PBS/ Tween und das Eindeckeln mit Mounting Medium (DAKO Fluorescent Mounting Medium, DAKO North America Inc., Carpinteria, USA). Über Nacht wurden die Objektträger zum Aushärten in den Kühlschrank gelegt.

Die Auswertung erfolgte am Apotome (ApoTome Axio Imager 2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland). Als Fluoreszenz-Kanal wurde DS Red gewählt. Mit dem Programm Axio Vision (Axio Vision 3.1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) erfolgte die Aufnahme und Bearbeitung der Bilder.

### **2.3 Analyse der Zellviabilität**

Zur Quantifizierung der Zellviabilität sowohl unter CUR-Mono- als auch unter Kombinationstherapie mit Zytostatika und PDT wurden MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] –Assays (AppliChem GmbH, Darmstadt) angesetzt. Das pulverförmige MTT wurde in warmem 1x PBS gelöst, sterilfiltriert (Sterilfilter, Millex®-GS, 0,22 µm, Millipore Ireland Ltd., Tullagreen, Irland), aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Konzentration der MTT-Lösung betrug 5 mg/ml. Der MTT-Viabilitäts-Test dient als Nachweis der Zellviabilität. Die gelbfarbige MTT-Reagenz wird, in Mitochondrien lebender Zellen, NAD(P)H-abhängig zu einem wasserunlöslichen Formazan umgesetzt und ändert seine Farbe in blau-violett bzw., in Kombination mit dem gelbfarbigen Curcumin, in grün. Die Intensität der Grünfärbung ist proportional zur Zellviabilität.

Die Zellen wurden passagiert, gezählt und anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur und 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in farblosem Medium (phenolrotfreies DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Phenolrot, Biochrom AG, Berlin), 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin) resuspendiert und  $5 \cdot 10^3$  Zellen in 100 µl pro Well (Zellkulturplatte, 96-Well Falcon® Microtest™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) mittels Multipipette (Eppendorf Multipette® Xstream, Eppendorf AG, Hamburg) pipettiert. In den Versuchsreihen mit dichten Zellkulturen wurde für alle Zelllinien die

fünffache Anzahl verwendet. Für die Zelllinie HepT1 wurde, aufgrund des langsameren Wachstums, in allen Versuchen die doppelte Anzahl, eingesetzt. Die Kulturen wurden über Nacht im Brutschrank stehen gelassen, um ein Anwachsen zu ermöglichen. Am nächsten Tag erfolgte die weitere Behandlung.

Die Standardinkubationsdauer mit CUR, CDDP und Doxorubicin betrug 48 h. Die Zytostatika stammten aus der Apotheke der Kinderklinik. Für die Versuchsreihe mit verkürzter Inkubation wurden die behandelten Zellkulturen 1 h nach CUR-Zugabe mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 48 h mit frischem, CUR-freiem, Medium versetzt.

Für die Viabilitätsanalyse nach einer photodynamischen Therapie (PDT) wurden die Zellen für 1 – 1,5 h mit CUR behandelt, 10 s (Fibroblasten sowohl 1 als auch 10 s) pro Well separat bei einer Wellenlänge von ca.  $\lambda_{\text{CUR}} = 480 \text{ nm}$  mit dem Laparoskop (KARL STORZ GmbH & Co. KG, Tuttlingen; PDD-Modus (5-ALA), Leistung der Lichtquelle = 300 W, Farbtemperatur = 6000 K, Distanz von Ende des Optik-Kabels zu Zellen = 2 cm) belichtet und anschließend für 48 h inkubiert. Für die Feststellung des optimalen Zeitpunktes der PDT erfolgte eine 1-, 3- oder 6-stündige Inkubation mit CUR, Belichtung nach dem gleichen Schema und eine weitere Inkubationsdauer von 24 h.

Für die Betrachtung verschiedener Behandlungskombinationen mit blauem Licht ( $\lambda = 480 \text{ nm}$ ) und CUR auf die Zellviabilität wurden die Zellen vier verschiedenen Behandlungen unterzogen: Einer reinen CUR-Applikation ohne Belichtung, einer separaten Belichtung der Zellen vor CUR-Zugabe, einer separaten Belichtung der CUR-Verdünnungen vor Zugabe auf die Zellen und einer Belichtung nach 1,5 h CUR-Inkubation. Sowohl Zellansätze als auch zellfreie Ansätze wurden in den 96-Well-Platten belichtet. Das Belichtungsschema wurde nicht abgeändert. Die anschließende Inkubationsdauer betrug 24 h.

Nach der Inkubation wurde pro Well 25  $\mu\text{l}$  MTT-Reagenz hinzugegeben und sechs Stunden (dichte Zellkulturen 5 h) im Brutschrank stehen gelassen. Anschließend wurde die Reaktion gestoppt durch 100  $\mu\text{l}$  SDS-Lösung (10 % Natriumdodecylsulfat (SDS, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), Salzsäure 0,02 N (HCl, 1 N, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), Aqua bidest) pro Well. Die Platten wurden in feuchte Papiertücher und Aluminiumfolie gewickelt und bei Raumtemperatur für 18 h gelagert. Mittels ELISA-Reader (Milenia Kinetic Analyzer, Milenia Biotec GmbH, Gießen)

wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch die Absorption gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism® (Version 4.0, GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). Die Messwerte der Ansätze ohne Zellen wurden abgezogen, die Werte auf den Ausgangswert normalisiert und die X-Werte logarithmiert. Bei den Kombinationsversuchen mit CDDP, Doxorubicin wurde zusätzlich auf den Ausgangswert der Kontrolle normiert um den reinen Curcumin-Effekt darzustellen. Sofern es möglich war, wurden sigmoidale Regressionskurven (mit der Formel: *sigmoidal dose-response (variable slope)*) erstellt.

## **2.4 Analysen mittels fluoreszenzbasierter**

### **Durchflusszytometrie**

Mit der Durchflusszytometrie, auch Fluorescence activated cell sorting (FACS) genannt, ist es möglich Zelleigenschaften und Fluoreszenzen zu detektieren sowie die Zellanzahl zu bestimmen. Dabei strömen die Zellen einzeln durch eine Kapillare und werden von einem Laser bestrahlt. Mittels Detektion des Streulichts werden außer den Fluoreszenzen, der Forward Scatter (FSC), ein Maß für die Zellgröße, und der Side Scatter (SSC), ein Maß für die Zellgranularität, ermittelt. Da in einem FACS-Puffer mehr Zellen absterben und Curcumin so aus den Zellen hinaus diffundiert, wurde stattdessen farbloses Medium und HEPES-Puffer (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure, 1 M, Biochrom AG, Berlin) im Verhältnis von 9:1 verwendet.

Die Zellen wurden in 24-Well-Platten (Zellkulturplatte, 24-Well Falcon® Multiwell™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) kultiviert und pro Tripletts verschiedenen CUR-Konzentrationen ausgesetzt. Falls eine Belichtung ( $\lambda_{\text{CUR}} = 480 \text{ nm}$ , Laparoskop von Storz) durchgeführt wurde, erfolgte sie nach ein bis zwei Stunden Inkubation, sodass die zelluläre Aufnahme von CUR gewährleistet war. Nach Kultivierung und Behandlung wurden die Zellen für fünf Minuten bei 37 °C mit 100 µl Trypsin-EDTA inkubiert, in 500µl farblosem Medium resuspendiert und in FACS-Röhrchen (FACS-Tube, BD Falcon™ Round-Bottom Tube, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) überführt. Die Messung (Anregungs- und Emissionswellenlängen von CUR:  $\lambda_{\text{Ex/Em}} = 488/546$ ) erfolgte am BD FACSCalibur (BD

FACSTM 7-Color Setup Beads, Biosciences, San Jose, USA) mit dem FL1-Kanal (s. Tabelle 2) bzw. am BD LSR II (BD Biosciences, San Jose, USA) und die Auswertung der Daten mit FCS-Express V3 (De Novo Software, Los Angeles, USA), BD FACSDiva™ (BD Biosciences, San Jose, USA) und Graph Pad Prism. Hierbei wurde entweder der für bestimmte Marker positive Zellanteil direkt dargestellt oder die geometrischen Mittelwerte nach Division durch die unbehandelte Kontrolle aufgezeigt.

	<b>FL1</b>	<b>FL2</b>	<b>FL3</b>	<b>FL4</b>
<b>Anregungswellenlänge [nm]</b>	488	488	488	633
<b>Emissionswellenlänge [nm]</b>	530/30	585/42	670 LP	661/16

**Tabelle 2: Fluorochromkanäle des BD FACSCalibur**

Aufgelistet sind die Anregungs- und Emissionswellenlängen der vier vorhandenen Fluorochromkanäle des BD FACSCalibur. Für CUR wurde der FL1-Kanal verwendet.

Für die Kennzeichnung abgestorbener Zellen wurde auf die Zellsuspensionen, drei Stunden nach Belichtung, 5 µl der lichtempfindlichen Substanz 7-AAD (Viability Staining Solution, eBioscience Inc., San Diego, USA) unmittelbar vor der Messung am BD FACSCalibur hinzugegeben. Dieser lichtgeschützt aufbewahrte Zelltodmarker gelangt erst nach Verlust des Membranpotenzials in die Zelle. Aufgrund des ähnlichen Emissionsprofils der CUR-Fluoreszenz wurde für die anschließende Messung im FL3-Kanal eine Kompensation durchgeführt. Die Auswertung wurde sowohl mit FCS-Express als auch mit Graph Pad Prism durchgeführt.

Für den Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurde das Reagenz CellROX® Orange (Life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) verwendet, welches unter Oxidation fluoresziert ( $\lambda_{Ex/Em} = 545/565$  nm). Hierbei korreliert die Fluoreszenzstärke mit dem Ausmaß der ROS-Bildung. 24 h nach Belichtung der Zellkulturen wurden 50 µl einer CellROX-Verdünnung mit farblosem Medium so hinzugegeben, dass die Well-Endkonzentration 5 µM betrug. Nach einer halben Stunde Inkubation im Brutschrank, wurden die Zellen zwei- bis dreimal mit 1x PBS gewaschen und für fünf Minuten mit 100 µl Trypsin-EDTA behandelt. 500 µl farbloses Medium wurde hinzugegeben, anschließend am BD FACSCalibur ( $\lambda_{Ex/Em} = 520/572$  nm (FL3-, FL4-Kanal)) gemessen und mit FCS-Express und Graph Pad Prism ausgewertet.

Auch zur Beurteilung des Einflusses von CUR, CDDP und PDT auf HEK 6D6-positive Subpopulationen in HC-AFW1- und HepT1-Zellkulturen wurde die fluoreszenzbasierte

Durchflusszytometrie benutzt. Dazu wurden die in 24-Well-Platten kultivierten Zellen mit CUR ( $C_{CUR} = 1, 5, 10 \mu\text{g/ml}$ , Inkubation 4 h), CDDP ( $C_{CDDP} = 1, 2, 10 \mu\text{g/ml}$ , Inkubation 24 h) und PDT ( $C_{CUR} = 1, 5, 10 \mu\text{g/ml}$ , 1 h, Belichtung  $\lambda_{\text{Ex.}} = 480 \text{ nm}$ , Inkubation 3 h) behandelt, trypsinisiert und für je 30 min. mit dem Erst- (HEK 6D6, Maus, monoklonal, AG Böhling, UKT, Verdünnung 1:40) und dem Zweit-AK (Anti-Mouse IgG (H+L), highly cross-adsorbed, CF 488A antibody produced in goat, Biotium, Hayward, CA 94545, USA, Endkonzentration =  $2 \mu\text{g/ml}$ ) auf Eis inkubiert. Vor und nach den Behandlungen wurde je zwei- bis dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die Markierung toter Zellen erfolgte hier mit Pacific Blue Succinimidyl Ester (Life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA; Verdünnung 1:400), die Messung am BD LSR II ( $\lambda_{\text{Ex/Em}} = 488/514 \text{ nm}$ ) und die Auswertung mit BD FACSDiva™, FCS-Express und Graph Pad Prism (s.o.).

Zur Analyse der zellulären Aufnahme von CUR und MicC wurden die Zellen für eine Stunde mit den Konzentrationen 0, 1, 5, 10 und 20  $\mu\text{g/ml}$  inkubiert und anschließend dem oben beschriebenen allgemeinen Procedere der durchflusszytometrischen Messung unterzogen. Zur Betrachtung der intrazellulären Metabolisierung von CUR wurden Zellkulturen mit CUR- bzw. MicC-Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  für 1 und 3 h inkubiert. In einem weiteren Experiment wurde nach 3 h CUR-/MicC-Inkubation mit 1x PBS gewaschen, frisches Medium hinzugegeben und für weitere 3 bzw. 21 h inkubiert. Die Auswertung erfolgte wie oben für das allgemeine Vorgehen beschrieben. Aufgezeigt sind die geometrischen Mittelwerte als Verhältnis zum Kontrollwert über den *Mean fluorescence index* (MFI).

## **2.5 Analyse der extrazellulären CUR-Fluoreszenz**

Zur näheren Betrachtung und Beurteilung der Reduktion der extrazellulären CUR-Fluoreszenz wurden zwei Versuchsansätze erstellt:

Subkonfluente und dichte Zellkulturen wurden mit verschiedenen CUR-Verdünnungen versetzt. Zu Beginn, nach 24 h und nach 48 h wurde die nach Anregung emittierte Fluoreszenz von CUR mittels Victor (Luminometer, WALLAC Victor™ 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer™ Life Sciences, Radgau; Messungsdauer pro Well = 1 s) gemessen.

Zur Bestimmung des Einflusses der Belichtung auf die Fluoreszenz von CUR wurden verschiedene zellfreie CUR-Verdünnungen 1 bzw. 10 s belichtet und unmittelbar, 24 und 48 h danach einer Fluoreszenzmessung am Victor unterzogen.

Die Auswertung erfolgte jeweils mit Graph Pad Prism. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Die Fluoreszenzwerte der zellfreien Kontrollen nach 24 h wurden als 0 % ( $C_{CUR} = 0 \mu\text{g/ml}$ ) und als 100 % ( $C_{CUR} = 20 \mu\text{g/ml}$ ) definiert. Anhand von errechneten sigmoidalen Regressionskurven (*sigmoidal dose-response (variable slope)*) wurden die LOGEC50-Werte von Kontrollen und Zellansätzen mittels F-Test auf signifikante Unterschiede untersucht.

## **2.6 Wirkung und Verteilung von oral appliziertem MicC in vivo**

Zur Betrachtung der Auswirkungen und Verteilung von CUR im lebenden Organismus, wurde Mäusen (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SZ, Charles River, Sulzfeld), mit einem vorher xenotransplantierten orthotopen Tumormodell, MicC peroral verabreicht.

Alle Versuche wurden, unter Genehmigung der Tierversuchsanträge (K9/1, K6/13) durch das Regierungspräsidium Tübingen und unter Leitung von Prof. Dr. Armeanu, durchgeführt. Das Mindestgewicht der Mäuse zu Versuchsbeginn war 20 g. Die Mäuse wurden in speziell für Tierhaltung eingerichteten Räumen und Käfigen mit separater Luftzufuhr gehalten. Der Zutritt zum S1-Bereich erfolgte über eine Schleuse in der Kittel, Mundschutz, Haube, Überziehschuhe und Handschuhe angelegt werden mussten. Die Arbeit mit den Mäusen wurde ausschließlich unter der sterilen Werkbank durchgeführt. Davor bzw. danach wurde mit Descosept desinfiziert. Alle verstorbenen

Mäuse wurden in einem speziellen Behälter bei -20 °C gelagert und gesondert vom Tierpfleger entsorgt.

Für das orthotope Tumormodell wurde die pHCC-Zelllinie HC-AFW1 gewählt. Zur Aufbereitung wurden die Zellen, wie bei der Zellpassage, gewaschen, trypsiniert und in Medium resuspendiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und als Suspension mit  $10^6$  Zellen pro 100 µl PBS umgehend den Operateuren übergeben. Die Zeit zwischen Ablösen der Zellen und Injektion betrug weniger als 30 min.

**Xenotransplantation:** Anschließend erfolgte die Xenotransplantation. Hierbei wurden lebende Zellen in einen fremden, lebenden Organismus injiziert. Das Ziel war ein orthotopes Tumorwachstum in der Maus, nach dem HB-Modell von Dr. Verena Ellerkamp, zu induzieren.

Die Versuchsmäuse wurden mit Xylazin 2 % und Ketamin 10 % narkotisiert und auf eine mit Wasser geheizte Unterlage gelegt bis keine Zwischenzehenreflexe mehr auszulösen waren. Die Augen wurden mit Bepanten-Salbe eingeschmiert um ein Austrocknen zu vermeiden.

Parallel zum unteren linken Rippenbogen wurde ein ca. 1 cm langer Schnitt gesetzt, erst durch die Haut, anschließend durch die Muskelschicht und das Peritoneum. Für eine bessere Zugänglichkeit wurde die Milz freipräpariert und vorsichtig etwas auf einen Tupfer außerhalb der Bauchhöhle gezogen. Nach Einstich mit einer 1 ml Spritze (1 ml Sub-Q, G26, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) in den unteren Milzpol, wurden  $2 \cdot 10^6$  Zellen in 200 µl 1x PBS behutsam injiziert. An der leichten Weißfärbung (Verdrängung des Blutes) der Milz konnte der Injektionserfolg überprüft werden. Darauf folgte eine zweiminütige Wartezeit, um den Abtransport der Zellen über die Milz- und Portalvene zu ermöglichen, und die Splenektomie mit einem bipolaren Schneidegerät. Carprofen wurde in den Bauchraum gespritzt und anschließend das Peritoneum und die Cutis zugenäht. Am Folgetag fand eine subkutane Carprofen-Injektion statt und eine Kontrolle der gesundheitlichen Zustände der Mäuse.

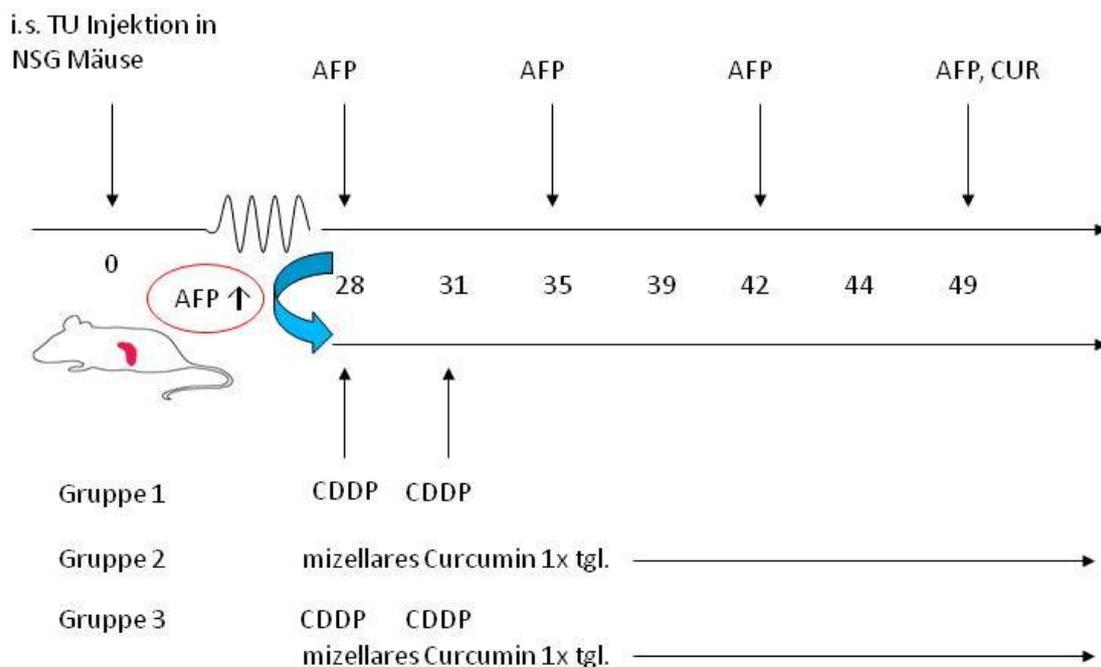
**Kontrolle des AFP-Spiegels:** AFP wird unter anderem von Hepatoblastomen und HCCs gebildet und findet in der Onkologie als zuverlässiger Tumormarker Anwendung. Die Höhe des AFP-Plasma Wertes korreliert mit Anzahl und Größe der Tumoren.

Zur Feststellung des AFP-Spiegels wurde pro Woche eine Blutabnahme durchgeführt. Die Mäuse wurden mit einem CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Gemisch für einige Sekunden betäubt. Mit einer Kapillare (heparinisiert, Hkt, 32 mm/9 µl, Hirschmann® Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt) wurde medial des Augapfels vorbeigestochen, retrobulbär 50 µl Blut entnommen und durch leichten Druck mit sterilen Papiertüchern die Blutung gestoppt. Um eine Gerinnung zu verhindern, wurden ein bis zwei EDTA-Kügelchen aus einem EDTA-Röhrchen zu den Proben hinzugegeben.

Die Proben wurden für drei Minuten bei RT und 7500 U/min in der kleinen Zentrifuge (Biofuge 15R Heraeus, Hanau) zentrifugiert um das Plasma als Überstand in ein separates Eppendorf-Tube (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) zu pipettieren. Ein Teil hiervon wurde für die AFP-Bestimmung verwendet, der Rest bei -20 °C eingefroren. Die Ermittlung des AFP-Gehalts der Proben erfolgte mittels AFP-ELISA-Kit (DRG International, Inc., Springfield, New Jersey, USA). AFP wird dabei von auf der Platte befestigten Antikörpern gebunden. Dann kann das hinzugegebene Enzym an AFP binden und das Substrat aus dem Kit zu einem farbigen Produkt umsetzen. Die Reaktion wird durch die Stopplösung beendet. Die Seren wurden, abhängig von vorherigen AFP-Werten, teilweise mit isotonischer Kochsalzlösung (Natriumchlorid 0,9 %, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) verdünnt. 25 µl der Proben und aller fünf Kit-Standards wurden in die Wells hineingegeben, je mit 100 µl Enzymkonjugat vermengt und 30 min, lichtgeschützt, bei RT stehen gelassen. Die Wells wurden ausgeleert, fünfmal gründlich mit doppelt deionisiertem Wasser gewaschen und mit 100 µl Substratlösung aufgefüllt. Nach zehnmütiger Inkubation bei RT wurde 50 µl Stopplösung hinzu pipettiert und innerhalb von zehn Minuten am ELISA-Reader bei 570 nm die Absorption gemessen.

In Graph Pad Prism wurde mit den Standards eine Eichgerade erstellt, woraus sich die AFP-Werte der Proben ergaben. Diese wurden mit den Verdünnungswerten multipliziert. Die Ergebnisse wurden in eine Tabelle zusammen mit allen AFP-Werten der jeweiligen Versuchsreihe eingetragen. Für die statistische Auswertung wurden die einzelnen Wochenwerte jedes Tieres durch den Wert der Woche 1 dividiert und mit log<sub>10</sub> logarithmiert. Letzteres wurde mit dem Programm Excel (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) durchgeführt.

**Behandlung:** Die Tiere mit positiven AFP-Plasmawerten ( $> 5$  U/ml) wurden entweder der Kontroll- oder den Versuchsgruppen (CUR- und CDDP-Monotherapie, CUR/CDDP-Kombinationstherapie) randomisiert per Losverfahren, zugeordnet. Die Versuchsgruppen erhielten entweder fünf Tage pro Woche 1,5 mg CUR als MicC pro Maus ( $\approx 60$  mg/Kg Körpergewicht (KG)) peroral oder an Tag 1 und 3 je 3 mg CDDP pro Kg KG (Hochdosis-Gruppe) bzw. 1 mg CDDP pro Kg KG (Niedrigdosis-Gruppe) oder die Kombinationstherapie mit beiden Substanzen. Nach MicC-Gabe erfolgte die Verabreichung von zwei Tropfen Glucose (50 %) gegen den bitteren Geschmack. Die Gabe von CDDP erfolgte intraperitoneal, die MicC-Gabe mittels mechanischer Multipipette Multipipette® plus, Eppendorf AG, Hamburg), da aufgrund der Kolbentechnik das zähflüssige MicC besser pipettiert werden kann. In Abbildung 4 sind die Therapiekonzepte visualisiert



**Abbildung 4: Therapiekonzepte im orthotopen pHCC-Modell in der NSG-Maus**

Durch intrasplenische Injektion von HC-AFW-1 Zellen mit nachfolgender Splenektomie wurde ein Tumorwachstum in der Leber von NSG (NOD.Cg-Prkdcscid IL2rgtmWjl/Sz)-Mäusen induziert. Das Tumorwachstum wurde mittels wöchentlicher AFP-Bestimmungen im Plasma der Mäuse überwacht. Ab dem ersten AFP Anstieg erfolgte die Therapie mit Cisplatin (CDDP, 1 bzw. 3 mg/Kg Körpergewicht intraperitoneal) und/ oder mizellarem Curcumin (1500 $\mu$ g 5/7 Tagen. p.o.). AFP wurde wöchentlich bestimmt.

Die Tiere wurden mindestens einmal wöchentlich gewogen. Bei einem Gewichtsverlust von über 10 % des Ausgangsgewichts, wurden die Tiere aus dem Versuch genommen

und eventuelle Tumoren und Organe zur histologischen Aufbereitung in Paraformaldehyd (PFA, 4,7%, Roti Histofix, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) eingelegt.

**Tumor-/Organexplantation:** 21 Tage nach Therapiebeginn wurden alle verbliebenen Mäuse getötet um Blut- und Organuntersuchungen durchführen zu können. Der CUR-Gehalt der Organe und Plasmaproben wurde durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Frank der Universität Hohenheim bestimmt.

Die Mäuse wurden gewogen, gefüttert und getötet. Um eine Blutkonzentrationskurve zu erhalten, wurde dies, je nach Versuchsreihe, 2 h, 3 h oder 5 h nach der letzten MicC-Gabe vollzogen. Im direkten Anschluss folgte die Sektion der Maus. Die Niere wurde abgeschnitten und das gesamte Blut mittels 1 ml-Spritze (Injekt®-F, Tuberkulin, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) aus dem Bauchraum entnommen und in ein EDTA enthaltendes Röhrchen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) überführt. Der Situs, die Leber, Tumoren und Metastasen wurden makroskopisch betrachtet und mit der Kamera (Canon Eos 550D, Canon Deutschland GmbH, Krefeld) fotografiert. Die Tumoren wurden gezählt und vermessen. Mittels Blaulichtkanal ( $\lambda = 480 \text{ nm}$ ) des Laparoscops wurde versucht die makroskopische CUR-Verteilung in den Organen zu fotografieren und zu beurteilen, da bei Anregung mit dieser Wellenlänge CUR fluoresziert. Gewebeproben der Niere, der Leber, des Tumors, der Lunge, des Herzens und des Gehirns wurden für Prof. Dr. Frank in Kryo-Röhrchen überführt und auf Trockeneis schockgefroren. Außerdem wurden Tumor- und Leberproben für die Paraffin-Einbettung entnommen. Das Blut wurde mit der kleinen Zentrifuge zentrifugiert, ein Teil des Plasmas für die AFP-Bestimmung genutzt und der restliche Teil eingefroren.

Aus Mäusen entnommenes Gewebe für Schnitte und Färbungen wurde, eingeschlossen in Einbettkassetten (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen), in 4,7 % Paraformaldehyd eingelegt und nach 24 h Inkubation, von der Pathologie, in Paraffin eingebettet. Das Einbetten erfolgte mit einem Automat, der zuvor, mittels aufsteigender Alkoholreihe, dem Gewebe das Wasser entzieht. Die Paraffin-Blöcke wurden bei RT gelagert.

Gewebe, das für Herrn Prof. Dr. Frank in Hohenheim bestimmt war, wurde in Kryo-Röhrchen in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bis zu Verwendung bei

-80°C verwahrt. Der Transport nach Hohenheim erfolgte auf Trockeneis in Styroporbehältern.

### **Statistische Auswertung:**

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS (Version 22.0), für die Abbildungen 26 und 31 mit GraphPad (Version 4.0). Zum Erhalt einer Normalverteilung wurden die Daten mit log<sub>10</sub> logarithmiert. Normalverteilte Daten wurden als Mittelwerte mit dem 95 % Konfidenzintervall (KI) dargestellt. Die Überprüfung von signifikanten Unterschieden wurde mittels Varianzanalyse (Einfaktorielle ANOVA) vollzogen. Im positiven Fall erfolgte der Vergleich einzelner Gruppen mit dem Post-hoc-Test (Bonferroni). Eine statistische Signifikanz wurde ab p-Werten von 0,05 oder kleiner erachtet.

**Histologische Schnitte und Färbungen:** Zum Schneiden der Paraffinblöcke wurde das eingebettete Gewebe, für eine bessere Schnittfestigkeit, am Tag vor dem Schneiden, in den -20°C-Gefrierschrank gelegt. Die Paraffinkassette wurde in die Schneidemaschine (RM 2155, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch) eingespannt, der Schneidewinkel auf 5° eingestellt. Die Schnittdicke betrug 4 µm. Mittels Pinsel wurden die Schnitte in ein lauwarmes Wasserbad überführt. Mit einem beschrifteten Objektträger wurden hieraus bis zu drei Schnitte aufgenommen, in einem 42°C warmen Wasserbecken (HI 1210, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch), durch Eintauchen, geglättet und auf einer Wärmeplatte (1220, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch) bei 45°C getrocknet.

Um eine Übersicht über das geschnittene Gewebe zu erhalten, bietet sich die Hämatoxylin/Eosin (H.E.)-Färbung an. Dazu wird es rehydratisiert mit einer absteigenden Alkohol-Reihe, dann gefärbt und schließlich mit einer aufsteigenden Alkohol-Reihe wieder entwässert. Die Schnitte wurden, in folgender Reihenfolge und jeweils für drei Minuten, zweimal in Roti-Histol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe), einmal in Rotihistol/ 99 % Ethanol 1:1 (Ethanol absolut, Merck KGaA, Darmstadt), zweimal in 99 % Ethanol, einmal in 96% Ethanol, einmal in 70% Ethanol und einmal in destilliertes Wasser getaucht. Im Anschluss wurden sie für 1 min in Mayers Hämalaun-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt) und 5-10 min zum Bläuen unter laufendes Leitungswasser gestellt. Für die Rotfärbung wurden die Schnitte fünfmal kurz

in Eosin (CERTISAIN®, Merck KGaA, Darmstadt) eingetaucht. Für jeweils drei Minuten wurden sie in 70% und 96% Ethanol, zweimal in 99% Ethanol und zweimal in Roti-Histol überführt. Anschließend wurden die Schnitte unter einem Deckglas in Pertex® (Medite GmbH, Burgdorf) eingebettet unter dem Abzug ausdampfen gelassen. Für den Nachweis und Beurteilung von intrazellulärem  $\beta$ -Catenin in den erstellten Paraffinschnitten der Mäuseorgane bot sich, im Gegensatz zu 2.2, eine nicht-fluoreszenzbasierte  $\beta$ -Catenin-Färbung an. Hierfür wurden die Schnitte rehydratisiert mit einer absteigenden Alkoholreihe, wie für die H.E.-Färbung beschrieben, und in Citratpuffer (pH = 6,0) auf 90°C erhitzt um sie zu demaskieren. Der Citratpuffer wurde kurz vor Verwendung aus destilliertem Wasser und zwei verschiedenen Ansätzen hergestellt (2 % Ansatz A: 21 g/L Zitronensäure Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt) mit HCl (5 M, Merck KGaA, Darmstadt) auf pH = 6 eingestellt; 8 % Ansatz B: 29,4 g/L Natriumcitrat Dihydrat (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim) mit Natriumlauge (5 M, Merck KGaA, Darmstadt) auf pH = 6 eingestellt). Anschließend wurde die endogene Peroxidase mit Wasserstoffperoxid 3 % (30 %, Merck KGaA, Darmstadt, Verdünnung 1:10) für 10 min geblockt. Nach je einem fünfminütigen Waschgang mit destilliertem Wasser und PBS/T (PBS + 0,1 % Tween 20) erfolgte eine 45-minütige Inkubation mit Goat-Serum 3 % zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Der Erstantikörper (Rabbit catenin (beta) concentrate, Zytomed Systems GmbH, Berlin) wurde in einer Verdünnung von 1:200 mit PBS/T für 20 min auf die Präparate gegeben. Pro Schnitt wurde eine Negativkontrolle ohne Erstantikörper angelegt. Es folgten drei Waschgänge à 5 min mit PBS/T, eine 30-minütige Inkubation mit dem unverdünnten Sekundärantikörper (HRP One-Step polymer anti mouse/rabbit/rat, Zytomed Systems GmbH, Berlin) und abermals drei Waschgänge mit PBS/T. Anschließend wurde das Peroxidase Substrat Kit (DAB SK-4100, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA 94010, USA) vorbereitet. 2,5 ml destilliertes Wasser wurde mit einem Tropfen „Buffer Stock Solution“ und zwei Tropfen „DAB Stock Solution“ gemischt. Nach Aktivierung der Reaktion mit einem Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erfolgte die Zugabe auf die Präparate und eine 5 – 10-minütige Inkubation. Die Schnitte wurden in destilliertes Wasser überführt und mit Mayers Hämalaun blau gegengefärbt. Anschließend wurden, wie für die H.E.-Färbung geschildert, die Objektträger zum Bläuen unter fließendes Leitungswasser gestellt, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe

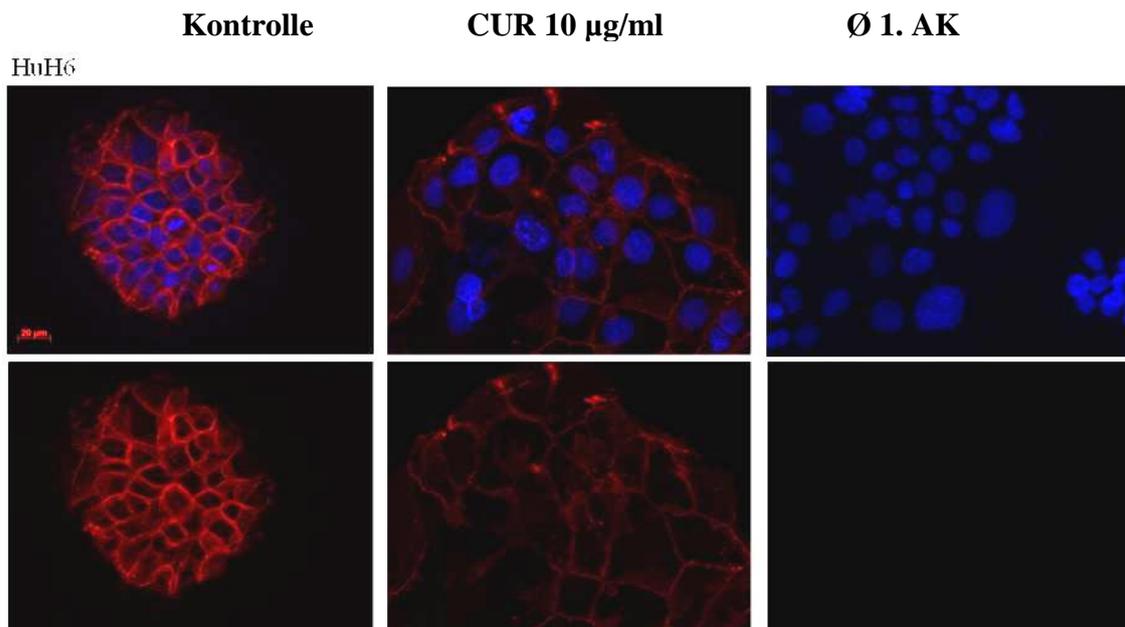
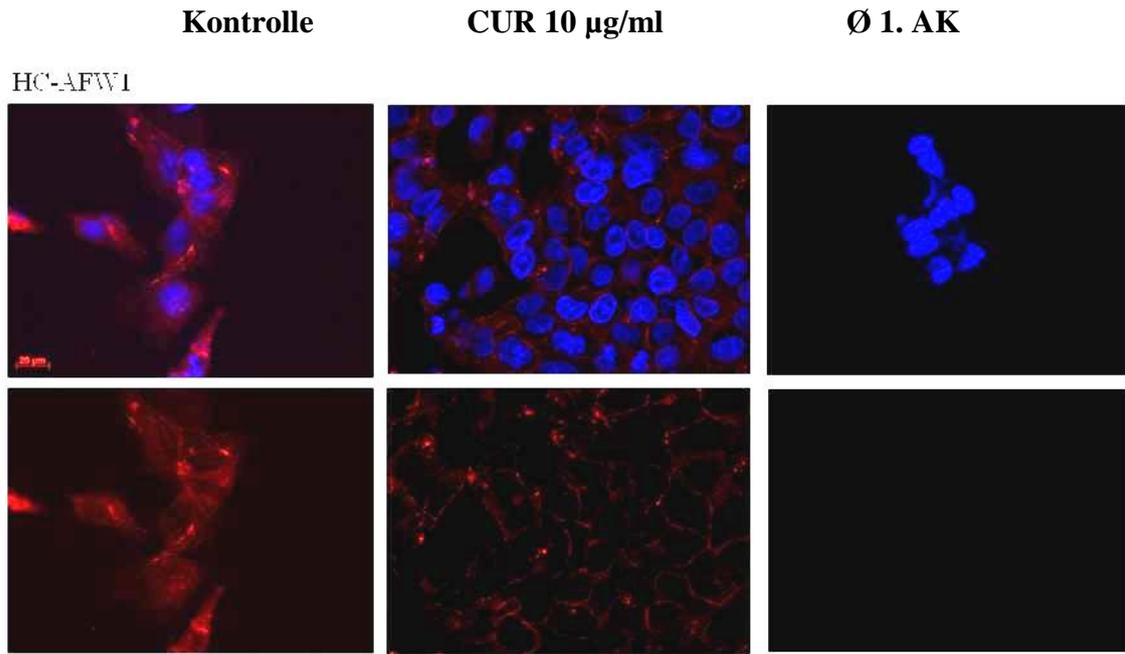
dehydratisiert und in Pertex eingebettet. Die Färbungen wurden mit dem Lichtmikroskop (Axiovert 135, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) betrachtet und mit dem Programm (Eos Utility, Canon Deutschland GmbH, Krefeld) aufgenommen.

