

**Aus der Universitätslinik für Neurochirurgie Tübingen**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Tatagiba**

**Systematische in vitro Charakterisierung des  
Photosensibilisators Hypericin für die  
Photodynamische Therapie von malignen Gliomen**

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

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

**vorgelegt von**

**Hannah Teresa Wein**

**aus**

**Ulm**

**2009**

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. M. Tatagiba

2. Berichterstatter:

Frau Professor Dr. A. Bornemann

Für

meine Großeltern  
Friedrich und Maria Vollmeyer  
sowie  
Walter und Anna-Christina Wein

In memoriam

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Vorwort .....	1
1.2 (Primäre) Tumoren des ZNS .....	3
1.2.1 Gliome .....	3
1.2.1.1 Astrozytome.....	4
1.2.1.2 Invasivität des Wachstums.....	8
1.2.1.3 Therapie und Prognose von Gliomen.....	9
1.3 Klinische Fluoreszenzdiagnostik und PDT.....	11
1.3.1 Historischer Überblick.....	11
1.3.2 Entstehung von Fluoreszenz.....	13
1.3.3 Fluoreszenzdiagnostik.....	17
1.3.4 PDT und Wirkmechanismen.....	19
1.3.5 Auswirkungen der PDT auf die Zelle.....	22
1.3.6 Photosensibilisatoren.....	24
1.3.6.1 Klassifikation der Photosensibilisatoren.....	27
1.4 Das Prodrug 5-Aminolävulinsäure.....	29
1.4.1 Chemische Eigenschaften und Charakterisierung.....	29
1.4.2 Klinische Anwendung Protoporphyrin IX.....	30
1.5 Der Photosensibilisator Hypericin.....	31
1.5.1 Chemische Eigenschaften und Charakterisierung.....	31
1.5.2 Geschichtliche Aspekte.....	33
1.5.3 Wirkungsweisen von Johanniskraut und Hypericin.....	36
1.5.3.1 Antidepressive Eigenschaften von Johanniskraut.....	36
1.5.3.2 Antivirale Eigenschaften.....	38
1.5.3.3 Antibakterielle Eigenschaften.....	39
1.5.3.4 Antiproliferative und antineoplastische Potenz.....	39
1.5.3.4.1 Inhibition der Proteinkinase C.....	40
1.5.3.4.2 Inhibition der Tyrosinkinase.....	42
1.5.3.4.3 Induktion von Apoptose und Nekrose.....	42
1.5.3.5 Pharmakokinetische Interaktionen.....	43
1.6 Schwerpunkte dieser Arbeit.....	44

1.6.1 Charakterisierung von Photosensibilisatoren an Zellkulturen.....	44
1.6.2 Fokus.....	45
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>46</b>
2.1 Zellkultur.....	46
2.1.1 Glioblastomzellen.....	46
2.1.2 Arbeitsmethoden.....	46
2.1.3 Kultivieren der Zellen.....	46
2.1.3.1 Anzucht der Zellen.....	46
2.1.3.2 Lagerung der Zellen.....	48
2.1.4 Wachstumskurven.....	48
2.2 Ansetzen der Stammlösung von Hypericin.....	49
2.3 Ansatz und Durchführung der Versuche.....	51
2.3.1 Aussaat und Inkubation für die Zytotoxizität.....	51
2.3.2 Aussaat und Inkubation für die Phototoxizität.....	52
2.3.2.1 Aussaat und Inkubation U373MG, LN229, T98G.....	53
2.3.2.2 Aussaat und Inkubation von U373 MG und T98G zur Bestimmung der Phototoxizität in Abhängigkeit der Inkubations- konzentration.....	54
2.3.2.3 Aussaat und Inkubation von LN229 zur Bestimmung des Aktionsspektrums von Hypericin.....	54
2.3.3 Aussaat und Inkubation von U373 MG zur Bestimmung der intrazellulären Akkumulation.....	55
2.3.4 Ansatz und Inkubation von U373 MG zur Bestimmung des Transportmechanismus.....	55
2.3.5 Intrazelluläre Lokalisation.....	56
2.4 Versuchsauswertung.....	57
2.4.1 Auswertung der Experimente von Zyto- und Phototoxizität.....	57
2.4.2 Auswertung Durchflusszytometrie (FACS).....	58
2.4.3 Auswertung der Versuche zur Fluoreszenzmikroskopie.....	59

2.5	Statistische Analysen.....	60
2.5.1	Analyse zur intrazellulären Akkumulation von Hypericin.....	61
2.5.1.1	Konzentrationsabhängige Aufnahmekinetik.....	61
2.5.1.2	Zeitabhängige Aufnahmekinetik.....	61
2.5.2	Analyse zur Phototoxizität von Hypericin.....	63
2.6	Darstellung der für die Auswertung benötigten Methoden.....	63
2.6.1	Laser.....	63
2.6.1.1	Farbstofflaser (Dye Laser).....	65
2.6.1.2	Argon-Laser.....	66
2.6.1.3	Anwendungsgebiete.....	67
2.6.2	Durchflusszytometrie (FACS).....	68
2.6.2.1	Prinzip.....	68
2.6.2.2	Lichtdetektion.....	69
2.6.2.3	Fluoreszenzkanäle.....	70
2.6.2.4	Geräteparameter.....	70
2.6.2.5	Auswertung der im FACS generierten Messdaten.....	71
2.6.3	Mikroskopie.....	72
2.6.3.1	Interne Totalreflektions-Fluoreszenz-Mikroskopie.....	73
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>75</b>
3.1	Wachstumskurven der Glioblastomzelllinien.....	75
3.2	Zytotoxizität von Hypericin.....	76
3.3	Intrazelluläre Akkumulation von Hypericin.....	79
3.4	Zellulärer Transportmechanismus.....	85
3.5	Phototoxizität von Hypericin.....	86
3.5.1	Phototoxizität von Hypericin U373 MG, T98G und LN229.....	86
3.5.2	Phototoxizität in Abhängigkeit der Inkubationskonzentration.....	90
3.5.3	Aktionsspektrum.....	93
3.6	Intrazelluläre Lokalisation.....	94

<b>4. Diskussion.....</b>	<b>97</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>109</b>
<b>6. Anhang.....</b>	<b>113</b>
6.1 Literaturverzeichnis.....	113
6.2 Literaturverzeichnis zu den Abbildungen.....	122
6.3 Literaturverzeichnis zu den Tabellen.....	123
6.4 Danksagung.....	124
6.5 Lebenslauf.....	126

### Abkürzungen

AO	Akridin-Orange
5-ALA	5-Aminolaevulin-Säure
EGF	Epidermal Growth Factor
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
LDL	Low-density-Lipoprotein
R123	Rhodamine 123
TIRFM	Internal Reflection Fluorescence Microscopy (Totale interne Reflexionsfluoreszenzmikroskopie)
PDT	Photodynamische Therapie
PBS	Phosphate buffered saline (gepufferte Salzlösung)
v.Chr.	vor Christus
w.E.	willkürliche Einheiten
Well	Kammer
WHO	World Health Organisation (Welt-Gesundheits-Organisation)
ZNS	Zentrales Nervensystem



### 1. Einleitung

#### 1.1 Vorwort

Der medizinische Fortschritt und die wissenschaftlichen Anstrengungen innerhalb der Tumorforschung sind derzeit enorm. Dennoch ist die Krankheit Krebs weltweit nach wie vor nicht aufzuhalten. Seit Beginn des 20. Jahrhunderts sind maligne Erkrankungen von der siebt- zur zweithäufigsten Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen geworden [1].

400.000 Menschen in Deutschland werden jährlich mit der Diagnose Krebs konfrontiert. Ohgaki et al. bestimmten mittels einer in der Schweiz durchgeführten Studie eine Inzidenzrate von 3.32 pro 100.000 bei Männern und 2.24 pro 100.000 bei Frauen (Bevölkerung/Jahr). Diese Zahlen wurden der Welt-Standard-Population angeglichen [2].

Gehirntumore zählen zwar mit 7 Neuerkrankungen auf 100 000 deutsche Einwohner zu den weniger häufigen Tumorarten, machen innerhalb der neurologischen Erkrankungen jedoch nach Schlaganfällen die zweithäufigste Todesursache aus [3]. Maligne Gliome treten im zentralen Nervensystem des Erwachsenen zu 40 bis 67% auf und zählen somit zu den häufigsten Primärtumoren des Gehirns [4]. Stereotaktische Biopsie und reduktive Chirurgie gefolgt von Radiatio und Chemotherapie stellen momentan die Standardtherapie bei der Behandlung maligner Hirntumore dar. Nach Stupp et al. sind nicht nur die Tumorphistologie, Grading und Lokalisation, sondern auch die Kontrastmittelaufnahme sowie molekulargenetische Marker ausschlaggebende Faktoren für das Überleben von Patienten mit niedrig-gradigen Gliomen. Gleichzeitig spielen Faktoren wie Alter und Anfalls-Anamnese eine entscheidende Rolle für die Prognose. Trotz verschiedenster Behandlungsschemata mittels Radiatio und simultaner Chemotherapie sind ausser der Tumorchirurgie bislang noch keine optimalen Therapieformen und -sequenzen etabliert [5]. Aufgrund des invasiven Wachstums der Tumore in das umliegende Hirnparenchym sind neurochirurgische Interventionen allerdings nur begrenzt und eine vollständige Resektion somit kaum möglich [6]. Auch die

Lokalisation der Tumore in unmittelbarer Umgebung wichtiger funktioneller Hirnareale erschwert die erfolgreiche Durchführung von Totalresektionen und beinhaltet das Risiko iatrogen verursachter neurologischer Defizite. Trotz aggressiver Therapieschemata verbleibt die mediane Überlebenszeit nach Diagnose bei weniger als einem Jahr [7]. Ohgaki et al. [2] beobachteten bei jenen, in der Schweiz generierten Daten, eine 6-Monats-Überlebensrate von 42.4%, wobei die 1-Jahres-Überlebensrate bei 17.7% lag. Die 2-Jahres-Überlebensrate betrug schließlich nur noch 3.3%.

Vor dem Hintergrund vieler Studien ist allerdings der Anlass zu der Annahme gegeben, dass eine radikale Tumorentfernung die mediane Überlebenszeit verlängert [8, 9, 10].