### **3 Ergebnisse**

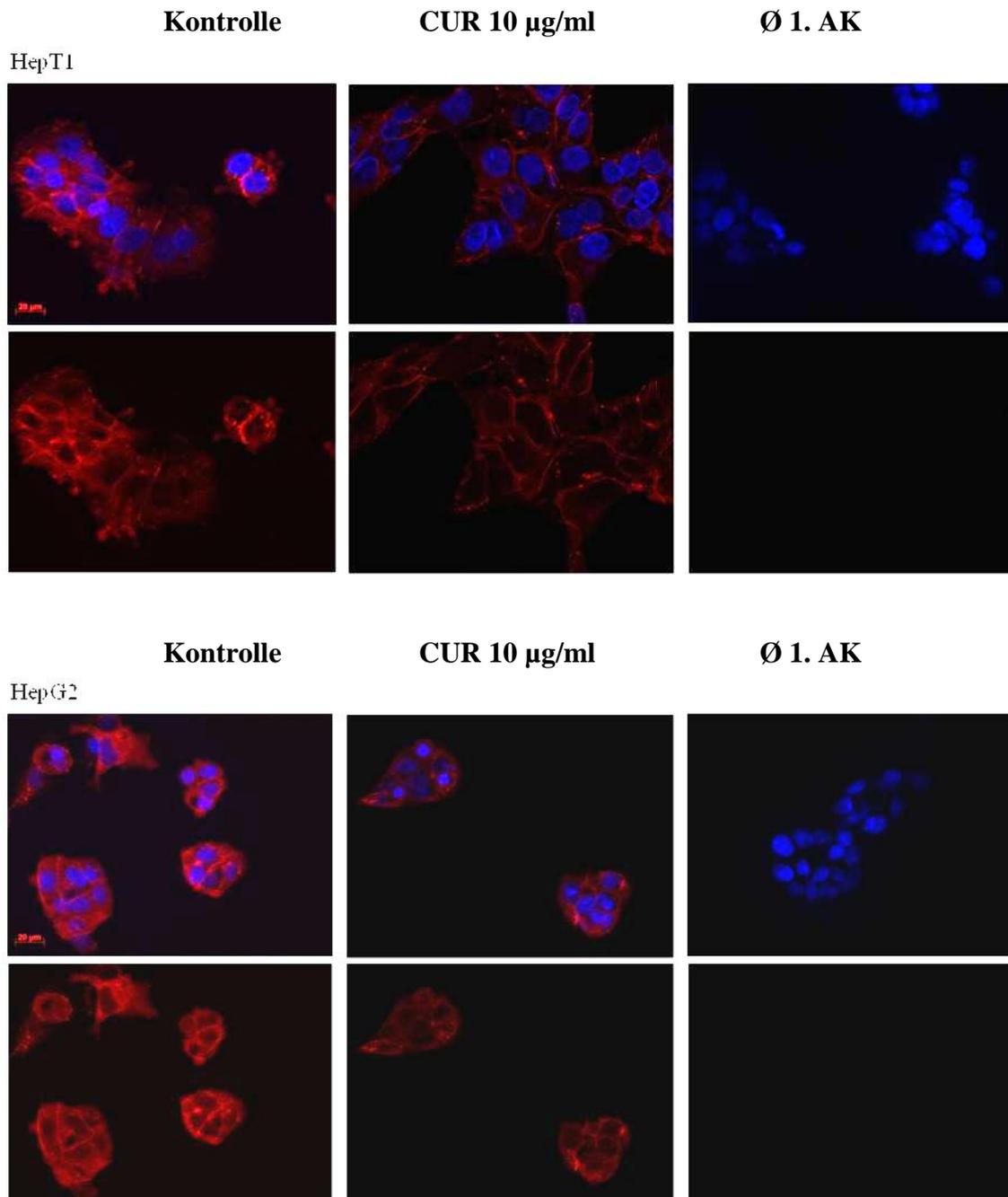
Große Teile der Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht. Die entsprechenden Paragraphen sind mit Quellenangaben gekennzeichnet.

#### ***3.1 Wirkung von CUR auf die differenzielle subzelluläre Lokalisation von $\beta$ -Catenin in etablierten Hepatom-Zelllinien***

Wie in der Einleitung beschrieben und durch Marvin Xuejun Xu et al. für HCC-Zellen bewiesen, kann die Translokation von  $\beta$ -Catenin, ein wichtiges Protein im Zusammenhang mit der Hepatogenese, in die Zellmembran mit einer Abnahme der Proliferationsfähigkeit von Tumorzellen einhergehen. Zur Analyse des Wirkungsspektrums von CUR auf die Tumorgenese wurde daher in einem ersten Ansatz die Frage nach dem Einfluss von CUR auf die  $\beta$ -Catenin-Lokalisation untersucht. Hierzu wurden, wie in 2.2 beschrieben, adhärent wachsende pHCC- und HB-Zellen mit einer CUR-Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  über 24 h immunhistochemisch analysiert. Die Immunfluoreszenzanalyse der  $\beta$ -Catenin Expression am konfokalen Mikroskop zeigte in allen Zellkulturen eine meist homogene  $\beta$ -Catenin-Verteilung sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma, vor allem aber an Zell-Zell-Kontakten und in der Zellmembran. In allen vier Hepatom-Zelllinien verursachte die CUR-Behandlung eine Umverteilung zu vorwiegend membrangebundenem  $\beta$ -Catenin (s. Abbildung 5). Am stärksten war dieser Effekt für HC-AFW1 zu sehen. Behandelte HuH6-Kulturen erscheinen in der Abbildung größer als unbehandelte. Ein Zusammenhang zwischen Behandlungsschema und Zellgröße bestätigte sich in weiteren Aufnahmen von HuH6-Zellen nicht (nicht gezeigt). [108]



(Fortsetzung auf der nächsten Seite)



**Abbildung 5: Analyse der  $\beta$ -Catenin-Lokalisation unter CUR**

Die immunhistochemische Untersuchung von Hepatomzellen (HC-AFW1, HuH6, HepT1, HepG2) zeigte nach 24 h Inkubation mit CUR (10µg/ml) bei allen Zelllinien eine Umverteilung von vorher eher zytoplasma- und kernständigem zu membrangebundenem  $\beta$ -Catenin (40-fache Vergrößerung, DAPI,  $\beta$ -Catenin). [108]

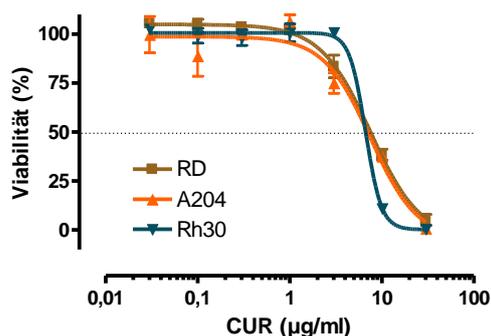
CUR kann in allen vier untersuchten Hepatomzelllinien die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin im Kern reduzieren. Dies könnte mit einer verringerten Aktivität als Transkriptionsfaktor und einem Viabilitätsverlust einhergehen.

## 3.2 Wirkung von CUR auf das Zellüberleben von verschiedenen Hepatom- bzw. RMS-Zelllinien

### 3.2.1 Subkonfluente und dichte Zellkulturen

Um zu prüfen, ob CUR zu einem Viabilitätsverlust führt, wurden subkonfluente Zellkulturen der RMS-Zelllinien RH30, RD und A204 sowie subkonfluente und dichte Zellkulturen der pHCC- und HB-Zellreihen HC-AFW1, HuH6, HepT1 und HepG2, wie unter 2.3 beschrieben, mit aufsteigenden CUR- und MicC-Konzentrationen inkubiert.

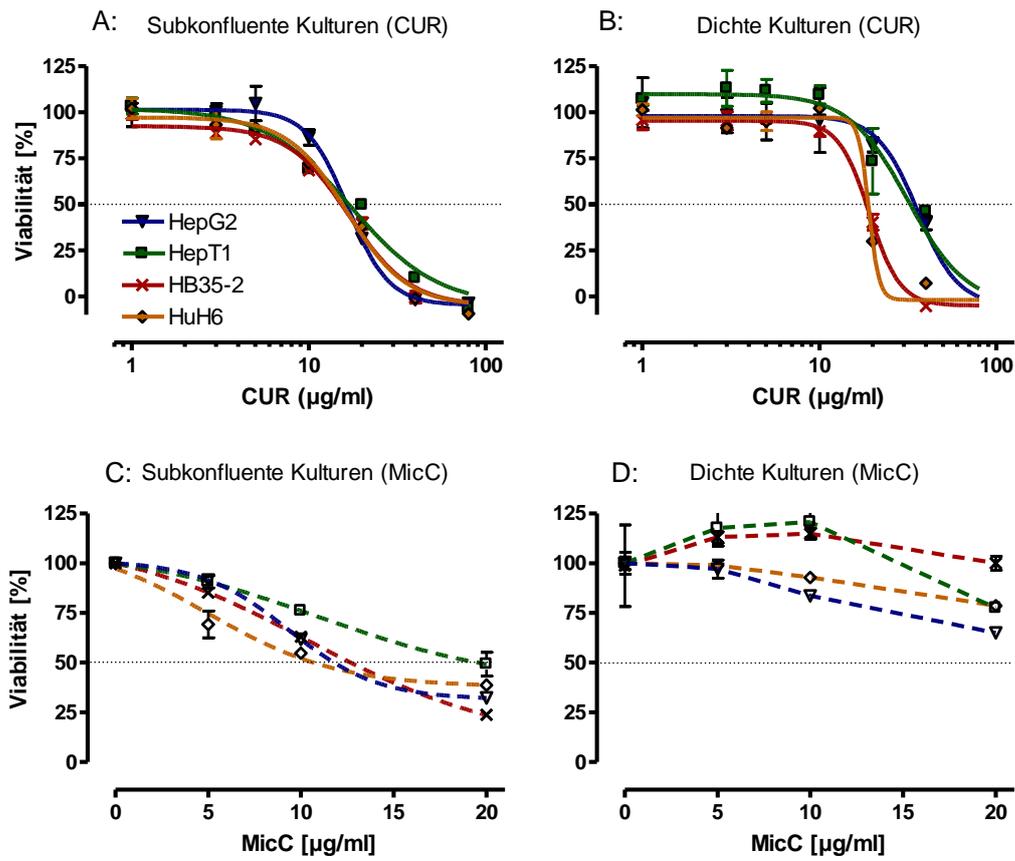
Die Evaluierung der Viabilität der RMS-Zellen mittels MTT-Assay ergab eine starke Reduktion der Viabilität für steigende CUR-Konzentrationen (s. Abbildung 6). Sie reagierten mit einem Viabilitätsabfall bereits ab einer CUR-Konzentration von 1 µg/ml. Die IC<sub>50</sub>-Werte aus den errechneten sigmoidalen Regressionskurven lagen bei 6,6, 7,1 und 7,4 µg/ml (RH30, A204, RD).



**Abbildung 6: Viabilitätsabnahme durch CUR in RMS-Zellkulturen**

Sigmoidale Regressionskurven der Mittelwerte und Standardabweichungen des Viabilitätsassays von den RMS-Zelllinien RD, A204 und RH30 nach 48-stündiger CUR-Inkubation wiesen eine signifikante Reduktion des Anteils der vitalen Zellen unter niedrigen CUR-Konzentrationen auf. Die IC<sub>50</sub> lag um 7 µg/ml CUR.

Die Viabilitätsassays für die Hepatomkulturen wiesen eine Viabilitätsreduktion sowohl unter steigenden CUR- als auch MicC-Konzentrationen auf (s. Abbildung 7). Für die CUR-Behandlung war der Viabilitätsabfall in subkonfluenten Zellkulturen ab 5 µg/ml und in dichten ab 10 µg/ml CUR zu sehen. Die IC<sub>50</sub>-Werte in subkonfluenten Kulturen betragen 15,5 (HC-AFW1 und HuH6), 16,2 (HepG2) und 17,0 µg/ml (HepT1, s. Abbildung 7A). Dichte Zellkulturen offenbarten IC<sub>50</sub>-Werte von 18,2, 19,1, 32,7 und 34,67 µg/ml (HC-AFW1, HuH6, HepT1, HepG2, s. Abbildung 7B). [108, 109]



**Abbildung 7: Zellviabilitätsabnahme durch CUR bzw. MicC in Hepatomzellkulturen**

Die Viabilität der Hepatomzellen HC-AFW1, HuH6, HepT1 und HepG2 wurde nach 48 h Inkubation mit CUR (A, B) und MicC (C, D) mittels MTT-Assay gemessen. Mit steigenden Konzentrationen fiel die relative Viabilität signifikant ab. Subkonfluente Zellkulturen (A, C) wiesen geringere IC<sub>50</sub>-Werte auf als dichte (B, D). Für MicC wurde in dichten Zellkulturen (D) keine IC<sub>50</sub> in den getesteten Konzentrationen erreicht. Für MicC beziehen sich die Konzentrationsangaben auf den Wirkstoff. [108, 109]

Die Viabilitätskurven und die IC<sub>50</sub>-Werte der dichten Zellkulturen waren, im Vergleich zu den subkonfluenten, zu höheren CUR-Konzentrationen verschoben. Die Empfindlichkeit gegenüber CUR war geringer als bei den getesteten RMS-Zellkulturen. Die IC<sub>50</sub> aus den berechneten Regressionskurven von mit MicC behandelten subkonfluenten Kulturen waren 10,7, 11,8, 12,7, und 19,5 µg/ml (HuH6, HepG2, HC-AFW1 und HepT1, s. Abbildung 7C). Bei den mit MicC behandelten dichten Kulturen konnten keine plausiblen Regressionskurven errechnet werden. Hier wurde unter den getesteten Konzentrationen keine IC<sub>50</sub> erreicht (s. Abbildung 7D).

Da die Mizellen des MicC in vivo an der intestinalen Schleimhaut zerschellen und ins Blut somit nur reines, mizellenfreies CUR gelangt, stellt die in vitro vorgenommene

direkte Applikation von MicC auf Zellen ein utopisches Szenario dar. Dennoch beweist die Viabilitätseinschränkung die zelluläre Aufnahme von CUR aus der mizellaren Lösung.

Bei Wiederholung der Versuche wurden niedrigere IC<sub>50</sub>-Werte erzielt, da trotz vorheriger Zellzahlbestimmung die Dichte der Zellkulturen zwischen den Versuchen variierte (vergl. IC<sub>50</sub> aus 3.2.3).

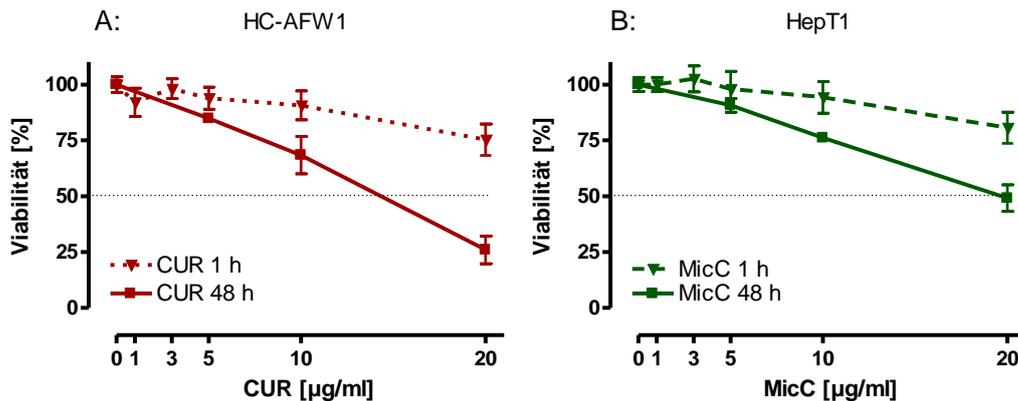
CUR führt zu deutlichen Viabilitätsverlusten von RMS-, pHCC- und HB-Zellen. MicC übt eine vergleichbare Wirkung auf Hepatomzellen aus und belegt somit die Fähigkeit der Zellen CUR aus der mizellaren Lösung heraus zu resorbieren. Das Ausmaß des viabilitätsreduzierenden Effekts ist von der Zelllinie und -dichte abhängig. RMS-Zellen offenbarten eine höhere Empfindlichkeit für CUR.

In vivo besitzt CUR eine merklich geringere Halbwertszeit als 48 h aufgrund der raschen Degradierung und des zügigen intestinalen bzw. hepatischen Abbaus. Es stellt sich also die Frage inwieweit eine kürzere Inkubationsdauer die Wirkung von CUR abschwächt.

### **3.2.2 Zellviabilität unter verkürzter Inkubationsdauer**

Im folgenden Versuch wurde die proliferationshemmende Wirkung von CUR und MicC unter kürzerer Inkubationszeit (1 h) untersucht. Die IC<sub>50</sub> wurde in subkonfluenten HC-AFW1- bzw. HepT1-Zellkulturen, wie unter 2.3 erklärt, nach 48 h ermittelt.

Unter einstündiger Inkubationszeit mit CUR bzw. MicC zeigte sich im MTT-Assay eine geringe Zellviabilitätsabnahme für beide Substanzen und beide Zelllinien im Vergleich zu einer dauerhaften Inkubation über 48 h (s. Abbildung 8, gestrichelte Linien). Bei einer Konzentration von 20 µg/ml betrug das Zellüberleben 75 %. Eine IC<sub>50</sub> wurde innerhalb der getesteten Konzentrationen nicht erreicht. Im Vergleich hierzu sanken nach 48-stündiger CUR-Inkubation die Viabilitätswerte auf 25 bzw. 48 % (HC-AFW1, HepT1, durchgezogene Linien). Die IC<sub>50</sub> lagen bei 14,3 und 19,7 µg/ml.



**Abbildung 8: Abgeschwächte Wirkung von CUR bzw. MicC unter kürzerer Inkubationsdauer**

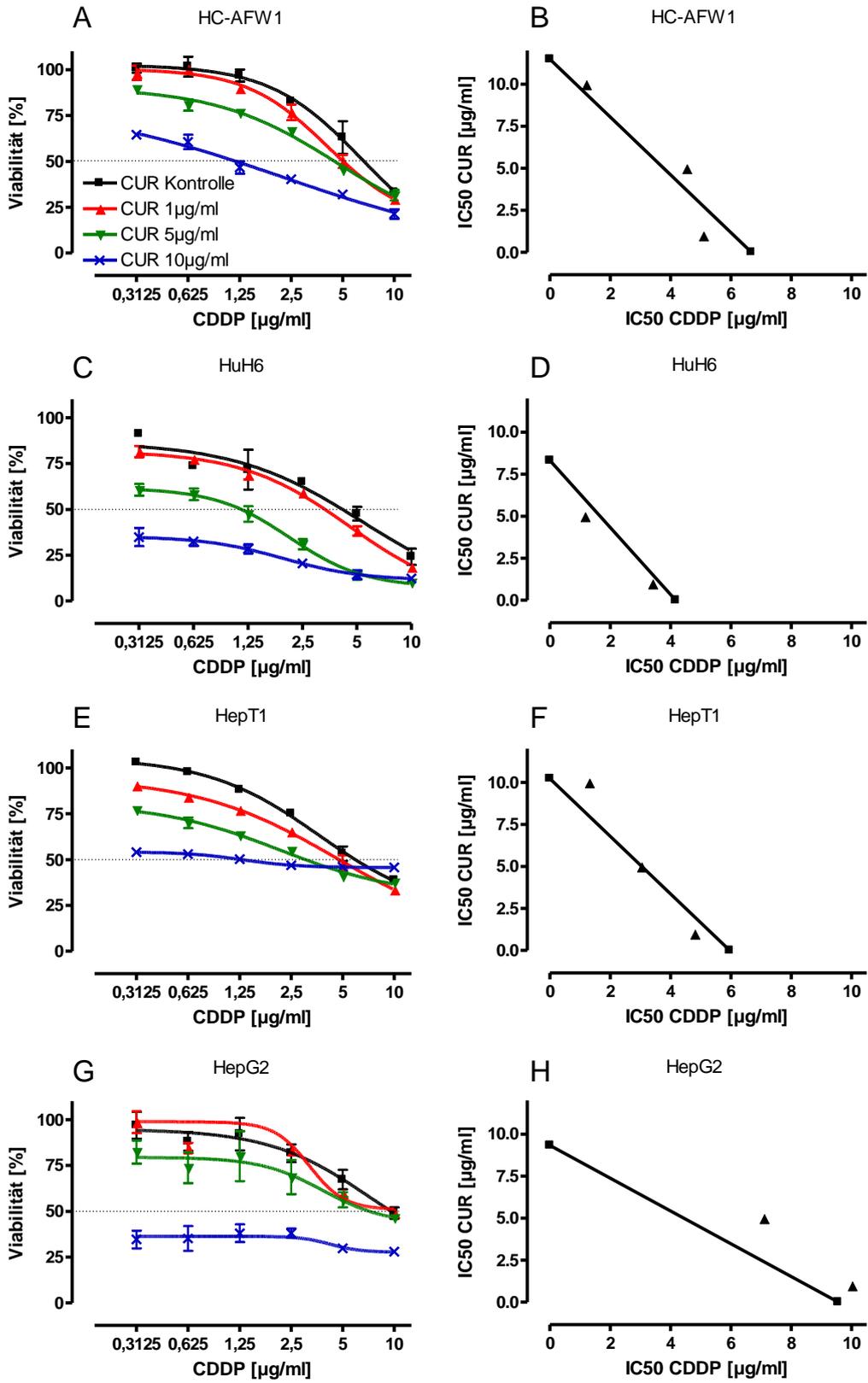
Die Zellviabilität von HC-AFW1- (A) und HepT1-Zellkulturen (B) wurde 48 h nach einer einstündigen Inkubation mit CUR bzw. MicC mittels MTT untersucht. Die Werte zeigten eine geringere Viabilitätsabnahme für beide Zelllinien im Vergleich zur 48-stündigen CUR-Inkubation. Eine IC<sub>50</sub> unter kürzerer Inkubationsdauer wurde innerhalb der getesteten Konzentrationen nicht erreicht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten.

Eine verkürzte, einstündige Inkubation sowohl mit CUR als auch mit MicC in HC-AFW1- und HepT1-Zellkulturen führt zu einem geringen Zellsterben. Für ähnliche Viabilitätseinbußen wie nach 48-stündiger CUR-Inkubation werden doppelt so hohe Konzentrationen benötigt. Somit stellt eine längere Exposition für die Wirkung von CUR und MicC einen wichtigen Faktor dar. Um die oben gezeigte Zellviabilitätsabnahme weiter zu verstärken, wird in den folgenden Versuchen die Kombination von CUR mit Zytostatika und PDT geprüft.

### 3.2.3 Kombination von CUR und CDDP

CUR kann die Wirkung von etablierten Chemotherapeutika potenzieren, wie Rocks et al. 2012 beispielsweise für Lungentumoren nachwies. In der pädiatrischen Onkologie ist CDDP das Standard-Therapeutikum für nicht operable Hochrisiko-HB. Im Folgenden wurden für die vier Hepatomzelllinien, wie in 2.3 beschrieben, die IC<sub>50</sub> von Kombinationsbehandlungen mit CDDP und CUR näher betrachtet.

Die HB-Zelllinie HuH6 zeigte im MTT-Assay nach 48 h einen deutlichen Viabilitätsverlust, sowohl durch CUR als auch durch CDDP (s. Abbildung 9C). Die IC<sub>50</sub> von CUR lag bei 8,3  $\mu\text{g/ml}$ , die von CDDP bei 4,2  $\mu\text{g/ml}$ . Die Kombinationsbehandlung mit CUR und CDDP führte zu einer Verschiebung der IC<sub>50</sub>



(Beschriftung zu Abbildung 9 folgt auf der nächsten Seite)

### Abbildung 9: Wirkung der Kombination von CUR mit CDDP in Hepatomzellkulturen

PHCC- (A) und HB-Zellkulturen (C, E, G) wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von CDDP und CUR behandelt. Im MTT- Assay nach 48 h zeigten Mittelwerte und Standardabweichungen der Kombinationsbehandlung einen deutlich stärkeren Viabilitätsabfall als die CDDP-Monotherapie. Die Verteilung der einzelnen IC50-Werte im Isobologramm nahe der Geraden wies auf eine additive Wirkung beider Substanzen hin (B, D, F, H). [108]

zu niedrigeren CDDP-Konzentrationen. Die Viabilitätswerte unter der höchsten getesteten CDDP-Dosis fielen von 28 % in monobehandelten Kulturen auf 10 % unter Kombinationstherapie mit CUR ( $C_{CUR} = 10 \mu\text{g/ml}$ ). Unter Verwendung einer CUR-Dosis von  $1 \mu\text{g/ml}$  wies CDDP eine IC50 von  $3,4 \mu\text{g/ml}$  auf. Unter Kombination mit  $10 \mu\text{g/ml}$  CUR lag die IC50 von CDDP unterhalb der niedrigsten getesteten CDDP-Konzentration von  $0,3 \mu\text{g/ml}$ . Die anderen Hepatomzelllinien verhielten sich ähnlich (A, E, G). Alle IC50-Werte sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Verteilung der IC50-Werte der einzelnen Zelllinien im Isobologramm nahe der Geraden, wies auf eine additive Wirkung von CUR und CDDP in allen getesteten Zellkulturen hin (B, D, F, H). [108]

CUR [ $\mu\text{g/ml}$ ]	HC-AFW1	HuH6	HepT1	HepG2
0	6,68	4,17	5,96	9,55
1	5,07	3,39	4,79	> 10
5	4,52	1,15	3,02	7,08
10	1,19	< 1	1,29	< 1
<b>IC50 von CUR</b>	11,48	8,32	10,23	9,33

**Tabelle 3: IC50-Werte von CDDP und CUR von Hepatomzellkulturen**

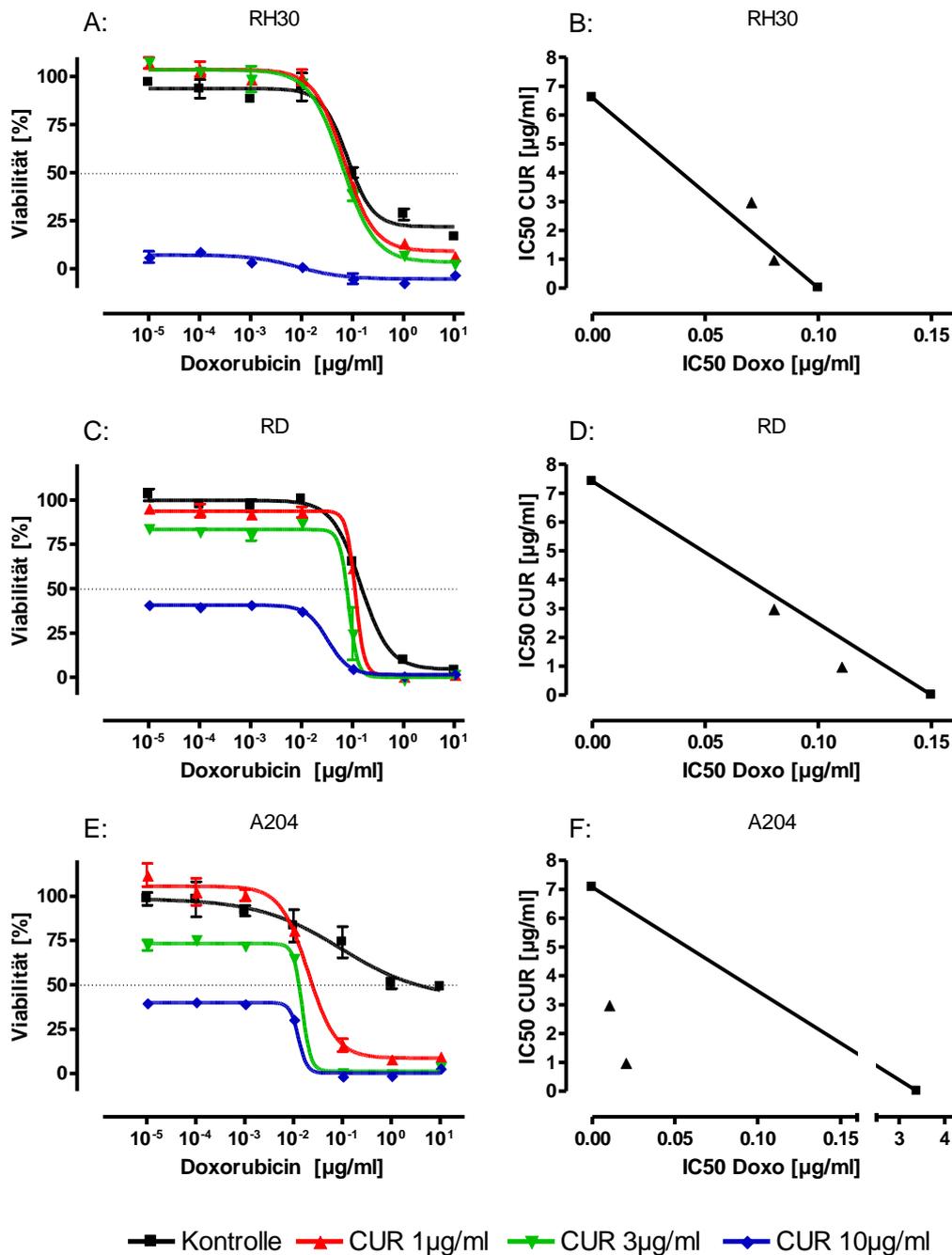
Zu sehen sind die IC50-Werte ( $\mu\text{g/ml}$ ) von CDDP für die einzelnen Hepatom-Zelllinien in Abhängigkeit von den applizierten CUR-Konzentrationen (0, 1, 5,  $10 \mu\text{g/ml}$ ). Aufgrund der hohen Varianz der IC50-Werte zwischen den Versuchen sind, zur besseren Vergleichbarkeit und Einordnung des Effektausmaßes der Kombinationstherapie, in der letzten Zeile die IC50-Werte der reinen CUR-Behandlung dieser Versuchsreihe dargestellt.

Die IC50 von CDDP bei allen vier Hepatom-Zelllinien kann mit einer Kombinationstherapie von CUR und CDDP deutlich gesenkt werden. Es besteht eine additive Wirkung beider Substanzen. Aufgrund des positiven Ergebnisses in Hepatom-Kulturen wurde die Kombination von CUR mit Zytostatika auch für RMS-Zellen untersucht.

### 3.2.4 Kombination von CUR und Doxorubicin

Anders als für Hepatome ist das Standardtherapeutikum für inoperable RMS Doxorubicin. RMS-Zellkulturen wurden, wie in 2.3 aufgezeigt, mit aufsteigenden CUR- und Doxorubicin-Konzentrationen inkubiert. IC<sub>50</sub>- und Hillslope-Werte wurden analysiert.

Der MTT-Assay nach 48 h zeigte für RH30 einen Viabilitätsverlust sowohl für CUR als auch für Doxorubicin (s. Abbildung 10A). Die IC<sub>50</sub> von CUR betrug 6,6 µg/ml, die von Doxorubicin 0,1 µg/ml. RD und A204 bekundeten ähnliche Ergebnisse (C, E). Alle IC<sub>50</sub>-Werte sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die Isobologramme stellten für RH30 und RD eine additive (B, D) und für A204 eine synergistische, überadditive Wirkung (F) beider Substanzen für die Konzentrationen 1 und 3 µg/ml dar. Die höchste CUR-Dosis ist hier nicht vertreten, da bereits die IC<sub>50</sub> der CUR-Monobehandlung bei unter 10 µg/ml lag.



**Abbildung 10: Analyse der Kombinationsbehandlung von RMS-Zellen mit CUR und Doxorubicin**

RMS-Zelllinien RH30, RD und A204 wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von Doxorubicin und CUR behandelt. Im MTT- Assay nach 48 h zeigten Mittelwerte und Standardabweichungen der Kombinationsbehandlung einen deutlich stärkeren Viabilitätsabfall als die Doxorubicin-Monotherapie (A, C, E). Die Verteilung der IC50-Werte im Isoblogramm in der Nähe der Geraden (B, D) bzw. darunter (F) wies auf eine additive bzw. synergistische Wirkung der Substanzen hin.

CUR [ $\mu\text{g/ml}$ ]	RH30	RD	A204
0	0,1	0,15	3,39
1	0,08	0,11	0,02
3	0,07	0,08	0,01
10	$< 10^{-5}$	$< 10^{-5}$	$< 10^{-5}$
IC50 von CUR	6,61	7,41	7,08

**Tabelle 4: IC50-Werte von Doxorubicin und CUR in RMS-Zellkulturen**

Zu sehen sind die IC50-Werte [ $\mu\text{g/ml}$ ] für die einzelnen RMS-Zelllinien von Doxorubicin in Abhängigkeit von den applizierten CUR-Konzentrationen (0, 1, 3, 10  $\mu\text{g/ml}$ ). In der letzten Zeile sind die IC50-Werte der reinen CUR-Behandlung dieser Versuchsreihe dargestellt.

Die Kombinationsbehandlung offenbarte sich in RD- und A204-Kulturen auch durch höhere negative Hillslope-Werte (Steigung im Wendepunkt) als die Monobehandlung. Dies bedeutet, dass für einen definierten Viabilitätsverlust unter CUR-Gabe weniger Zytostatikum hinzugegeben werden muss als unter Doxorubicin-Monobehandlung. Die Hillslope-Werte unter Doxorubicin-Monobehandlung betragen -1,6 bzw. -0,5  $\mu\text{g/ml}$  (RD bzw. A204) und fielen unter zusätzlicher CUR-Applikation auf bis -5,0  $\mu\text{g/ml}$  (s. Tabelle 5).