Um diese geforderte Radikalität des Eingriffs umsetzen zu können, ist eine exakte nicht nur präoperative, sondern vor allem intraoperative Tumorentfernung und -lokalisation erforderlich. Gerade deshalb ist die forcierte Forschung nach anderen, alternativen Behandlungsmethoden unter dem Aspekt der nur sehr kurzen medianen Überlebenszeit der Hirntumor-Patienten dringend erforderlich.

Die Photodynamische Therapie (PDT), welche sich in den letzten Jahren zunehmend in der klinischen Forschung und Entwicklung befand, stellt ein hierfür geeignetes Verfahren dar und wurde nicht zuletzt deshalb zum Fokus dieser Arbeit.

Die Methode der PDT basiert auf der Applikation eines Photosensibilisators und der anschließenden Bestrahlung des angereicherten Gewebes mit Licht einer geeigneten Wellenlänge.

Der Photosensibilisator Hypericin, ein Naphtodianthron, besitzt wie ein Großteil aller Photosensibilisatoren zusätzlich die Eigenschaft der Fluoreszenz und eignet sich somit besonders zur kontrastreichen intraoperativen Visualisierung von Tumorgewebe. Die Substanz erweist sich somit als vorteilhaft für die Anwendung der PDT innerhalb der Neurochirurgie, auch im Rahmen der Zielsetzung einer zukünftigen klinischen Therapieform in diesem Bereich.

Nicht nur diese essentiellen Aspekte eröffneten für diese Arbeit neues Forschungsterrain. Auch vor dem Hintergrund einer kürzlich veröffentlichten

Studie, welche zeigte, dass sich Hypericin in Glioblastomzellen stärker akkumuliert, als in Neuronen [11], ergab sich für diese Arbeit die Fragestellung der systematischen In-vitro-Charakterisierung der Substanz.

### **1.2 (Primäre) Tumoren des ZNS**

Tumoren des zentralen Nervensystems bilden unter allen menschlichen Tumoren einen Anteil von etwa 9% [12].

#### **1.2.1 Gliome**

Gliome sind primäre Tumore des zentralen Nervensystems und bilden unter den Hirntumoren die größte Gruppe. Gliale Tumore entwickeln sich aus dem Stütz- und Nährgewebe des Gehirns, der sogenannten Glia. Nach Bruner et al. sind 70% der primären ZNS-Tumoren Gliome, jedes Jahr werden nahezu 5000 Fälle neu diagnostiziert [13]. Nach Ohgaki et al. beträgt die Anzahl der Neuerkrankungen pro Jahr 2,96 bis 3,39 auf 100 000 Personen [14]. Codd et al. bezeichneten diese Tumorentität ebenfalls als die mit 40 bis 67% am häufigsten im zentralen Nervensystem des Adulten wachsende Tumorentität unter den primären Hirntumoren [4]. Hierzu zählen Astrozytome, oligodendrogliale Tumore, Ependymome sowie gemischte Gliome [15, 16]. Hierunter bildet das Glioblastom mit 50% einen beträchtlichen Anteil. Dessen ursprünglicher Zellverband ist aufgrund seines undifferenzierten Wachstums nicht eindeutig zu definieren, seine histologische Morphologie stellt sich als äußerst variabel dar [13]. Gliomzellen sind stark migratorisch und infiltrieren sehr früh benachbarte Hirnareale. Gliome stellen nicht nur morphologisch, sondern auch zellbiologisch in sich heterogene Tumore dar, deren Wachstum als diffus-infiltrierend beschrieben wird [13]. Aufgrund der Diffusität der Tumorgrenzen erweist sich sowohl die intraoperative Abgrenzung von physiologischem Hirnparenchym als auch die histopathologische Bestätigung vollständiger Resektionsränder als äußerst kompliziert [17, 18]. Meist ist eine vollständige Resektion der Gliome somit kaum möglich.

### 1.2.1.1 Astrozytome

Astrozyten dienen der Versorgung des Gehirns und Rückenmarks, übernehmen darüber hinaus bedeutende Funktionen bei neuronalen Stoffwechselfunktionen und sind an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke mitbeteiligt [13]. Diese Zellen enthalten charakteristischerweise das Filament-Protein GFAP (glial fibrillary acidic protein), welches trotz der morphologischen Variabilität ihrer neoplastischen Korrelate, einen nützlichen immunhistochemischen Marker für deren Identifizierung darstellt.

Astrozytome gehören zur Gruppe der neuroepithelialen Tumoren und bilden mit 75 bis 90% den grössten Anteil unter den primären Gliomen. Diese lassen sich nach der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems in vier Dignitätsgrade unterteilen:

WHO	Tumor	Dignität	Histologie	Genetische Alterationen
I	Pilozytisches Astrozytom	Benigne	Rosenthalfasern Eosinophile Körperchen	Akkumulation von p53 (> 50%) Deletion Chromosom 17q (< 20%)
II	Astrozytom	Niedergradig	Kernatypien	Mutation von p53 (>25%)
III	Anaplast. Astrozytom	Maligne	Kernatypien Mitosen	Mutation von p53 (> 30%) Mutation von p16 (> 20%) Deletion Chromosom 10 (> 60%) und 19q (< 50%)
IV	Glioblastoma multiforme	Hochmaligne	Kernatypien Mitosen Nekrosen Gefäßproliferation	Mutation von p53 (> 30%) Mutation von p16 (> 50%) Deletion Chromosom 10 (> 60%) und 19q (25%)

Tabelle 1: WHO-Klassifikation astrozytärer Tumoren, modifiziert nach Kleihues

Im Jahre 2007 wurde allerdings die vierte Edition der WHO-Tumorklassifikation des zentralen Nervensystems veröffentlicht. Diese bezieht, um nur zwei von vielen exemplarisch aufzuführen, mehrere neue Tumorentitäten wie das angiozentrische Gliom und den papillären glioneuralen Tumor mit ein. Außerdem wurden histologische Typen hinzugefügt und die Bereiche der genetischen Profile aktualisiert [19]. Da im Rahmen vorliegender Arbeit mit Glioblastomzellen experimentiert wurde, wird im folgenden lediglich auf diese Untergruppe der Gliome im Detail eingegangen. Glioblastome werden wie in Tabelle 1 ersichtlich als WHO Grad IV klassifiziert. Zu deren Untergruppen zählen das Riesenzellglioblastom sowie das Gliosarkom [20].

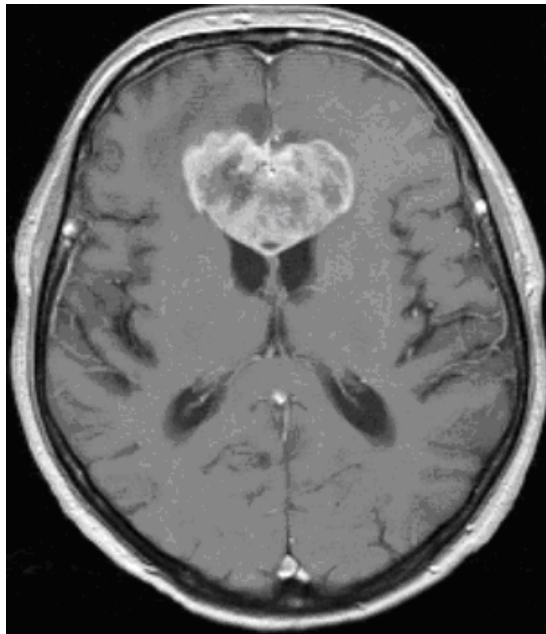


Abbildung 1: Typisches Bild eines sogenannten Schmetterlingglioms in der T1 gewichteten MRT Aufnahme nach Gadoliniumgabe. Der Tumor breitet sich über das Corpus callosum bifrontal aus und komprimiert die beiden Frontalhörner.

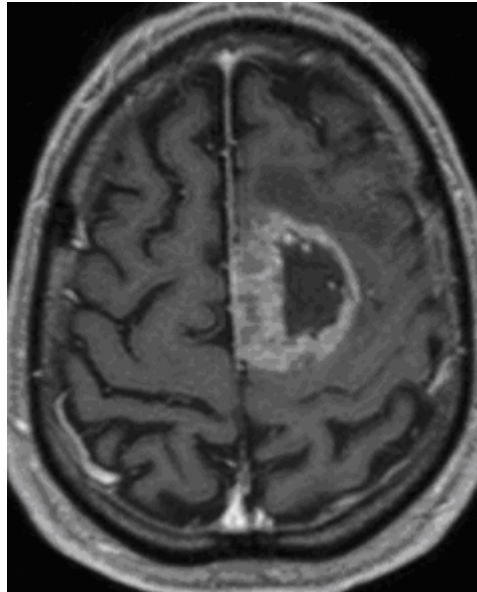


Abbildung 2 A: Präoperative MRT des Zerebrums. Die T1-gewichtete Aufnahme nach Gadoliniumgabe zeigt ein teils zystisches, teils solides Glioblastom, links präzentral.

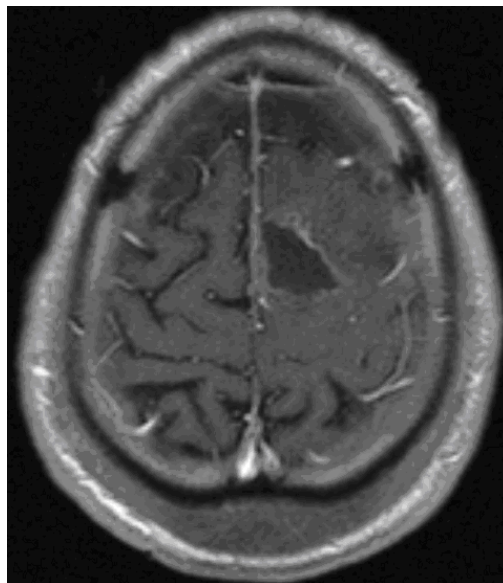


Abbildung 2 B: Die postoperative Aufnahme zeigt den Zustand nach Resektion des Glioblastoms.

Die Tumornekrose ist das Hauptkriterium zur Differenzierung zwischen anaplastischen Astrozyomen und Glioblastomen [21, 22, 23] darüber hinaus weisen Glioblastome pathohistologisch nicht nur Hämorrhagien und Thrombosenbildung auf, sondern imponieren auch durch enorm rasches

Zellwachstum [13] sowie durch ihre äusserst unterschiedliche histologische Morphologie.