Zelllinie\ Hillslope	0 $\mu\text{g/ml}$ CUR	1 $\mu\text{g/ml}$ CUR	3 $\mu\text{g/ml}$ CUR	10 $\mu\text{g/ml}$ CUR
RH30	-1,75	-1,47	-1,35	-0,96
RD	-1,55	-4,96	-4,93	-2,07
A204	-0,51	-1,52	-4,99	-5,01

**Tabelle 5: Hillslope-Werte unter Kombinationsbehandlung in RMS-Zellkulturen**

Aufgelistet sind die Hillslope-Werte (Steigung im Wendepunkt) der Kombinationsbehandlungen in den einzelnen RMS-Zelllinien in Abhängigkeit von der angewandten CUR-Konzentration. Die stärkere Viabilitätsabnahme unter CUR-Zugabe in RD- und A204-Zellkulturen spiegelt sich in einer deutlichen Reduktion der Hillslope-Werte wider. RH30 weist keine Abnahme der Hillslope-Werte vor.

Die Kombinationsbehandlung von Doxorubicin und CUR verursacht eine deutliche Verringerung der IC50 von Doxorubicin, die mit einer stärkeren Viabilitätsabnahme einhergeht. Für RH30 und RD zeigt sich eine additive, für A204 eine synergistische, Wirkung beider Substanzen.

### 3.3 Wirkung einer PDT mit CUR auf Hepatomzellen

#### 3.3.1 Zellviabilität nach Inkubation mit CUR und Anregung mit blauem Licht

Wie, unter anderen, Dahl (1994) für murine leukämische Zellen publizierte, kann CUR auch als Photosensitizer in eine PDT eingebunden werden. Um dies für Hepatom-Zellen zu prüfen, wurden, wie in 2.3 beschrieben, die IC<sub>50</sub> von CUR in subkonfluenten und dichten HC-AFW1-, HuH6-, HepT1- und HepG2-Zellkulturen nach 1,5 h Inkubation mit CUR und Exposition zu blauem Licht ( $\lambda = 480 \text{ nm}$ ) bestimmt.

Belichtete subkonfluenten HC-AFW1-Kulturen zeigten im Viabilitätsassay eine IC<sub>50</sub> von 0,7  $\mu\text{g/ml}$ , belichtete dichte Kulturen eine IC<sub>50</sub> von 2,1  $\mu\text{g/ml}$  CUR (s. Abbildung 11A). Die anderen Hepatomzelllinien wiesen ähnliche Ergebnisse vor (B, C, D). [109]

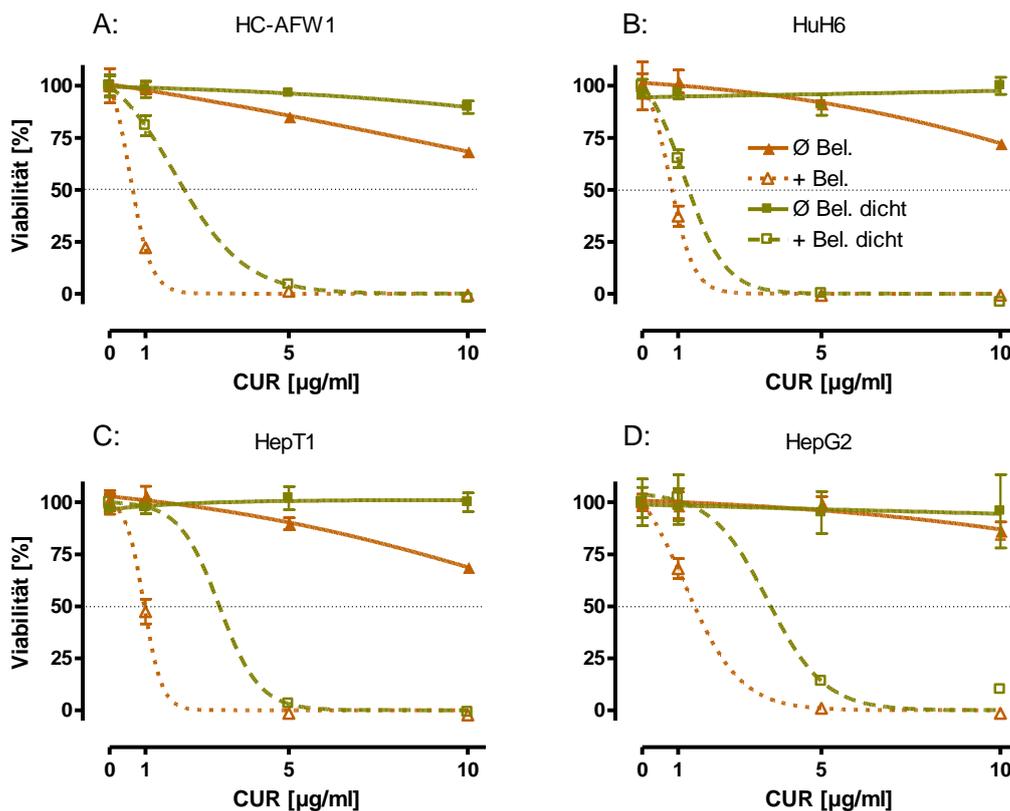


Abbildung 11: Verstärkte Viabilitätsabnahme durch PDT

Subkonfluenten und dichte Hepatom-Zellkulturen wurden nach 1,5-stündiger Inkubation mit CUR blauem Licht ausgesetzt und 48 h danach einem MTT-Assay unterzogen. Mittelwerte und Standardabweichungen der Regressionskurven ergaben bei allen mit PDT behandelten Kulturen eine deutlich stärkere Viabilitätsabnahme. Die IC<sub>50</sub> reduzierte sich um das 15- bis 26-fache in subkonfluenten und um das 9- bis 14-fache in dichten Zellkulturen. [109]

Die IC50 von CUR in unbelichteten subkonfluenten (17,0 µg/ml) und dichten Kontrollkulturen (19,2 µg/ml) wurde damit deutlich unterschritten. Ohne PDT erzielte CUR in subkonfluenten HC-AFW1-Kulturen eine 26-fach, in dichten eine 9-fach höhere IC50 als mit PDT. Die Viabilitätskurve der belichteten dichten Zellkulturen war im Vergleich zu den subkonfluenten zu höheren CUR-Konzentrationen verschoben. Die IC50 war um das Dreifache größer. Gleichsam war dies für die anderen Zelllinien zu sehen (s. Tabelle 6).

	Zellkultur	HC-AFW1	HuH6	HepT1	HepG2
<b>∅ Bel. (IC50)</b>	<b>normal</b>	16,95	16,43	17,37	16,64
	<b>dicht</b>	19,16	17,77	31,50	35,86
<b>+ Bel. (IC50)</b>	<b>normal</b>	0,65	0,78	0,97	1,14
	<b>dicht</b>	2,10	1,30	3,04	3,58
<b>Verhältnis ∅Bel/+Bel.</b>	<b>normal</b>	26,08	21,06	17,91	14,60
	<b>dicht</b>	9,12	13,67	10,36	10,02
<b>Verhältnis +Bel normal/dicht</b>		2,86	1,54	1,73	1,46

**Tabelle 6: Vergleich der IC50 von Hepatomzellkulturen mit und ohne Belichtung**

Gezeigt sind die IC50-Werte (µg/ml) von subkonfluenten und dichten Hepatomzellen mit und ohne PDT unter CUR-Behandlung. Zusätzlich wurde das Verhältnis der IC50-Werte von unbelichteten zu belichteten subkonfluenten bzw. dichten Zellkulturen, sowie das Verhältnis von belichteten subkonfluenten zu belichteten dichten Zellkulturen errechnet.

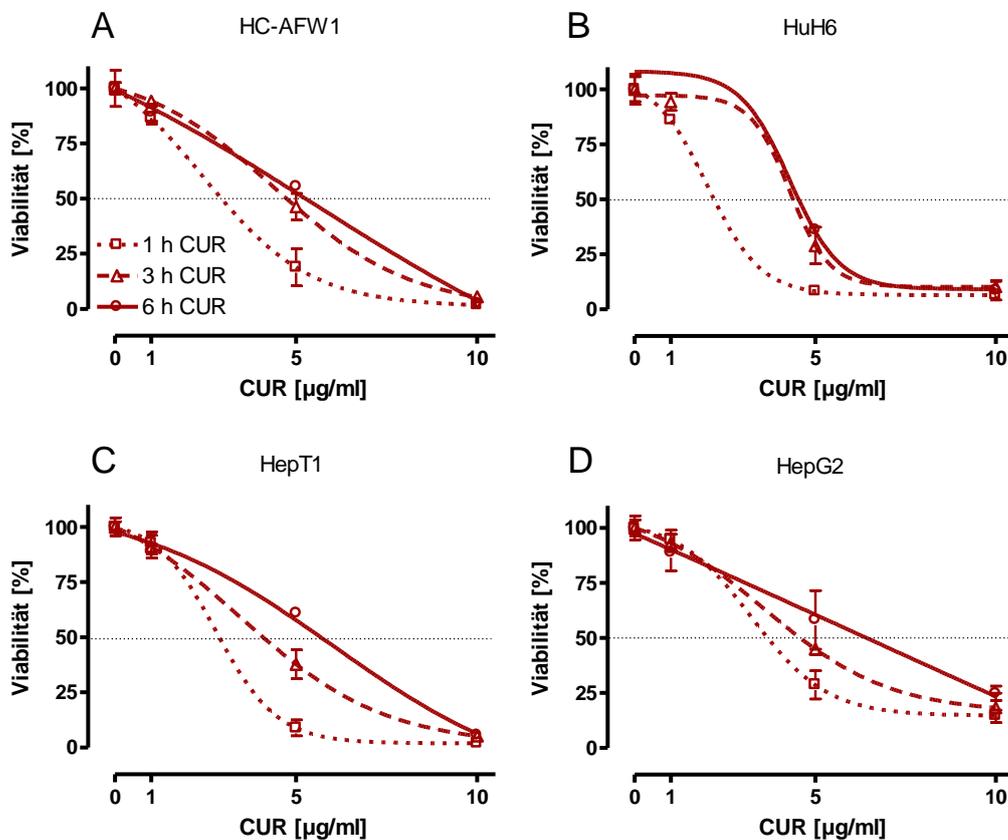
Für alle getesteten Kulturen waren die Viabilitätsabnahmen durch die PDT signifikant (IC50, Two-way ANOVA,  $p < 0,0001$ ). Für die getesteten CUR-Konzentrationen ohne PDT war in den Zellkulturen ein Viabilitätsverlust von maximal 25 % zu verzeichnen.

Die CUR-Wirkung unter PDT ist sichtbar erhöht und führt nicht nur in subkonfluenten sondern auch in dichten Zellkulturen zu stärkeren, signifikanten Viabilitätsverlusten in niedrigen micromolaren Konzentrationen von CUR. Eine interessante Fragestellung hierbei ist, ob die Inkubationsdauer mit CUR vor der Belichtung Auswirkungen auf die Effektivität der PDT besitzt.

### 3.3.2 Optimaler Zeitpunkt der PDT

Um der Frage nach einer optimalen Inkubationszeit mit CUR vor Belichtung der Zellen im Hinblick auf die Viabilität nachzugehen, wurden pHCC- und HB-Kulturen unterschiedlich lange (1, 3, 6 h) mit verschiedenen CUR-Konzentrationen inkubiert und anschließend belichtet (s. 2.3). Die IC<sub>50</sub> wurden verglichen.

Der MTT-Assay nach 20 h zeigte für die Zelllinie HC-AFW1 für alle Inkubationszeiten einen kompletten Viabilitätsverlust bei der höchsten verwendeten CUR-Konzentration (s. Abbildung 12A). Für geringere Konzentrationen waren signifikante Unterschiede zu verzeichnen (F-Test,  $p < 0,05$ ). [109]



**Abbildung 12: Zeitpunkt der Belichtung nach Inkubation mit CUR**

Mit CUR behandelte pHCC- und HB-Zellen wurden nach 1, 3 oder 6 h gewaschen und belichtet. Die ermittelten Regressionskurven des MTT-Assays nach 24 h zeigten einen signifikanten Einfluss (F-Test,  $p < 0,05$ ) der Inkubationsdauer vor PDT auf die vitale Zellzahl. Eine kurze CUR-Inkubation von 1 h erzielte die größten Viabilitätsverluste bei allen getesteten Zellreihen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. [109]

Bei belichteten HC-AFW1-Kulturen nach einstündiger CUR-Inkubation lag die berechnete IC<sub>50</sub> bei 2,9 µg/ml. Bei einer CUR-Konzentration von 5 µg/ml sank die

Viabilität auf unter 25 %. Wurde die PDT nach 6 h CUR-Inkubation durchgeführt, erhöhte sich die IC50 auf 5,5 µg/ml. Nach 3 h CUR-Inkubation betrug sie 4,8 µg/ml. HuH6, HepT1 und HepG2 offenbarten ähnliche Resultate (s. Abbildung 12B-D und Tabelle 7).

Zeit	HC-AFW1	HuH6	HepT1	HepG2
1 h	2,93	2,20	2,89	3,70
3 h	4,75	3,78	4,09	4,58
6 h	5,5	4,36	6,03	6,04

**Tabelle 7: IC50 in Abhängigkeit der CUR-Inkubationszeit vor Belichtung**

Aufgezeigt sind die aus den sigmoidalen Regressionskurven entnommenen IC50-Werte (µg/ml) für die einzelnen Hepatomzelllinien in Abhängigkeit zur CUR-Inkubationszeit vor Belichtung der Zellkulturen.

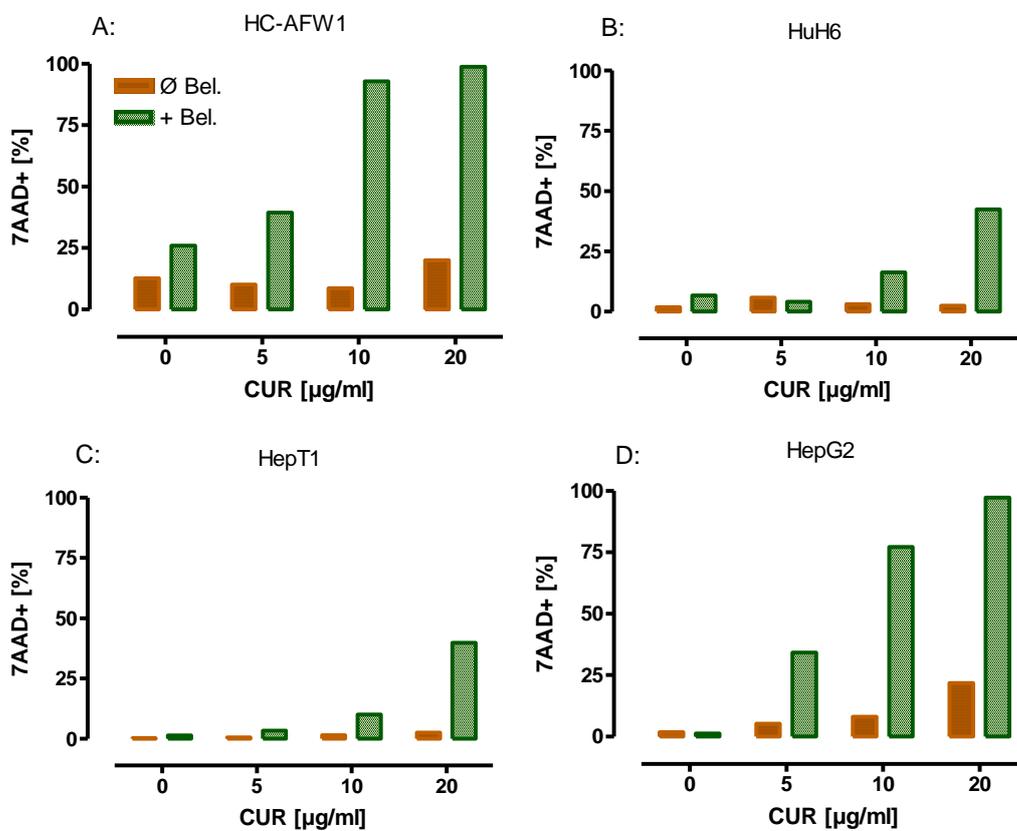
Die Inkubationsdauer mit CUR vor Belichtung der Zellen zeigt einen signifikanten Einfluss auf die Effektivität der PDT mit CUR hinsichtlich der vitalen Zellzahl. Eine zeitnahe Belichtung erzielt die größten Viabilitätsverluste bei allen getesteten Zelllinien. Die kürzeren Inkubationszeiten und das stärkere Zellsterben unter PDT weisen auf einen Unterschied der Wirkmechanismen zwischen der CUR-Monotherapie und der PDT hin. Ein anderer Wirkmechanismus könnte mit einer, im Vergleich zur CUR-Wirkung, früheren, vorzeitigen Viabilitätsreduktion einhergehen.

### 3.3.3 Frühzeitige Störung der Zellintegrität durch PDT

Zur Messung der Zytotoxizität einer Substanz können neben der Analyse der lebenden Zellen (MTT-Assay) auch die sterbenden Zellen quantifiziert werden. Um zu untersuchen, ob die durch die PDT verursachte stärkere Viabilitätsabnahme auch zu einem frühzeitigeren Zellsterben führt, wurden mit CUR inkubierte pHCC- und HB-Zellkulturen, wie in 2.4 geschildert, 3 h nach Belichtung mit 7AAD versetzt. 7AAD dient als Marker für die Integrität des Membranpotenzials und erfasst Zellen in der frühen Phase des Zelltodes.

Die anschließende durchflusszytometrische Analyse ergab für mit PDT behandelten HC-AFW1 Kulturen ein stärkeres Fluoreszenzsignal von 7AAD als für unbelichtete (s. Abbildung 13A). Unbehandelte Kontrollen wiesen einen Anteil an 7AAD-positiven Zellen von 12,8 % der Gesamtpopulation auf. Unter CUR-Monobehandlung stieg der Prozentsatz leicht auf 20,0 % bei der höchsten verwendeten Konzentration ( $C_{CUR} = 20$  µg/ml) an. Eine reine Belichtung ohne CUR-Zugabe führte ebenfalls zu einem leichten

Anstieg des positiven Zellanteils auf 25,9 %, möglicherweise aufgrund der von der Lichtquelle emittierten Wärme. Dies äußerte sich auch über die nach 24 h gemessenen, verminderten Viabilitätswerte im nächsten Versuch (vergl. Abbildung 15). Unter PDT wuchs der Anteil positiver Zellen bei einer Konzentration von 5 µg/ml auf über 30 %. Bei der höchsten getesteten Konzentration betrug die relative Menge an 7AAD-positiven Zellen 98,7 %. Für alle weiteren getesteten Zelllinien zeigten sich ähnliche Ergebnisse (Abbildung 13B, C, D). Der Kontrollwert ohne Behandlung lag hier jedoch deutlich niedriger. [109]



**Abbildung 13: Frühzeitige Störung der Zellintegrität durch PDT**

Mit PDT behandelte Hepatom-Zelllinien (HC-AFW1, HuH6, HepT1, HepG2) wurden 3 h nach Belichtung mit dem Zellsterbemarkers 7AAD versetzt. Die durchflusszytometrische Analyse ergab für alle Zellkulturen unter PDT eine vorzeitige Störung der Zellintegrität. Ohne Belichtung vergrößerten sich die 7AAD positiven Populationen nach der gleichen Behandlungsdauer nur geringfügig. [109]

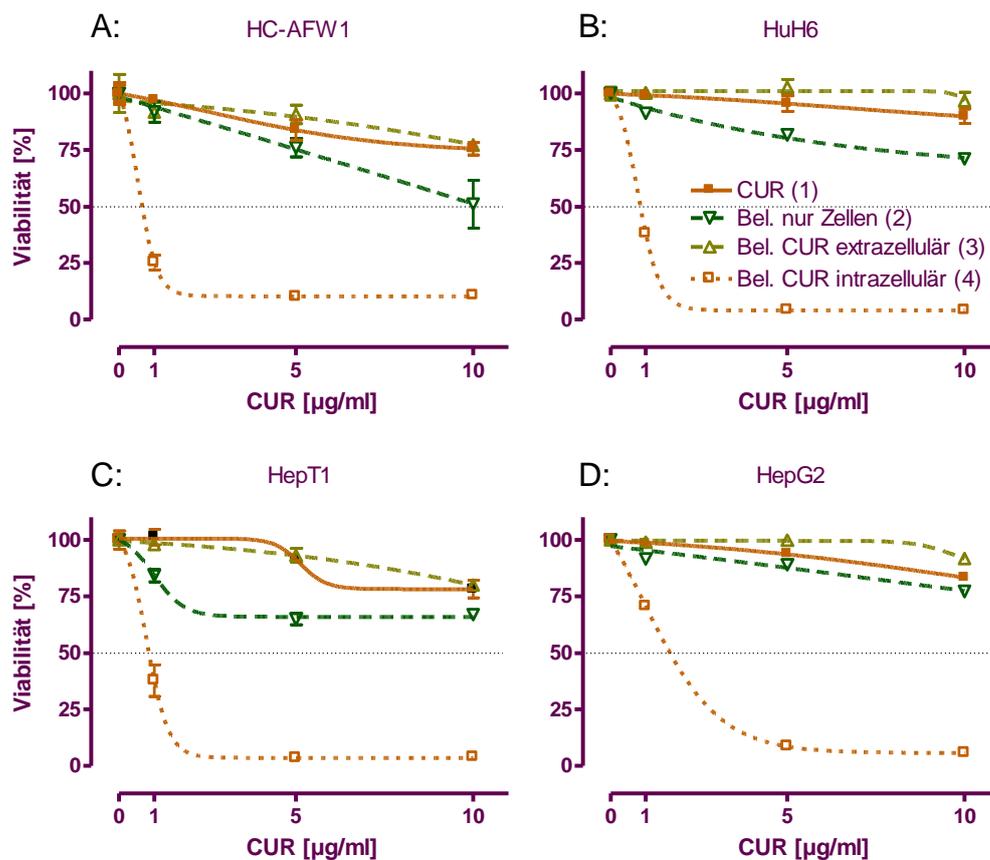
Die PDT führt konzentrationsabhängig zu einer deutlich früher eintretenden Störung der Zellintegrität. Bereits 3 h nach der Belichtung befindet sich der größte Anteil der behandelten Zellen im Sterbeprozess.

Im Folgenden wird der Wirkmechanismus der verstärkten Viabilitätseinschränkung durch die PDT mit CUR genauer untersucht.

### **3.3.4 Intra- versus extrazellulärer Belichtung von CUR**

Wie Priyadarsini (2014) beschreibt, führt sichtbares Licht auch zur vorzeitigen Degradation von CUR, was in einer abgeschwächten Wirkung resultiert. In diesem Versuch wurde untersucht, ob die Belichtung von CUR nach Aufnahme in die Zelle erfolgen muss oder ob eine externe Anregung von CUR mit blauem Licht auch die Zellviabilität reduzieren kann. Hierzu wurden subkonfluente Hepatom-Zellkulturen, wie in 2.3 geschildert, bezüglich ihrer IC50 verglichen.

Im MTT-Assay nach 24 h war, mit steigenden CUR-Konzentrationen, eine Zellviabilitätsabnahme bei beiden Behandlungsschemata (*Bel. CUR intrazellulär (4)*, *Bel. CUR extrazellulär (3)*) für alle Zelllinien zu sehen (s. Abbildung 14). Die Viabilitätswerte nach Zugabe von extern belichtetem CUR unterschieden sich jedoch kaum von den Kontrollbehandlungen mit unbelichtetem CUR. IC50-Werte wurde nicht erzielt. Bei intrazellulärer Bestrahlung von CUR fielen die Viabilitätswerte aller getesteten Zelllinien deutlich stärker ab. Lediglich hier wurden IC50-Werte innerhalb der getesteten CUR-Dosen erreicht. Sie lagen bei 0,7 µg/ml (HC-AFW1), 0,9 µg/ml (HuH6 und HepT1) und 1,7 µg/ml (HepG2, s. Tabelle 8). [109]



**Abbildung 14: Viabilitätsvergleich unter intra- und extrazellulärer Belichtung von CUR**

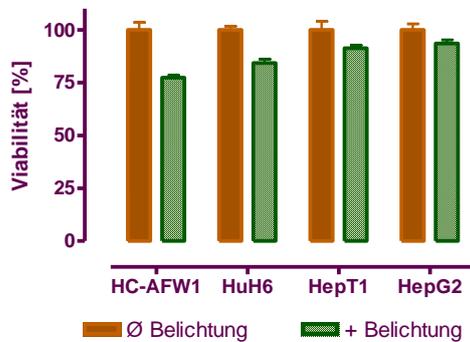
Hepatomzellkulturen (HC-AFW1, HuH6, HepT1, HepG2) wurden entweder nach zellulärer Aufnahme von CUR belichtet (4) oder mit extern belichtetem CUR inkubiert (3) und auf ihre Zellviabilität untersucht. Als Kontrolle wurde die CUR-Monotherapie (1) und eine reine Bestrahlung der Zellen ohne CUR-Applikation verwendet (2). Mittelwerte und Standardabweichungen der MTTs nach 24 h zeigten bei allen Zelllinien für die intrazelluläre Belichtung (4) die mit Abstand größte Viabilitätsabnahme. Die vorherige Aufnahme von CUR scheint Bedingung für den potenzierenden Effekt der Belichtung auf die Viabilitätsreduktion zu sein. [109]

Behandlung	HC-AFW1	HuH6	HepT1	HepG2
CUR (1)	> 10	> 10	> 10	> 10
Bel. nur Zellen (2)	10	> 10	> 10	> 10
CUR + Bel. extrazellulär (3)	> 10	> 10	> 10	> 10
CUR + Bel. intrazellulär(4)	0,65	0,85	0,85	1,68

**Tabelle 8: IC50 der verschiedenen Behandlungskonzepte**

Tabellarisch aufgelistet sind die IC50-Werte (µg/ml) der getesteten pHCC- und HB-Zelllinien gegen die vier Behandlungskonzepte: CUR-Monobehandlung ohne Belichtung (1), separate Belichtung der Zellen vor Inkubation mit CUR (2), separate Belichtung der CUR-Verdünnungen vor Zugabe auf die Zellen (3), Belichtung nach 1,5 h CUR-Inkubation (4). Deutlich wird das herausstechende Ergebnis der Belichtung von intrazellulärem CUR (4) gegenüber den anderen Behandlungskonzepten

Eine alleinige Belichtung der Zellen mit blauem Licht ohne jegliche CUR-Behandlung führte zu einer zellabhängigen Abnahme der vitalen Zellzahl um 6 - 23 % (s. Abbildung 15).



**Abbildung 15: Viabilitätsverlust unter Bestrahlung mit blauem Licht**

Dargestellt sind die vier getesteten Hepatom-Zelllinien HC-AFW1, HuH6, HepT1 und HepG2 bezüglich ihres Viabilitätsverlusts unter Belichtung ohne jegliche Zusatzbehandlung. Der MTT-Assay (24 h) weist eine maximale Viabilitätsreduktion von 23 % (HC-AFW1) gegenüber der unbelichteten Kontrolle auf.

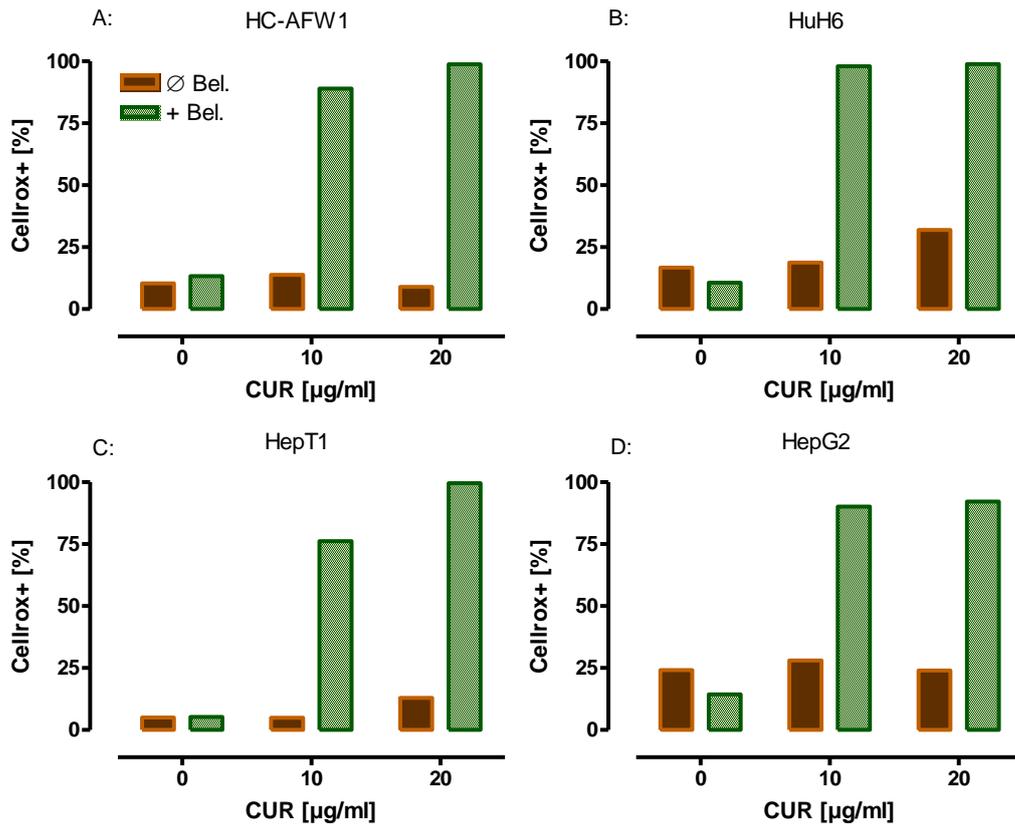
Intrazellulär belichtetes CUR führt zu den größten Viabilitätseinbußen. Die vorherige Aufnahme von CUR in die Zelle stellt somit den wichtigsten Faktor für die potenzierende Wirkung der Belichtung auf die Zytotoxizität von CUR dar. Verschiedene Wirkmechanismen können diesen Effekt bedingen. Zwei Ansätze wurden im Folgenden näher betrachtet.

### 3.3.5 Sauerstoffradikalbildung durch PDT

Der Hauptwirkmechanismus bei vielen Photosensitizern, wie beispielsweise Photofrin, besteht in der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Dahl et al. wies bereits 1994 in leukämischen Zellen aus der Ratte nach, dass eine PDT mit CUR Sauerstoff benötigt und zur Bildung von ROS führen kann. Auf der Suche nach dem Wirkmechanismus der PDT mit CUR in Hepatomzellen wurden deshalb, wie in 2.4 aufgezeigt, mit CUR behandelte und danach belichtete pHCC- und HB-Zellen 24 h später einem CellROX Orange- Assay unterzogen.

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie zeigte eine starke Streuung der CUR-Fluoreszenz in den empfohlenen Detektionskanal für CellROX Orange, FL3. Hierbei fiel auf, dass belichtete Zellen eine stärkere CUR-Fluoreszenz emittierten als unbelichtete (s. 3.4.3). Eine sinnvolle Auswertung für CellROX Orange wurde mit den

schwächeren Fluoreszenzsignalen aus dem FL4-Detektionskanal durchgeführt. Unbelichtete Zellkulturen zeigten keinen (HC-AFW1, HepG2) bzw. einen geringfügigen Anstieg (HepT1, HuH6) des CellROX-Signals bzw. an radikalen Sauerstoffspezies (ROS). Unter PDT erhöhte sich bei allen untersuchten Zelllinien die Fraktion CellROX-positiver Zellen stark auf 73,4 – 99,6 % ( $C_{CUR} = 10$  bzw.  $20 \mu\text{g/ml}$ , s. Abbildung 16). [109]



**Abbildung 16: Sauerstoffradikalbildung durch PDT mit CUR**

Zur Überprüfung der Sauerstoffradikalbildung (ROS) unter einer PDT mit CUR wurden Hepatomzellkulturen (HC-AFW1, HuH6, HepT1, HepG2) 24 h nach Behandlung einem CellROX-Assay unterzogen. Die durchflusszytometrische Analyse ergab für alle belichteten Zellkulturen einen starken Anstieg an CellROX positiven Zellen bzw. der ROS-Produktion. Für unbelichtete Zellkulturen zeigte sich lediglich für HuH6 und HepT1 eine leichte Zunahme des CellROX Signals. [109]

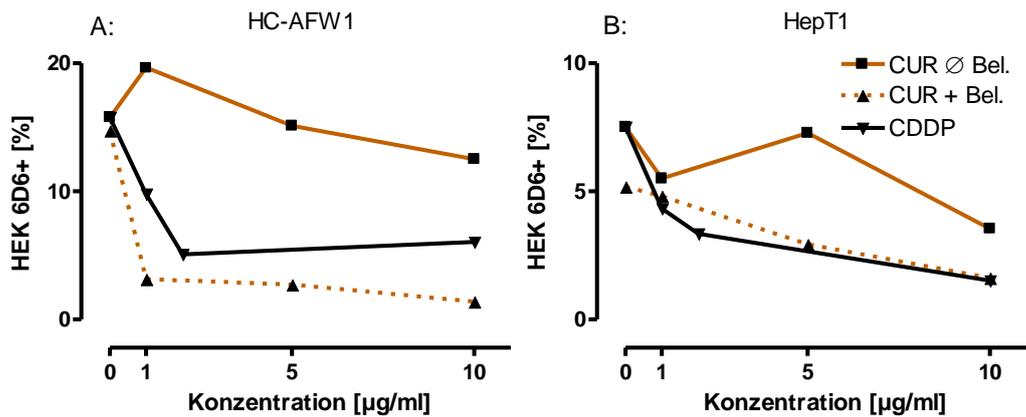
Eine PDT mit CUR führt, im Gegensatz zur reinen CUR-Behandlung, in allen untersuchten Hepatomzelllinien zu einer deutlichen ROS-Produktion. Die starke Viabilitätsabnahme (s. 3.3.1) ist jedoch wahrscheinlich nicht ausschließlich darin

begründet. Ein weiterer potenzieller, wenn auch langwieriger Wirkmechanismus einer PDT mit CUR wurde im folgenden Versuch untersucht.

### **3.3.6 Veränderung der Zusammensetzung von Subpopulationen**

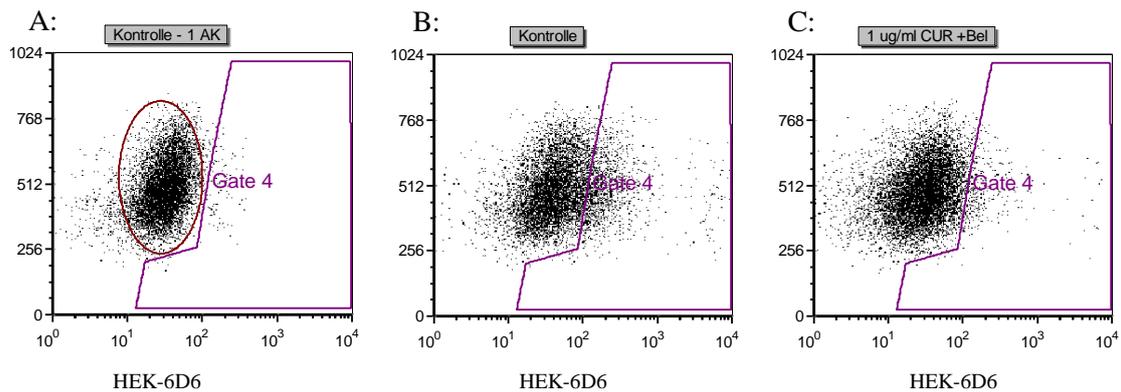
Auch Zelllinien, die lange Zeit in Kultur sind, stellen sich als Mischpopulationen dar, worunter sich auch sogenannte Tumorstammzellen (Cancer Stem Cells, CSCs) befinden. Im letzten Jahrzehnt wurde zunehmend die Rolle der Tumorstammzellen in der Tumorgenese diskutiert. CSCs stellen laut Abdullah et al. (2013) unter anderem die Schlüsselzellen der Tumorentstehung mit beachtlichem Einfluss auf das Auftreten von Rezidiven dar. Um die Auswirkungen einer PDT mit CUR auf die Zusammensetzung von unterschiedlichen Populationen zu untersuchen, wurden, wie in 2.4 beschrieben, mit CDDP (24 h), CUR (4 h) oder PDT (3 h) behandelte HC-AFW1- und HepT1-Zellen mit dem Antikörper HEK-6D6 (ein Antikörper gegen Antigene der Stammzellen) markiert und verglichen.