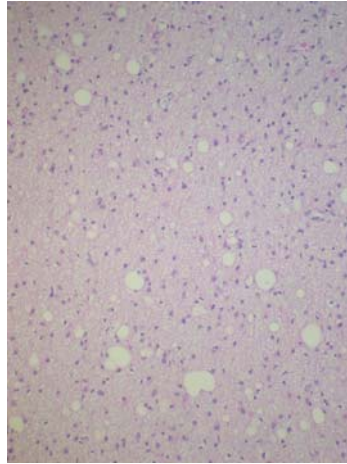


Abbildung 3: Histologisches Schnittbild eines diffusen Astrozytoms WHO Grad II mit charakteristischem fibrillärem Hintergrund.

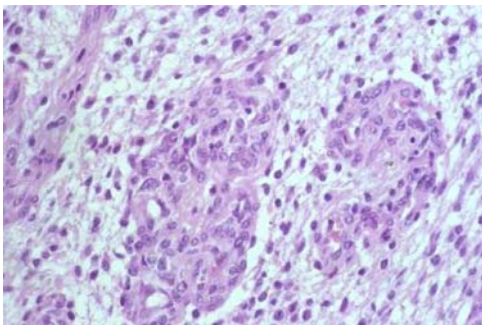


Abbildung 4 A

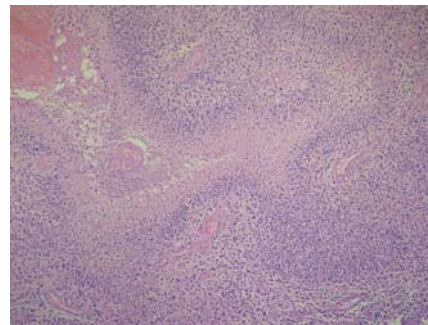


Abbildung 4 B

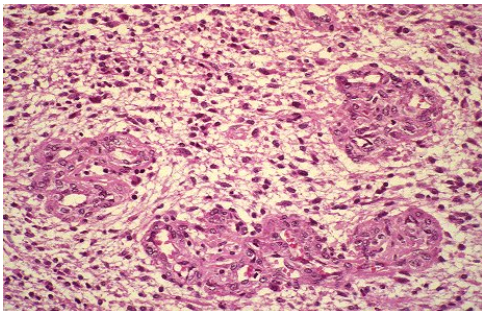


Abbildung 4 C

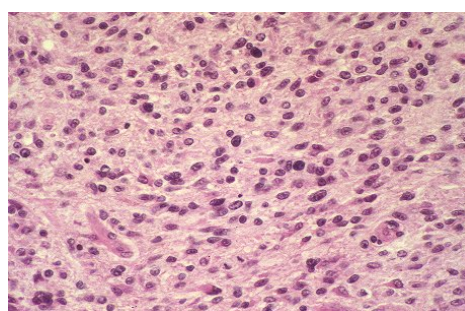


Abbildung 4 D

Abbildung 4 A bis D: Histologische Schnittbilder eines Glioblastoms WHO Grad IV mit Mitosenreichtum. In Abbildung A und D ist im Vergleich zu Abbildung 3 eine ausgeprägtere Kernpleomorphie zu sehen; im unteren mittleren Bildbereich ist eine Mitosefigur erkennbar. Abbildung B weist viele Gefäßproliferate auf. In Abbildung C imponiert eine strichförmige Nekrose mit palisadenförmiger Anordnung der Tumorzellen.

Typisch sind auch ausgeprägte glomeruloide Gefäßproliferationen (Endothelzell-Proliferate) in den Tumorrandbereichen. Primäre, de novo Glioblastome, welche die häufigere Form darstellen, entstehen ohne Nachweis eines geringer differenzierten Glioms und manifestieren sich überwiegend bei älteren Patienten, wohingegen sekundäre Glioblastome, welche auf dem Boden ursprünglich besser differenzierter Astrozytome, Oligoastrozytome oder Oligodendrogliome malignisieren, vorwiegend bei jüngeren Patienten entstehen [20]. Diese Form des Glioblastoms ist seltener und weist eine bessere Prognose auf. Bei ersterer lässt sich molekulargenetisch häufig eine PTEN-Mutation feststellen, letztere geht oft mit einer p53-Mutation einher [20] und zwar in 60% der Fälle [15].

Glioblastome treten nicht nur solitär auf, sondern auch in 3 bis 6% multifokal. Sie sind meist supratentoriell lobär lokalisiert, circa 5% metastasieren in den Subarachnoidalraum [20]. Vor allen Dingen in den Großhirnhemisphären lokalisiert, breitet es sich häufig schmetterlingsförmig über das corpus callosum auf die balkennahen Regionen der Gegenseite aus [24], hierbei spricht man vom sogenannten Schmetterlingsglioblastom.

Die klinischen Symptome zeichnen sich durch Kopfschmerzen (20 bis 60%), Paresen (20 bis 60%), Psychosyndrom (14 bis 42%) sowie durch epileptische Anfälle (11 bis 36%) aus [20].

### **1.2.1.2 Invasivität des Wachstums**

Invasiv wachsende Gliomzellen breiten sich in verschiedenen anatomischen Strukturen des ZNS wie beispielsweise in der Membran von Blutgefäßen oder innerhalb der Glia limitans externa aus. Durch extrazelluläre Matrixproteine ebenso wie über eine enzymatische Modifizierung des Extrazellulärraums wird die nötige Umgebung für eine Ausbreitung in benachbarte Hirnareale geschaffen [25].

Ebenso wurde beobachtet, dass sich invasive Gliomzellen häufig über Myelinfaserbündel der weissen Substanz verbreiten.



Die Art und Weise der Tumorausbreitung scheint somit nicht willkürlich zu sein, sondern geschieht auf hämatogenem Wege oder auch über myelinisierte Axone. Aufgrund ihrer großen Affinität zu Myelinfaserbündeln erstreckt sich die Ausbreitung maligner Gliomzellen von der Sehstrahlung über das Corpus callosum bis hin zur vorderen Kommissur und resultiert so in bilateralem Wachstum [26, 27, 28]. Matsukado et al. entdeckten bei 47% von 100 Patienten mit malignen Gliomen eine Ausbreitung auf die kontralaterale Hemisphäre [29]. Die Ausbreitung in die Ventrikel wird letztlich mit subependymalem Wachstum, Invasion des plexus choroideus sowie der Metastasierung über den Liquor assoziiert.

Metastasen im Subarachnoidalraum sind in 15 bis 25% der Glioblastome [30, 31], zu beobachten, eine systemische Metastasierung ist jedoch selten [32, 33].

### **1.2.1.3 Therapie und Prognose von Gliomen**

Die Mortalität bei Tumoren des ZNS in Westeuropa, Nordamerika und Australien, einschließlich aller histologischer Subtypen, liegt ungefähr bei 4 bis 7 pro 100 000 Personen pro Jahr beim männlichen sowie bei 3 bis 5 beim weiblichen Geschlecht [34, 35].

Die Prognose für Patienten, die an einem Gliom erkrankt sind, ist, das pilozytische Astrozytom ausgenommen, nach wie vor schlecht. Die mediane Überlebenszeit beträgt 4,9 Monate, die Fünf-Jahres-Überlebensrate nur 1,2 bis 2,9%. Der Altersdurchschnitt bei Erstdiagnose beträgt 61 bis 62 Jahre [14].

Für die Prognose von Langzeitüberleben bei Patienten mit höhergradigen Gliomen, sind mehrere Variablen von Bedeutung. Diese betreffen nicht nur den Therapieerfolg, sondern sind ebenso abhängig von der Tumorphistologie wie auch vom Patienten selbst. So zählen nicht nur das Ausmaß des chirurgischen Eingriffs und das Tumorgrading, sondern auch Alter und mental-kognitive Fähigkeiten zu den Faktoren, die das Überleben wesentlich beeinflussen [9].

Allerdings scheint das Ausmaß der neurochirurgischen Intervention unter all diesen den beständigsten Faktor darzustellen. Im Gegensatz zur

stereotaktischen Biopsie hat die Durchführung einer Totalresektion eine signifikant verlängerte Überlebenszeit zur Folge [9].

Stummer et al. 2008 [36] veröffentlichten erst kürzlich, dass bei Glioblastomen die Überlebensrate von einer kompletten Resektion des Tumors im Sinne einer totalen Tumorsektion abhängt. Somit überlebten Patienten ohne Residualtumor länger (16,7 versus 11,8 Monate). Weiterhin fanden Re-Interventionen bei Patienten mit residualem Tumor früher statt (6,7 versus 9,5 Monate). Ammirati et al. [8] hatten bereits im Jahre 1987 in ihrer Studie den positiven Effekt der chirurgischen Resektion supratentorieller Glioblastome und anaplastischen Astrozytome auf Überlebenszeit und Lebensqualität postuliert. Patienten, welche eine Totalresektion erhalten hatten, wiesen eine mediane Überlebenszeit von 90 Wochen, wohingegen Patienten mit subtotaler Resektion lediglich 43 Wochen überlebten. Ebenso wurde ein signifikanter Unterschied bezüglich der Lebensqualität, gemessen am Karnowsky-Index, festgestellt. Somit korreliert die Totalresektion mit längerem Überleben sowie einer verbesserten Lebensqualität.

Aktueller Standard ist die maximal mögliche Resektion des Tumors mit anschließender Radiochemotherapie mit Temozolomide sowie adjuvanter Chemotherapie für weitere 6 bis 12 Monate [37].

Stupp et al. [38] verglichen Resektion plus anschließende Radiotherapie versus Resektion plus Radiotherapie sowie Chemotherapie mit Temozolomide, das während und nach der Radiatio verabreicht wurde. Die Therapieform der Radiatio mit Temozolomide führte zu dem Ergebnis einer Zwei-Jahres-Überlebensrate von 26,5% im Gegensatz zu einer Zahl von 10,4% bei alleiniger Radiotherapie.

## 1.3 Klinische Fluoreszenzdiagnostik und PDT

### 1.3.1 Historischer Überblick

Die Ursprünge photodynamischer Verfahren lassen sich bis in die Antike zurückverfolgen. Bereits damals erkannte man, dass Sonnenlicht einerseits und die Wirksamkeit verschiedener Substanzen andererseits miteinander korrelieren. Diese Erkenntnis vom Nutzen des Sonnenlichts wurde nicht nur in antiken ägyptischen Schriften (1300 v. Chr.) dokumentiert, sondern findet sich ebenfalls in medizinischen Niederschriften aus Indien und dem antiken Griechenland [39]. So geben Zeilen des Corpus Hippocraticum (460 bis 375 v. Chr.) erstmals Aufschluss über die physiologischen Auswirkungen von Sonnenlicht auf den menschlichen Körper [40].

Das Phänomen der Biolumineszenz war bereits den Römern ein Begriff [41], über photosensibilisierende Medikamente und nachfolgende Exposition mit Sonnenlicht berichtete Abn Mohamed Abdullah Ben Ahmed („Ebn Baithar“) bereits um 1200 v. Chr. [42].

Über die Abhängigkeit des Ausmasses der Lichtreaktion von der Höhe der Konzentration bestimmter Medikamente und Pflanzen wurden im 19. Jahrhundert erste Beobachtungen angestellt. Baumstark berichtete über die klinischen Symptome der akuten intermittierenden Porphyrrie bei Sonnenlicht im Jahre 1874.

16 Jahre später beschrieben Charles Darwin und Karl Damann die Entstehung von Exanthemen bei Tieren nach der Nahrungsaufnahme von Buchweizen. Diejenigen Tiere, welche einer längeren Sonnenexposition ausgesetzt worden waren, wiesen schwerwiegendere Hautirritationen auf [43]. Bei Schafen und Rindern, welche auf der Weide Johanniskraut aufgenommen hatten, resultierten ähnliche Hautveränderungen [44].

Erstmals richtungsweisende Schritte in das Neuland der Umsetzung photochemischer Prozesse in die Praxis und deren klinisch-therapeutischer Anwendung, wagte Professor Hermann von Tappeiner in der Neuzeit. Untersuchungen seines Mitarbeiters Oscar Raab zu Acridin und seinen

Derivaten und deren Auswirkungen auf Infusorien und Protozoen richteten das Augenmerk der Wissenschaftler auf die Phototoxizität weiterer fluoreszierender Substanzen wie beispielsweise Chinidin und Eosin [45, 46].

Diese Erkenntnisse voraussetzend, führte von Tappeiner gemeinsam mit dem Dermatologen Alfons Jesionek im Jahre 1903 die ersten therapeutischen Versuche am Menschen durch. Die photodynamische Behandlung erfolgte bei Patienten mit kanzerösen, Syphilis bedingten sowie tuberkulösen Erkrankungen der Haut mittels topischer Applikation eines eosinhaltigen Farbstoffes. Zunächst erfolgte die Bestrahlung durch Sonnenlicht, später auch durch das Licht einer Kohlebogenlampe [45, 47, 48].

Erste Ergebnisse zu photodynamischen Versuchen mit Hämatoporphyrin, einem eisenfreien Hämderivat [49] veröffentlichte Walter Hausmann im Jahre 1911. 1912 injizierte sich der Münchener Assistenzarzt Friedrich Meyer-Betz selbst 200 mg Hämatoporphyrin. Im Anschluss bestrahlte er selbst ein kleines Areal seines Unterarms mittels einer Finsen-Lampe, woraufhin es zur Bildung von Ulzerationen kam. Hiermit studierte er im mutigen Selbstversuch die photosensibilisierende Eigenschaft dieser Substanz [50].

Die selektive Detektion der roten Fluoreszenz in Rattensarkomen nach Gabe von Hämatoporphyrin gelang schließlich Albert Pericard im Jahre 1924 unter Verwendung einer Woods-UV-Lampe zur Fluoreszenzanregung [51].

Zwei Jahrzehnte später demonstrierten Auler und Banzer die tumorlokalisierenden Eigenschaften von Porphyrinen. Bei ihren Versuchen erwies sich die Fluoreszenz von Hämatoporphyrin in Tumoren als deutlich höher [52] als in gesundem Gewebe. Diese Beobachtung der vermehrten Akkumulation dieser Substanz in neoplastischen Geweben wurde durch Figge et al. [53] in späteren Versuchen verifiziert und Hämatoporphyrin somit als geeigneter Photosensibilisator postuliert [54]. Aufgrund der damals in unreiner Zusammensetzung vorliegenden Substanzen und der hieraus möglicherweise resultierenden starken Nebenwirkungen, wurde diese Erkenntnis klinisch-therapeutisch allerdings nicht weiter erprobt.

Mit der Synthese eines Hämatoporphyrinderivats im Jahre 1960 gelang es schließlich, die Tumorselektivität der Substanz massgeblich zu verbessern [55]

und so später unterschiedliche Tumorarten zu detektieren. So nutzte Lipson 1966 erstmals die Substanz zur Behandlung eines Mamma-Karzinoms bei einer Patientin [56, 57, 58, 59].

Mit der Anwendung der photodynamischen Therapie mittels Hämatoporphyrinderivaten und Dihämatoporphyrinether sowie der Bestrahlung aus einer Xenon-Bogenlampe an 25 Patienten mit kutanen und subkutanen Tumoren, konnten Dougherty et al. [60] im Jahre 1978 bei 111 von 113 Tumoren komplette oder partielle Remission erzielen und leisteten so bahnbrechende Arbeit in der Geschichte der PDT.

James Kennedy et al. befassten sich im Jahre 1990 [61] erstmals mit der klinischen Bedeutsamkeit der 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), einer Vorläufersubstanz der Porphyrine, bei der Behandlung dermatologischer Erkrankungen. Nach Gabe von 5-ALA wird das Fluorophor Protoporphyrin IX in situ gebildet und führt aufgrund seiner Halbwertszeit von nur 24 Stunden zu einer nur kurzzeitigen Sensibilisierung der Haut.

Das Hämatoporphyrin-Derivat Photophrin wurde 1993 in Kanada erstmals zugelassen und ist bis heute der einzig zugelassene Photosensibilisator für die PDT, obwohl derzeit mehrere Substanzen in präklinischen Studien getestet werden. Hierunter zeichnet sich vor allem die Substanz Hypericin aus, auf deren besondere Eigenschaften im Rahmen dieser Arbeit im Detail eingegangen wird.

### **1.3.2 Entstehung von Fluoreszenz**

Luminiszenz (Licht) bedeutet eine durch niedrige Temperaturen verursachte Lichtemission eines Stoffes und lässt sich durch Bestrahlung hervorrufen. Eine ausschließlich während dieser Erregung auftretende Luminiszenz bezeichnet man wiederum als Fluoreszenz.

Somit stellt die Fluoreszenz innerhalb der Lumineszenz ein besonderes Phänomen dar und wird definiert durch den Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie durch spontane

Lichtemission. Dabei wird das angeregte Photon innerhalb von circa  $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  Sekunden nach dem Absorptionsvorgang wieder emittiert.

Erfolgt der Prozess der Lumineszenz in raschem Ablauf, nämlich in einer kurzen Zeitspanne relativ gesehen zur Lebensdauer des angeregten Zustandes, so wird er als Fluoreszenz bezeichnet.

Die Fluoreszenz findet ihren begrifflichen Ursprung in dem fluoreszierenden Mineral Fluorit (Flussspat, Kalziumfluorit).

Die Absorption elektromagnetischer Strahlen resultiert häufig in der Anregung von Atomen oder Molekülen, welche energetisch höhere Elektronenzustände einnehmen. Das Molekül befindet sich zunächst im elektronischen Grundzustand. Wird nun ein Photon geeigneter Wellenlänge absorbiert, kommt es zu einer Anhebung eines Elektrons in einen elektrisch angeregten Zustand.

Hierbei spricht man von Singulett (S) oder Triplett (T) - Zuständen, je nach der Quantenzahl des Elektronenspins  $S = 0$  oder  $S = 1$  [62].

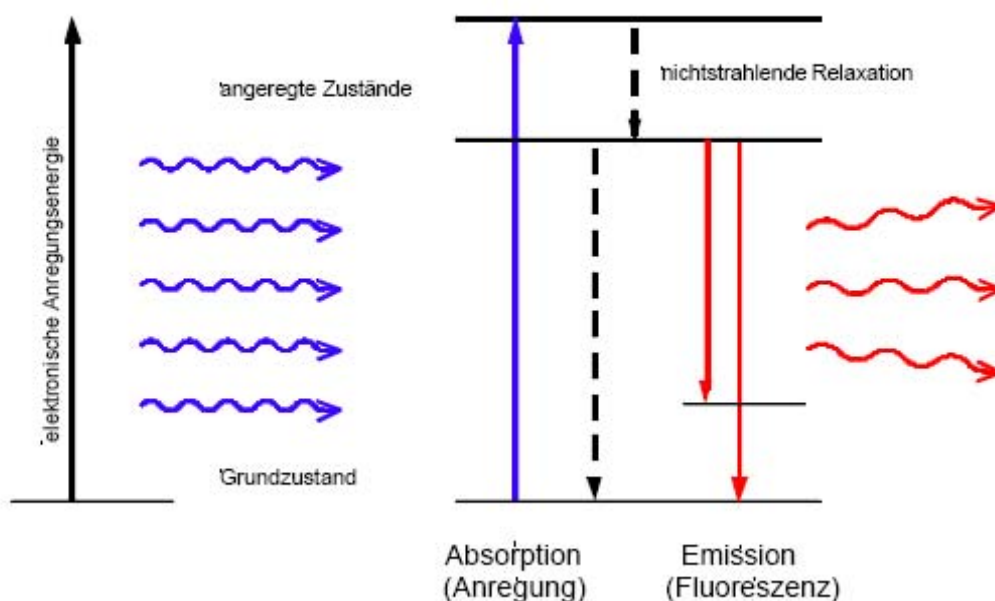


Abbildung 5: Absorption und Floreszenzemission.

Ein Photosensibilisator wird im Grundzustand mit Licht einer definierten Wellenlänge angeregt. Ein Teil der so eingebrachten Energie relaxiert nichtstrahlend auf ein tiefer liegendes Niveau. Von dort ist nun eine charakteristische Fluoreszenzemission möglich.

Erfolgt nun die Absorption eines Photons oder Lichtquants durch ein Atom oder (Photosensibilisator-)Molekül, geht dieses von seinem energetischen Grundzustand  $S_0$  in einen energetisch angeregten Singulett-Zustand  $S_1$  oder  $S_2$ , in Abhängigkeit von der Wellenlänge, über. Dies ist mit einer Anhebung eines Valenzelektrons von einer der inneren Bahnen auf eine weiter außen liegende Bahn gleichzusetzen. Beim Singulettzustand zeichnen sich die beiden gepaarten Elektronen durch einen entgegengesetzten Spin ( $+1/2$  und  $-1/2$ ) aus. Die Summe der Spins  $S = +1/2 - 1/2$  beträgt schließlich 0.