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie ergab für alle Versuchsreihen bei den getesteten Zelllinien eine Verringerung der HEK-6D6-positiven Zellen (s. Abbildung 17). Die Kontrollen wiesen eine HEK-6D6-Zellfraktion von 15,8 und 7,5 % (HC-AFW1, HepT1) auf. Trotz einer relativ kurzen Inkubation war selbst unter CUR-Monotherapie eine Abnahme der HEK-6D6-positiven Zellfraktion zu erkennen. Unter 10 µg/ml CUR fiel sie leicht auf bis 12,5 bzw. 3,5 %. Die PDT verminderte den Anteil der HEK-6D6-Populationen stark auf 1,4 bzw. 1,6 %. Damit konnte unter dreistündiger CUR-Inkubation und anschließender Belichtung der Bruchteil dieser Populationen ähnlich stark reduziert werden wie unter 24-stündiger CDDP-Behandlung (6,0 bzw. 1,5 %).



**Abbildung 17: HEK 6D6-positive Subpopulationen unter PDT**

Mit CDDP (24 h), CUR (4 h, CUR Ø Bel.) oder PDT (3 h, CUR + Bel.) behandelte Hepatom-Zellkulturen wurden bezüglich ihres Anteils an HEK-6D6-positiven Zellen verglichen. Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie wies eine Dezimierung des Anteils an HEK-6D6-positiven Subpopulationen beider Zelllinien für alle drei Behandlungsschemata auf. PDT und CDDP-Behandlung führten zu deutlich stärkeren Reduktionen der positiven Zellfraktionen.



**Abbildung 18: HEK-6D6-positive Subpopulationen in HC-AFW1-Kulturen – Streudiagramm**

Dargestellt sind die im Fluoreszenzkanal *Alexa Fluor 488-A* ( $\lambda_{\text{Ex/Em}} = 488/514 \text{ nm}$ ) gemessenen Fluoreszenzwerte von HC-AFW1-Zellen der Negativkontrolle (A, ohne ersten Antikörper), der Kontrolle (B, ohne CUR-Behandlung, ohne Belichtung) und der Probe mit CUR-Behandlung (1 µg/ml) und Belichtung (C). Gate 4 wurde unter Berücksichtigung der Negativkontrolle gesetzt und definiert die HEK-6D6-positiven Zellen.

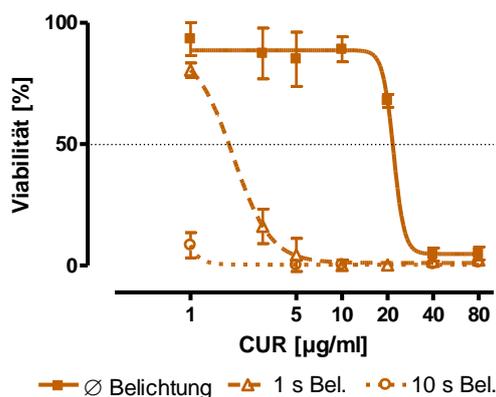
Eine PDT mit CUR dezimiert bereits nach kurzer Inkubationszeit bei den untersuchten Zelllinien die HEK-6D6-positiven Subpopulationen ähnlich stark wie nach 24-stündiger CDDP-Behandlung.

Im Allgemeinen bewiesen die Versuche zur PDT eine starke Wirkung. Im Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit und die Zytotoxizität für gesunde Körperzellen, wäre die Überprüfung des Konzeptes an primären, nicht entarteten Zellkulturen aufschlussreich.

### 3.3.7 Zytotoxizität von CUR und PDT auf Fibroblasten

Die erwünschte, hohe Zelltoxizität von CUR und PDT sollte möglichst spezifisch für Tumorzellen sein. Um die Auswirkungen der zwei Therapiekonzepte auf die Viabilität von primären Zellen zu untersuchen, wurden, wie unter 2.3 beschrieben, subkonfluente Fib3-Kulturen für 1,5 h mit verschiedenen CUR-Konzentrationen (1 – 80 µg/ml) inkubiert und anschließend belichtet. Die IC50 wurden ermittelt.

Der MTT-Assay nach 48 h offenbarte für unbelichtete Zellkulturen einen Viabilitätsabfall ab CUR-Konzentration von knapp unter 20 µg/ml (s. Abbildung 19). Die IC50 lag bei 21,6 µg/ml und war damit höher als die IC50-Werte in RMS- und Hepatomkulturen (vergl. Abbildung 6, Abbildung 7). Eine Belichtung von 1 bzw. 10 s führte zu einem deutlichen Abfall der IC50 auf 1,8 bzw. < 1 µg/ml, vergleichbar mit den Werten für pHCC- und HB-Zellen aus 3.3.1. Somit bestand kein nennenswerter Unterschied zwischen den Viabilitätswerten der getesteten Hepatom- und Fibroblastenzellen.



**Abbildung 19: : Zytotoxizität von CUR und PDT für Fibroblasten**

Kultivierte primäre Fib3-Zellen wurden mit aufsteigenden CUR-Konzentrationen behandelt und 1 bzw. 10 s belichtet. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Viabilität im MTT-Assay nach 48 h zeigten für unbelichtete Kulturen eine geringere Toxizität von CUR als für Hepatomzellen (IC50 = 21,6 µg/ml). Unter Belichtung (10 s) verringerte sich die IC50 jedoch ähnlich stark auf unter 1 µg/ml.

CUR wirkt zytotoxisch in Fib3-Kulturen, jedoch erst bei höheren Dosen als in Hepatom-Kulturen. Unter zusätzlicher Belichtung fällt die vitale Zellzahl ähnlich stark ab wie jene von mit PDT behandelten Hepatomzellen. Bei der klinischen Durchführung sollte daher eine lokale Belichtung, beispielsweise im Zuge einer Laparoskopie, in Betracht gezogen werden.

Zusammenfassend zeigte die Behandlung von Hepatomzellen mit CUR alleine oder in Kombination mit CDDP bzw. PDT eine deutliche, konzentrationsabhängige Viabilitätsabnahme. Durch die Kombinationsbehandlungen wurde die Viabilitätsreduktion verstärkt. Die PDT führt darüber hinaus zu einem frühzeitigen Zellsterben, einer Erhöhung der ROS-Produktion und einer Verschiebung der Subpopulationen. Zur Übertragung dieser Therapiekonzepte auf tierexperimentelle oder humane Studien muss neben der Pharmakodynamik auch die Pharmakokinetik genauer untersucht werden. Einen elementaren Teil hiervon stellen die Metabolisierung sowie die zeit-, licht- und milieuabhängige Degradation von CUR dar. Im folgenden Kapitel werden einige dieser Punkte näher betrachtet.

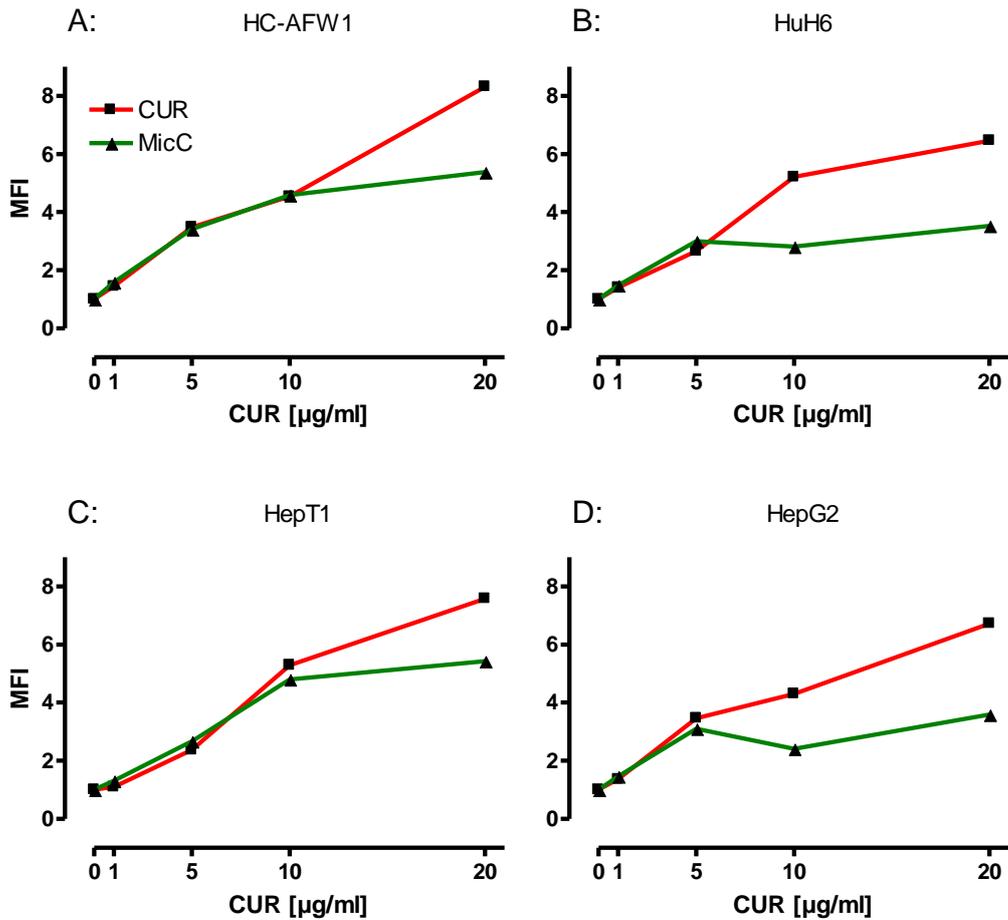
### **3.4 Metabolisierung von CUR in RMS- und Hepatomzellen**

#### **3.4.1 Zelluläre Aufnahme und Metabolisierung von CUR**

Mit dem folgenden Versuch sollte ein besseres Verständnis der Zeitspannen sowohl der zellulären Aufnahme als auch der intrazellulären Metabolisierung bzw. Degradation von CUR und MicC gewonnen werden. Dazu wurden behandelte pHCC- und HB-Zellkulturen, wie in 2.4 ausgeführt, mittels ihres *Mean fluorescence index* (MFI) verglichen.

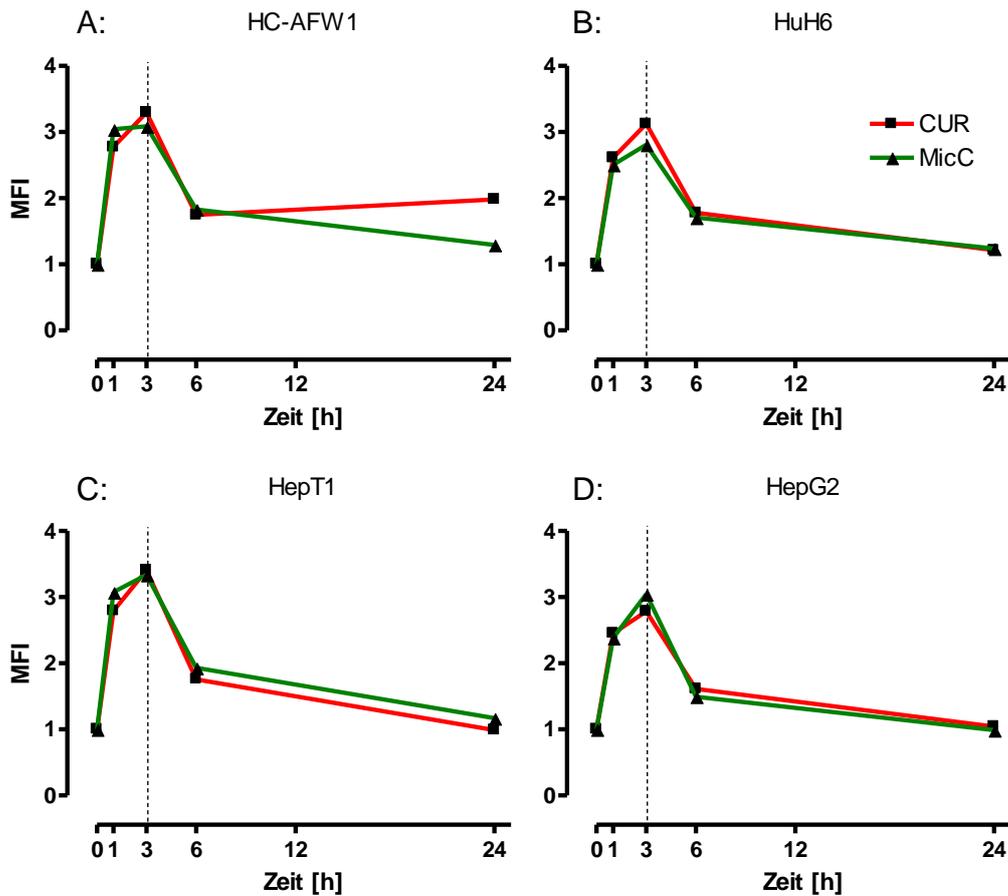
Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie zeigte nach 1 h Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen beider Substanzen für HC-AFW1-Kulturen eine Verschiebung der Histogramme zu höheren Fluoreszenzintensitäten. Dies war konzentrationsabhängig. Dargestellt ist der MFI der geometrischen Mittelwerte (s. Abbildung 20A). Je höher die Konzentration desto stärker war der MFI. Dieser stieg unter CUR vom 1,4-fachen ( $C = 1 \mu\text{g/ml}$ ) auf das 8,3-fache ( $C = 20 \mu\text{g/ml}$ ) des Kontrollwertes. Unter MicC stieg er vom 1,6-fachen auf das 5,4-fache. Die Aufnahme von CUR und MicC bei niedrigen Konzentrationen war ähnlich. Für MicC wurde ab einer Konzentration von  $10 \mu\text{g/ml}$  eine Sättigung der Aufnahme festgestellt, sodass bei der höchsten Konzentration der MFI von CUR drei über dem von MicC lag. Die weiteren Zelllinien erzielten ähnliche Ergebnisse (B, C, D). [109]

Zur Analyse der Metabolisierung von aufgenommenem CUR, wurden Hepatomzellkulturen anschließend unterschiedlich lange mit einer konstanten Konzentration von  $5 \mu\text{g/ml}$  CUR bzw. MicC inkubiert. Nach drei Stunden erfolgte ein Mediumwechsel ohne CUR. Durch die Metabolisierung von CUR ist zu erwarten, dass die Fluoreszenz von CUR abnimmt. HC-AFW1-Kulturen zeigten innerhalb der ersten drei Stunden eine starke Aufnahme von CUR und MicC und erreichten MFI-Werte von 3,3 und 3,1 (s. Abbildung 21A). Nach dem Mediumwechsel fiel der intrazelluläre CUR-Gehalt rasch ab, so dass 21 h danach keine erwähnenswerten Unterschiede zu unbehandelten Zellen zu verzeichnen waren. Für die anderen Zelllinien war dies ähnlich (B, C, D). [109]



**Abbildung 20: Konzentrationsabhängige Aufnahme von CUR bzw. MicC**

Hepatomazellen wurden für 1 h mit aufsteigenden CUR- und MicC-Konzentrationen inkubiert. Die MFIs der Durchflusszytometrie nahmen unter steigenden CUR bzw. MicC-Konzentrationen bei allen Zelllinien zu. Die Zellkulturen wiesen eine Sättigung für MicC auf. [109]



**Abbildung 21: Metabolisierung von CUR bzw. MicC**

Mit 5 µg/ml CUR / MicC inkubierte Hepatomzellen wurden mittels Durchflusszytometrie nach 1, 3, 6, oder 24 h auf ihre CUR-Fluoreszenz untersucht. Der MFI zeigte eine starke Aufnahme innerhalb der ersten Stunde und eine rasche Metabolisierung nach dem Mediumwechsel ohne CUR (t = 3 h). [109]

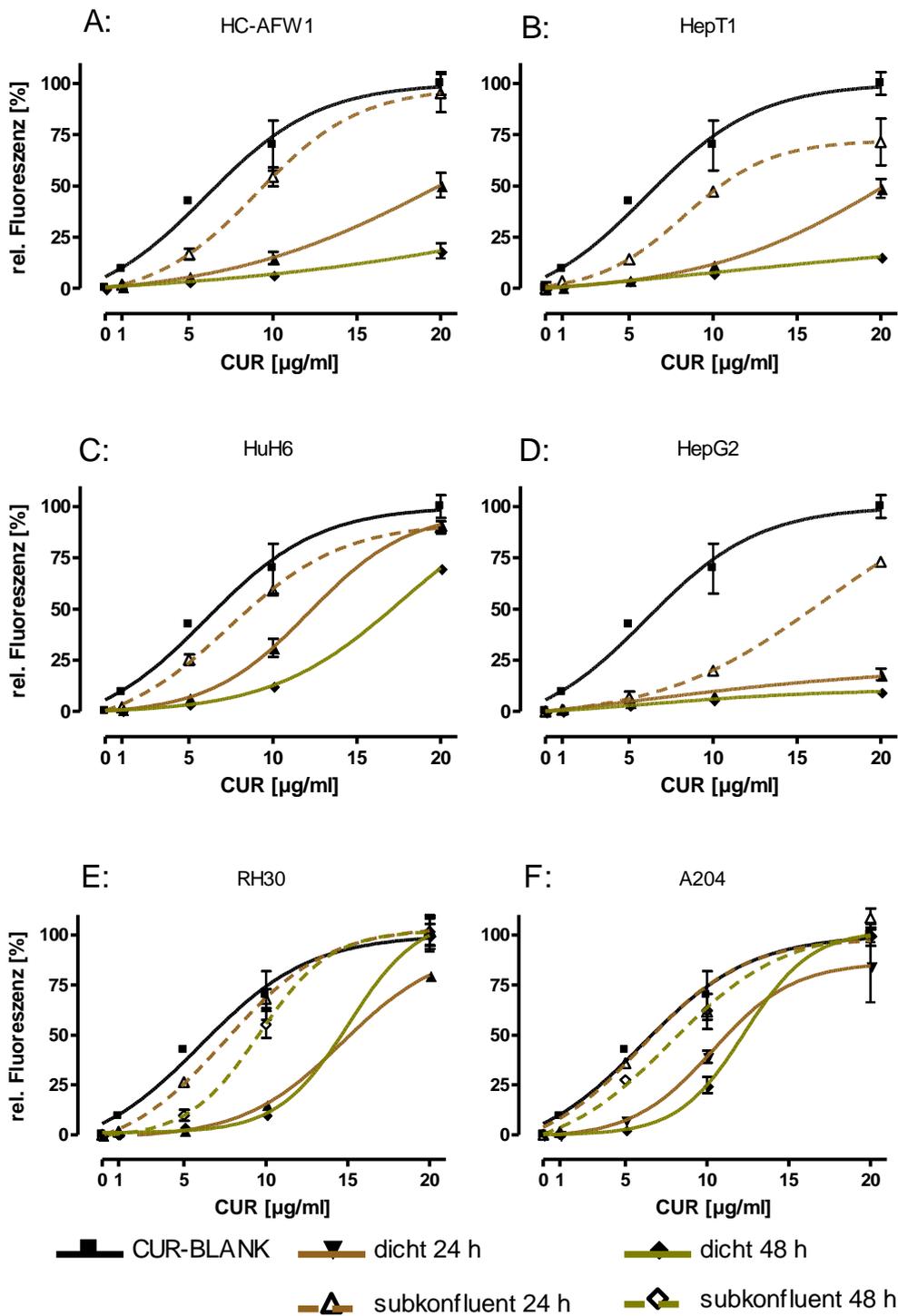
Ursächlich hierfür kann neben der zellulären Metabolisierung bzw. Degradation von CUR auch eine retrograde Diffusion in die CUR-freie Extrazellulärflüssigkeit sein. Festzustellen wäre dies beispielsweise mit einer Absorptionmessung des Überstandes.

Die Aufnahme von CUR, sowohl aus CUR- als auch aus MicC-Lösungen, erfolgt umso stärker je höher die angewandte Konzentration gewählt wird. Die größte Menge an CUR wird innerhalb der ersten Stunde aufgenommen. Unter MicC-Gabe kommt es zu einer Sättigung der Zellen. Beide Substanzen werden intrazellulär rasch metabolisiert.

### 3.4.2 Abbau von CUR in subkonfluenten und dichten Zellkulturen

Ähnlich wie das intrazelluläre CUR, kann auch die Fluoreszenz des extrazellulären CURs für die Untersuchung der Metabolisierung und Degradation von CUR herangezogen werden. Hierbei wurden die einzelnen Zelllinien sowie die Auswirkungen der Dichte der Zellkulturen verglichen. Verschiedene CUR-Verdünnungen wurden, wie in 2.5 geschildert, für 48 h auf subkonfluente bzw. dichte Hepatom- und RMS-Zellkulturen gegeben und auf ihre Fluoreszenzstärke untersucht.

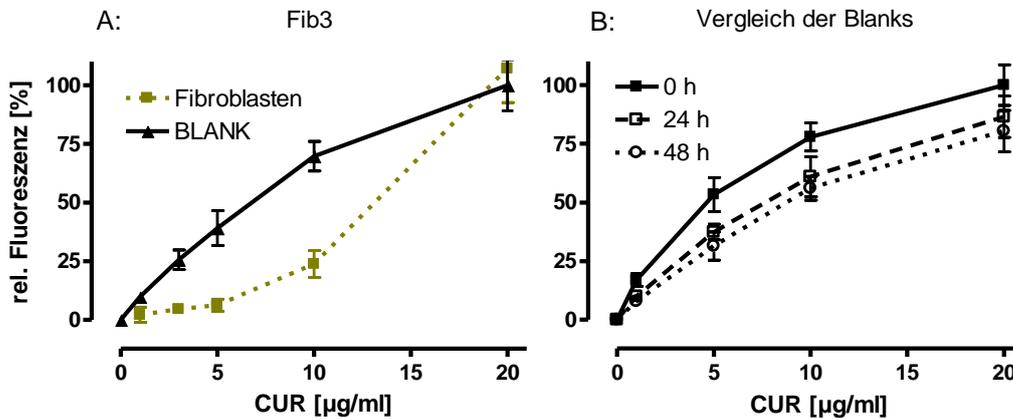
Fluoreszenzmessungen nach 24 und 48 h wiesen eine zeit-, konzentrations- und zelltypabhängige Minderung der Signalstärke in Relation zu den zellfreien Kontrollen auf (s. Abbildung 22). Bei einer CUR-Konzentration von 20 µg/ml waren nach 24 h in subkonfluenten Kulturen lediglich bei HepT1- und HepG2-Zellen merkliche Fluoreszenzabnahmen zu verzeichnen (B, D). In dichten Zellansätzen zeigte sich diese Abnahme bei allen getesteten Hepatom-Zelllinien für beide Zeitpunkte (A-D). HepG2-Zellen verursachten die größten Fluoreszenzunterschiede in allen Kulturen. Fluoreszenzmessungen nach 48 h für subkonfluente Hepatomkulturen wurden nicht erhoben. RMS-Kulturen offenbarten geringere Fluoreszenzdifferenzen. Unterschiede bezüglich der Kontrollen waren für dichte Kulturen bei den drei niedrigen CUR-Konzentrationen (1, 5, 10 µg/ml) zu sehen (E, F). Dennoch waren die Fluoreszenzunterschiede zwischen Zellansätzen und den Kontrollen für die Log-EC50-Werte der errechneten sigmoidalen Regressionskurven aller Zelllinien signifikant (F-Test  $p < 0,05$ ). [109]



**Abbildung 22: Signifikante Metabolisierung von CUR**

Verschiedene CUR-Verdünnungen wurden auf subkonfluente und dichte Hepatom- bzw. RMS-Zellen gegeben und nach 0, 24 und 48 h auf ihre Fluoreszenzstärken überprüft. Die errechneten sigmoidalen Regressionskurven zeigten einen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Abbau von CUR für alle Zelllinien in Relation zum Blank (Zellfreie Ansätze zum Zeitpunkt 24 h). RMS-Kulturen offenbarten einen geringeren Abbau. [109]

Auch Fibroblasten-Kulturen enthüllten Fluoreszenzdifferenzen im Vergleich zu zellfreien Kontrollen (s. Abbildung 23A). Zellfreie Ansätze wiesen geringe zeitabhängige Fluoreszenzunterschiede auf (B). Diese kann man auf die chemische Degradation von CUR zurückführen.



**Abbildung 23: CUR-Abbau in Fibroblastenkulturen nach 48 h**

Verschieden konzentrierte CUR-Ansätze wurden auf Fib3-Kulturen gegeben. Die Fluoreszenzmessung nach 48 h zeigte eine deutliche Metabolisierung. In B sind zellfreie CUR-Ansätze (Blanks) dargestellt. Sie zeigen die Fluoreszenzdifferenzen unter zellunabhängiger, chemischer Degradation auf, welche von der zellulären Metabolisierung abzugrenzen ist.

Die zeitabhängigen Fluoreszenz-Unterschiede sowohl in Abbildung 22 als auch in Abbildung 23A deuten auf eine durch die Zellen verursachte Veränderung der CUR-Struktur hin und somit auf einen zellulären Umsatz. Bei höheren CUR-Konzentrationen fiel der von Zellen umgesetzte CUR-Anteil weniger ins Gewicht, was eine geringere Abnahme der Fluoreszenz zur Folge hatte. Eine positive Korrelation zwischen Umsatz und Zytotoxizität konnte nicht gefunden werden. Vielmehr wurde eine negative Korrelation beobachtet. Ein gebremster Abbau hat eine erhöhte Zytotoxizität zur Folge. Möglicherweise kann CUR seine Wirkung länger entfalten. Beispielsweise zeigten RMS-Zellen eine merklich geringere IC<sub>50</sub> von CUR als Hepatomzellen (s. 3.2.1) und eine deutlich langsamere Metabolisierung (s.o.).

Die Diskrepanz zwischen Hepatom- und RMS-Kulturen kann in unterschiedlichen Metabolisierungswegen begründet sein, da Hepatomzellen, aufgrund ihrer Herkunft, eine andere Enzymkonstellation besitzen. Dies wurde bereits in der Einleitung angesprochen und wird in der Diskussion genauer betrachtet.

Die Fluoreszenz von CUR schwindet zeit-, konzentrations- und zelltypabhängig. Die Abnahme ist bedeutend. RMS-Kulturen weisen eine geringere Metabolisierung als Hepatomkulturen auf. Zusätzlich findet eine geringe zellunabhängige, chemische Degradation von CUR statt. Es könnte eine negative Korrelation zwischen zellulärem Umsatz und Zytotoxizität bestehen.

Im Zusammenhang mit erhöhter Zytotoxizität und verändertem zellulärem Umsatz von CUR könnte, aufgrund der in 3.3.1 bewiesenen gesteigerten Viabilitätsabnahme unter PDT, auch der Einfluss von Belichtung stehen. Darüber hinaus fiel in 3.3.5 auf, dass die Belichtung von mit CUR behandelten Zellen die CUR-Fluoreszenz verstärkte, was sowohl in einer verstärkten Aufnahme als auch einer reduzierten Metabolisierung von belichtetem CUR begründet sein kann.

### **3.4.3 Erhöhte Aufnahme von CUR nach Exposition zu blauem Licht**

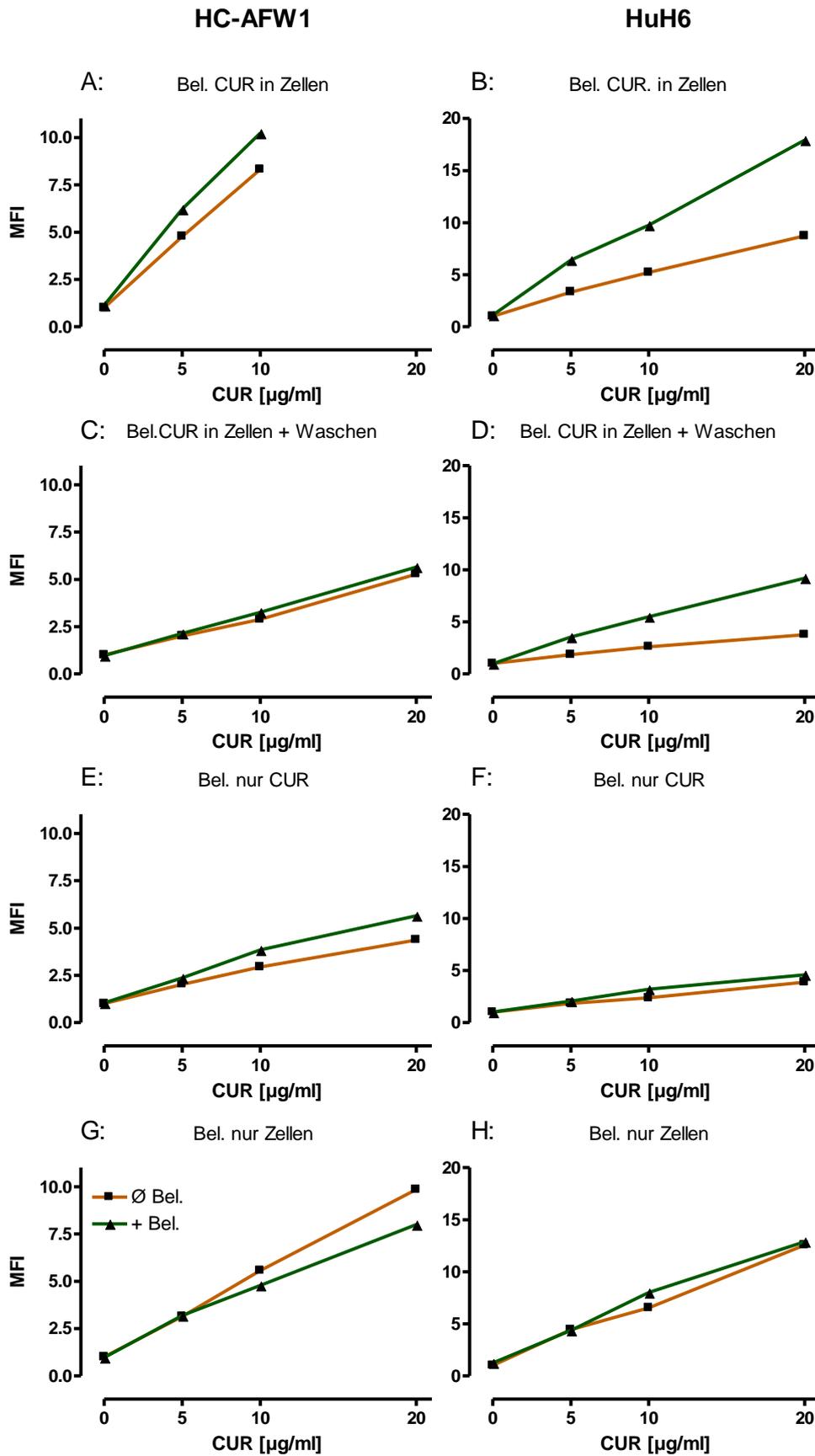
Um der Frage nachzugehen ob Belichtung zu einer verstärkten Aufnahme bzw. verminderten Metabolisierung von CUR führt, wurden in 24-Well-Platten kultivierte HC-AFW1- und HuH6-Zellen für 1,5 h mit verschiedenen CUR-Konzentrationen behandelt und, entweder direkt (A, B) oder nach einem PBS-Waschgang (C, D) mit blauem Licht bestrahlt (s. 2.4). Es wurden die MFIs verglichen.

Die geometrischen Mittelwerte der Durchflusszytometrie ergaben eine konzentrationsabhängige Erhöhung der MFI-Werte (s. Abbildung 24). Belichtung verstärkte die Zunahme der MFIs. Die Differenz betrug bei einer Konzentration von 10 µg/ml 2 bzw. 4,5 MFI-Einheiten (HC-AFW1, HuH6, s. A, B). Bei der zweiten Versuchsreihe (C, D) wurde vor Lichtexposition das Medium durch frisches, ohne CUR, ersetzt um die Veränderung der Fluoreszenz von bereits aufgenommenem CUR zu betrachten. Dabei fiel der Unterschied zwischen belichteten und unbelichteten Kulturen bei HC-AFW1 deutlich geringer aus, bei HuH6 aber dennoch deutlich mit einem MFI von 3. Für den erhöhten MFI nach Belichtung ist bei HuH6 also v.a. eine Veränderung des schon intrazellulären CURs verantwortlich.

Zur Feststellung ob eine Belichtung vor zellulärer Aufnahme Auswirkungen auf die Fluoreszenz hat, wurde in zwei weiteren Versuchen entweder CUR separat blauem Licht ausgesetzt und anschließend zu den Zellen gegeben (E, F) oder Zellkulturen vor

Zugabe von CUR belichtet (G, H). HC-AFW1-Zellen wiesen, im Vergleich zu unbelichteten Zellen, in E eine Zunahme des MFIs auf. Dies deutet auf eine, durch die Belichtung verursachte, extrazelluläre Veränderung des CURs hin. Reine Zellbelichtung führte zu einem gegenteiligen Effekt, da durch die Bestrahlung alleine bereits Zellstress entstehen kann, der die CUR-Aufnahme behindert (vergl. Viabilitätswerte aus Abbildung 15). Die entsprechenden Ergebnisse in HuH6-Kulturen unterschieden sich kaum von den Kontrollen (F, H). [109]

Die Belichtung von CUR und Zellkulturen verursacht, abhängig vom Belichtungskonzept, eine Verstärkung der CUR-Fluoreszenz der Zellen. Bei HC-AFW1 ist die Belichtung von CUR bzw. Zellkulturen vor, bei HuH6 nach zellulärer Aufnahme relevanter. Dies spricht entweder für eine gesteigerte Aufnahme oder eine verminderte Metabolisierung von CUR nach Belichtung in HC-AFW1-Kulturen.