Dieser Zustand der Anregung eines Moleküls ist jedoch instabil: Innerhalb weniger Nanosekunden erfolgt ein strahlungsfreier Übergang vom angeregten Zustand  $S_1$  oder  $S_2$  zurück in den ursprünglichen Zustand  $S_0$ .

Entsteht eine komplette Umwandlung der absorbierten Energie in Wärme, so spricht man von einer strahlungslosen Deaktivierung oder auch inneren Konversion (internal conversion). Andererseits kann diese jedoch auch beim Übergang von  $S_1$  zu  $S_0$  durch die Emission von Licht, nämlich der Abgabe eines Photons entstehen. So entsteht ein sogenannter strahlender Übergang, welcher auch als Phänomen der Fluoreszenz bezeichnet wird. Anschließend kehrt das Elektron ohne Spinumkehr wiederum in seinen Grundzustand  $S_0$  zurück.

Zusammenfassend gilt somit, dass Elektronenübergänge in den Grundzustand  $S_0$  und dessen vibronische Niveaus entweder unter Abstrahlung von Fluoreszenz, das heißt durch die spontane Emission eines Photons oder strahlungslos durch innere Konversion erfolgen.

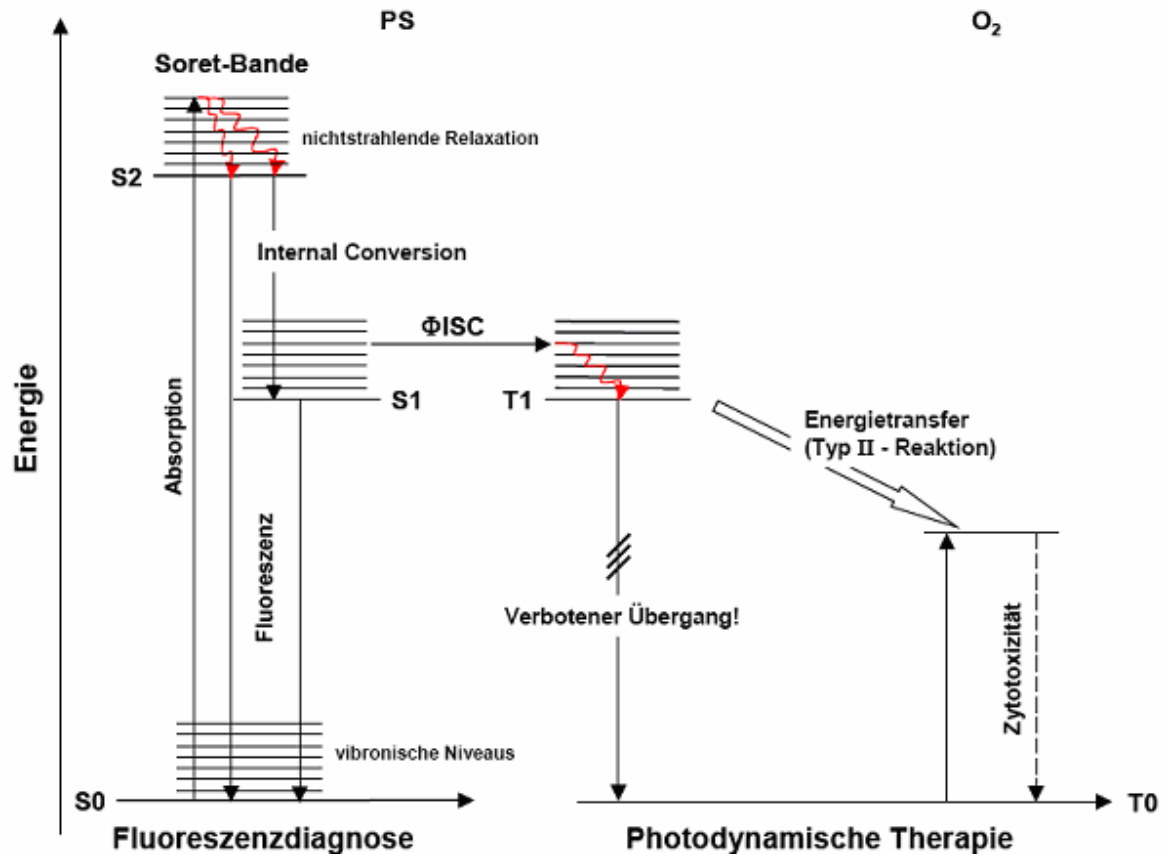


Abbildung 6: Jablonski-Diagramm Molekulare Energieniveaus und Elektronenübergänge bei der Photodynamischen Therapie und Fluoreszenzdiagnostik.

Eine wesentliche Rolle spielt ebenso der Prozess des „Intersystem crossing“, welcher für strahlungslose Übergänge vom angeregten Singulett-Zustand  $S_1$  in den angeregten Triplett-Zustand  $T_1$  unter Umkehr des Elektronenspins steht. Dieser Prozess impliziert das Umklappen von Elektronenspins. Die Summe  $S = 1/2 + 1/2$  beträgt hierbei 1, oder aber  $S = -1/2 + (-1/2)$  beträgt -1. Die Summe  $S = 0$  der Spinvektoren ist ebenfalls möglich.

Energetisch ist der  $T_1$  Zustand ein niedrigerer als  $S_1$ . Durch einen verbotenen Übergang, das sogenannte Spin-Verbot, resultiert ein sich durch eine relative Stabilität auszeichnender Triplett-Zustand. Somit ist der Übergang von  $T_1$  zu  $S_0$  ein relativ langandauernder: Die  $T_1$ -Lebensdauer liegt im Bereich von Mikrosekunden. Der Übergang findet einerseits strahlungslos durch innere Konversion oder andererseits durch Abgabe von Strahlung in Form von Phosphoreszenzstrahlung statt, welche sich durch eine längere



Überlebensdauer (Sekunden- bis Minutenbereich) auszeichnet. Bei beiden Prozessen findet eine Spinumkehr statt.

Lediglich für den Übergang vom schwingungsfreien Zustand  $S_1$  in den schwingungsfreien Zustand  $S_0$  ist die Photonenenergie sowohl für die Absorption als auch für die Fluoreszenz gleich. Denn der durch den Abstieg über vibronische Niveaus oder auch durch den Übergang in niedrigere angeregte elektronische Zustände bedingte Energieverlust hat zur Folge, dass bei allen anderen optischen Vorgängen (angeregter Zustand  $S_1$  zu  $S_0$  bzw. angeregter Zustand  $S_1$  zu  $T_1$ ) die Absorptionsenergie immer größer ist als die Emissionsenergie. Daraus resultierend ist in der Umkehrung die Wellenlänge der Fluoreszenzstrahlung größer als die der Absorption.

Weitere Energieverluste führen außerdem zu einem Fluoreszenzlicht, welches sogar noch langwelliger ist. Dieses Phänomen ist auch als „Stokes-Verschiebung“ bekannt [62] und ist in Abbildung 7 dargestellt.

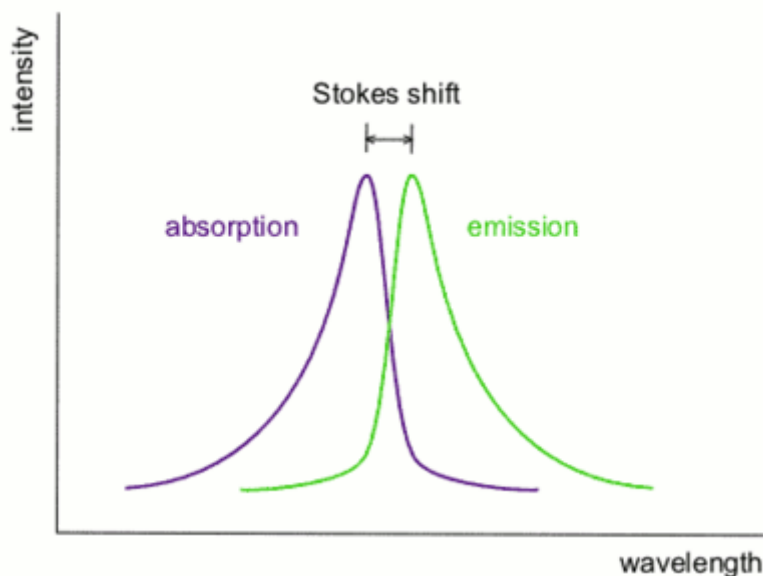


Abbildung 7: Stokes Shift

### 1.3.3 Fluoreszenzdiagnostik

Die Fluoreszenzdiagnostik stellt innerhalb der onkologischen Diagnostik ein modernes Verfahren und eine gute Alternative zu den herkömmlichen bildgebenden Verfahren dar, um malignes Gewebe visualisieren und von

Normalgewebe sicher differenzieren zu können. Die Möglichkeit der exakten Lokalisation von Tumorgewebe ist vor allem während operativen Einsätzen von grosser Bedeutung (siehe auch Abbildung 8).

Unterschieden werden hierbei die Autofluoreszenzdiagnostik, basierend auf der endogenen Fluoreszenz des Gewebes und die exogene Fluoreszenzdiagnostik, welche die Applikation eines Photosensibilisators erforderlich macht, welcher selektiv im Tumorgewebe akkumuliert.

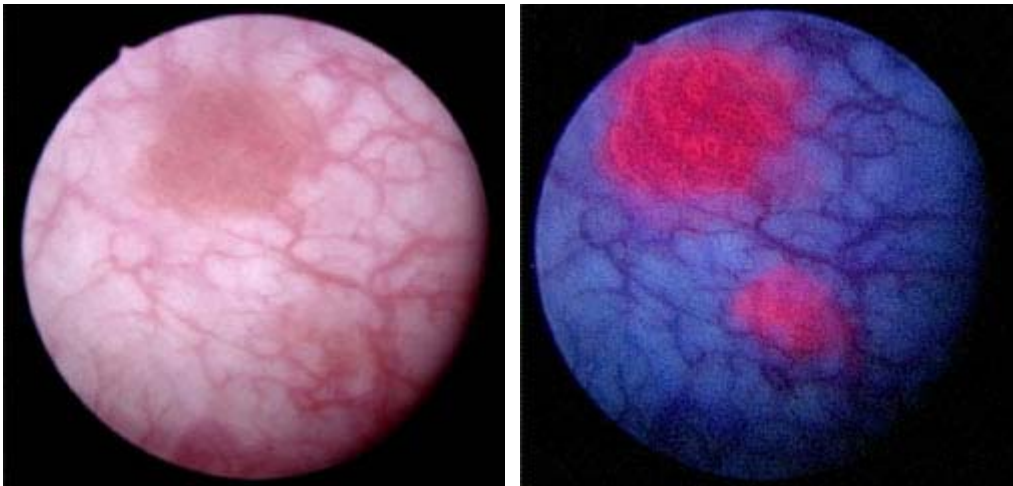


Abbildung 8: Endoskopische Darstellung der Harnblase.

In der linken Aufnahme ist unter normaler Sicht ein zweiter Tumor nur schwer erkennbar. Nach prä-operativer Verabreichung von 5-ALA ermöglicht eine intraoperative Fluoreszenzdarstellung die exakte Lokalisation des zweiten kleineren Tumors.

Die beim Übergang vom Zustand  $S_1$  zu  $S_0$  entstehende Emission von Fluoreszenzlicht kann bei der Fluoreszenzdiagnostik durch optische Systeme dargestellt werden und eine Lokalisation des malignen Gewebes ermöglichen. Somit wird hierbei der Singulettzustand von positivem Nutzen, wohingegen der Triplettzustand aufgrund der entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies und daraus resultierenden Phototoxizität einen Störfaktor darstellt. Dieser Effekt kann allerdings durch eine schwache Intensität des Anregungslichtes umgangen werden [63]. Die für eine erfolgreiche Fluoreszenzdiagnostik verwendeten Photosensibilisatoren sollten sich durch eine möglichst hohe Fluoreszenz-Quantenausbeute auszeichnen. Unter diesen Bedingungen ist erst

eine genaue, kontrastreiche Visualisierung von malignem Gewebe möglich. Eine Vielzahl der gängigen Photosensibilisatoren weist diese Eigenschaft auf und kann somit zur Fluoreszenzdiagnostik oder aber auch für operative Eingriffe wie die Gewinnung von Biopsaten oder Durchführung von Resektionen erfolgreich eingesetzt werden.

### 1.3.4 PDT und Wirkungsmechanismen

Im Unterschied zur Fluoreszenzdiagnostik ist für die PDT vor allem der strahlungslose Energietransfer vom angeregten Triplett-Zustand  $T_1$  auf benachbarte Moleküle, insbesondere Sauerstoffmoleküle, von großer Bedeutung. Dies impliziert den direkten Energietransfer auf einen geeigneten Partner, gewöhnlich molekularen Sauerstoff.

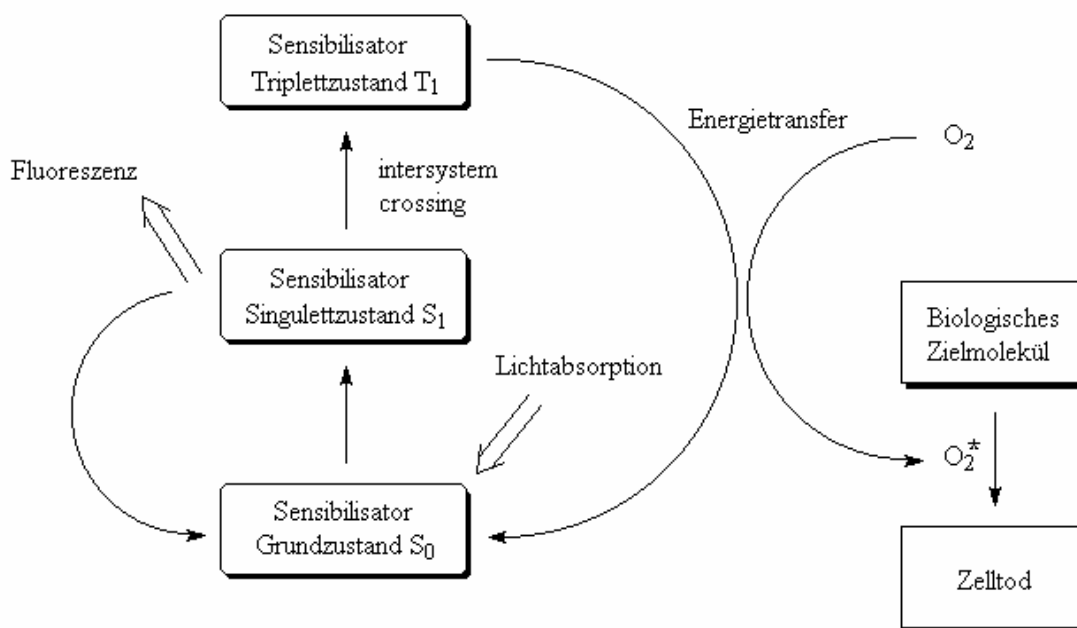


Abbildung 9: Energietransfer von einem Photosensibilisator auf ein Sauerstoffmolekül

Dieser Prozess des strahlungslosen Übergangs des Photosensibilisatormoleküls erfolgt unter Umklappen von Elektronenspins vom angeregten Singulett-Zustand  $S_1$  in den angeregten Triplett-Zustand  $T_1$ .

Letzterer stellt für die Abfolge photochemischer Reaktionen einen wesentlichen Faktor dar und zeichnet sich vor allem durch seine Langlebigkeit (Mikrosekunden) aus. Dieser Vorgang wird auch als Intersystem Crossing bezeichnet.

In Gegenwart geeigneter Substrate finden hieraus Elektronen- oder Energietransferreaktionen statt, welche als Typ-1 bzw. Typ-2-Mechanismus bezeichnet werden. Beide Mechanismen führen zur Entstehung hochreaktiver Sauerstoffspezies.

Reaktionstyp	Sauerstoff-Spezies (ROS)	
Typ I	Hydroxylradikal	$\text{OH}\cdot$
	Hydroperoxid	$\text{H}_2\text{O}^{\cdot-}$
	Superoxid(radikal)	$\text{O}_2^{\cdot-}$
Typ II	Singulett-Sauerstoff	$\text{O}_2^*$

Tabelle 2: Reaktionstypen bei der PDT und dabei gebildete Sauerstoffspezies

Beim Typ-1-Mechanismus, dem Elektronentransfer, übernehmen die Photosensibilisatormoleküle die Funktion von Elektronendonoren oder – akzeptoren für Substrat- oder Sauerstoffmoleküle. Hierbei werden hochreaktive Radikale oder Radikalanionen gebildet, welche sich wiederum mit molekularem Sauerstoff zu Superoxidradikalen ( $\text{O}_2^{\cdot-}$  oder  $\text{H}_2\text{O}^{\cdot-}$ ) umbilden können. Diese ziehen die Oxidation verschiedenster Biomoleküle wie beispielsweise Phospholipide, ungesättigten Fettsäuren und Cholesterin nach sich und resultieren letztlich in einer direkten oder indirekten Zerstörung [64].

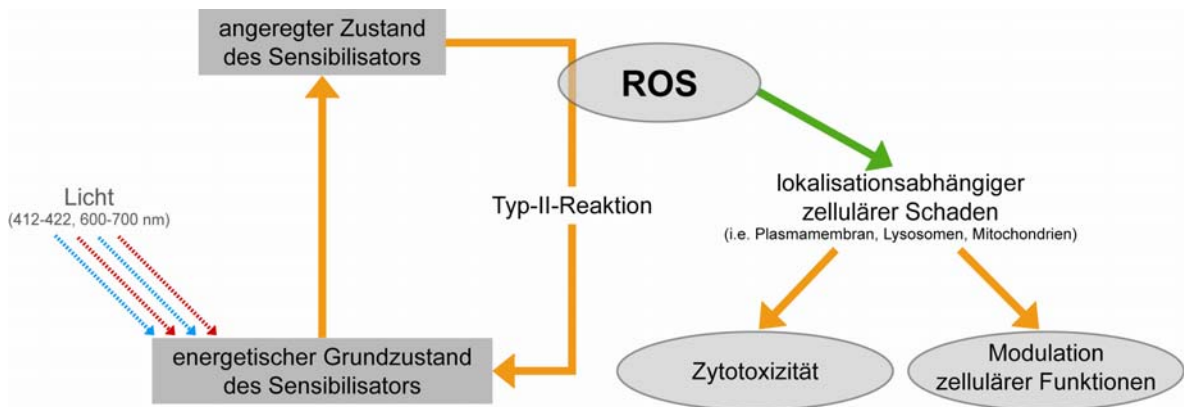


Abbildung 10: Wirkmechanismus der PDT

Beim Typ-2-Mechanismus hingegen kommt es zum Transfer elektronischer Anregungsenergie vom Photosensibilisatormolekül auf ein Sauerstoffmolekül durch direkte Energieübertragung. Analog hierzu erfolgt ein Übergang des Sensibilisatormoleküls vom angeregten Triplett-Zustand in den Singulett-Grundzustand sowie ein Übergang des Sauerstoffmoleküls vom Triplett-Grundzustand in den angeregten Singulett-Zustand.

Diesem Mechanismus kommt in der PDT eine wesentliche Bedeutung zu.

Hierbei wird hochreaktiver Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) gebildet, während die Photosensibilisatormoleküle in ihren energetischen Grundzustand zurückkehren. So ist eine erneute Absorption von Licht und demzufolge eine weitere Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wieder möglich und der Kreislauf somit geschlossen.

Das Sauerstoffangebot in der Umgebung des Photosensibilisators ist maßgebend für die letztendliche Menge des Singulett-Sauerstoffes, von welchem für die PDT möglichst viel vorliegen sollte. Während Sauerstoff eines der wenigen Moleküle darstellt, dessen Grundzustand der Triplett-Zustand ist, ist der angeregte Singulett-Sauerstoff ein hochreaktives Molekül, das zu ähnlichen Oxidationsmechanismen wie beim Typ-1-Mechanismus führt. Aufgrund ihrer Instabilität bilden die primären Oxidationsprodukte Potential für weitere Reaktionen, die wiederum die direkte oder indirekte Destruktion von Zellen nach sich ziehen können [65].