(Beschriftung von Abbildung 24 siehe nächste Seite)

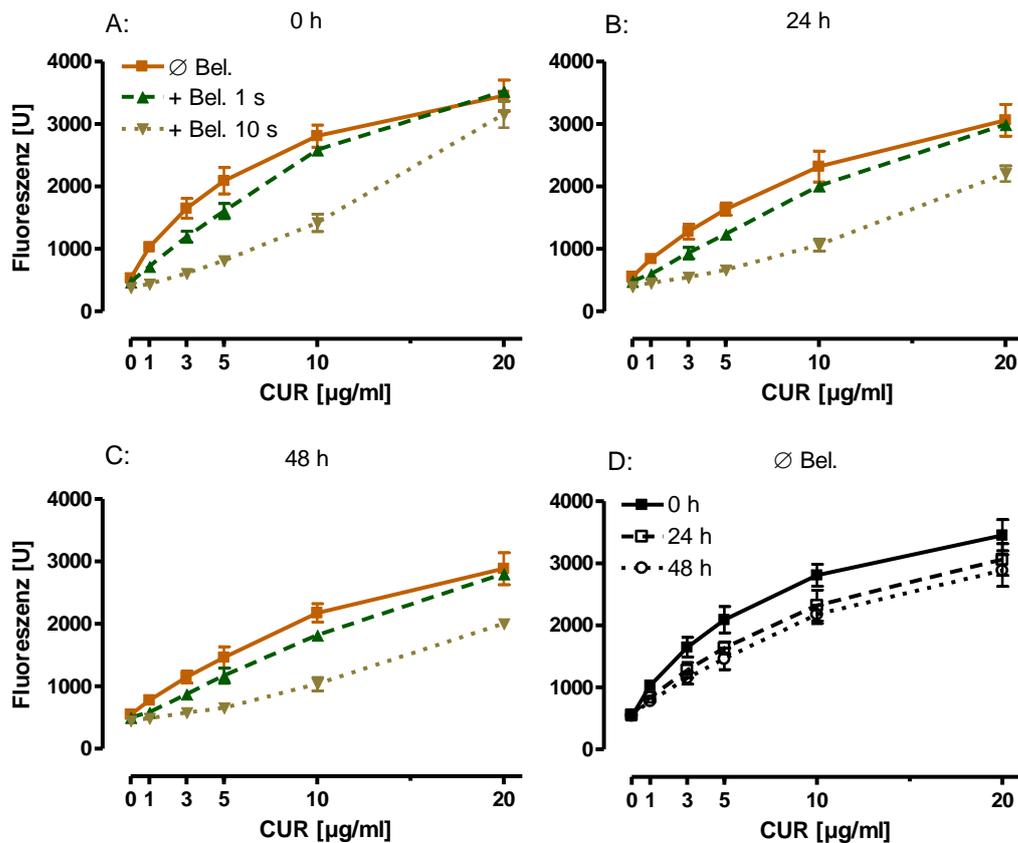
#### **Abbildung 24: Gesteigerte zelluläre Aufnahme von CUR nach Belichtung**

Mit CUR behandelte HC-AFW1- und HuH6-Kulturen wurden entweder direkt (A+B) oder nach einem PBS-Waschgang (C + D) mit blauem Licht bestrahlt. Die geometrischen Mittelwerte der FACS-Analyse ergaben eine Erhöhung der MFIs belichteter Kulturen im Vergleich zu unbelichteten. In C + D war dies nur für HuH6 zu sehen, was auf eine Veränderung des intrazellulären CURs hindeutete. HC-AFW1-Zellen wiesen einen Anstieg des MFI bei vorheriger, separater Bestrahlung von CUR (E, F) auf, was für eine beschleunigte Aufnahme durch Belichtung spricht. Reine Bestrahlung der Zellen vor der Behandlung führte zu keinem oder sogar gegensätzlichen Effekt (G, H). [109]

#### **3.4.4 Stabilität von CUR nach Exposition zu blauem Licht**

Im Gegensatz zur Verstärkung der zellulären Fluoreszenz in 3.4.3, wird in der Fachliteratur beschrieben, dass Licht eine Degradation von CUR in wässrigen Lösungen verursacht (Priyadarsini, 2014). Um dies zu überprüfen, wurden verschiedene zellfreie CUR-Verdünnungen 1 bzw. 10 s belichtet und unmittelbar, 24 und 48 h danach Fluoreszenzmessungen unterzogen.

Es zeigte sich für alle Belichtungszeiten und Messzeitpunkte eine signifikante, sofortige Reduktion der Eigenfluoreszenz von CUR (s. Abbildung 25A, B, C;  $p < 0,0001$ ). Der größte Unterschied zwischen den einzelnen Belichtungszeiten war bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  zu sehen und vergrößerte sich nach 24 und 48 h nicht mehr. Bei 20  $\mu\text{g/ml}$  verkleinerte sich die Differenz, da die Fluoreszenzabnahme bei hohen Konzentrationen weniger ins Gewicht fällt. [109]



**Abbildung 25: Abnahme der Fluoreszenz nach Exposition zu blauem Licht**

Zellfreie CUR-Verdünnungen wurden 1 bzw. 10 s belichtet. Die Fluoreszenzmessungen nach 0, 24 und 48 h ergaben eine signifikante Reduktion der Werte (A, B, C). In D ist die zeitabhängige Fluoreszenzabnahme ohne Belichtung dargestellt. [109]

Die Fluoreszenz von CUR nimmt unmittelbar nach Exposition zu blauem Licht ab. Da die Ansätze keine Zellen enthielten, basiert dieses Phänomen auf der photochemischen Degradation von CUR.

Die Aufnahme von CUR und MicC in Hepatomzellen erfolgt vorwiegend innerhalb der ersten Inkubationsstunde und umso stärker je höher die angewandte Konzentration gewählt wird. Die Metabolisierung bzw. Degradation geschieht zügig. Belichtung von intrazellulärem CUR verursacht eine Verstärkung der CUR-Fluoreszenz der Zellen. Dies spricht entweder für eine gesteigerte Aufnahme oder eine verminderte Metabolisierung von CUR nach Belichtung in HC-AFW1-Kulturen. Möglich wäre auch eine Stabilisierung von CUR durch Interaktionen mit Proteinen. Gleichzeitig führt die Belichtung zu einer zellunabhängigen, photochemischen Degradation von CUR.

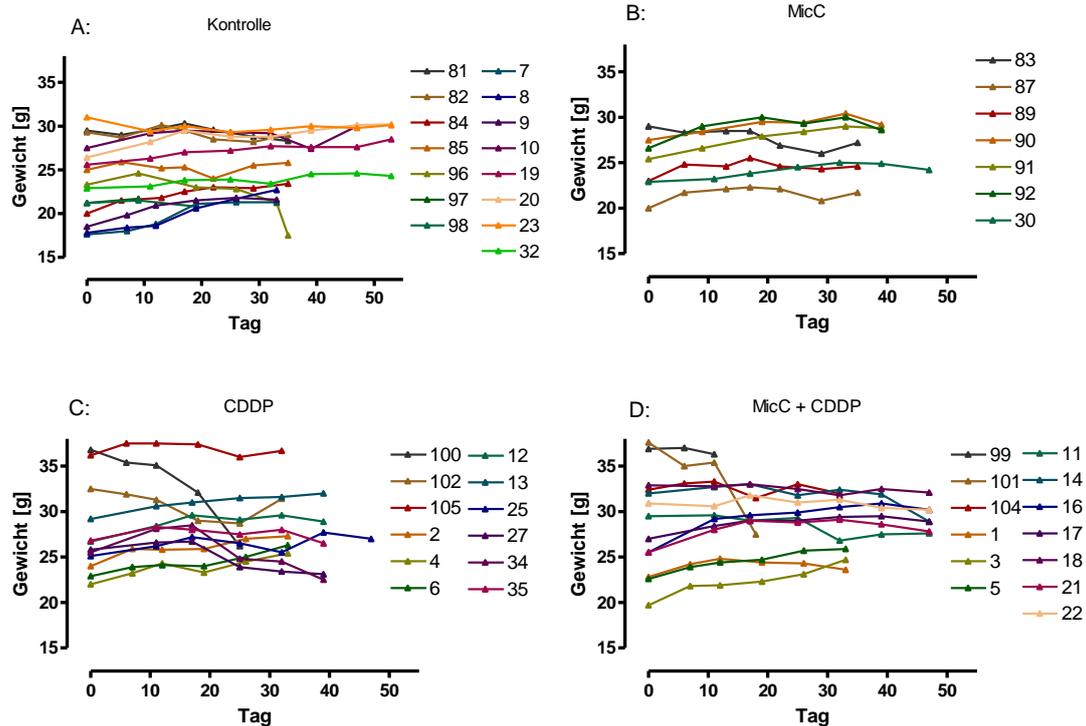
### ***3.5 Wirkung und Bioverfügbarkeit von oral appliziertem MicC im orthotopen HC-AFW1-Mausmodell***

#### **3.5.1 Bioverfügbarkeit von CUR und die Aufnahme in Organe**

Die gezeigten Auswirkungen von CUR *in vitro*, stellen eine vernünftige Basis für eine Überprüfung eines Therapiekonzeptes *in vivo* am orthotopen Tumormodell dar.

Hierfür wurde, aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit von CUR, MicC verwendet. Prof. Frank von der Universität Hohenheim konnte nachweisen, dass MicC im Menschen durch erhöhte Wasserlöslichkeit, zu einer verstärkten intestinalen Aufnahme von CUR führt [86]. In der Maus wurden bisher keine CUR-Blutspiegel unter Gabe dieses MicC bestimmt. Um eine Blutkonzentrationskurve von CUR und seinen zwei Derivaten DMC und BDMC in der Maus zu erstellen, wurde, wie in 2.6 geschildert, zu verschiedenen Zeitpunkten nach der letzten MicC-Gabe, Blut abgenommen. Darüber hinaus wurden nach Versuchsende Organproben entnommen und zusammen mit den Blutproben zur Arbeitsgruppe von Prof. Frank für Konzentrationsbestimmungen geschickt. Zusätzlich wurde versucht die Aufnahme von CUR in die Organe mittels Fluoreszenz nachzuweisen.

Das MicC wurde von allen Versuchsmäusen gut vertragen. Bei einem Gewichtsverlust von über 10 % des Ausgangsgewichts, wurden die Tiere aus dem Versuch genommen. In der CUR-Monotherapie-Gruppe wurde trotz der Tumorbelastung bei keiner Maus ein Gewichtsverlust von mehr als 10 % beobachtet. Die Gewichtsverläufe der einzelnen Versuchstiere der vier Gruppen sind in Abbildung 26 dargestellt.



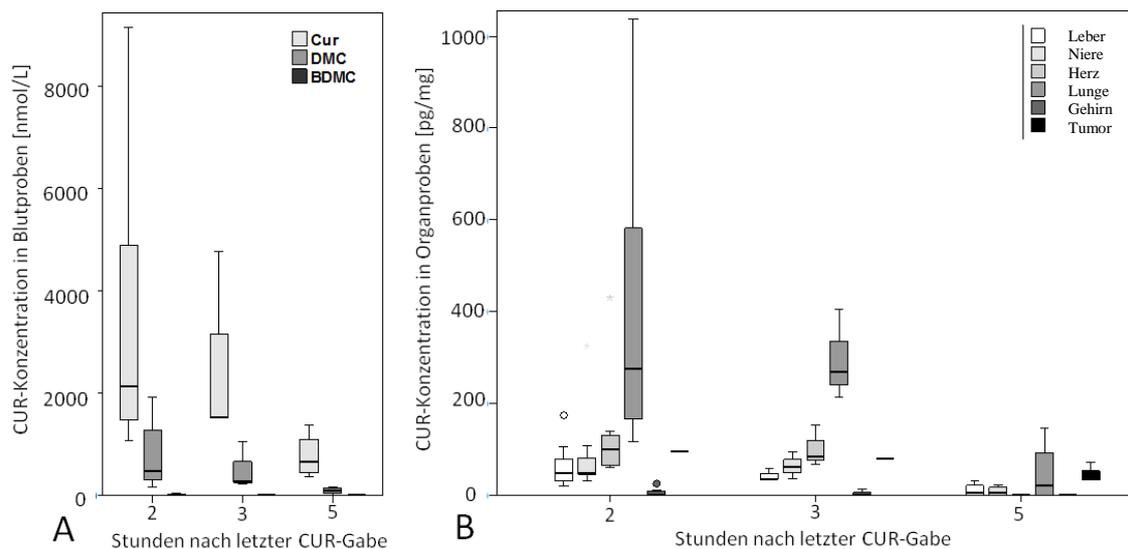
**Abbildung 26: Gewichtsverläufe der Versuchstiere**

Aufgezeigt sind die Gewichtsverläufe der einzelnen Versuchstiere (#1-35, #81-105) sortiert nach Versuchsgruppen: Kontrollen (A), MicC-Behandlung (B), CDDP-Behandlung (C), Kombinationstherapie (D). Der Therapiestart lag 15 bis 25 Tage postoperativ. Bei einem Gewichtsverlust von mehr als 10 % wurden die entsprechenden Mäuse aus dem Versuch genommen.

Die Auswertungen der Blutkonzentrationen wiesen auf eine hohe intestinale CUR-Aufnahme hin. Sowohl CUR als auch seine zwei Derivate DMC und BDMC konnten im Blut in relevanten Konzentrationen nachgewiesen werden (s.

Abbildung 27A). Nach Normalisierung ( $\log_{10}$ ) ergab der ANOVA-Test signifikante Gruppenunterschiede ( $p = 0,017$ ), der Post-hoc-Test (Bonferroni) eine Signifikanz zwischen den Messungen der Zeitpunkte 2 und 5 h. Die Mediane der CUR-Konzentrationen betragen nach zwei, drei, fünf Stunden 2,1, 1,5 und 0,5 mmol/l was 0,8, 0,6 und 0,2  $\mu\text{g/ml}$  entspricht und eine geringere Konzentration darstellt als in vitro getestet wurde. Die höchsten Blutspiegel wurden 2 h nach peroraler Gabe von MicC erreicht. Je größer die Dauer nach der letzten MicC-Gabe, desto weiter sank der CUR-Blutspiegel. Nach fünf Stunden wurden die niedrigsten Werte nachgewiesen, was für eine schnelle Metabolisierung und Degradation von CUR spricht. Auch in den Organen wurden bedeutsame CUR-Konzentrationen festgestellt (s.

Abbildung 27B). Nach Normalisierung ( $\log_{10}$ ) bewies der ANOVA-Test signifikante Gruppenunterschiede ( $p = 0,0001$ ). Der Post-hoc-Test (Bonferroni) zeigte im Vergleich mit allen anderen Organproben in der Lunge signifikant höhere CUR-Konzentrationen, mit Ausnahme des Herzens, und im Gehirn signifikant geringere Konzentrationen mit Ausnahme der Leber. Auch bei Betrachtung der Mediane zeigte die Lunge den durchschnittlich höchsten CUR-Gehalt nach 2 h (201 pg/mg Gewebe), gefolgt von Herz (66,4 pg/mg) und Niere (44,9 pg/mg). Leber (34 pg/mg) und Gehirn (0 pg/mg) wiesen die geringsten Konzentrationen von CUR auf. Der Medianwert von 0 pg/mg Gehirngewebe kommt dadurch zu Stande, dass in der Mehrzahl der Fälle kein CUR nachgewiesen werden konnte. Die CUR-Konzentration in der Tumorprobe betrug im Median 70,85 pg/mg Tumor und damit das Doppelte der Konzentration in der Leber. Das Versuchstier # 90 wies in der Leber keine CUR-Spuren auf, im Tumor jedoch eine Konzentration von 33,93 pg/mg. [108]



**Abbildung 27: A. Blutkonzentrationen von CUR, DMC und BDMC**

Nach letzter MicC-Gabe waren deutliche CUR-, DMC- und BDMC-Konzentrationen im Blut nachweisbar, die eine zeitabhängige Abnahme aufwiesen. Nach Normalisierung ( $\log_{10}$ ), ergab der ANOVA-Test signifikante Gruppenunterschiede ( $p = 0,017$ ); Der Post-hoc-Test (Bonferroni) bewies die Signifikanz zwischen 2 und 5 h ( $p = 0,016$ ). [108]

#### **B. CUR-Konzentrationen in Organproben.**

Nach letzter MicC-Gabe konnten auch in den Organproben relevante CUR-Konzentrationen mit zeitabhängiger Abnahme festgestellt werden. Zu bestimmten Zeitpunkten (2, 3 h) zeigte nach Normalisierung ( $\log_{10}$ ) der ANOVA-Test signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Organgruppen ( $p = 0,0001$ ); der Post-hoc-Test (Bonferroni) enthüllte im Vergleich zu allen anderen Organen nach 2 bzw. 3 h signifikant höhere CUR-Konzentrationen in der Lunge mit Ausnahme des Herzens und signifikant geringere Konzentrationen im Gehirn mit Ausnahme der Leber. [108]

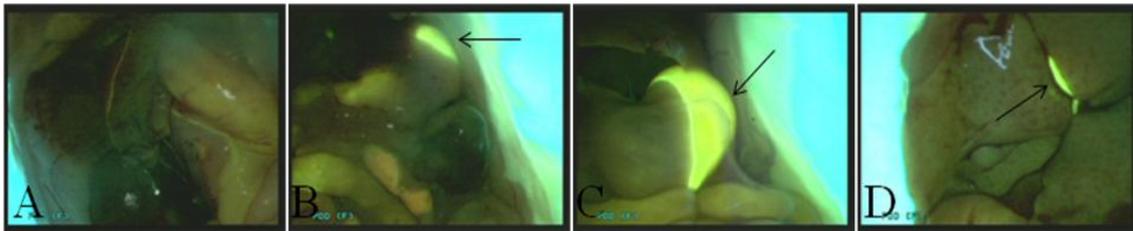
Dies führt zur Annahme, dass die Aufnahme und/oder die Metabolisierung von CUR sich im Tumor und dem Lebergewebe unterscheiden. Wie im Blut fiel auch in den Organen und Tumoren bereits innerhalb der betrachteten fünf Stunden die Konzentration von CUR, DMC und BDMC ab. Die geringe Probenanzahl behinderte jedoch statistische Analysen bezüglich der Signifikanz. Die Konzentrationen von DMC und BDMC in den einzelnen Organen sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Versuchstier	Organ	Einwaage	Curcumin	DMC	BDMC	Versuchstier	Organ	Einwaage	Curcumin	DMC	BDMC
		(mg Gewebe)	[pg/mg Gewebe]	[pg/mg Gewebe]	[pg/mg Gewebe]			(mg Gewebe)	[pg/mg Gewebe]	[pg/mg Gewebe]	[pg/mg Gewebe]
1	Lunge	21,7	212,49	23,79	1,04	1	Leber	129,20	33,94	5,15	0,32
3	Lunge	109,6	403,69	73,52	2,09	3	Leber	206,30	34,01	8,66	0,42
5	Lunge	24,7	267,9	56,34	1,44	5	Leber	139,30	58,61	14,47	0,82
11	Lunge	50,4	518,49	75,86	2,52	11	Leber	153,50	50,77	8,94	0,65
14	Lunge	128,9	116,32	15,87	0,52	14	Leber	283,20	40,26	9,76	0,44
16	Lunge	192,2	189,59	27,06	0,74	16	Leber	245,80	46,66	7,27	0,42
17	Lunge	157,3	274,56	39,53	1,23	17	Leber	268,10	22,15	3,26	0,26
21	Lunge	207,1	141,91	24,71	0,79	21	Leber	251,10	19,62	4,22	0,29
22	Lunge	39,1	644,55	71,76	2,02	22	Leber	255,40	104,61	30,28	0,92
30	Lunge	178,9	1037,25	133,25	3,82	30	Leber	272,50	173,57	34,63	1,64
90	Lunge	14,1	0	0	0	90	Leber	163,60	0	0	0
91	Lunge	51,9	0	0	0	91	Leber	135,60	0	0	0
92	Lunge	63,4	144,73	27,35	0,78	92	Leber	114,50	31,23	6,54	0,31
104	Lunge	155,3	40,34	5,2	0,24	104	Leber	237,30	9,67	0	0,12
1	Herz	116,7	84,15	8,27	0,31	1	Gehirn	66,50	11,5	0	0
3	Herz	127,9	152,46	25,97	0,76	3	Gehirn	144,50	0	0	0
5	Herz	143,6	67,16	10	0,35	5	Gehirn	39,80	0	0	0
11	Herz	128,9	138,76	22,25	0,65	11	Gehirn	85,80	24,41	7	0
14	Herz	218,4	60,92	7,4	0,2	14	Gehirn	142,50	0	0	0
16	Herz	161,2	121,62	14,34	0,37	16	Gehirn	164,90	0	0	0
17	Herz	174,5	100,25	15,95	0,42	17	Gehirn	142,20	0	0	0
21	Herz	120,2	65,67	0	0	21	Gehirn	66,70	5,98	0	0
22	Herz	136,4	60,38	4,61	0,11	30	Gehirn	113,80	10,52	0	0
30	Herz	118,4	430,24	54,77	1,28	90	Gehirn	48,10	0	0	0
90	Herz	136	0	0	0	91	Gehirn	146,90	0	0	0
91	Herz	134,9	0	0	0	92	Gehirn	158,00	0	0	0
92	Herz	132,5	0	0	0	104	Gehirn	154,10	0	0	0
104	Herz	119,5	0	0	0	1	Tumor	192,50	78,58	10,28	0
1	Niere	191	60,41	8,71	0,45	16	Tumor	194,70	94,6	12,56	0,42
3	Niere	195,3	94,83	15,54	0,58	90	Tumor	19,60	33,93	0	0
5	Niere	198,8	36,14	5,54	0,23	92	Tumor	65,70	70,85	7,11	0
11	Niere	223,8	107,93	15,88	0,53	104	Tumor	132,00	32,49	4,72	0
14	Niere	260,1	48,51	7,27	0,22						
16	Niere	283,6	52,7	6,23	0,24						
17	Niere	241,1	48,13	6,21	0,25						
21	Niere	251,8	30,14	4,71	0,18						
22	Niere	268,5	41,71	1,86	0,11						
30	Niere	159,7	324,89	53,23	1,94						
90	Niere	234,3	0	0	0						
91	Niere	193,5	0	0	0						
92	Niere	232,4	21,63	0	0						
104	Niere	208,8	10,67	3,41	0						

**Tabelle 9: Komplette Tabelle der Curcuminoid-Konzentrationen in den Organproben**

Aufgelistet sind die massenspektrometrisch ermittelten Konzentrationen von CUR, DMC und BDMC in Lunge, Herz, Niere, Leber, Gehirn und Tumor von allen mit MicC behandelten Versuchstieren.

Weiterhin wurde versucht CUR in den Organen und Tumoren makroskopisch über seine Fluoreszenzeigenschaft optisch darzustellen. Dazu wurden die entnommenen Organe mit dem Blaulichtkanal des Laparoscops bestrahlt und fotografiert. Eine Fluoreszenz von CUR ergab sich lediglich für den Magen. Die Gallenblase fluoreszierte ebenfalls stark aufgrund der Gallensäuren. Für die anderen Organe und Tumoren zeigte sich kein Ergebnis (s. Abbildung 28)



**Abbildung 28: Makroskopische CUR-Fluoreszenz in Organen**

Die Grafik zeigt den mit blauem Licht bestrahlten, präparierten Bauchsitus nach Versuchsende. Eine Fluoreszenz ist nur für das CUR im Magen (Pfeile in B, C) und die Gallensäuren in der Gallenblase (Pfeil in D) erkennbar. Leber und andere Organe fluoreszierten nicht (A).

Nach MicC-Gabe in vivo sind CUR, DMC und BDMC im Blut und in Organen in relevanten Konzentrationen nachweisbar. Die orthotopen Tumoren enthalten eine deutlich höhere Konzentration an CUR als das umgebene Lebergewebe. Zwischen den einzelnen Organen existieren signifikante Konzentrationsunterschiede. Es besteht eine signifikante zeitabhängige Abnahme der CUR-Konzentrationen in Blut und Organen.

### **3.5.2 Analyse des Tumorwachstums anhand des AFP-Plasmaspiegels**

Für eine Analyse des Tumorwachstums unter den einzelnen Therapiekonzepten wurde einmal wöchentlich retrobulbär Blut entnommen und der AFP-Blutspiegel mittels ELISA gemessen. Wie in 2.6 beschrieben, erfolgte bei positivem AFP-Wert (> 5 U/ml) die Zuteilung der Versuchsmäuse in eine der folgenden vier Gruppen: Kontrolle, CUR-Monotherapie, CDDP-Monotherapie, Kombinationstherapie CUR/CDDP (s. Tabelle 10). Insgesamt wurden 60 Versuchsmäuse operiert. In den meisten Fällen konnte ein beginnendes Tumorwachstum ca. drei Wochen nach der Operation festgestellt werden. 13 Tiere lebten intra- bzw. postoperativ (maximal 48 h danach) aufgrund von

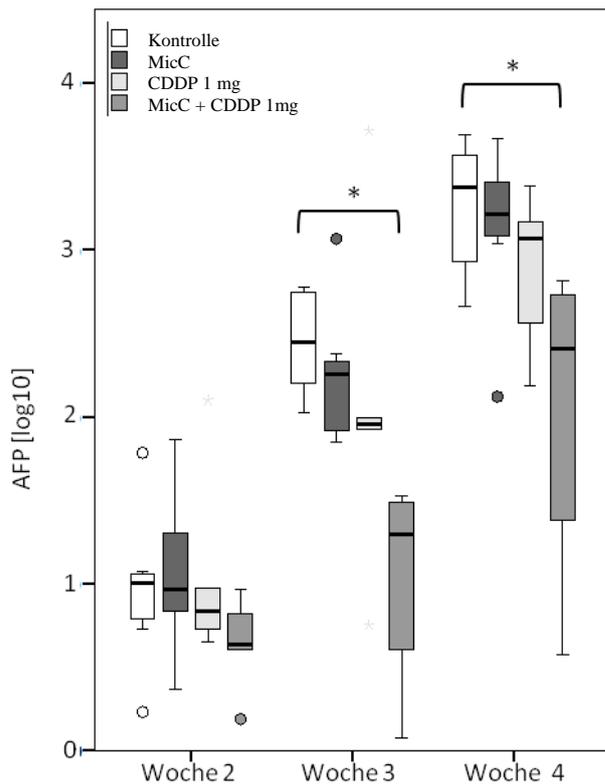
Komplikationen ab und konnten nicht für die Statistik verwendet werden. Fünf Tiere verstarben nach der ersten AFP-Bestimmung. Vier davon wiesen relevante AFP-Werte auf und wurden als positiv für das Tumor-Uptake gewertet. Fünf Tiere entwickelten über die gesamte Versuchszeit keinen Tumor. Somit betrug das Tumor-Uptake der die Operation überlebenden Mäusen 41 von 47 Tieren, also 87,2 % (KI95%: 74,3 – 95,2 %). Zu Beginn enthielten die CDDP-Behandlungen eine Konzentration von 3 mg CDDP/Kg KG. Die Resultate ergaben bei allen Versuchstieren einen kompletten Tumorrückgang sowohl unter Kombinations- als auch Monotherapie, was auf eine alleinige Wirkung von CDDP zurückgeführt wurde und eine sinnvolle Auswertung der Daten bezüglich der tumorhemmenden Eigenschaften von MicC verhinderte. Daher wurde die CDDP-Konzentration für die folgenden Versuchstiere auf 1 mg/Kg KG herabgesetzt.

Die gemittelten normalisierten und logarithmierten AFP-Konzentrationen offenbarten im ANOVA-Test signifikante Gruppenunterschiede in Woche drei ( $p = 0,006$ ) und vier ( $p = 0,023$ ), nicht aber in Woche zwei ( $p = 0,35$ ). Der sich anschließende Post-hoc-Test (Bonferroni) ergab eine signifikante Abnahme der AFP-Werte unter Kombinationsbehandlung mit MicC und CDDP im Vergleich zur Kontrollgruppe (Woche 3:  $1.04 \pm 0.67$  vs.  $2.73 \pm 0.64$ ,  $p = 0.004$ ; Woche 4:  $2.05 \pm 1.01$  vs.  $3.35 \pm 0.43$ ,  $p = 0.02$ ). In der Gegenüberstellung mit der MicC- bzw. CDDP-Monotherapie zeigte die Kombinationstherapie eine leichte, jedoch nicht signifikante Reduktion der AFP-Werte. Die Monotherapien führten gegenüber der Kontrollen zu keinen signifikanten Unterschieden. (s. Abbildung 29) [108]

CDDP \ Versuchstiere	Kontrolle	MicC	CDDP	MicC + CDDP
3 mg	10	7	6	5
1 mg			6	7

**Tabelle 10: Anzahl an Versuchstieren pro Versuchsgruppe.**

Tabellarisch aufgezeigt ist die Zusammensetzung der Versuchsgruppen. Insgesamt betrug das Tumoruptake 41 von 47 Mäusen (87,2%). Die AFP-positiven Mäuse wurden randomisiert den Versuchsgruppen zugeteilt.



**Abbildung 29: Vergleich der AFP-Blutkonzentrationen der einzelnen Behandlungskonzepte**

Die Kombinationstherapie mit mizellarem Curcumin und Cisplatin führte in den Wochen drei und vier zu einer signifikanten Reduktion der AFP-Werte im Verhältnis zur Kontrollgruppe (Bonferroni Post-hoc-Test,  $p = 0,004$  und  $0,02$ ). Von den 41 Versuchstieren verstarb in Woche 2 eines aus der Kontrollgruppe und in Woche 3 eines aus der MicC/CDDP-Gruppe. [108]

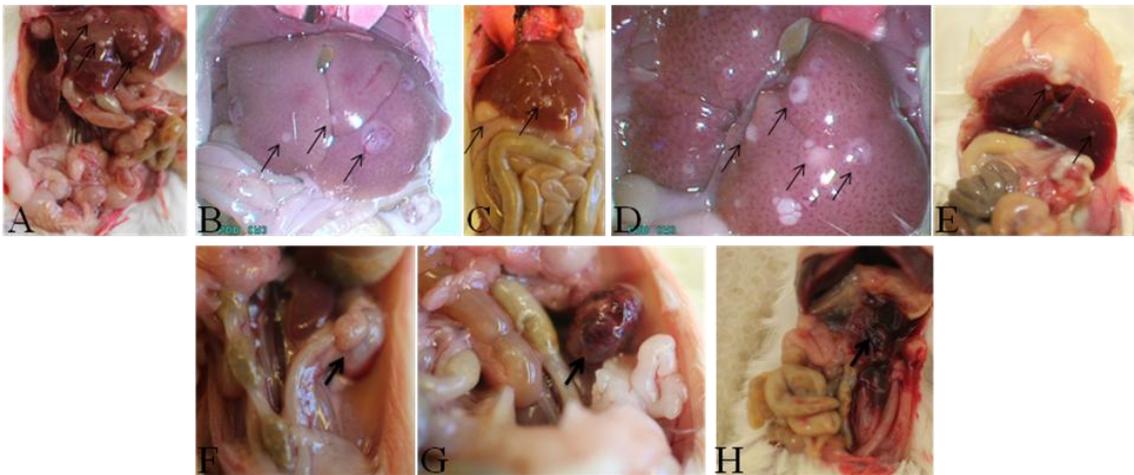
Das Tumor-Uptake des orthotopen Tumormodells unter Verwendung der Zelllinie HC-AFW1 beträgt 87,2 %. Die Kombinationsbehandlung aus MicC und CDDP bei Mäusen führt zu einer leichten Reduktion der AFP-Werte im Vergleich zur Monotherapie und zu einer signifikanten Abnahme in Relation zur Kontrollgruppe.

AFP ist als zuverlässiger Tumormarker für pHCC in der pädiatrischen Onkologie etabliert. Dennoch existieren Sekretionsunterschiede und Tumoren, die wenig oder kein AFP sezernieren. Als weitere Maßnahme zur Überprüfung des Tumorwachstums und des Therapieerfolgs empfiehlt sich daher nach Versuchsende eine Bestimmung der Tumoranzahl und -größe durchzuführen.

### 3.5.3 Analyse des Tumorwachstums anhand von Tumoranzahl und -größe

Zur Bestimmung der Tumoranzahl und Tumorgrößen wurden, wie unter 2.6 geschildert, nach Versuchsende der Bauchsitus und die Mäuselebern präpariert und die makroskopisch sichtbaren Tumoren untersucht.

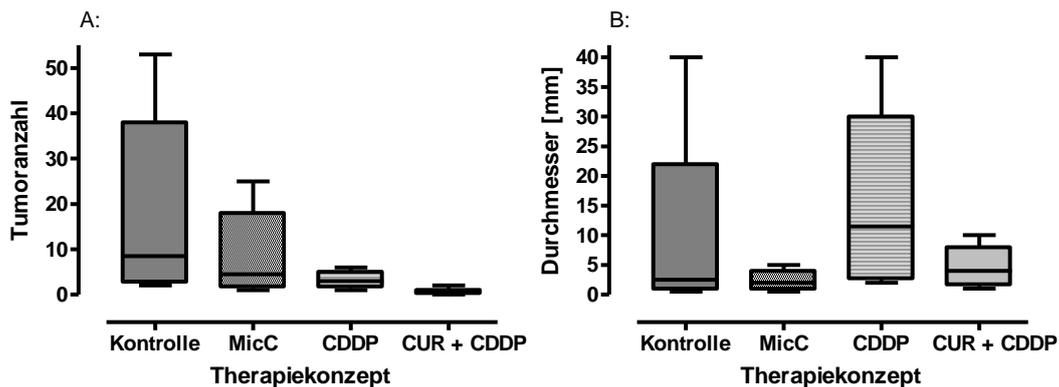
Der Begriff Tumor schließt sowohl Lebermalignome als auch Metastasen ein. In den meisten Fällen wurden multiple intrahepatische tumoröse Knoten gefunden. Metastasen konnten in der Milzloge, der Nierenloge, peritoneal, am Magen, subphrenisch und am Ovar festgestellt werden (s. Abbildung 30). Häufig war hierfür eine bei der OP unabsichtliche parasplenische Injektion von Tumorzellen in den Bauchsitus ursächlich.



**Abbildung 30: Multiple Lebertumoren und Metastasen**

Die tumorpositiven Versuchstiere entwickelten in den meisten Fällen multiple hepatische Tumorknoten (A-E). In einigen Fällen konnten Metastasen im Bauchsitus nachgewiesen werden (Ovar (F), Milzloge (G), Darm (H)).

Die Anzahl an gefundenen Tumoren war bei allen therapeutischen Gruppen geringer als bei der Kontrollgruppe (Median = 8,5 Tumoren, s. Abbildung 31A). Die Versuchsgruppe mit der Kombinationstherapie wies am wenigsten Tumoren auf (Median = 1 Tumor), allerdings ohne Signifikanz (ANOVA-Test). Zusätzlich wurden die Tumorgrößen gemessen. In Abbildung 31B sind die Durchmesser der jeweils größten Tumoren der Mäuse per Boxplot dargestellt. Die Mediane der therapeutischen Gruppen zeigten keine geringeren maximalen Tumordurchmesser als die Kontrollgruppe. Die Streuung der Werte der Kontroll- und der CDDP-Monotherapie-Gruppen war deutlich höher als die der MicC- und Kombinationstherapie-Gruppen. [108]



**Abbildung 31: Analyse des Tumorwachstums anhand der Anzahl (A) und maximalen Tumorgößen (B)**

Nach Versuchsende wurden die makroskopisch sichtbaren Tumoren (Lebermalignome + Metastasen) gezählt und deren Durchmesser gemessen. Die therapeutischen Gruppen zeigten eine Verringerung der Tumoranzahl, nicht jedoch der Tumorgößen. [108]

Die intrasplenische Injektion von HC-AFW1-Zellen führt zu multiplen intrahepatischen Tumoren und Metastasen im Bauchraum. Alle getesteten Therapiekonzepte weisen eine Verringerung der Tumoranzahl, nicht aber der Tumorgößen auf.