Auch die Photosensibilisatormoleküle selbst stellen geeignete Reaktionspartner der reaktiven Sauerstoffspezies dar, weshalb die Bildung zytotoxischer Agentien letztendlich selbstlimitierend ist. Hierbei kommt es zur Bildung sogenannter Photoprodukte, welche mit einer Änderung der Fluoreszenzeigenschaften und somit einer Einschränkung der therapeutischen Wirksamkeit des Photosensibilisators einhergehen. Diese Abnahme der Fluoreszenzintensität des Photosensibilisators wird als „Photobleaching“ bezeichnet [62].

### 1.3.5 Auswirkungen der PDT auf die Zelle

Die durch photophysikalischen Prozesse entstandenen zelltoxischen Oxidationsprodukte (bereits in Abschnitt 1.3.4 beschrieben) führen nicht nur zur Beeinträchtigung der Integrität der Zellfunktionen, sondern resultieren letztendlich in einer kompletten Destruktion der Zelle.

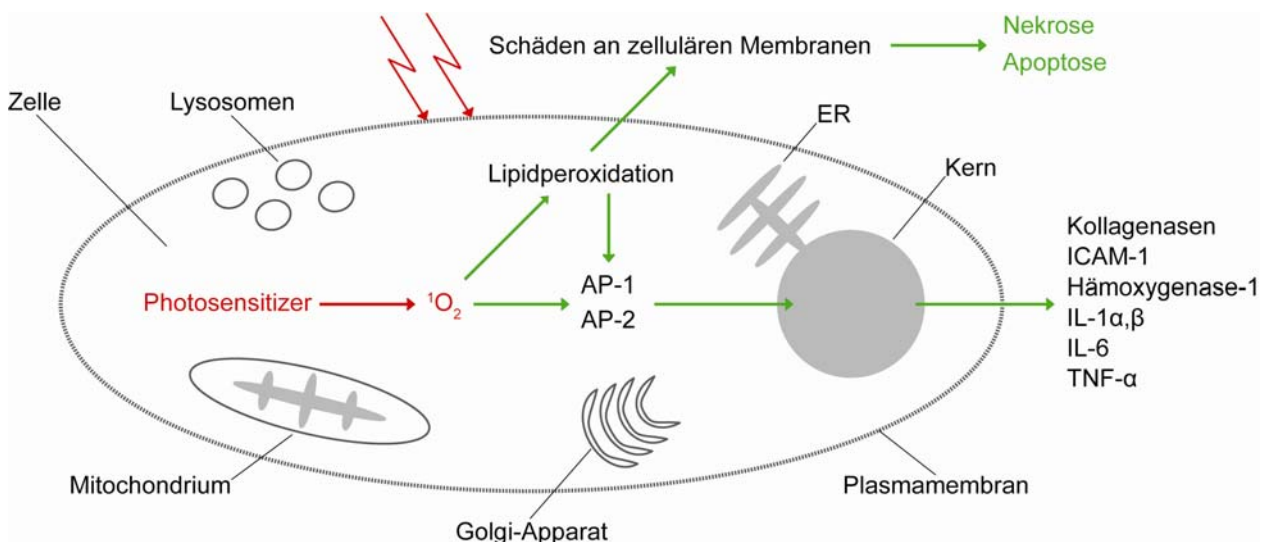


Abbildung 11: Zytotoxizität – induziert durch PDT

Durch Bildung von Sauerstoffradikalen kommt es intrazellulär zur Lipidperoxidation und somit zur Schädigung der Zellmembran mit dem Resultat

der Nekrose und Apoptose. Außerdem führt die Bildung der Radikale zur Bildung von Interleukinen und Tumornekrosefaktor über eine Modulation der Zellkernfunktion. Diese führen ebenfalls zum Zelltod.

Dieser Zelltod kann Folge von zwei verschiedene Mechanismen sein: einerseits der Zellnekrose [66] und andererseits der Induktion der Apoptose [67, 68] der Zelle.

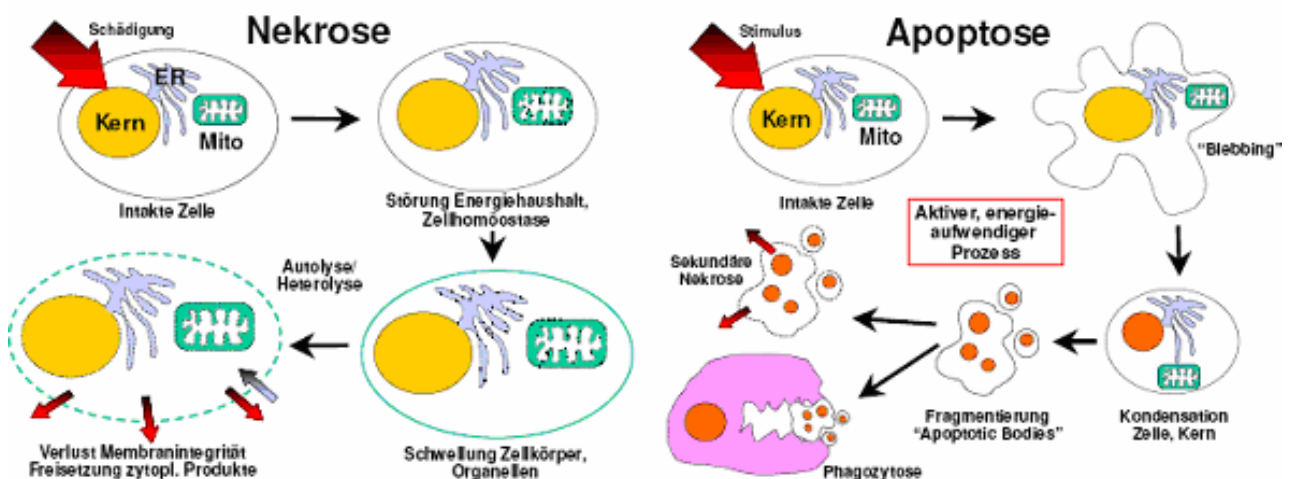


Abbildung 12: Induktion von Apoptose und Nekrose durch die Entstehung von Sauerstoffradikalen während der PDT

Die Ursache dieser Prozesse liegt bei beiden Mechanismen in unterschiedlichen Ebenen. So kommt es zur Schädigung einzelner Moleküle wie beispielsweise von Enzymen, ganzen Molekülkomplexen oder aber von intrazellulären Strukturen. Welcher dieser Vorgänge letztlich ausschlaggebend für den Zelltod ist, ist abhängig von der Art der Sauerstoffspezies, deren Konzentration und Ort der Generierung. Diese Faktoren wiederum stehen mit den Eigenschaften des Photosensibilisators an sich (zum Beispiel Lipophilie und Hydrophilie), dessen Verteilung in der Zelle, aber auch vom vorhandenen Sauerstoff innerhalb der Zelle in Zusammenhang.

Lipophile Sensibilisatoren wie beispielsweise Hypericin reichern sich bevorzugt im Membransystem an, wohingegen sich hydrophile Substanzen wie beispielsweise 5-ALA im Zytoplasma akkumulieren.

Beim Prozess der Nekrose kommt es zur hydropischen Zellschwellung mit Zerstörung der Plasmamembran, während die Apoptose eine Form des

programmierten physiologischen Zelltodes darstellt, der aktiv über bestimmte Kaskadewege abläuft.

Wie bereits beschrieben, zeichnen sich Singulett-Sauerstoff und dessen Radikale aufgrund ihrer Reaktionsfreudigkeit durch eine kurze Lebensdauer aus, welche im Mikrosekundenbereich liegt. Folglich kommt es lediglich in unmittelbarer Umgebung ihres eigenen Entstehungsortes zu Destruktionen. Somit lässt sich schlussfolgern, dass der bevorzugte Ort der Anreicherung von Photosensibilisatormolekülen in bestimmten Zellstrukturen typische Schädigungen mit sich bringt. So wiesen Salet et al. [69] die Destruktion von Mitochondrien während der PDT nach.

Weitere Effekte, die durch eine Behandlung mittels PDT erzielt werden können, sind neben der Zellnekrose und Zellapoptose, sekundäre Schädigungen des Tumors. Da bei der Bestrahlung auch Endothelzellen in Mitleidenschaft gezogen werden, führen diese teils erwünschten, teils unerwünschten Auswirkungen der PDT möglicherweise zur Vasokonstriktion, Plättchenaggregation mit Thrombosierung und letztlich zur Blutstase der tumorversorgenden Blutgefäße [70]. Außerdem entstehen Entzündungsreaktionen mit nachfolgender Destruktion des Gewebes [71]. Weiterhin wurden Beobachtungen über immunmodulatorische Effekte angestellt [72, 73].

### **1.3.6 Photosensibilisatoren**

Der Prozess der Photodynamik basiert auf drei wesentlichen Komponenten, nämlich Sauerstoff, Licht und Photosensibilisator, wobei die Menge der entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies in erster Näherung proportional zur Konzentration des Photosensibilisators, zur absorbierten Lichtenergie sowie zum zur Verfügung stehenden Sauerstoff ist [74].

Die selektive Anreicherung der Photosensibilisatoren ist für deren klinisch-therapeutischen Einsatz von großer Bedeutung und ermöglicht durch gezielte Applikation und Dosis der Bestrahlung durch Licht die selektive Destruktion von neoplastischem Gewebe.



Die spezifische Akkumulation des Photosensibilisators im Tumorgewebe kann durch verschiedene Mechanismen erklärt werden. Es wurde gezeigt, dass Makrophagen und tumor-assoziierte Monozyten erstens eine verstärkte Aufnahme dieser Substanzen aufweisen, zweitens ihr Angebot aufgrund der starken Neovaskularisierung von Tumoren erhöht ist und drittens erhöhte Retention aufgrund des sauren pH -Gehalts im Tumorgewebe (verminderte Löslichkeit) resultierte. Weiterhin stellen sich viele Photosensibilisatoren als äußerst affin zu Low-density-Lipoproteinen dar, so dass die Aufnahme in das maligne Gewebe per Endozytose erfolgt [75, 76]. Jedoch reichern sich die Photosensibilisatoren ebenfalls in gesundem Gewebe an. Das Verhältnis der Aufnahme im Normalgewebe zur Aufnahme im Tumorgewebe wird mit dem sogenannten Akkumulationsindex beschrieben

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

Dieser liegt für die meisten Photosensibilisatoren im Bereich zwischen 2:1 und 5:1.

Die optimale Wellenlänge für die Bestrahlung des Tumorgewebes sollte im Bereich des Absorptionsmaximums des Photosensibilisators liegen, um so die höchstmögliche Aktivierung des Sensibilisators zu erzielen und eine optimale Therapie garantieren zu können.