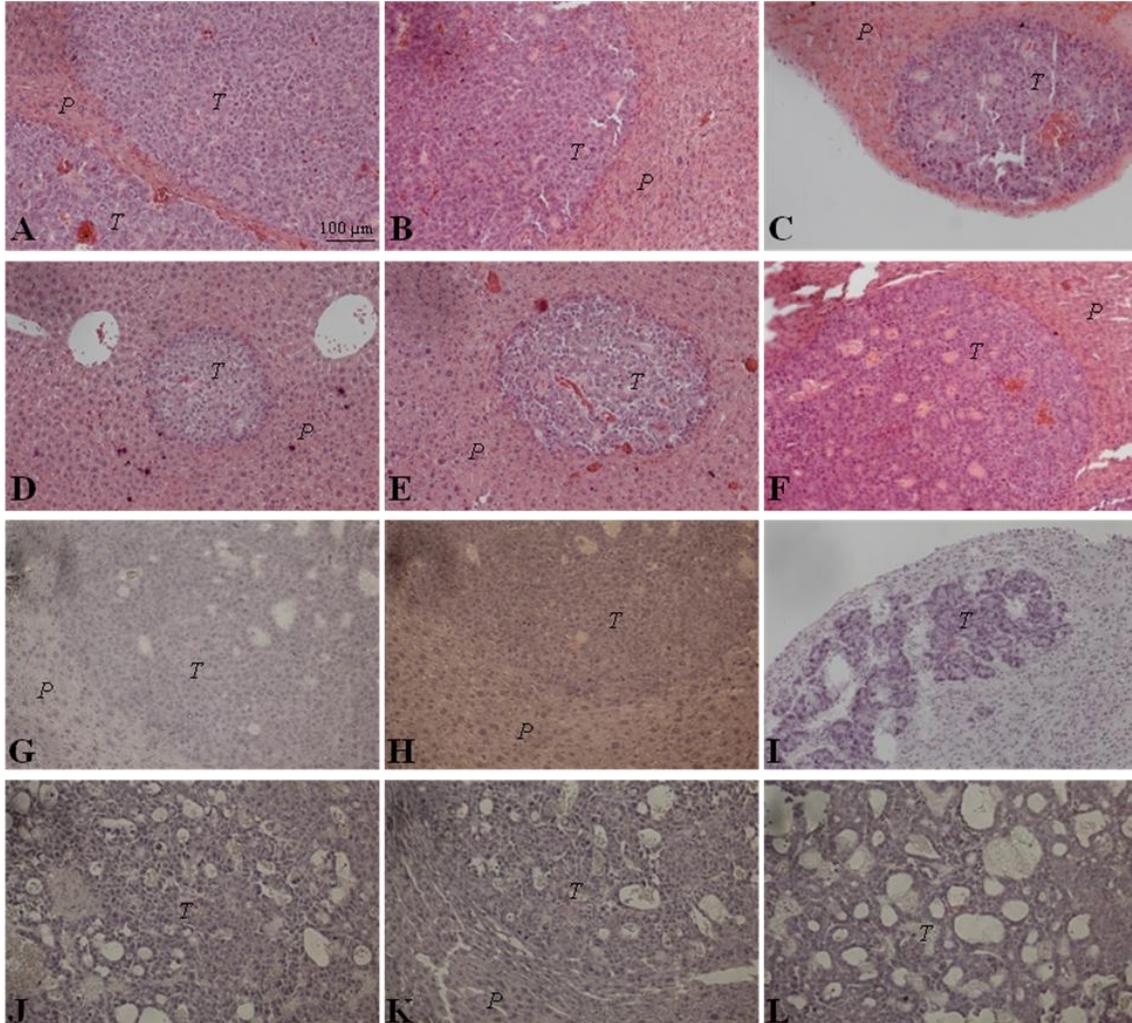
Zur Feststellung von Veränderungen auf mikroskopischer Ebene wurden Gewebeproben entnommen und analysiert.

### 3.5.4 Morphologische Veränderungen der Tumoren unter MicC-Therapie

Die Unterschiede im AFP-Blutspiegel und der Tumoranzahl der einzelnen Therapien erwecken das Interesse nach morphologischen Korrelaten auf mikroskopischer Ebene und damit einhergehenden Anhaltspunkten der Wirkprinzipien von CUR. Wie unter 2.6 aufgeführt, wurden Paraffinschnitte der Tumoren sowohl einer gewöhnlichen H.E.- als auch einer immunhistochemischen  $\beta$ -Catenin-Färbung unterzogen.

Die lichtmikroskopische Auswertung der H.E.-Färbung ergab ein typisches multinoduläres Wachstumsmuster der Tumorzellen mit einer erhöhten Kern-Plasma-Relation, vermehrten Mitosen, gewöhnlicher Apoptoseaktivität und pleomorpher Struktur. Außerdem wiesen einige Tumorproben größere Bereiche mit interstitieller Flüssigkeit und nekrotische Areale auf. Vermehrte Gefäßeinsprossung wurde kaum beobachtet. Die meisten tumorösen Knoten zeigten eine klare Abgrenzung vom Leberparenchym (s. Abbildung 32). Unterschiede zwischen den Kontrolltieren ohne

Therapie (A-C) und den Versuchstieren mit MicC-Behandlung (D-F) konnten nicht festgestellt werden. Die Gruppen mit reiner CDDP- (G-I) und Kombinationstherapie (J-L) wiesen vermehrte Bereiche mit interstitieller Flüssigkeit auf. [108]

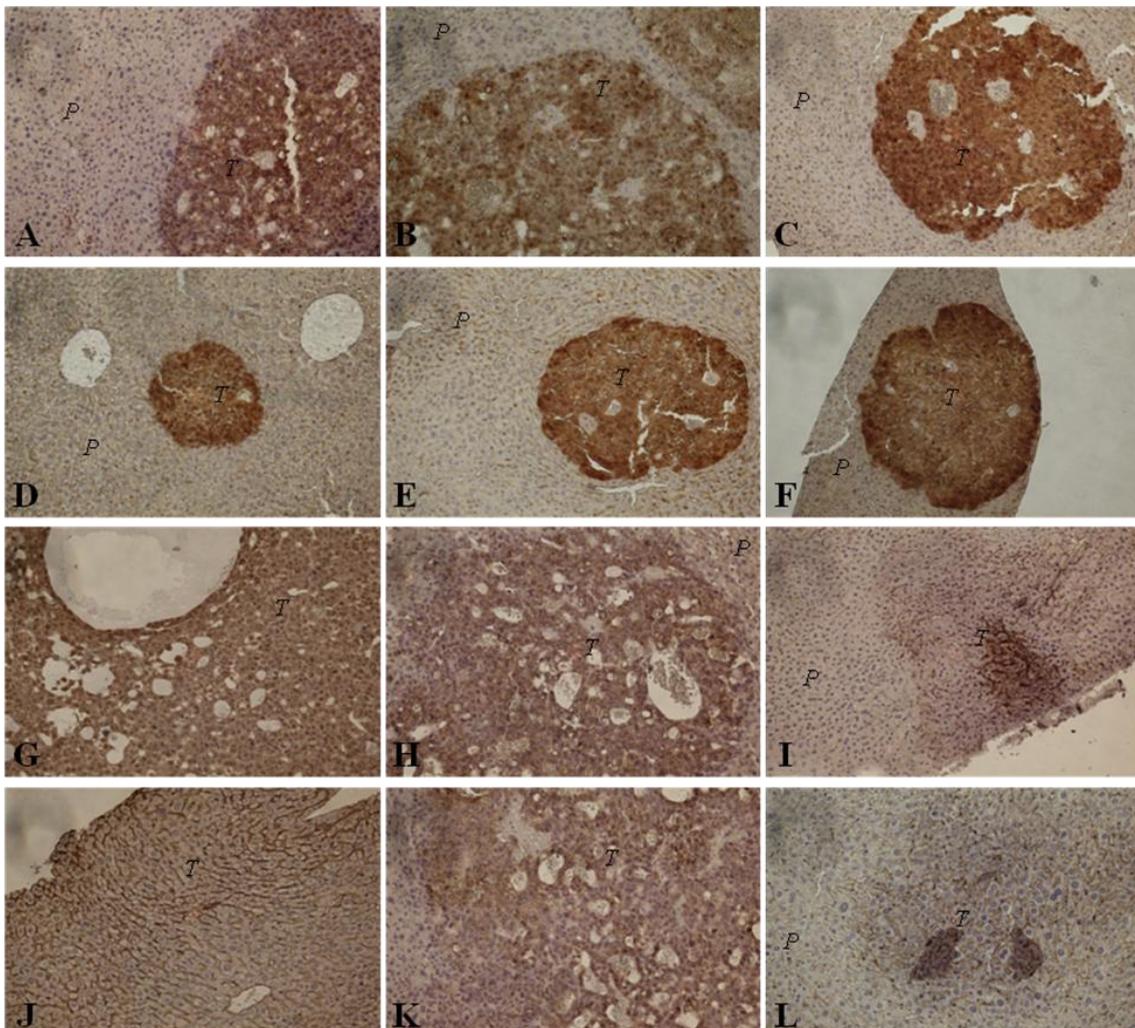


**Abbildung 32: Morphologie der Tumoren – H.E.-Färbung**

Die lichtmikroskopische Auswertung der H.E.-gefärbten Paraffinschnitte der Versuchstiere zeigte, im Vergleich zum Parenchym (*P*), bei den Tumoren (*T*) das typische multinoduläre Wachstumsmuster mit vergrößerter Kern-Plasma-Relation, vermehrten Mitosen und pleomorpher Struktur. Ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (A, B, C) und der Versuchsgruppe mit MicC (D, E, F) war nicht zu erkennen. Die Gruppen mit reiner CDDP- (G-I) und Kombinationstherapie (J-L) wiesen vermehrte Bereiche mit interstitieller Flüssigkeit auf. Pro Versuchsgruppe ist eine Auswahl von drei unterschiedlichen Präparaten gezeigt. [108]

Die lichtmikroskopische Untersuchung der immunhistochemischen Färbung belegte die vermehrte Expression von  $\beta$ -Catenin in den Tumorzellen (s. Abbildung 33). Das stärkste  $\beta$ -Catenin-Signal wurde im Kern beobachtet. Im Gegensatz zu den in-vitro Ergebnissen zeigte sich keine Translokation des nukleären  $\beta$ -Catenins unter CUR-

Behandlung zur Zellmembran. Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (A-C) und der MicC-Gruppe (D-F) wurden nicht festgestellt. Die Expression von  $\beta$ -Catenin war in der reinen CDDP-Gruppe (G-I) teilweise, besonders jedoch in der kombinationstherapeutischen Gruppe (J-L), vermindert, was eine Abgrenzung der Tumoren gegenüber dem Parenchym erschwerte. Dieser Umstand kann auf einen Abbau von  $\beta$ -Catenin unter Kombinationsbehandlung hinweisen und ermöglicht somit einen relevanten Erklärungsansatz für einen der Wirkmechanismen von CUR in pädiatrischen soliden Lebertumoren. [108]



**Abbildung 33:  $\beta$ -Catenin-Expression und -Verteilung der Tumoren**

Die lichtmikroskopische Analyse der immunhistochemisch gefärbten Paraffinschnitte offenbarte eine deutlich verstärkte Expression von  $\beta$ -Catenin in den Tumoren (*T*) in Relation zum Parenchym (*P*). In der CDDP- (G-I) und kombinationstherapeutischen Gruppe (J-L) war sie geringer ausgeprägt als in der Kontroll- (A-C) und MicC-Gruppe (D-F). Es wurde keine Inhibition der nukleären  $\beta$ -Catenin Translokation beobachtet. Pro Versuchsgruppe ist eine Auswahl von je drei unterschiedlichen Präparaten zu sehen. [108]

Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigen die typischen morphologischen tumorösen Veränderungen. Im Gegensatz zur MicC-Gruppe führt die CDDP- und Kombinationstherapie zu leichten morphologischen und immunhistochemischen Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die  $\beta$ -Catenin-Expression ist in diesen zwei Gruppen vermindert und offenbart so deutliche Hinweise auf einen eventuellen Wirkmechanismus von CUR im orthotopen Tumormodell.

## 4 Diskussion

Im Gegensatz zur Verbesserung des Langzeitüberlebens von Kindern mit malignen Tumoren von 10 auf 80 %, stagnierte es bei Patienten aus den Hochrisikogruppen von pädiatrischen soliden Tumoren, selbst unter Hochdosis-Therapien [35]. Häufige Probleme repräsentieren dabei Rezidive und Chemoresistenzen. Aufgrund der hochspezifischen Wirkung von vielen Zytostatika, können bereits einzelne Mutationen von Tumorzellen zu Resistenzen führen. Aktuelle Therapieansätze von pädiatrischen Hochrisikomalignomen sind daher auf Weiterentwicklungen angewiesen, die, möglichst nebenwirkungsarm, verschiedene intrazelluläre Strukturen beeinflussen und so den Therapieeffekt vergrößern. Einer der am stärksten beforschten und gutverträglichsten Substanzen der Komplementärmedizin stellt CUR dar, welches etliche Wirkungen und diverse intrazelluläre Angriffspunkte in unterschiedlichen Tumorentitäten aufweist. In Hepatomen und RMS sind diese nur wenig bekannt [101, 110]. In dieser Arbeit wurden daher die Auswirkungen einer CUR-Behandlung, sowohl alleine, als auch in Kombination mit aktuellen bzw. potentiellen Therapieansätzen (Zytostatika bzw. PDT) auf mehrere Hepatom- und RMS-Zelllinien untersucht. Die in vitro erzielten Ergebnisse wurden anschließend im komplexen System des orthotopen Mausmodells mit mizellarem CUR überprüft.

### ***4.1 Wirkung von CUR auf die Funktion von $\beta$ -Catenin in etablierten Hepatom-Zelllinien***

Ein Schlüsselprotein im Zusammenhang mit der Entstehung von HB und pHCC ist  $\beta$ -Catenin. Normalerweise wird  $\beta$ -Catenin in Zelladhäsionskomplexen und als Transkriptionsfaktor im Kern gefunden. Im Zytoplasma wird es durch einen Destruktionskomplex bestehend aus den Proteinen Axin, Adenomatous polyposis coli (APC) und Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) gebunden und phosphoryliert, was schließlich zum Abbau führt. Bindet das Molekül Wnt an den Frizzled-Rezeptor, so werden Teile des Destruktionskomplexes membranös gebunden und somit inhibiert.  $\beta$ -Catenin sammelt sich im Zytoplasma an. Es wird dann vermehrt in den Kern

transloziert, wo es als Transkriptionsfaktor für Zellwachstum und Zellproliferation wirkt [13].

In 3.1 konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass CUR in etablierten HB- und pHCC-Zelllinien die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin im Kern reduziert. Dies weist auf eine Funktionsänderung von  $\beta$ -Catenin hin. In der Literatur finden sich mehrere Berichte über CUR als inhibierendes Agens auf die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade, unter anderem in Mamma-, Darm- und Prostata-Tumorzelllinien [111]. So verminderte es die Expression von Proteinen der Signalkaskade wie  $\beta$ -Catenin und Cyclin D1, reduzierte die Wnt-Signalübertragung und aktivierte die GSK-3 $\beta$ . Weiterhin führte CUR über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg zur Apoptose. Unter intratumoraler Injektion im Xenograft-Mausmodell mit Prostatatumorzellen zeigte sich eine verstärkt membranöse Lokalisation von  $\beta$ -Catenin, was zu einer Hemmung des Tumorwachstums um mehr als das Zweifache beitrug [112]. Marvin Xu konnte für mit CUR behandelte HCC-Zellen eine verminderte Aktivität von  $\beta$ -Catenin nachweisen [102]. Diese wird darauf zurückgeführt, dass CUR die membranöse Bindungsstelle von Axin, einem Protein des Destruktionskomplexes, blockiert, wodurch dieses, trotz aktiviertem Frizzled-Rezeptor, im Destruktionskomplex verbleibt. Dadurch behält dieser seine Funktion bei und  $\beta$ -Catenin wird weiterhin für den Abbau gekennzeichnet.

Durch CUR verursachte Veränderungen im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg von pHCC- und HB-Zellen existieren bisher keine Publikationen. Ob die in dieser Arbeit gezeigte Hemmung der nukleären  $\beta$ -Catenin-Translokation mit einer verringerten Aktivität als Transkriptionsfaktor einhergeht, müsste untersucht werden, beispielsweise mit einem Promoter-Luciferase-Assay. Hierbei würde ein Reportergen, das für die Luciferase codiert und nach Transkription zur Lumineszenz führt, mit  $\beta$ -Catenin abhängigen Genen gekoppelt und mittels Vektor in den Zellkern geschleust. Die Ergebnisse aus 3.5.4 zur verminderten Expression von  $\beta$ -Catenin unter Kombinationstherapie, welche mit einer signifikanten Reduktion des AFP-Spiegels einhergehen, weisen auf einen Abbau von  $\beta$ -Catenin hin. Dies würde in einem Funktionsverlust resultieren (vergl. 4.5).

## **4.2 Wirkung von CUR auf das Zellüberleben von verschiedenen Hepatom- bzw. RMS-Zelllinien**

Wie in 3.2.1 gezeigt, führt CUR zu einem deutlichen Viabilitätsverlust pHCC- und HB-Zellen. Die viabilitätseinschränkende Wirkung von CUR ist Gegenstand der Forschung seit den 1980er Jahren und konnte bereits für etliche Tumoren in vitro und in vivo bewiesen werden [101, 113]. Hierzu zählen neben den Malignomen des Verdauungstraktes auch Brust-, Lungen-, Hirn-, Knochen-, urologische, hämatologische und weitere Tumoren. Zu Rectum- und Pankreas-Karzinom existieren bereits Daten aus klinischen Phase II-Studien [71, 72], die auf einen präventiven Effekt bezüglich ACF (*aberrant crypt foci*) hindeuten. Eine vorübergehende Regression eines Pankreaskarzinoms konnte bei einem Patienten beobachtet werden. Hinsichtlich hepatischer Malignome existieren ebenfalls einige Publikationen, die einen antiproliferativen Effekt von CUR offenbaren. In vitro wurde dies, unter anderem, für die Zelllinien HepG2, HuH7, Hep3B, Hepa1-6, und HA22T/VGH veröffentlicht [114-117]. Die angewandten CUR-Konzentrationen lagen zwischen 3,7 und 66,3 µg/ml und waren damit vergleichbar mit den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von 1 bis 80 µg/ml. Auch die erzielten IC50 lagen in ähnlichen Größenordnungen [118, 119]. In den meisten Fällen konnte eine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden. CUR kann je nach Zelllinie sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Apoptoseweg initialisieren [120]. Eine Aktivierung des intrinsischen Pathways scheint häufiger aufzutreten [121]. Jedoch gibt es auch einige Veröffentlichungen, die die Hochregulierung des extrinsischen Pathways beschreiben, beispielsweise in pankreatischen Tumor- und Chondrosarkomzellen [122, 123]. Bezüglich des Wirkmechanismus von CUR beschreibt die Literatur einen Einfluss auf eine Vielzahl verschiedener pro- und anti-apoptotisch wirksamen Signalwegen und deren Schlüsselproteine wie unter anderem FAS-Rezeptor, Caspase 3/8 und NFκB [111]. Darüber hinaus führt eine CUR-Behandlung auch zur Generierung von ROS und zur Dezimierung von spezifischen Subpopulationen, wie CSCs [50]. Beide letztgenannten Wirkmechanismen wurden in dieser Arbeit untersucht (s. 3.3.5 und 3.3.6) und werden unter 4.3 diskutiert.

Für HC-AFW1, HuH6 und HepT1 existieren bisher keine Publikationen in Zusammenhang mit einer CUR-Behandlung. MicC übt eine vergleichbare Wirkung auf

Hepatomzellen aus. Die Reduktion der IC50 im Vergleich zu reinem CUR ist nicht signifikant. Im Vergleich hierzu existieren in der Fachliteratur zu CUR-Analoga Veröffentlichungen mit sowohl signifikanten als auch nicht signifikanten IC50-Unterschieden bezüglich nativem CUR [124-126]. Wird das MicC in vivo oral verabreicht, zerschellen die Mizellen jedoch an der Darmwand und nur reines CUR gelangt in die Blutbahn. Daher beweist dieser Versuchsteil lediglich die Intaktheit der Mizellen und die Fähigkeit der Zellen CUR aus der mizellaren Lösung heraus zu resorbieren.

Die in dieser Arbeit größtenteils angewandten Inkubationszeiten mit CUR und MicC betragen 48 h. Aufgrund der raschen Degradation und des zügigen intestinalen bzw. hepatischen Abbaus, besitzt CUR im tierischen und menschlichen Organismus eine Halbwertszeit, die deutlich kürzer ist [90]. Auch in 3.2.2 konnte aufgezeigt werden, dass eine längere Exposition für die Wirkung von CUR und MicC einen wichtigen Faktor darstellt. Für ähnliche Viabilitätseinbußen wie nach 48-stündiger CUR-Inkubation werden unter verkürzter, einstündiger Inkubationsdauer doppelt so hohe Konzentrationen benötigt.

Eine weitere bekannte Tatsache bezüglich CUR ist die Kombinationsmöglichkeit mit Zytostatika [127]. Für Hepatomzellen wurde in dieser Arbeit CDDP verwendet, was zusammen mit Doxorubicin der von SIOPEL erstellten Empfehlung für die medikamentöse Behandlung von HB und pHCCs entspricht (*PLADO*). Der Versuch 3.2.3 offenbarte eine deutliche Reduktion der IC50 von CDDP bei allen vier Hepatomzelllinien unter Kombinationstherapie von CUR und CDDP. Die Wirkung beider Substanzen ist additiv. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für andere Zelllinien, wie zum Beispiel für Larynx- und Zervixkarzinomzellen, veröffentlicht [128, 129]. In der Lebertumorzelllinie HA22T/VGH wurden für CUR und CDDP synergistische Effekte nachgewiesen [117]. Weiterhin ist es relevant zu welchem Zeitpunkt die Agenzien auf die Zellkulturen gegeben werden. So konnte unter anderem in Ovarialtumorzellen nachgewiesen werden, dass eine der CDDP-Behandlung um zwei Stunden vorangehende CUR-Gabe zu den größten Viabilitätseinbußen führt [80]. Wird CUR deutlich früher als CDDP oder danach verabreicht, können statt synergistischen Effekten antagonistische auftreten. Darum wurde auch in dieser Arbeit CUR zwei Stunden vor CDDP auf die Zellen gegeben. Zur Kombination von CUR mit weiteren

Zytostatika existieren bereits mehrere klinische Phase I- und Phase II-Studien, beispielsweise zu metastasiertem Mamma- und Pankreaskarzinom [70, 73]. Die Ergebnisse aus 3.2.3 sind nicht nur hinsichtlich der Erhöhung des tumortoxischen Effekts interessant. Die Kombination mit CUR bringt weitere Vorteile mit sich. In Ovarial- und Zervixkarzinomzellen wurden inhibitorische Eigenschaften von CUR auf Interleukine und den NFκB-Signalweg beschrieben, denen eine relevante Rolle in der Resistenzbildung gegenüber Zytostatika, bis hin zu einer *Multi-Drug-Resistance* (MDR), zugeschrieben wird. Darüber hinaus sind der Einfluss auf den NFκB-Signalweg, die Reduktion des TNF-α-Blutspiegels sowie die Funktion als potentes Antioxidans unter anderem verantwortlich für chemo- und radioprotektive Eigenschaften von CUR in gesunden Zellen [127, 130]. Zusammenfassend könnte eine Kombinationstherapie, durch niedrigere Zytostatika-Konzentrationen und CUR, resistenzvorbeugend wirken und zu einer deutlichen Besserung des problematischen Nebenwirkungsspektrums von CDDP, wie Neuro-, Oto- und Nephrotoxizität, führen.

Auch für die zu den Weichteiltumoren gehörenden RMS-Zelllinien RH30, RD und A204 wurde in 3.2.1 eine signifikante Viabilitätsabnahme unter aufsteigenden CUR-Konzentrationen festgestellt. In der Fachliteratur sind ähnlich Effekte von CUR für die RMS-Zelllinien RH30, RH1, A204, G401 und BT16 beschrieben [110, 131]. Die Aktivierung der Apoptose besitzt große Relevanz. Masuelli et al. beschrieben sie als p53-unabhängig, was von Vorteil bei der Behandlung von p53-defizienten Tumoren sein könnte [132]. CUR scheint teilweise seine Wirkung über eine Hemmung von mTor-vermittelten zellulären Signalwegen auszuüben [110, 133]. Veröffentlichungen zu mit CUR behandelten RMS-Zellen bezüglich der Inhibition auf den NFκB-Signalweg existieren bisher nicht. NFκB reguliert auch die Differenzierung von Muskelzellen, welche sich umgekehrt proportional zum Metastasierungspotential von RMS-Zellen verhält. Berger et al. publizierten 2012, dass CUR nicht geeignet sei um die Differenzierung von RMS-Zellen zu fördern und damit unpassend für eine Therapie des RMS [134]. Hinsichtlich der niedrigen IC50-Werte aus 3.2.1, die ein gutes Ansprechen einer CUR-Behandlung zeigen, sollte die Suche nach zellulären Wirkmechanismen von CUR jedoch fortgeführt und die Einbindung in neue Therapieschemata intensiv betrachtet werden.

Hierfür sprechen auch die Ergebnisse aus 3.2.4 zur Kombinationstherapie mit CUR und Doxorubicin auf RMS-Zellen. Diese verursacht eine deutliche Reduktion der IC50 von Doxorubicin. Für RH30 und RD zeigt sich eine additive, für A204 eine synergistische, Wirkung beider Substanzen. Für diese Substanzkombination in Bezug auf RMS-Zellen gibt es bisher keine Veröffentlichungen. Vergleichbare Ergebnisse wurden unter anderem mit Tumorzellen aus Prostata, Brust und Gliomen publiziert [127]. In Leberzellen erbrachte eine Kombinationsbehandlung von CUR und Doxorubicin additive Viabilitätseinschränkungen [117]. Chemoprotektive Eigenschaften von CUR offenbarten sich unter anderem bezüglich der Kardio- und Nephrotoxizität von Doxorubicin in Ratten [127]. In vitro wurde allerdings auch beschrieben, dass CUR kardiale Nebenwirkungen von Doxorubicin, aufgrund der Produktion von ROS, verstärken kann [135].

### ***4.3 Wirkung einer PDT mit CUR auf die Viabilität von Hepatomzellen***

Eine weitere Möglichkeit die zellviabilitätseinschränkende Wirkung von CUR zu potenzieren, ist die Verwendung im Zuge einer PDT. Die PDT stellt ein Therapiekonzept dar, welches bereits klinische Anwendung, beispielsweise mit dem Photosensitizer Photofrin, erfährt [136]. Dazu werden Zellen durch bestimmte Substanzen photosensibilisiert und anschließend mit Licht von Wellenlängen, die dem jeweiligen Absorptionsspektrum entsprechen, bestrahlt. Wie aus 3.3.1 hervorgeht, führt eine PDT mit CUR, sowohl in subkonfluenten als auch in dichten Hepatomzellkulturen, zu signifikanten Viabilitätsverlusten. Dabei ist die ermittelte IC50 von CUR, verglichen mit der Monotherapie, zu deutlich niedrigeren Konzentrationen verschoben. Die vorherige Aufnahme von CUR in die Zelle ist Bedingung für die potenzierende Wirkung der Belichtung. Eine reine Bestrahlung ohne vorherige CUR-Inkubation resultiert in geringen Viabilitätsverlusten (s. 3.3.4). Für pHCC- und HB-Zelllinien existieren bisher diesbezüglich keine Veröffentlichungen. Tønnesen et al. bewiesen bereits im Jahr 1987 die hohe Photozytotoxizität von CUR an Salmonella Typhimurium und Escherichia Coli [137]. Dies konnte in mehreren unterschiedlichen Studien auch für Tumorzellen nachgewiesen werden, wie für Nasopharyngeal-, Zervix-, Lewis-Lungen-

Karzinomzellen u.a. [138]. Wie in 3.3.1 wurde auch in diesen Publikationen eine hohe Zytotoxizität schon unter micromolaren CUR-Konzentrationen festgestellt. Belichtung alleine führte zu keiner signifikanten Viabilitätsabnahme. Die Wellenlänge entsprach dem Absorptionsmaximum von CUR in neutralem Milieu (420 nm). Je nach pH-Wert variiert das Absorptionsmaximum zwischen 420 und 530 nm [139]. Im basischen Milieu liegt es bei ca. 480 nm. Die Inkubationszeiten in der Fachliteratur zur PDT mit CUR vor der Belichtung betragen in den meisten Fällen zwischen 20 und 60 min [82, 140, 141]. In 3.3.2 wurde gezeigt, dass bei Inkubationszeiten über 60 min der die Zellviabilität betreffende photodynamische Effekt signifikant sinkt. Dies spricht für eine zeitabhängige Reduktion des photoaktivierbaren CURs. Einen wahrscheinlichen Grund hierfür repräsentiert die zügige Metabolisierung und Degradation von CUR (vergl. 4.4). Eine kürzere Inkubationszeit der Hepatomzellen mit CUR vor Belichtung ist nicht sinnvoll, da der intrazelluläre CUR-Gehalt und damit die Photosensibilität bis zur Vollendung der ersten Inkubationsstunde stark ansteigt (s. 3.4.1).

In der Hoffnung das Problem der geringen Bioverfügbarkeit von CUR durch eine Belichtung zu umgehen, führen die herausragenden Ergebnisse der PDT zur Fragestellung der klinischen Umsetzbarkeit. Die Belichtung könnte dabei entweder nicht-invasiv von außen oder invasiv, im Zuge einer Laparoskopie, lokal an der Leber erfolgen. Für hepatische Tumoren existieren diesbezüglich keine Veröffentlichungen. Dujic et. al. untersuchten die Kombinationsbehandlung jedoch an einem Xenograft-Mausmodell mit subkutan injizierten epidermoiden A431-Zellen. Die CUR-Gabe erfolgte intraperitoneal, die anschließende Belichtung wurde nicht-invasiv von außen mit einem Abstand von 45 cm durchgeführt (5 min, 10 x 40 W,  $\lambda_{Em} = 400 - 550$  nm). Das Resultat zeigte, dass eine signifikante Reduktion der Tumorgrößen nur durch die Kombinationstherapie CUR/Belichtung stattfand [140]. Ob das Konzept auf das in dieser Arbeit angewandte orthotope Lebertumormodell übertragbar ist, müsste überprüft werden. Mögliche Schwierigkeiten könnten unter anderem in der eingeschränkten Reichweite der Belichtung liegen, da intrahepatische Tumoren von mehr Gewebe umgeben sind als subkutane. Als Alternative würde eine lokale, invasive Belichtung, im Zuge einer Laparoskopie, dienen. Deren Umsetzung ist im Mausmodell schwierig, an Patienten jedoch machbar. Aufgrund des hohen Cytochromgehalts der Leberzellen, sind diese besonders lichtempfindlich. Um den hepatischen Schaden einzugrenzen, könnte

eine Belichtung demnach nur in kleineren, klar abgegrenzten Bereichen erfolgen. Die Auswirkungen der PDT auf weitere Gewebearten sind auf Seite 88 und 89 diskutiert. Klinische Studien zur PDT mit CUR liegen bisher nicht vor. Die starken viabilitätssenkenden Effekte sowohl in vitro als auch in vivo sind in dieser Hinsicht jedoch vielversprechend. Sie stellen einen interessanten Lösungsansatz bezüglich der mit der geringen Bioverfügbarkeit einhergehenden eingeschränkten CUR-Wirkung dar.

Die kürzeren Inkubationszeiten und das stärkere Zellsterben unter PDT mit CUR werfen die Frage nach den Wirkmechanismen auf. Die Resultate aus 3.3.3 offenbaren unter PDT eine deutliche Beschleunigung des Zellsterbens. Im Gegensatz zu unbelichteten Zellpopulationen, befindet sich der Großteil der photodynamisch exponierten Zellen bereits nach 3 h im Sterbeprozess. Dies ist hinweisend auf einen Unterschied zwischen den Wirkmechanismen der PDT und der CUR-Monotherapie. Bisher wurde weder ein eindeutiger Grund für die Potenzierung der Zytotoxizität noch ein Hauptwirkmechanismus der PDT mit CUR gefunden. Ein Erklärungsansatz für den erhöhten zytotoxischen Effekt unter PDT ist in der starken Bindungstendenz von CUR zu zahlreichen Proteinen begründet: Ein Energietransfer von einer Lichtquelle über CUR auf das gebundene Protein ist wahrscheinlich. Der von CUR exerzierte Einfluss auf das Protein würde durch die Belichtungsenergie verstärkt [138]. Diese Hypothese wird durch die Resultate aus 3.3.4 unterstützt. Sie zeigen, dass eine zelluläre CUR-Aufnahme vor Belichtung, und somit eine eventuelle Bindung an intrazelluläre Proteine, für das Ausmaß des viabilitätseinschränkenden Effekts Voraussetzung ist.

In der Fachliteratur weisen einige Studien eine photoaktivierte Zytotoxizität von CUR durch ROS-Produktion, DNA-Fragmentierung und Apoptoseaktivierung auf [81-84]. Zudem wurde ein Einfluss auf die Membranfluidität mit Änderung von Funktionen von integralen Membranproteinen beschrieben [138]. Dujic et al. zeigten eine Reduktion des Zellteilungsmarkerproteins KI-67 sowie eine Inhibition von *Extracellular regulated kinases* (ERK) 1/2 und des *Epidermal growth factor receptor* (EGF-R), was eine Apoptose induzieren kann [140]. Die meisten dieser Mechanismen wurden ebenfalls ohne Belichtung, unter CUR-Monotherapie berichtet [111]. Die Auswirkungen einer PDT mit CUR auf die Generierung von Sauerstoffradikalen und die Zusammensetzung von Subpopulationen wurden in dieser Arbeit genauer betrachtet.

Aus 3.3.5 resultiert eine deutliche Generierung von ROS in allen untersuchten Hepatomzelllinien unter PDT mit CUR. Eine Behandlung ohne Belichtung besitzt kaum Einfluss auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Dahl et al. wiesen bereits 1994 die Notwendigkeit von Sauerstoff und die Bildung von ROS im Zusammenhang mit der Photozytotoxizität von CUR am leukämischen Zellmodell in der Ratte nach [84]. Auch in Adenokarzinomzellen der Lunge, sowie in CDDP-resistenten Ovarialtumorzellen wurde die Relevanz der durch eine PDT entstandenen Sauerstoffradikale gezeigt [142, 143]. Doch die photochemischen Eigenschaften von CUR unterscheiden sich abhängig von den äußeren Umständen der Versuche [84]. Dies spiegelt sich in den Möglichkeiten von CUR, multiple Signalwege zu beeinflussen, wider. So existieren auch Veröffentlichungen, in denen keine ROS-Produktion festgestellt wurde [83, 138]. Darüber hinaus besitzt CUR in primären Zellkulturen die Eigenschaft eines bifunktionellen Antioxidans. Zum einen ist CUR ein direkter Radikalfänger, zum anderen induziert es die Hochregulierung zellprotektiver Proteine über den *Nuclear factor erythroid-derived 2* (Nrf2), wie unter anderem der Superoxid-Dismutase und der Katalase [130]. Aufgrund der widersprüchlichen Funktionen von CUR (ROS-Produzent vs. Antioxidans), wird es als „autodestruktiver Photosensitizer“ beschrieben [83]. Bei den in dieser Arbeit getesteten Hepatomzellen steht die Bildung von ROS unter PDT jedoch klar im Vordergrund.

Der zweite betrachtete Ansatzpunkt auf der Suche nach den Wirkmechanismen der PDT ist der Einfluss auf die Zusammensetzung der Subpopulationen in Hepatomzellkulturen. Hierunter fallen unter anderem auch die CSCs (*tumor stem cells, tumor stem-like cells*), welche zunehmend in Diskussionen über Faktoren der Tumorgenese und Therapieresistenzen auftreten. Das Vorhandensein solcher pluripotenten Stammzellen mit Eigenschaften zur Selbsterneuerung und zur Kontrolle über die Differenzierung des Tumors, ist nicht vollständig bestätigt. Dessen ungeachtet bestehen etliche Publikationen, die über Tumorsubpopulationen mit besonderen Charakteristika berichten [144]. Erstmals beschrieben wurden CSCs für verschiedene Malignome des hämatopoetischen Systems [145, 146]. Für HCC-Zellen konnten CSCs mittels Antikörpern gegen Antigene wie CD90, CD133, ABCB5 und EPCAM detektiert werden [147-149]. In dieser Arbeit wurden HEK-6D6-Antikörper verwendet, welche an spezifische Antigene mesenchymaler Stammzellen binden. Aufgrund der geringen

Erfahrung mit dem Hek-6D6-Antikörper, sollte das hier durchgeführte Experiment mit Vorbehalt betrachtet werden und weitere Charakterisierungen der untersuchten Subpopulationen angestrebt werden. Der Versuch 3.3.6 offenbart unter PDT mit CUR, bereits nach kurzer Inkubationszeit, eine Verringerung von HEK-6D6-positiven Subpopulationen. Diese ist etwas stärker als nach 24-stündiger CDDP-Behandlung. Unter CUR-Monotherapie wurde eine leichte Abnahme der genannten Subpopulationen erzielt. Eine sichtbare Auswirkung mit einer Verringerung der gesamten Tumormasse würde erst nach längerer Zeit eintreten, da die Wirkung über den fehlenden Prozess der Zellselbsterneuerung entfaltet wird [40]. Vergleichbare Literatur zu CUR-Behandlungen in hepatischen Zellkulturen wurde bisher nicht publiziert. Die Existenz von CSCs in kindlichen Hepatomen ist weiterhin strittig. Jedoch gibt es diverse Studien, die spezifische Oberflächenmarker und Subpopulation mit besonderen Zelleigenschaften beschreiben und damit starke Argumente für das Vorhandensein von CSCs aufweisen [40]. Maßnahmen, wie der Nachweis von für die MDR mitverantwortlichen ABC-Transportern und der synchrone Einsatz von mehreren Oberflächenmarkern, sollten ergriffen werden um solche Subpopulationen besser abzugrenzen. Unter Ersteres fällt die Messung des Efflux aus den Zellen des DNA-bindenden Farbstoffs Hoechst 33342. In anderen Tumorentitäten wurden für CUR einige CSC-dezimierende Effekte beschrieben. Hierzu zählt die Verringerung von CSCs in Medullo- und Glioblastomen, im Pankreas, im Kolon und in der Mamma (über eine Inhibition des Wnt-/β-Catenin-Signalwegs) [50]. Normale Stamm- und differenziertere Zellen wurden nicht oder nur wenig in Mitleidenschaft gezogen. Einige Autoren publizierten Hinweise, dass sogar vorwiegend Subpopulationen von Zellkulturen mit CSC-Charakteristika vernichtet werden [141]. In Kombination mit Dasatinib wirkte CUR über eine Reduktion von CSCs gegen 5-Fluorouracil- und Oxaliplatin-resistente Kolontumorzellen [150]. Gerade die Inhibition des Wnt-/β-Catenin-Signalwegs sowie die Überwindung von Resistenzen gegen Platin-haltige Chemotherapeutika sind für pHCC- und HB-Kulturen von großer Relevanz. Sie schaffen Hoffnungen die Überlebensraten der schwer zu therapierenden Hochrisikohepatome zu senken. Resistenzen gegen CDDP und die Rolle hierbei von CSCs wurden in der Fachliteratur beschrieben [149]. Die in 3.3.6 gezeigte dezimierende Wirkung von CDDP auf Hek-6D6-positive Zellkulturen könnte, unter Kombination mit CUR, ebenfalls zu einem resistenzvorbeugenden Therapieschema führen. Zhang et al.

veröffentlichten 2013, dass die Kombinationstherapie (CDDP/CUR) in Larynxkarzinomzellkulturen in einer deutlichen Verringerung von CD133-positiven Zellen resultiert [128]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus 3.3.6 wies er eine leichte Erhöhung dieser Zellfraktion unter CDDP-Monotherapie auf, was, aufgrund der Rolle der CSCs bezüglich Resistenzen gegen CDDP, sinnvoll erscheint. Die in dieser Arbeit durch CDDP verursachte Reduktion der Hek-6D6-positiven Populationen weist auf eine Resistenzfreiheit der getesteten Hepatomkulturen hin.

Den stärksten vermindernden Effekt auf Hek-6D6-positive Zellen, verglichen mit der CUR- und CDDP-Monotherapie, besitzt die PDT (s. 3.3.6). Bislang sind keine Publikationen zu Auswirkungen einer PDT mit CUR auf spezifische Subpopulationen von Zellkulturen bekannt. Diverse Autoren veröffentlichten jedoch Resultate mit anderen Photosensitizern. So wurde gezeigt, dass in Kolorektal- und Kopfhaltumoren mit *5-Aminolävulinsäure* (5-ALA) der CSC-Anteil verringert werden kann [151, 152]. Für Erstere wurde durch Inhibition von Autophagieprozessen eine Steigerung der Sensibilität von CSCs gegenüber der PDT erreicht. Für Letztere wurde ein synergistischer Effekt der 5-ALA-PDT und CDDP beschrieben. Bostad et al. verwendeten Immuntoxine als Photosensitizer um spezifisch CD133-positive Subpopulationen aus Kolon- und Pankreastumorzellkulturen mit einer PDT zu behandeln [153]. Die zielgerichtete Applikation des Photosensibilisators verhindert die Eliminierung von normalen Stammzellen, welche ebenfalls CD133 exprimieren können. Von sogenannten Aptameren werden den Tumor bzw. die CSCs kennzeichnenden Moleküle gebunden und darüber gekoppelte Photosensitizer zu den entsprechenden Lokalisationen transportiert [154]. Auch hinsichtlich CUR existieren bereits synthetische Derivate, beispielsweise in Form von Nanopartikeln, welche an bestimmte Zielstrukturen im Körper binden und CUR so zum gewünschten Ort der Wirkung befördern [92]. Eine Einbindung dieser Substanzen in eine PDT wäre aufschlussreich. Doch wie in 3.3.6 gezeigt, führt bereits die Verwendung von nativem CUR im Zuge einer PDT, in Hek-6D6-positiven Zellkulturen zu zytotoxischeren Effekten als in gewöhnlichen Hepatomkulturen.

Generell weisen Tumorzellen einen aktiveren Stoffwechsel und besondere Charakteristika auf, weshalb Photosensibilisatoren von ihnen verstärkt aufgenommen werden [154]. Auch die massenspektrometrischen Untersuchungen in 3.5.1 ergaben

höhere CUR-Konzentrationen in den Tumorknoten als im umgebenen Lebergewebe. Im Hinblick auf eine klinische Anwendbarkeit einer systemischen CUR-Gabe und der PDT sind die Auswirkungen beider Therapiekonzepte auf normale Körperzellen relevant. Die Resultate aus 3.3.7 offenbaren für primäre Fib3-Kulturen eine niedrigere Zytotoxizität von CUR als für die getesteten Hepatomzellen. Unter zusätzlicher Belichtung fällt die vitale Zellanzahl dagegen gleichsam stark ab. In der Literatur existieren ähnliche und gegensätzliche Resultate. Die toxischere Wirkung von CUR in entarteten als in normalen Zellen wird nicht zuletzt mit den protektiven Eigenschaften von CUR in primären Kulturen erklärt. So fängt es einerseits durch seine chemische Struktur ROS ab, andererseits induziert es die Expression von zellprotektiven und antioxidativen Proteinen durch den Transkriptionsfaktor Nrf2. Hierüber entfaltet CUR auch Wirkungen gegen mitochondriale Störungen [155]. Darüber hinaus verfügen entartete Zellen zum einen häufig eine gesteigerte CUR-Aufnahme und zum anderen Mutationen in jenen Signalwegen, die durch CUR manipulierbar sind, beispielsweise NFκB [138]. Dujic et al. zeigten mittels des Zellproliferationsmarkers Bromdesoxyuridin, mit denen dieser Arbeit vergleichbare Ergebnisse in diversen primären Zellkulturen, darunter auch Keratinozyten und Fibroblasten [156]. Sie wiesen unter reiner CUR-Behandlung ( $C_{CUR} \leq 1 \mu\text{g/ml}$ ) keinen Effekt auf, unter PDT allerdings einen bereits mit Konzentrationen von unter  $1 \mu\text{g/ml}$ . Vermittelt wurde dies unter anderem über die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c, die Aktivierung von Caspase 8 und 9 sowie die Inhibition von NFκB. Dagegen berichteten Lundvig et al. eine ROS-Produktion und eine Caspase-unabhängige Apoptoseinduktion unter CUR ( $C_{CUR} = 25 \mu\text{M} \sim 9,2 \mu\text{g/ml}$ ) in Fibroblasten [157]. Eine Hochregulierung zellprotektiver Proteine wurde detektiert. Atsumi et al. publizierten, dass Gingiva-Fibroblasten unter CUR und vor allem unter zusätzlicher Belichtung sensibler sind als Tumorzellen des Zahnfleischs [158]. Die Aussagen sind widersprüchlich und erfordern weitere Untersuchungen. Empfehlenswert wären auch Versuche an nicht proliferierenden primären Zellen, da sie ein realistischeres Modell des Organismus als die in dieser Arbeit verwendeten schnell proliferierenden Fib3-Zellen darstellen. Am verlässlichsten in Bezug auf Toxizitätsuntersuchungen sind in vivo Studien, bei denen beispielsweise eine PDT an der Haut durchgeführt wird. Dujic et al. führten eine PDT an subkutanen Epidermoidtumoren in der Maus durch, ohne dass diese an Gewicht verloren [140].

Hautschäden wurden nicht beschrieben. Mikroskopische Analysen von Hautproben wären bei solchen Studien sinnvoll. Relativ einheitlich zeigen die Resultate die hohe Empfindlichkeit von Fibroblasten bezüglich einer CUR-PDT auf. Das therapeutische Fenster der CUR-Behandlung und der PDT wurden, aufgrund der schlechten Übertragbarkeit des Modells auf den lebenden Organismus, in dieser Arbeit nicht bestimmt. In Mitleidenschaft könnten, neben den Tumoren und der Haut, auch andere schnell proliferierende Zellen, wie Blut- und Schleimhautzellen, gezogen werden. Um gesundes Gewebe zu schonen, sollte daher, im Hinblick auf eine klinische Anwendung der PDT, die Belichtung für tiefer liegende Schichten und innere Organe lokal, beispielsweise im Zuge einer Laparoskopie, in Betracht gezogen werden. Doch auch bezüglich der Belichtung von Hepatozyten sollten weitere Versuche vorgenommen werden. Aufgrund des hohen Gehaltes an Cytochromen, ist ein zytotoxischer Effekt einer PDT ebenfalls wahrscheinlich.

#### ***4.4 Metabolisierung von CUR in RMS- und Hepatomzellen***

Ein großes Problem einer Therapie mit CUR stellt die unzureichende orale Bioverfügbarkeit dar, die in der dürftigen intestinalen Resorption, der zügigen Metabolisierung durch den Verdauungstrakt und der geringen chemischen Stabilität von CUR begründet ist [85, 88, 89, 91].

Die zelluläre Aufnahme von CUR in Hepatomkulturen, sowohl aus CUR- als auch aus MicC-Lösungen, ist unter 3.4.1 beschrieben. Sie erfolgt erwartungsgemäß umso stärker, je höher die gewählte Konzentration beträgt. Die größte Menge an CUR wird innerhalb der ersten Stunde aufgenommen. Dies ist der Grund, warum für eine PDT die Belichtung erst nach einer Stunde Inkubation durchgeführt wurde. Veröffentlichungen in der Fachliteratur bestätigen dies [82, 141]. Das CUR wurde in DMSO vorverdünnt, da hohe Konzentrationen schwer wasserlöslich sind. Für die hohen Konzentrationen sind die Resultate deswegen nur eingeschränkt auf das in vivo Modell übertragbar. Im Gegensatz dazu wurde MicC nicht in DMSO vorverdünnt. Die Zellen offenbaren jedoch eine Sättigung ab 5 – 10 µg/ml MicC. Jede Mizelle enthält lediglich 6 % CUR. Eventuell stellt die Masse an Mizellenresten nach Entladung des CUR ein Hindernis für die Aufnahme dar. Der Mechanismus der zellulären Aufnahme von CUR ist bisher nicht

geklärt. Möglich wären sowohl eine freie Diffusion durch die Zellmembran als auch ein aktiver Transport. Vareed et al. stellten in menschlichen Probanden ab einer oralen CUR-Dosis von 10 g keinen weiteren Anstieg des CUR-Blutspiegels fest. Dies könnte mit einer Sättigung von Transportern erklärt werden [159]. Lee et al. wiesen nach, dass die biliäre Ausscheidung von CUR durch das *multidrug resistance-associated protein drug 2* erfolgt [160]. Ob dieses oder ähnliche Proteine in anderen Zellen auch für einen Transport von CUR über die Zellmembran zuständig sind, ist unbekannt.

Auch die Metabolisierung von intrazellulärem CUR wurde in 3.4.1 betrachtet. Bereits nach einem Tag konnte CUR durchflusszytometrisch nicht mehr detektiert werden. Der Verlust der Fluoreszenz von CUR weist auf eine Veränderung der Struktur hin. Es ist bekannt, dass CUR rasch in intestinalen und hepatischen Zellen erst in Hydrocurcuminoide reduziert und anschließend vorwiegend glucuronidiert bzw. sulfatiert wird [88, 89]. Die in vivo Resultate aus 3.5.1 belegen dies ebenso. Auch Hepatomzellen können, aufgrund ihrer Herkunft, hepatische Enzyme besitzen. Der Verlust von Doppelbindungen durch eine Reduktion geht mit einer verminderten Fluoreszenzaktivität einher. Eine Umwandlung von CUR in den getesteten pHCC- und HB-Zellen in Hydrocurcuminoide, ist daher wahrscheinlich. Vareed et al. berichteten über sie eine geringere zytotoxische Wirkung als über normales CUR [159]. Dies unterstreichen die Ergebnisse aus dem Versuch 3.2.2. Hier wurden Hepatomkulturen für 1 h mit CUR versetzt und anschließend für 48 h mit CUR-freiem Medium inkubiert. Die Viabilitätseinbußen fielen, im Vergleich zur normalen zweitägigen Inkubationsdauer mit CUR, deutlich geringer aus. Dies liegt an der kleineren Menge von CUR, der die Zellen, aufgrund der kürzeren Expositionsdauer zu CUR, ausgesetzt sind. Das in der ersten Stunde aufgenommene CUR wird zügig metabolisiert und somit in seiner Wirkung abgeschwächt.

Die Ergebnisse aus 3.4.2 belegen die Metabolisierung von CUR. Die Fluoreszenz des extrazellulären CUR wurde sowohl in Hepatom- als auch in RMS-Zellkulturen untersucht. Sie schwindet zeit-, konzentrations- und zelltypabhängig. RMS-Kulturen weisen eine geringere Metabolisierung als Hepatomkulturen auf. Der Vergleich mit den Viabilitätswerten aus 3.2.1 deutet auf eine negative Korrelation zwischen Umsatz und Zytotoxizität hin. Dies könnte in unterschiedlich starken Ausprägungsformen der CUR-abbauenden Enzymkonstellationen wie Alkoholdehydrogenase, UDP-

Glucuronosyltransferase (UGT), Glutathion-S-Transferase, Lipoxygenase und Cyclooxygenase, begründet sein. Cytochrom P450-Proteine sind laut aktuellen Studien nicht beteiligt [161]. Die Unterschiede zwischen den Tumorentitäten RMS und pHCC/HB bestätigen die These einer negativen Korrelation von Umsatz und Toxizität. RMS-Zellen offenbaren eine geringe IC<sub>50</sub> und eine schwache Metabolisierung von CUR. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die oben genannten Enzyme weniger in RMS-Zellen sondern vorwiegend in denen des Verdauungstrakts vorkommen [161]. Um den ausgeprägten Umsatz von CUR in solchen Zellen zu mindern existieren mehrere Lösungsansätze. Hierzu gehört beispielsweise der Einsatz von stabileren CUR-Analoga oder von Enzym-inhibierenden Substanzen wie Piperin, welches die UGT hemmt [54]. Die Metabolisierungsmechanismen in anderen Zellen sind unzureichend geklärt. Ein Umsatz von CUR konnte jedoch auch anderen, nicht dem Verdauungstrakt angehörigen Organen, beispielsweise der Niere, nachgewiesen werden [162]. Weiterhin steht die oben diskutierte Interaktion mit etlichen intrazellulären Molekülen fest.

Wie in 3.4.2 an zellfreien Ansätzen gezeigt, unterläuft CUR jedoch auch einer chemischen Degradation. Diese wird durch den Stand der Wissenschaft bestätigt, welche Metzler et al. 2012 zusammenfassten [161]. Die Halbwertszeit liegt in serumfreiem Zellmedium bei 10 min, in mit Kälberserum versetztem Medium oder in menschlichem Blut allerdings bei 8 h. Die Degradation verläuft vorwiegend autooxidativ, teilweise auch durch die Lipoxygenase und Cyclooxygenase katalysiert. Sie wird gefördert durch ein alkalisches Milieu (pH > 6,5), Sauerstoff- und Lichtexposition. Zu den Abbauprodukten gehören Bicyclopentadione, Ferulasäure und Vanillin. Für letzteres wurden zellprotektive Eigenschaften beschrieben, die denen von CUR ähneln [163]. Die Wirkungen dieser Substanzen sind wenig bekannt.

Der Einfluss von sichtbarem, blauem Licht auf die Degradation von CUR wurde in 3.4.4 analysiert. Die Fluoreszenz von CUR nimmt unmittelbar nach Exposition ab. Da die Ansätze keine Zellen enthielten, ist dies auf die photochemische Degradation zurückzuführen. Die Degradation ist deutlich stärker als in unbelichteten Ansätzen, in denen sie, aufgrund des mit Kälberserum versetzten Zellmediums, relativ langsam verläuft. In der Fachliteratur ist der beschleunigte Zerfall von CUR durch Licht gut erforscht. Bereits die Verwendung von klaren statt gelben Glasröhrchen während der Probenzubereitung verminderte die Absorptionsrate von CUR um 5 % [163]. Dem

Review von Heger et al. nach ist die photochemische Degradation unabhängig von pH und Sauerstoffgehalt des Milieus und wird vor allem durch von CUR selbstproduzierten ROS vorangetrieben [162]. Die Sonderstellung der photochemischen Degradation von CUR bestätigen auch die von den selbigen Autoren zusammengefassten Zerfallsprodukte, welche außer den gewöhnlichen wie Vanillin und Ferulasäure auch zusätzliche, beispielsweise Vanillinsäure und Ferula-Aldehyd, aufweisen. Weiterhin beschrieben sie ein ROS-unabhängiges *Photo-bleaching* (lichtinduzierte Bleiche) von CUR, dessen Degradationsprodukte sich von den oben genannten unterscheiden. Unabhängig des Mechanismus steht fest, dass CUR durch die photochemische Degradation verändert wird, was zu einer starken Funktionsminderung führen kann. Ungeachtet dessen ist der Einfluss von sichtbarem Licht auf die Stabilität von CUR vor allem für die extrakorporale Handhabung der Proben relevant und weniger für das intrasystemische CUR [161].

Im Gegensatz zu der photochemischen Degradation von CUR steht der Versuch 3.4.3. Er offenbart einen verstärkenden Effekt der Belichtung auf die Fluoreszenz von durchflusszytometrisch gemessenem, intrazellulärem CUR. Dies könnte entweder für eine gesteigerte Aufnahme oder eine verminderte Metabolisierung von CUR nach Belichtung sprechen. Beides könnte in einer Strukturänderung von CUR begründet sein. Die verringerte Metabolisierung ist zusätzlich auch durch den erhöhten Zellstress nach Belichtung erklärbar. Vergleichbare Literatur zu CUR existiert nicht. Zu anderen Substanzen, beispielsweise zu Tetrapyrrolen, beschreibt die Literatur nach durch ROS entstandenem Zellstress, sowohl fördernde als auch hemmende Faktoren auf den zellulären Metabolismus [164].

Zusammen mit der Literatur führen die Ergebnisse aus 3.4.2 und 3.4.4 zu dem Schluss, dass CUR zügig metabolisiert wird und unterschiedliche Faktoren zu einer Degradation führen. Zur sinnvollen Übertragung des Konzepts einer PDT auf Organismen sollten demnach die den Zerfall fördernden Faktoren minimiert und für einen konstanten, ausreichend hohen Blutspiegel gesorgt werden. CUR-Nanopartikel, CUR-Analoga und Enzym-inhibierende Substanzen scheinen für eine klinische Verwendung besonders geeignet zu sein und sollten intensiv untersucht werden.

#### **4.5 Wirkung und Verteilung von oral appliziertem MicC im orthotopen HC-AFW1-Mausmodell**

Die gezeigten Effekte von CUR in vitro, stellen eine vernünftige Basis für eine Überprüfung des Konzeptes in vivo am orthotopen Tumormodell dar. Analysiert wurden die Konzentrationen von CUR in Blut und Organen, dessen Auswirkungen auf das orthotope Tumormodell bezüglich des AFP-Spiegels und der Tumorumfänge sowie die Therapieeffekte auf subzellulärer Ebene. Für die Behandlung wurde, aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit von CUR, MicC verwendet.

Nur wenige Studien konnten bisher erwähnenswerte Blutkonzentrationen von CUR unter oraler Gabe nachweisen und benötigten dafür sehr hohe Dosen. So beschrieben Yang et al. CUR-Konzentrationen von 0,06 µg/ml im Plasma von Ratten nach einmaliger CUR-Gabe von 500 mg/Kg KG [165]. In einer Phase I-Studie berichteten Cheng et al. über detektierte Plasmapkonzentrationen von bis zu 1,3 µg/ml (3,6 µM) CUR nach dreimonatiger Verabreichung von bis zu 8 g pro Person [74]. Vareed et al. veröffentlichten Daten zu Plasmaspiegeln von bis zu 2,6 µg/ml nach einmaliger Gabe von 10 g CUR [159]. Die geringen Plasmaspiegel von CUR könnten das Fehlen von in der Literatur beschriebenen Nebenwirkungen erklären. Bezüglich des Problems der geringen Bioverfügbarkeit von CUR existieren mehrere unterschiedliche Lösungsansätze, die entweder an der verminderten Resorption oder am erhöhten hepatischen bzw. intestinalen Abbau von CUR ansetzen [54, 86, 90, 92]. In der Pädiatrie sind mizellare Lösungen, aufgrund ihrer simplen Applikationsform und den physiologischen, gutverträglichen Inhaltsstoffen, von besonderem Interesse. Amphiphile CUR-Komplexe mit Phosphatidylcholin- und Lecithinbestandteilen potenzieren die intestinale Absorption von CUR [93]. Cuomo et al. wiesen mit diesen Präparaten an menschlichen Probanden eine 29-fach höhere Aufnahme von Curcuminoiden nach [94]. Schiborr et al. publizierten mit einem anderen mizellarem Transportsystem eine bisher nicht erreichte Potenzierung der Bioverfügbarkeit von CUR um den Faktor 185 [86]. Dieses MicC wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet. Erstmals fand es im murinen Modell Einsatz. Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. Die angewandte Dosis war niedriger als in veröffentlichten Studien zu anderen mizellaren CUR-Produkten [166, 167]. Die Ergebnisse aus 3.5.1 offenbaren, nach MicC-Gabe (60

mg/Kg KG  $\approx$  1,5 mg/Maus), relevante Konzentrationen an CUR, DMC und BDMC im Blut von bis zu 3,4  $\mu$ g/ml. Die Blutspiegel der zwei letztgenannten Derivate waren, aufgrund deren niedrigeren Gehalts im MicC, entsprechend geringer. Es besteht eine zeitabhängige, signifikante Abnahme der CUR-Konzentrationen. Der Zeitpunkt (2 h) der maximalen Plasma-Konzentrationen korrespondiert mit den Angaben von Vareed, Yang und Cheng (40 min bis 3 h), die jedoch reines, statt mizellarem, CUR verwendeten [74, 159, 165]. Dennoch waren die hohen Konzentrationen nur kurzfristig nachweisbar. Der Plasmaspiegel von CUR sank, innerhalb der ersten fünf Stunden, auf ca. 25 % des Ausgangswerts. Die schnelle Metabolisierung deckt sich ebenfalls mit den Resultaten der oben genannten Autoren. Auch in Organen konnten CUR und seine Derivate in unterschiedlichen Konzentrationen detektiert werden. Signifikant am niedrigsten waren sie im Gehirn mit maximal 24 pg/mg Gewebe. Hohe Konzentrationen von CUR im Gehirn nach oraler Applikation sind nicht beschrieben in der Fachliteratur. Unter intravenöser Behandlung, mit einer Dosis von 30 mg/Kg, konnten Werte von 150 pg/mg Gewebe erreicht werden [92]. Am höchsten waren die Konzentrationen in der Lunge mit bis über 1 ng/mg Gewebe. Matabudul et al. berichteten nach Injektion von liposomalem CUR in die Venen von Beaglehunden ebenso über die Lunge als Organ mit den höchsten Konzentrationen [168]. Der Magen wurde nicht auf intraparenchymale CUR-Konzentrationen untersucht. Die starke, makroskopisch sichtbare Fluoreszenz nach Anregung mit der Lichtquelle des Laparoscops belegt die große Menge an CUR, die den Magen passiert. Dieser Umstand resultiert in besonders starken Wirkungen von CUR gegenüber Tumoren im Magendarmtrakt, die bereits mehrere klinische Studien entfachten [101]. Hinsichtlich der Leber, weisen die Resultate aus dieser Arbeit zwei- bis drei-fach höhere Konzentrationen als eine vergleichbare Untersuchung zu Gewebekonzentrationen nach CUR-Gabe über ein Implantat auf [169]. Besonders interessant sind die hohen CUR-Konzentrationen des Tumors im Vergleich zum umgebenen Lebergewebe. Zwar ist die Standardabweichung groß und nur wenige Tumorproben konnten analysiert werden. Doch führt dies zur Annahme eines beschleunigten Stoffwechsels in Hepatozyten im Verhältnis zu Hepatomzellen, beispielsweise aufgrund einer stärkeren Ausprägung der Alkoholdehydrogenase oder anderen CUR-metabolisierenden Enzymen. Ein zweiter Erklärungsansatz stellt die, im Vergleich zu normalen Zellen, ausgeprägtere CUR-Aufnahme von Tumoren dar [138].

Zur Überprüfung der in vivo Effekte von CUR wurde die kürzlich beschriebene pHCC-Zelllinie HC-AFW1 verwendet. Dazu erfolgte die Etablierung eines murinen, orthotopen Tumormodells, bei dem die Zellen durch intrasplenische Injektion über die Blutbahn in die Leber gelangen. Das Tumor-Uptake betrug 87,2 % (s. 3.5.2). Nur wenige Studien berichten über ein verlässliches Tumor-Uptake [45, 170, 171]. In den meisten Veröffentlichungen mit orthotopen Modellen wurden entweder die in vitro gezüchteten Tumorzellen direkt in die Leber injiziert oder die zuvor in einer ersten Maus subkutan induzierten Tumoren auf die Leber einer zweiten Maus übertragen [172-174]. Beide Verfahren bergen ein hohes, unkontrollierbares Blutungsrisiko. Für das letztere besteht der doppelte Verbrauch an Versuchstieren. Eines für das Wachstum des Tumors, das andere für die Implantation. Doch auch das in dieser Arbeit verwendete Modell weist eine hohe Komplikationsrate auf: Von 60 operierten Versuchsmäusen lebten dreizehn innerhalb der ersten 48 h, aufgrund von Komplikationen, ab. Fünf weitere Tiere verstarben nach der ersten AFP-Bestimmung und konnten so lediglich für das Tumor-Uptake gewertet werden. In dieser Arbeit konnte mit der intrasplenischen Injektionsmethode ein multinoduläres Tumorstadium erreicht werden. Zur Kontrolle des Tumorstadiums und des Therapieansprechens wurde der in der pädiatrischen Onkologie zuverlässige Tumormarker AFP benutzt. Frühere Untersuchungen hinterlegen die starke AFP-Produktion von HC-AFW1 mit einer Rate von  $34 \text{ IU}/10^5$  Zellen in 24 h [103]. Die Resultate aus 3.5.2 und 3.5.3 offenbaren unter CUR-Monotherapie keinen signifikanten Einfluss auf den AFP-Spiegel oder das Gesamttumorstadium. Im Gegensatz dazu existieren in der Fachliteratur einige Studien, die signifikante Effekte einer CUR-Behandlung auf HCC vorweisen [175]. Ning et al. zeigten an einem subkutanen Modell unter 16 tägiger intraperitonealer CUR-Behandlung eine Verringerung des Tumorstadiums 40 % [176]. Liu et al. präsentierten mit dem CUR-Analogon EF24 sowohl am subkutanen als auch am orthotopen Modell, ebenfalls unter intraperitonealer Behandlung, eine signifikante Abnahme des Tumorstadiums bzw. der Tumorstadien [177]. Jedoch starteten hierbei die Therapien ohne Tumorkontrolle bereits ein Tag (Ning) oder eine Woche (Liu) nach der Implantation. Weiterhin stellt das Tumorstadium als einziges Maß der Ausdehnung einen unsicheren Marker dar. Problematisch ist die subjektive und unzuverlässige Erfassung der Werte, wozu das multinoduläre Wachstum des Tumors beiträgt.

Detektiert werden vor allem oberflächlich liegende Knoten. Die Verwendung von AFP als Ersatzmarker wird ebenfalls diskutiert, da zwischen dem Tumoren erhebliche Unterschiede im Sekretionsverhalten auftreten können. Jedoch erfährt es nach wie vor Anwendung in der Standarddiagnostik des HCC [178]. Veröffentlichte Studien, die auf AFP-Messungen vor und nach einer CUR-Therapie von HB und pHCC basieren, existieren bisher nicht. Darüber hinaus wären bildgebende, radiologisch basierte Verfahren hilfreich, wie beispielsweise MRT-Untersuchungen. Aufgrund der vorgelegten Argumente zeigen die Publikationen von Wing und Liu eher einen Tumorvorbeugenden statt eines therapeutischen Effekts.

Unter Kombinationsbehandlung mit MicC und CDDP wurde im Vergleich zur Monotherapie niedrigere AFP-Werte festgestellt (3.5.2). In Relation zur Kontrollgruppe war diese Abnahme signifikant. Die Tumorgrößen und -anzahl waren unter Kombinationstherapie zwar verringert, was aber, aufgrund der hohen Varianz der Werte, keine Signifikanz erreichte (3.5.3). In anderen Tumorentitäten, vor allem im Kopf-Hals-Bereich, konnte bereits eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums in der Maus nachgewiesen werden. Duarte et al. zeigten eine signifikante Reduktion unter Kombinationstherapie von i.v.-injiziertem liposomalen CUR und i.p. gespritztem CDDP [179]. Die Resultate von Kumar et al. offenbaren unter Verwendung des CUR-Analogon H-4073 mit und ohne CDDP signifikante Abnahmen der Tumormassen [180]. Darüber hinaus wurden in Mäusen auch protektive Funktionen von CUR hinsichtlich der Nebenwirkungen von CDDP nachgewiesen, die histopathologischen und ultrastrukturellen Schäden in gesunden Hepatozyten vorbeugen [181].

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen aus 3.5.4 zeigen die typischen morphologischen tumorösen Veränderungen. Im Gegensatz zur MicC-Monotherapie führt die CDDP- und Kombinationstherapie zu morphologischen und immunhistochemischen Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die  $\beta$ -Catenin-Expression ist in diesen zwei Gruppen vermindert und offenbart so deutliche Hinweise auf einen eventuellen Wirkmechanismus von CUR im orthotopen Tumormodell. Dies führt zur Annahme, dass trotz niedrigeren Konzentrationen als in vitro und schneller Metabolisierung, ausreichend Zeit für eine Wirkung von CUR im Organismus vorhanden ist. Sundram et al. wiesen in subkutanen Prostatatumoren eine mit einer Wachstumseinschränkung einhergehenden, verstärkt membranöse

Lokalisation von  $\beta$ -Catenin nach [112]. Das CUR wurde dabei jedoch direkt in den Tumor injiziert, was zu höheren intratumoralen Konzentrationen führt.

Zusammenfassend wirkt CUR in vitro gut sowohl gegen pHCC- und HB- als auch gegen RMS-Zellkulturen. Ein möglicher Wirkmechanismus stellt die Inhibition der nukleären  $\beta$ -Catenin-Translokation bzw. der Abbau von  $\beta$ -Catenin dar. Empfehlenswert ist die Kombination von CUR mit Zytostatika, wie CDDP und Doxorubicin, und im Zuge einer PDT mit blauem Licht. Letztere zeigte eine starke ROS-Produktion und einen Einfluss auf mögliche CSC-Populationen. Die geringe intestinale Absorption, die rasche Metabolisierung und die chemische Instabilität unter bestimmten Bedingungen heben die Galenik von CUR als Hauptansatzpunkt für den wirkungsvollen Transfer der Therapiekonzepte auf den tierischen und menschlichen Organismus hervor. MicC führt zu stark erhöhten Blutspiegeln von CUR, die jedoch rasch absinken. Für einen signifikanten therapeutischen Effekt ist daher die Kombination mit CDDP nötig. Grundsätzlich demonstrieren die Resultate das Potential von CUR, als komplementärmedizinisches Agens, die Überlebensraten von soliden Hochrisikotumoren im Kindesalter zu senken.

## Zusammenfassung

Hepatoblastome und pädiatrische hepatozelluläre Karzinome stehen auf Platz eins und zwei hinsichtlich der Inzidenzen pädiatrischer Malignome der Leber. Rhabdomyosarkome sind die häufigsten Weichteilmalignome in der Pädiatrie. Im Gegensatz zu den Standardrisikogruppen stagnierten die Überlebensraten der Hochrisikogruppen aller drei Tumorentitäten, was in wachsenden Chemoresistenzen und Rezidiven begründet liegt. Weiterentwicklungen der aktuellen Therapiekonzepte sind somit unerlässlich. Eine der am intensivsten beforschten Substanzen in der onkologischen Komplementärmedizin mit weitreichenden Wirkungen auf diverse intrazelluläre Moleküle und Signalwege stellt Curcumin dar. Etliche *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen sowie erste Phase I- und II-Studien belegen unter anderem antioxidative, antiproliferative und, unter Kombination mit Zytostatika, chemoprotektive, resistenzvorbeugende und synergistische Eigenschaften. In der Pädiatrie existieren bezüglich der antiproliferativen Effekte jedoch nur wenige publizierte Daten. Gerade hier wäre ein Einsatz des nebenwirkungsarmen und protektiven Curcumins außerordentlich wertvoll.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher verschiedene Auswirkungen von Curcumin auf Hepatome und Rhabdomyosarkome zu analysieren und die Ergebnisse am orthotopen Tumormodell in der Maus zu überprüfen. Die Resultate des MTT-Viabilitätsassays offenbaren eine starke Wirkung von Curcumin *in vitro* sowohl gegen Hepatom- als auch gegen Rhabdomyosarkom-Zellkulturen. Als möglicher Wirkmechanismus wurde in Hepatomzellen per Fluoreszenzmikroskopie die Inhibition der nukleären  $\beta$ -Catenin-Translokation beobachtet. Die Kombination von Curcumin mit Zytostatika (Cisplatin, Doxorubicin) zeigt in Hepatomkulturen additive und in Rhabdomyosarkomkulturen sowohl additive als auch synergistische Effekte auf die Zellviabilität. Auch eine photodynamische Therapie mit blauem Licht führt zu deutlich geringeren Viabilitätswerten als die Monobehandlung. Die größten Viabilitätseinbußen erbrachte eine Belichtung der Zellen nach einer Inkubationsdauer mit Curcumin von einer Stunde. Weiterhin war mittels durchflusszytometrischen Untersuchungen zu sehen, dass die photodynamische Therapie eine hohe Produktion an Sauerstoffradikalen verursacht und einen Einfluss auf die Konstellation von Subpopulationen besitzt. Darüber hinaus wurden per Fluoreszenzmessungen die zelluläre Aufnahme sowie die Metabolisierung

und der chemische Zerfall von Curcumin betrachtet. Curcumin wird zügig in die Zelle aufgenommen und rasch metabolisiert. Letzteres ist stark abhängig vom Zelltyp und der Zelldichte. Außerdem unterliegt Curcumin einem chemischen Zerfall, der durch sichtbares Licht deutlich beschleunigt wird. Im Mausmodell eines orthotopen pädiatrischen hepatozellulären Karzinoms wurde für eine erhöhte Bioverfügbarkeit von Curcumin mizellares Curcumin verwendet. Es führt zu hohen Curcuminkonzentrationen in Blut und Organen, die jedoch rasch absinken. Eine signifikante Reduktion der Werte des Tumormarkers Alpha-Feto-Protein und der Tumoranzahl wurde unter Kombination mit Cisplatin festgestellt. Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten die typischen morphologischen tumorösen Veränderungen sowie die Beteiligung von  $\beta$ -Catenin. Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse vielversprechende Möglichkeiten von Curcumin, als komplementärmedizinisches Agens in bereits etablierte Therapiekonzepte von soliden pädiatrischen Hochrisikotumoren, integriert zu werden.

## Literaturangaben

1. Davidoff, A.M., *Pediatric oncology*. Semin Pediatr Surg, 2010. **19**(3): p. 225-33.
2. Fuchs, J., *Solide Tumoren im Kindesalter*. Grundlagen - Diagnostik - Therapie. 2012.
3. Perilongo, G., et al., *Risk-adapted treatment for childhood hepatoblastoma. final report of the second study of the International Society of Paediatric Oncology--SIOPEL 2*. Eur J Cancer, 2004. **40**(3): p. 411-21.
4. Schnater, J.M., et al., *Where do we stand with hepatoblastoma? A review*. Cancer, 2003. **98**(4): p. 668-78.
5. Vos, A., *Primary liver tumours in children*. Eur J Surg Oncol, 1995. **21**(1): p. 101-5.
6. Feusner, J. and J. Plaschkes, *Hepatoblastoma and low birth weight: a trend or chance observation?* Med Pediatr Oncol, 2002. **39**(5): p. 508-9.
7. Steenman, M., A. Westerveld, and M. Mannens, *Genetics of Beckwith-Wiedemann syndrome-associated tumors: common genetic pathways*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. **28**(1): p. 1-13.
8. Hughes, L.J. and V.V. Michels, *Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis*. Am J Med Genet, 1992. **43**(6): p. 1023-5.
9. Ishak, K.G. and P.R. Glunz, *Hepatoblastoma and hepatocarcinoma in infancy and childhood. Report of 47 cases*. Cancer, 1967. **20**(3): p. 396-422.
10. Ruck, P. and J.C. Xiao, *Stem-like cells in hepatoblastoma*. Med Pediatr Oncol, 2002. **39**(5): p. 504-7.
11. Li, X., et al., *Promoter-specific methylation and expression alterations of igf2 and h19 are involved in human hepatoblastoma*. Int J Cancer, 1998. **75**(2): p. 176-80.
12. Sugawara, W., et al., *Promoter hypermethylation of the RASSF1A gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma*. Pediatr Blood Cancer, 2007. **49**(3): p. 240-9.
13. MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He, *Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*. Dev Cell, 2009. **17**(1): p. 9-26.
14. Czauderna, P., *Adult type vs. Childhood hepatocellular carcinoma--are they the same or different lesions? Biology, natural history, prognosis, and treatment*. Med Pediatr Oncol, 2002. **39**(5): p. 519-23.
15. Czauderna, P., et al., *Hepatocellular carcinoma in children: results of the first prospective study of the International Society of Pediatric Oncology group*. J Clin Oncol, 2002. **20**(12): p. 2798-804.
16. Weinberg, A.G. and M.J. Finegold, *Primary hepatic tumors of childhood*. Hum Pathol, 1983. **14**(6): p. 512-37.
17. Emre, S. and G.J. McKenna, *Liver tumors in children*. Pediatr Transplant, 2004. **8**(6): p. 632-8.
18. Nishida, N., et al., *Role and mutational heterogeneity of the p53 gene in hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 1993. **53**(2): p. 368-72.
19. Nishida, N. and A. Goel, *Genetic and epigenetic signatures in human hepatocellular carcinoma: a systematic review*. Curr Genomics, 2011. **12**(2): p. 130-7.

20. Nishida, N., et al., *Extensive methylation is associated with beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma: evidence for two distinct pathways of human hepatocarcinogenesis*. *Cancer Res*, 2007. **67**(10): p. 4586-94.
21. Lack, E.E., C. Neave, and G.F. Vawter, *Hepatoblastoma. A clinical and pathologic study of 54 cases*. *Am J Surg Pathol*, 1982. **6**(8): p. 693-705.
22. Dasgupta, R. and D.A. Rodeberg, *Update on rhabdomyosarcoma*. *Semin Pediatr Surg*, 2012. **21**(1): p. 68-78.
23. Breitfeld, P.P. and W.H. Meyer, *Rhabdomyosarcoma: new windows of opportunity*. *Oncologist*, 2005. **10**(7): p. 518-27.
24. Sung, L., et al., *Neurofibromatosis in children with Rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma study IV*. *J Pediatr*, 2004. **144**(5): p. 666-8.
25. Li, F.P. and J.F. Fraumeni, Jr., *Prospective study of a family cancer syndrome*. *JAMA*, 1982. **247**(19): p. 2692-4.
26. Smith, A.C., et al., *Association of alveolar rhabdomyosarcoma with the Beckwith-Wiedemann syndrome*. *Pediatr Dev Pathol*, 2001. **4**(6): p. 550-8.
27. Grufferman, S., et al., *Parents' use of cocaine and marijuana and increased risk of rhabdomyosarcoma in their children*. *Cancer Causes Control*, 1993. **4**(3): p. 217-24.
28. Enzinger, F.M. and M. Shiraki, *Alveolar rhabdomyosarcoma. An analysis of 110 cases*. *Cancer*, 1969. **24**(1): p. 18-31.
29. Parham, D.M., et al., *Solid alveolar rhabdomyosarcomas with the t(2;13). Report of two cases with diagnostic implications*. *Am J Surg Pathol*, 1994. **18**(5): p. 474-8.
30. Parham, D.M. and D.A. Ellison, *Rhabdomyosarcomas in adults and children: an update*. *Arch Pathol Lab Med*, 2006. **130**(10): p. 1454-65.
31. Sebire, N.J. and M. Malone, *Myogenin and MyoD1 expression in paediatric rhabdomyosarcomas*. *J Clin Pathol*, 2003. **56**(6): p. 412-6.
32. Kumar, S., et al., *Myogenin is a specific marker for rhabdomyosarcoma: an immunohistochemical study in paraffin-embedded tissues*. *Mod Pathol*, 2000. **13**(9): p. 988-93.
33. Litten, J.B. and G.E. Tomlinson, *Liver tumors in children*. *Oncologist*, 2008. **13**(7): p. 812-20.
34. Cromheecke, M., et al., *Liver tissue tolerance for irradiation: experimental and clinical investigations*. *Hepatogastroenterology*, 2000. **47**(36): p. 1732-40.
35. Yanagisawa, T., U. Bartels, and E. Bouffet, *Role of prognostic factors in the management of pediatric solid tumors*. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. **1138**: p. 32-42.
36. Fuchs, J., et al., *Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with hepatoblastoma: a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB 94*. *Cancer*, 2002. **95**(1): p. 172-82.
37. von Schweinitz, D., et al., *Complete resection before development of drug resistance is essential for survival from advanced hepatoblastoma--a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB-89*. *J Pediatr Surg*, 1995. **30**(6): p. 845-52.
38. Abdullah, L.N. and E.K. Chow, *Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells*. *Clin Transl Med*, 2013. **2**(1): p. 3.

39. Moitra, K., H. Lou, and M. Dean, *Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development*. Clin Pharmacol Ther, 2011. **89**(4): p. 491-502.
40. Alisi, A., et al., *Multidrug resistance and cancer stem cells in neuroblastoma and hepatoblastoma*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(12): p. 24706-25.
41. Norris, L., et al., *The role of cancer stem cells in the anti-carcinogenicity of curcumin*. Mol Nutr Food Res, 2013. **57**(9): p. 1630-7.
42. Fuchs, J., et al., *Successful transplantation of human hepatoblastoma into immunodeficient mice*. J Pediatr Surg, 1996. **31**(9): p. 1241-6.
43. Pietsch, T., et al., *Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma*. Lab Invest, 1996. **74**(4): p. 809-18.
44. Doi, I., *Establishment of a cell line and its clonal sublines from a patient with hepatoblastoma*. Gan, 1976. **67**(1): p. 1-10.
45. Ellerkamp, V., et al., *Successful establishment of an orthotopic hepatoblastoma in vivo model in NOD/LtSz-scid IL2Rgammanull mice*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23419.
46. Park, W.S., et al., *Nuclear localization of beta-catenin is an important prognostic factor in hepatoblastoma*. J Pathol, 2001. **193**(4): p. 483-90.
47. Yamaoka, H., et al., *Diagnostic and prognostic impact of beta-catenin alterations in pediatric liver tumors*. Oncol Rep, 2006. **15**(3): p. 551-6.
48. Purcell, R., et al., *HGF/c-Met related activation of beta-catenin in hepatoblastoma*. J Exp Clin Cancer Res, 2011. **30**: p. 96.
49. Ellerkamp, V., et al., *Pharmacological inhibition of beta-catenin in hepatoblastoma cells*. Pediatr Surg Int, 2013. **29**(2): p. 141-9.
50. Gupta, S.C., G. Kismali, and B.B. Aggarwal, *Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy*. Biofactors, 2013. **39**(1): p. 2-13.
51. Andre, N., et al., *Pilot study of a pediatric metronomic 4-drug regimen*. Oncotarget, 2011. **2**(12): p. 960-5.
52. Goodman, R.H. and S. Smolik, *CBP/p300 in cell growth, transformation, and development*. Genes Dev, 2000. **14**(13): p. 1553-77.
53. Ryu, M.J., et al., *Natural derivatives of curcumin attenuate the Wnt/beta-catenin pathway through down-regulation of the transcriptional coactivator p300*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **377**(4): p. 1304-8.
54. Anand, P., et al., *Bioavailability of curcumin: problems and promises*. Mol Pharm, 2007. **4**(6): p. 807-18.
55. Aggarwal, B.B. and B. Sung, *Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets*. Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(2): p. 85-94.
56. Sharma, R.A., A.J. Gescher, and W.P. Steward, *Curcumin: the story so far*. Eur J Cancer, 2005. **41**(13): p. 1955-68.
57. Shishodia, S., G. Sethi, and B.B. Aggarwal, *Curcumin: getting back to the roots*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1056**: p. 206-17.
58. Gupta, S.C., et al., *Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies*. Nat Prod Rep, 2011. **28**(12): p. 1937-55.
59. Shin, H.K., et al., *Inhibitory effect of curcumin on motility of human oral squamous carcinoma YD-10B cells via suppression of ERK and NF-kappaB activations*. Phytother Res, 2010. **24**(4): p. 577-82.

60. Rajasingh, J., et al., *Curcumin induces growth-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active JAK-STAT pathway in T cell leukemia*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **340**(2): p. 359-68.
61. Bhattacharyya, S., et al., *Curcumin prevents tumor-induced T cell apoptosis through Stat-5a-mediated Bcl-2 induction*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(22): p. 15954-64.
62. Bae, M.K., et al., *Curcumin inhibits hypoxia-induced angiogenesis via down-regulation of HIF-1*. *Oncol Rep*, 2006. **15**(6): p. 1557-62.
63. Wang, Z., et al., *Notch-1 down-regulation by curcumin is associated with the inhibition of cell growth and the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells*. *Cancer*, 2006. **106**(11): p. 2503-13.
64. Chen, A., J. Xu, and A.C. Johnson, *Curcumin inhibits human colon cancer cell growth by suppressing gene expression of epidermal growth factor receptor through reducing the activity of the transcription factor Egr-1*. *Oncogene*, 2006. **25**(2): p. 278-87.
65. Prasad, C.P., et al., *Potent growth suppressive activity of curcumin in human breast cancer cells: Modulation of Wnt/beta-catenin signaling*. *Chem Biol Interact*, 2009. **181**(2): p. 263-71.
66. Korutla, L. and R. Kumar, *Inhibitory effect of curcumin on epidermal growth factor receptor kinase activity in A431 cells*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1224**(3): p. 597-600.
67. Lev-Ari, S., et al., *Curcumin augments gemcitabine cytotoxic effect on pancreatic adenocarcinoma cell lines*. *Cancer Invest*, 2007. **25**(6): p. 411-8.
68. Lev-Ari, S., et al., *Curcumin synergistically potentiates the growth inhibitory and pro-apoptotic effects of celecoxib in pancreatic adenocarcinoma cells*. *Biomed Pharmacother*, 2005. **59 Suppl 2**: p. S276-80.
69. Zhou, H., C.S. Beevers, and S. Huang, *The targets of curcumin*. *Curr Drug Targets*, 2011. **12**(3): p. 332-47.
70. Bayet-Robert, M., et al., *Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer*. *Cancer Biol Ther*, 2010. **9**(1): p. 8-14.
71. Carroll, R.E., et al., *Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011. **4**(3): p. 354-64.
72. Dhillon, N., et al., *Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(14): p. 4491-9.
73. Kanai, M., et al., *A phase I/II study of gemcitabine-based chemotherapy plus curcumin for patients with gemcitabine-resistant pancreatic cancer*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011. **68**(1): p. 157-64.
74. Cheng, A.L., et al., *Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions*. *Anticancer Res*, 2001. **21**(4B): p. 2895-900.
75. Henrotin, Y., et al., *Decrease of a specific biomarker of collagen degradation in osteoarthritis, Coll2-1, by treatment with highly bioavailable curcumin during an exploratory clinical trial*. *BMC Complement Altern Med*, 2014. **14**: p. 159.
76. Soare, A., et al., *Multiple dietary supplements do not affect metabolic and cardio-vascular health*. *Aging (Albany NY)*, 2014. **6**(2): p. 149-57.

77. Dhandapani, K.M., V.B. Mahesh, and D.W. Brann, *Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors*. J Neurochem, 2007. **102**(2): p. 522-38.
78. Rocks, N., et al., *Curcumin-cyclodextrin complexes potentiate gemcitabine effects in an orthotopic mouse model of lung cancer*. Br J Cancer, 2012. **107**(7): p. 1083-92.
79. Pramanik, D., et al., *A composite polymer nanoparticle overcomes multidrug resistance and ameliorates doxorubicin-associated cardiomyopathy*. Oncotarget, 2012. **3**(6): p. 640-50.
80. Nessa, M.U., et al., *Studies on combination of platinum drugs cisplatin and oxaliplatin with phytochemicals anethole and curcumin in ovarian tumour models*. Anticancer Res, 2012. **32**(11): p. 4843-50.
81. Banerjee, S., et al., *Remarkable photocytotoxicity of curcumin in HeLa cells in visible light and arresting its degradation on oxovanadium(IV) complex formation*. Chem Commun (Camb), 2012. **48**(62): p. 7702-4.
82. Park, K. and J.H. Lee, *Photosensitizer effect of curcumin on UVB-irradiated HaCaT cells through activation of caspase pathways*. Oncol Rep, 2007. **17**(3): p. 537-40.
83. Bruzell, E.M., E. Morisbak, and H.H. Tonnesen, *Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations*. Photochem Photobiol Sci, 2005. **4**(7): p. 523-30.
84. Dahl, T.A., et al., *Photocytotoxicity of curcumin*. Photochem Photobiol, 1994. **59**(3): p. 290-4.
85. Prasad, S., A.K. Tyagi, and B.B. Aggarwal, *Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice*. Cancer Res Treat, 2014. **46**(1): p. 2-18.
86. Schiborr, C., et al., *The oral bioavailability of curcumin from micronized powder and liquid micelles is significantly increased in healthy humans and differs between sexes*. Mol Nutr Food Res, 2014. **58**(3): p. 516-27.
87. Savjani, K.T., A.K. Gajjar, and J.K. Savjani, *Drug solubility: importance and enhancement techniques*. ISRN Pharm, 2012. **2012**: p. 195727.
88. Ireson, C.R., et al., *Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002. **11**(1): p. 105-11.
89. Ireson, C., et al., *Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production*. Cancer Res, 2001. **61**(3): p. 1058-64.
90. Shoba, G., et al., *Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers*. Planta Med, 1998. **64**(4): p. 353-6.
91. Priyadarsini, K.I., *The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent*. Molecules, 2014. **19**(12): p. 20091-20112.
92. Helson, L., *Curcumin (diferuloylmethane) delivery methods: a review*. Biofactors, 2013. **39**(1): p. 21-6.
93. Gupta, N.K. and V.K. Dixit, *Bioavailability enhancement of curcumin by complexation with phosphatidyl choline*. J Pharm Sci, 2011. **100**(5): p. 1987-95.
94. Cuomo, J., et al., *Comparative absorption of a standardized curcuminoid mixture and its lecithin formulation*. J Nat Prod, 2011. **74**(4): p. 664-9.

95. Sreenivasan, S., et al., *Effect of curcumin on miRNA expression in human Y79 retinoblastoma cells*. *Curr Eye Res*, 2012. **37**(5): p. 421-8.
96. Lee, S.J. and S.A. Langhans, *Anaphase-promoting complex/cyclosome protein Cdc27 is a target for curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis*. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 44.
97. Bangaru, M.L., et al., *Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis and blocks migration of human medulloblastoma cells*. *Anticancer Res*, 2010. **30**(2): p. 499-504.
98. Pisano, M., et al., *Enhanced anti-tumor activity of a new curcumin-related compound against melanoma and neuroblastoma cells*. *Mol Cancer*, 2010. **9**: p. 137.
99. Freudlsparger, C., J. Greten, and U. Schumacher, *Curcumin induces apoptosis in human neuroblastoma cells via inhibition of NFkappaB*. *Anticancer Res*, 2008. **28**(1A): p. 209-14.
100. Lee, S.J., et al., *Curcumin-induced HDAC inhibition and attenuation of medulloblastoma growth in vitro and in vivo*. *BMC Cancer*, 2011. **11**: p. 144.
101. Shehzad, A., J. Lee, and Y.S. Lee, *Curcumin in various cancers*. *Biofactors*, 2013. **39**(1): p. 56-68.
102. Xu, M.X., et al., *Curcumin suppresses proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via the wnt signaling pathway*. *Int J Oncol*, 2013. **43**(6): p. 1951-9.
103. Armeanu-Ebinger, S., et al., *Characterisation of the cell line HC-AFW1 derived from a pediatric hepatocellular carcinoma*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e38223.
104. Aden, D.P., et al., *Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line*. *Nature*, 1979. **282**(5739): p. 615-6.
105. Lopez-Terrada, D., et al., *Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line*. *Hum Pathol*, 2009. **40**(10): p. 1512-5.
106. Hinson, A.R., et al., *Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls*. *Front Oncol*, 2013. **3**: p. 183.
107. Giard, D.J., et al., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. *J Natl Cancer Inst*, 1973. **51**(5): p. 1417-23.
108. Bortel, N., et al., *Effects of curcumin in pediatric epithelial liver tumors: inhibition of tumor growth and alpha-fetoprotein in vitro and in vivo involving the NFkappaB- and the beta-catenin pathways*. *Oncotarget*, 2015. **6**(38): p. 40680-91.
109. Ellerkamp, V., et al., *Photodynamic Therapy Potentiates the Effects of Curcumin on Pediatric Epithelial Liver Tumor Cells*. *Anticancer Res*, 2016. **36**(7): p. 3363-72.
110. Beevers, C.S., et al., *Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(4): p. 757-64.
111. Shehzad, A. and Y.S. Lee, *Molecular mechanisms of curcumin action: signal transduction*. *Biofactors*, 2013. **39**(1): p. 27-36.
112. Sundram, V., et al., *Curcumin attenuates beta-catenin signaling in prostate cancer cells through activation of protein kinase D1*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e35368.

113. Kuttan, R., et al., *Potential anticancer activity of turmeric (Curcuma longa)*. Cancer Lett, 1985. **29**(2): p. 197-202.
114. Yoysungnoen, P., et al., *Anti-cancer and anti-angiogenic effects of curcumin and tetrahydrocurcumin on implanted hepatocellular carcinoma in nude mice*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(13): p. 2003-9.
115. Wang, W.Z., et al., *Abrogation of G2/M arrest sensitizes curcumin-resistant hepatoma cells to apoptosis*. FEBS Lett, 2008. **582**(18): p. 2689-95.
116. Jia, L., et al., *CD147 regulates vascular endothelial growth factor-A expression, tumorigenicity, and chemosensitivity to curcumin in hepatocellular carcinoma*. IUBMB Life, 2008. **60**(1): p. 57-63.
117. Notarbartolo, M., et al., *Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF-kB activation levels and in IAP gene expression*. Cancer Lett, 2005. **224**(1): p. 53-65.
118. Lin, L.I., et al., *Curcumin inhibits SK-Hep-1 hepatocellular carcinoma cell invasion in vitro and suppresses matrix metalloproteinase-9 secretion*. Oncology, 1998. **55**(4): p. 349-53.
119. Liang, H.H., et al., *MicroRNA-200a/b influenced the therapeutic effects of curcumin in hepatocellular carcinoma (HCC) cells*. Tumour Biol, 2013. **34**(5): p. 3209-18.
120. Reuter, S., et al., *Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(11): p. 1340-51.
121. Karunagaran, D., R. Rashmi, and T.R. Kumar, *Induction of apoptosis by curcumin and its implications for cancer therapy*. Curr Cancer Drug Targets, 2005. **5**(2): p. 117-29.
122. Youns, M. and G.M. Fathy, *Upregulation of extrinsic apoptotic pathway in curcumin-mediated antiproliferative effect on human pancreatic carcinogenesis*. J Cell Biochem, 2013. **114**(12): p. 2654-65.
123. Lee, H.P., et al., *Curcumin induces cell apoptosis in human chondrosarcoma through extrinsic death receptor pathway*. Int Immunopharmacol, 2012. **13**(2): p. 163-9.
124. Farazuddin, M., et al., *Chemotherapeutic potential of curcumin-bearing microcells against hepatocellular carcinoma in model animals*. Int J Nanomedicine, 2014. **9**: p. 1139-52.
125. Zhou, T., et al., *Autophagy and apoptosis in hepatocellular carcinoma induced by EF25-(GSH)2: a novel curcumin analog*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107876.
126. Simoni, D., et al., *Antitumor effects of curcumin and structurally beta-diketone modified analogs on multidrug resistant cancer cells*. Bioorg Med Chem Lett, 2008. **18**(2): p. 845-9.
127. Goel, A. and B.B. Aggarwal, *Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs*. Nutr Cancer, 2010. **62**(7): p. 919-30.
128. Zhang, H., et al., *Curcumin enhances the effectiveness of cisplatin by suppressing CD133 cancer stem cells in laryngeal carcinoma treatment*. Exp Ther Med, 2013. **6**(5): p. 1317-1321.
129. Roy, M. and S. Mukherjee, *Reversal of resistance towards cisplatin by curcumin in cervical cancer cells*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(3): p. 1403-10.

130. Trujillo, J., et al., *Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings*. Redox Biol, 2013. **1**(1): p. 448-56.
131. Lunenburger, H., et al., *Systematic analysis of the antiproliferative effects of novel and standard anticancer agents in rhabdoid tumor cell lines*. Anticancer Drugs, 2010. **21**(5): p. 514-22.
132. Masuelli, L., et al., *Resveratrol and diallyl disulfide enhance curcumin-induced sarcoma cell apoptosis*. Front Biosci (Landmark Ed), 2012. **17**: p. 498-508.
133. Beevers, C.S., et al., *Curcumin disrupts the Mammalian target of rapamycin-raptor complex*. Cancer Res, 2009. **69**(3): p. 1000-8.
134. Berger, F., I. Buchsler, and B. Munz, *The effect of the NF-kappa B inhibitors curcumin and lactacystin on myogenic differentiation of rhabdomyosarcoma cells*. Differentiation, 2012. **83**(5): p. 271-81.
135. Hosseinzadeh, L., et al., *Curcumin potentiates doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells through generation of reactive oxygen species*. Food Chem Toxicol, 2011. **49**(5): p. 1102-9.
136. Usuda, J., et al., *Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers*. J Thorac Oncol, 2006. **1**(5): p. 489-93.
137. Tonnesen, H.H., et al., *Studies on curcumin and curcuminoids. IX: Investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems*. J Pharm Sci, 1987. **76**(5): p. 371-3.
138. Bernd, A., *Visible light and/or UVA offer a strong amplification of the anti-tumor effect of curcumin*. Phytochem Rev, 2014. **13**: p. 183-189.
139. Erez, Y., et al., *Effect of acid on the ultraviolet-visible absorption and emission properties of curcumin*. J Phys Chem A, 2014. **118**(5): p. 872-84.
140. Dujic, J., et al., *Curcumin in combination with visible light inhibits tumor growth in a xenograft tumor model*. Int J Cancer, 2009. **124**(6): p. 1422-8.
141. Yan, D., M.E. Geusz, and R.J. Jamasbi, *Properties of lewis lung carcinoma cells surviving curcumin toxicity*. J Cancer, 2012. **3**: p. 32-41.
142. Chen, Q., et al., *Curcumin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway*. Oncol Rep, 2010. **23**(2): p. 397-403.
143. Weir, N.M., et al., *Curcumin induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by modulating Akt and p38 MAPK*. Cancer Biol Ther, 2007. **6**(2): p. 178-84.
144. Di, C. and Y. Zhao, *Multiple drug resistance due to resistance to stem cells and stem cell treatment progress in cancer (Review)*. Exp Ther Med, 2015. **9**(2): p. 289-293.
145. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
146. Park, C.H., D.E. Bergsagel, and E.A. McCulloch, *Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay*. J Natl Cancer Inst, 1971. **46**(2): p. 411-22.
147. Yang, Z.F., et al., *Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(2): p. 153-66.
148. Wong, N.C., et al., *Antibody against Granulin-Epithelin Precursor Sensitizes Hepatocellular Carcinoma to Chemotherapeutic Agents*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(12): p. 3001-12.

149. Chen, X., et al., *Epithelial mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance and invasion of hepatoma subpopulations*. J Hepatol, 2011. **55**(4): p. 838-45.
150. Nautiyal, J., et al., *Combination of dasatinib and curcumin eliminates chemo-resistant colon cancer cells*. J Mol Signal, 2011. **6**: p. 7.
151. Wei, M.F., et al., *Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells*. Autophagy, 2014. **10**(7): p. 1179-92.
152. Yu, C.H. and C.C. Yu, *Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid (ALA) impairs tumor initiating and chemo-resistance property in head and neck cancer-derived cancer stem cells*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e87129.
153. Bostad, M., et al., *Photochemical internalization (PCI) of immunotoxins targeting CD133 is specific and highly potent at femtomolar levels in cells with cancer stem cell properties*. J Control Release, 2013. **168**(3): p. 317-26.
154. Crous, A.M. and H. Abrahamse, *Lung cancer stem cells and low-intensity laser irradiation: a potential future therapy?* Stem Cell Res Ther, 2013. **4**(5): p. 129.
155. Trujillo, J., et al., *Mitochondria as a target in the therapeutic properties of curcumin*. Arch Pharm (Weinheim), 2014. **347**(12): p. 873-84.
156. Dujic, J., et al., *Low concentrations of curcumin induce growth arrest and apoptosis in skin keratinocytes only in combination with UVA or visible light*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(8): p. 1992-2000.
157. Lundvig, D.M., et al., *Curcumin induces differential expression of cytoprotective enzymes but similar apoptotic responses in fibroblasts and myofibroblasts*. Exp Cell Res, 2015. **330**(2): p. 429-41.
158. Atsumi, T., K. Tonosaki, and S. Fujisawa, *Comparative cytotoxicity and ROS generation by curcumin and tetrahydrocurcumin following visible-light irradiation or treatment with horseradish peroxidase*. Anticancer Res, 2007. **27**(1A): p. 363-71.
159. Vareed, S.K., et al., *Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(6): p. 1411-7.
160. Lee, J.H., J.H. Oh, and Y.J. Lee, *Biliary excretion of curcumin is mediated by multidrug resistance-associated protein 2*. Biol Pharm Bull, 2012. **35**(5): p. 777-80.
161. Metzler, M., et al., *Curcumin uptake and metabolism*. Biofactors, 2013. **39**(1): p. 14-20.
162. Heger, M., et al., *The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer*. Pharmacol Rev, 2014. **66**(1): p. 222-307.
163. Wang, Y.J., et al., *Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products*. J Pharm Biomed Anal, 1997. **15**(12): p. 1867-76.
164. Busch, A.W. and B.L. Montgomery, *Interdependence of tetrapyrrole metabolism, the generation of oxidative stress and the mitigative oxidative stress response*. Redox Biol, 2015. **4C**: p. 260-271.
165. Yang, K.Y., et al., *Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from Curcuma longa by LC-MS/MS*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **853**(1-2): p. 183-9.

166. Schrader, C., et al., *Curcumin induces paraoxonase 1 in cultured hepatocytes in vitro but not in mouse liver in vivo*. Br J Nutr, 2011. **105**(2): p. 167-70.
167. Sung, B., et al., *Curcumin circumvents chemoresistance in vitro and potentiates the effect of thalidomide and bortezomib against human multiple myeloma in nude mice model*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(4): p. 959-70.
168. Matabudul, D., et al., *Tissue distribution of (Lipocurc) liposomal curcumin and tetrahydrocurcumin following two- and eight-hour infusions in Beagle dogs*. Anticancer Res, 2012. **32**(10): p. 4359-64.
169. Bansal, S.S., et al., *Controlled systemic delivery by polymeric implants enhances tissue and plasma curcumin levels compared with oral administration*. Eur J Pharm Biopharm, 2012. **80**(3): p. 571-7.
170. Zhao, G.J., et al., *Establishment of an orthotopic transplantation tumor model of hepatocellular carcinoma in mice*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(47): p. 7087-92.
171. Lee, T.K., et al., *Establishment of animal models with orthotopic hepatocellular carcinoma*. Nucl Med Mol Imaging, 2014. **48**(3): p. 173-9.
172. Zhao, D., et al., *Metformin decreases IL-22 secretion to suppress tumor growth in an orthotopic mouse model of hepatocellular carcinoma*. Int J Cancer, 2014.
173. Portmann, S., et al., *Antitumor effect of SIRT1 inhibition in human HCC tumor models in vitro and in vivo*. Mol Cancer Ther, 2013. **12**(4): p. 499-508.
174. Bour, G., et al., *Design and development of a robotized system coupled to microCT imaging for intratumoral drug evaluation in a HCC mouse model*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e106675.
175. Darvesh, A.S., B.B. Aggarwal, and A. Bishayee, *Curcumin and liver cancer: a review*. Curr Pharm Biotechnol, 2012. **13**(1): p. 218-28.
176. Ning, L., et al., *Down-regulation of Notch1 signaling inhibits tumor growth in human hepatocellular carcinoma*. Am J Transl Res, 2009. **1**(4): p. 358-66.
177. Liu, H., et al., *In vivo and in vitro suppression of hepatocellular carcinoma by EF24, a curcumin analog*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48075.
178. Debruyne, E.N. and J.R. Delanghe, *Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-fetoprotein: new aspects and applications*. Clin Chim Acta, 2008. **395**(1-2): p. 19-26.
179. Duarte, V.M., et al., *Curcumin enhances the effect of cisplatin in suppression of head and neck squamous cell carcinoma via inhibition of IKKbeta protein of the NFkappaB pathway*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(10): p. 2665-75.
180. Kumar, B., et al., *A novel curcumin analog (H-4073) enhances the therapeutic efficacy of cisplatin treatment in head and neck cancer*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e93208.
181. Wang, Y., et al., *The protective effect of curcumin on hepatotoxicity and ultrastructural damage induced by cisplatin*. Ultrastruct Pathol, 2014. **38**(5): p. 358-62.

## **Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Arbeit wurde in der Abteilung für Kinderchirurgie und Kinderurologie der Universitätskliniken Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Sorin Armeanu-Ebinger durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Armeanu-Ebinger und meiner Co-Betreuerin Dr. med. Verena Ellerkamp (Oberärztin der Kinderchirurgie).

Sämtliche Versuche, mit Ausnahme der operativen Abschnitte der Tierversuche, wurden, nach Einarbeitung durch die medizinisch technische Assistentin Bettina Kirchner, von mir eigenständig durchgeführt. Die Xenotransplantation wurde durch Frau Dr. Ellerkamp durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte, nach Anleitung von Prof. Armeanu und Dr. Ellerkamp, eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 26.06.2016

## Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Nicola Bortel, Sorin Armeanu-Ebinger, Evi Schmid, Bettina Kirchner, Jan Frank, Alexa Kocher, Christina Schiborr, Steven Warmann, Jörg Fuchs, Verena Ellerkamp, *Effects of curcumin in pediatric epithelial liver tumors: inhibition of tumor growth and alpha-fetoprotein in vitro and in vivo involving the NFkappaB- and the beta-catenin pathways*. *Oncotarget*. 2015 Dec 1;6(38):40680-91. doi: 10.18632/oncotarget.5673

Verena Ellerkamp, Nicola Bortel, Evi Schmid, Bettina Kirchner, Sorin Armeanu-Ebinger, Jörg Fuchs, *Photodynamic therapy potentiates the effects of curcumin on pediatric epithelial liver tumor cells*. *Anticancer Research*, 2016 Jul;36(7):3363-72

Weiterhin wurden aus den beschriebenen Ergebnissen folgende zwei Poster im Rahmen des SIOP 2015 in Kapstadt präsentiert:

Bortel, N., et al., *Photodynamic effects of curcumin on pediatric hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma cell lines*.

Ellerkamp, V., et al., *Micellar curcumin effectively reduces AFP and tumor growth in an orthotopic murine model of pediatric hepatocellular carcinoma*.

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Jörg Fuchs, dem Ärztlichen Direktor der kinderchirurgischen und kinderurologischen Klinik der Universität Tübingen, für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit in seiner Abteilung.

Ein ganz besonderes Dankeschön möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sorin Armeanu-Ebinger aussprechen. Vielen Dank für die ausgezeichnete Betreuung sowohl während der Experimentdurchführung als auch im gesamten Schreibprozess. Die große Diversität an Ideen und Tipps beschleunigte die Fertigstellung der Arbeit und festigte meine Motivation. Die täglich stattfindenden Gespräche beim Mittagessen gaben mir nicht nur auf fachlicher sondern auch auf persönlicher Ebene wichtige Anreize.

Ohne meine Betreuerin Frau Dr. med. Verena Ellerkamp (Oberärztin für Kinderchirurgie) wäre die Promotion nicht zu Stande gekommen. Sie schaffte es auf Antrieb mich für Kurkuma zu begeistern und führte mich durch meine Promotion mit beachtenswerter, tänzerischer Leichtigkeit. Trotz chirurgischer Zeitengpässe fand sie viel Zeit für die Xenotransplantationen und den Austausch von Ideen. Ihrem Einsatz verdanke ich die raschen Veröffentlichungen von Teilen meiner Promotion sowie meine Kongressteilnahme in Kapstadt. Vielen Dank!

Sehr wichtig ist mir das Dankeschön an die zwei erfahrenen, fleißigen und sympathischen Labortechnischen Assistentinnen Bettina Kirchner und Julia Wenz, die mich schnell einarbeiteten und für viele kurzweilige Labortage sorgten. Der morgendliche gemeinsame Kaffee stellte stets einen optimalen Start in den Arbeitstag dar.

Herzlichen Dank an die Arbeitsgruppe in Hohenheim von Prof. Dr. Frank mit seinen zwei Kolleginnen Christina Schiborr und Alexa Kocher. Sie stellten uns sowohl das mizellare als auch das reine Curcumin zur Verfügung und ermöglichten uns durch massenspektrometrische Messungen die Curcuminkonzentrationen in Blut und Organen der Versuchstiere zu bestimmen.

Schließlich möchte ich mich noch bei Frau Dr. rer. nat. Evi Schmid bedanken, die mir als Nachfolgerin für Prof. Armeanu-Ebinger in den Endzügen meiner Promotionsarbeit

sehr hilfsbereit und unterstützend zur Seite stand. Mit letzten Inspirationen sorgte sie für den letzten Schliff dieser Promotion.

# Curriculum vitae

## *Persönliche Daten*

**Name** Nicola Kanyabirunga Bortel  
**Geboren** 25. Februar 1990 in Annweiler am Trifels  
**Nationalität** Deutsch

## *Ausbildung*

**4/2010 – 09/2017** **Universität Tübingen**  
Studium der Humanmedizin

**08. – 09.05.2017** **Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung**

**12. - 14.04.2016** **Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung**

**10/2015** **SIOP (Paediatric Oncology Congress), Kapstadt**  
Vorstellung eines wissenschaftlichen Posters, „Best Poster Price“

**3/2015 – 10/2015** **Universität PUCRS, Porto Alegre, Brasilien**  
Auslandssemester als Baden-Württemberg-Stipendiat

**10/2013 – 9/2014** **Stipendiat des IZKF-Promotionskollegs Tübingen**

**04/2012** **Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung**

**2000 – 2009** **Fichte-Gymnasium, Karlsruhe**  
Abitur

**8/2006 – 7/2007** **Colegio Rafael Antonio Moreno, Macaracas, Panamá**  
Schüleraustauschjahr

**1996 – 2000** **Grundschule in Karlsruhe**