Bei der Auswahl des Photosensibilisators ist nicht nur die Tumorselektivität sowie eine große Eindringtiefe des Anregungslichts ins Gewebe von großer Bedeutung, sondern ebenso eine hohe Triplett-Quantenausbeute des Photosensibilisators bzw. Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute (Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute von 0,5). Voraussetzung für letztere sind das Vorhandensein von Licht einerseits und Sauerstoff andererseits [77].

Außerdem ist das Absorptionsspektrum der Sensibilisatoren ein weiterer entscheidender Faktor für eine erfolgreiche PDT. Dieses sollte sich im therapeutischen Fenster befinden, da nur innerhalb von diesem die maximale Eindringtiefe des Lichts ins Tumorgewebe gewährleistet werden kann [62]. Photosensibilisatoren der zweiten Generation dringen in etwa 5 bis 10 mm ins

Gewebe ein. Ell et al. stellten hingegen im Rahmen von Bestrahlungsversuchen zur Therapie des Barrett-Ösophagus fest, dass die Eindringtiefe von ALA bei etwa 2 mm liegt [78].

Außerdem stellen sowohl eine gute Photostabilität, als auch eine geringe Zytotoxizität wesentliche Aspekte von Hypericin dar.

Jedoch ist die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies begrenzt. Die Bildung dieser hochaggressiven Stoffe wird nämlich durch die oben genannte Eindringtiefe des Lichts limitiert und determiniert folglich eine Anwendung der PDT auf oberflächliche Läsionen.

Zur Vermeidung der Photosensibilisierung der Haut nach Anwendung der PDT sollte sich die Substanz durch eine nur geringe Verweildauer im Gewebe auszeichnen. So führt beispielsweise die systemische Verabreichung von 5-ALA nur zu einer kurzfristigen Photosensibilisierung für 1 bis 2 Tage.

Die in 1.3.4 erwähnte Photodegeneration ist einerseits der zeitlich limitierende Faktor bei der Anwendung von Photosensibilisatoren in der Fluoreszenzdiagnostik, begrenzt jedoch andererseits die Gewebeschädigung des umgebenden Normalgewebes während einer PDT, da das Normalgewebe üblicherweise eine geringere Konzentration des Photosensibilisators enthält als das zu bestrahlende Tumorgewebe.

### 1.3.6.1 Klassifikation der Photosensibilisatoren

Photosensibilisatoren lassen sich mittlerweile in zwei Klassen unterteilen, da im Rahmen der wissenschaftlichen Forschungsprozesse die Entwicklung neuerer und hinsichtlich verschiedener Aspekte verbesserter Photosensibilisatoren vorangeschritten ist.

Photosensibilisatoren der ersten Generation sind Derivate des Hämatoporphyrins, eines natürlich-biologischen Stoffes (Blut des Rindes).

Bei sogenannten Photosensibilisatoren der zweiten Generation, welche körperfremde Stoffe sind, ist im Unterschied zu ersteren nicht nur die schnellere Akkumulation im Tumorgewebe von Vorteil, sondern auch ein deutlich reduziertes Ausmass an Nebenwirkungen wie etwa der Photosensibilisation der Haut ersichtlich.

Die Photosensibilisatoren der zweiten Generation sollten sich idealerweise durch folgende Charakteristika auszeichnen:

- chemisch stabile Reinsubstanz
- geringe Zytotoxizität
- sehr gute Absorptionseigenschaften und somit Absorptionsmaximum im Langwellen-Bereich sowie ein hoher Absorptionskoeffizient
- große Sauerstoff-Quantenausbeute bei therapeutischer Anwendung
- große Fluoreszenz-Quantenausbeute bei diagnostischer Anwendung
- sehr gute Pharmakokinetik in Bezug auf hohe Tumorselektivität und rasche Eliminierung

Durch eine gezielte Veränderung hydrophiler Eigenschaften des Photosensibilisators (beispielsweise über Modifizierung von Liganden und Substituenten) ist eine Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften möglich. Weiterhin kann eine höhere Sauerstoff-Quantenausbeute erzielt werden, indem ein diamagnetisches Metallion wie etwa Zinn eingebaut wird.

Nachfolgende Tabelle dient zur prägnanten Übersicht der Photosensibilisatoren hinsichtlich ihrer Klassifikation und Eigenschaften.

1. Generation	2. Generation
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hämatorporphyrinderivate (HpD) oder Photophrin I</li> <li>➤ Dihämatorporphyrinester sowie Dihämatorporphyrinäther (DHE) oder Photophrin II</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Benzoporphyrinderivate (BPD)</li> <li>➤ Zink-Phtalozyanin</li> <li>➤ Meso-Tetraphenolporphyrine</li> <li>➤ Aluminiumchloresulfophtalozyanin</li> <li>➤ Purpurine</li> <li>➤ Chlorine</li> <li>➤ Kationische Farbstoffe</li> </ul>
Eigenschaften	Eigenschaften
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Absorptionsmaximum bei circa 400 nm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ raschere Akkumulation im Tumorgewebe (im Vergleich zu HpD und DHE)</li> <li>➤ höhere Tumorselektivität</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ weitere Maxima mit abnehmender Intensität bei 500, 525, 560 und 630 nm =&gt; PDT bei 630 nm, da Penetrationstiefe von 1-6 mm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Absorptionsmaximum im langwelligen Spektralbereich =&gt; Penetrationstiefe von 4-9 mm</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ langanhaltende Photosensibilisierung der Cutis (6-8 Wochen) =&gt; klinische Anwendung der PDT begrenzt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ schnellere Ausscheidung Photosensibilisierung der Cutis von nur 1-2 Tagen</li> </ul>

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

In präklinischen Studien befinden sich derzeit synthetische Isomere von Porphyrinen, Porphycene, Chlorophyll-A-Derivat-Photosensitizer HPPH-23, Anthraquinone, Bakterienchlorine, kationische Porphyrine, Rhodamin 123, Xanthine, verschiedene Aminolävulinsäureester und Hypericin.

Bislang zugelassen als Therapeutikum von Ösophagus-Karzinomen und kleinzelligen Bronchialtumoren ist ausschließlich der Photosensibilisator Photophrin. Die Zusammensetzung dieser Substanz besteht vor allem aus Hämato- und Protoporphyrinderivaten.

Klinisch erprobt und als Pharmaka innerhalb der PDT eingesetzt, wurden bislang Purpurine, Chlorine, Texafrine und Porphyrine [79]. Vor allem die Porphyrine wurden jedoch hinsichtlich ihrer Eignung für eine PDT intensiv in vielerlei Experimenten und Studien untersucht.

## 1.4 Das Prodrug 5-Aminolävulinsäure

### 1.4.1 Chemische Eigenschaften und Charakterisierung

Die chemische Bezeichnung für 5-ALA ist 5-Amino-4-oxo-Pentansäurehydrochlorid ( $C_5 H_{10} Cl N O_3$ ). Sein Molekulargewicht beträgt 167,59 g/mol. Als hydrophile Substanz ist 5-ALA gut in Wasser, jedoch wenig in Ethanol und Methanol löslich.

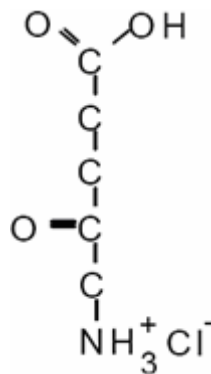


Abbildung 13: 5-ALA-Molekül

Besonders 5-ALA gewann in jüngster Zeit an Bedeutung hinsichtlich seiner hohen Tumorselektivität, aber auch seiner raschen Metabolisierung.

5-ALA ist eine körpereigene Substanz und somit in fast allen Zellen von Säugetieren vorhanden. Innerhalb der intrazellulären Hämbiosynthese, welche acht enzym-katalysierte Schritte beinhaltet, bildet es das erste Zwischenprodukt. Letztendlich kommt es nach Ablauf diverser Reaktionsschritte zur Synthese endogener Porphyrine, vor allem des Protoporphyrin IX, in den Mitochondrien und im Zytosol.

Die körpereigene Bildung dieses Fluorochroms nach Applikation von 5-ALA wurde im Jahre 1990 erstmals von Kennedy et al. [80] bei der Behandlung von Neoplasien der Haut mittels PDT genutzt. Neben seiner Fähigkeit der Fluoreszenz zeichnet sich Protoporphyrin IX ebenso durch seine selektive Anreicherung in Tumoren aus und bringt aufgrund seiner schnellen Aufnahme wie raschen Elimination eine nur geringe Photosensibilisierung der Haut mit sich [81]. Somit ist eine Detektion maligner Prozesse sowie eine Eingrenzung diffus wachsender Tumore durch den Photosensibilisator 5-ALA nach dessen Umwandlung zum fluoreszierenden Protoporphyrin IX teilweise bereits realisierbar. Als Ursache für die selektive Akkumulation von Protoporphyrin IX in tumoralem Gewebe gibt es bereits viele Erklärungsansätze. So nahmen Kennedy et al. 1992 [80] eine Deformation der Zellmembran im Sinne einer tumorbedingt niedrigeren Diffusionsbarriere als ursächlich an. Navone et al. [82] postulierten eine gesteigerte Aktivität der an der Protoporphyrin IX-Synthese mitwirkenden Enzyme. Norata et al. [83] erklären hingegen eine erhöhte Anreicherung der Substanz in malignem Gewebe durch eine erhöhte LDL-Rezeptoraktivität der Tumorzellen. Somit erfolgt eine gesteigerte intrazelluläre Akkumulation von LDL sowie dem daran gebundenen Hämatoporphyrin.

### **1.4.2 Klinische Anwendung Protoporphyrin IX**

Die Photosensibilisation von Tumorgewebe mit 5-ALA induziertem Protoporphyrin IX ermöglicht eine PDT von malignen Prozessen durch selektive Destruktion von entarteten Zellen [80]. Nach intraperitonealer Applikation wurde am Maus-Modell eine starke Akkumulation von Protoporphyrin IX in der Blase, der Dermis sowie im Endometrium des Uterus beobachtet [84]. Tiefer liegende Gewebeschichten erwiesen sich hingegen als weniger photosensibel, wodurch sehr oberflächlich liegende Tumoren wie Präkanzerosen [85] ohne Beeinträchtigung des umliegenden Gewebes oder von Organen therapiert werden können. In klinischen Studien erprobt wurde die Anwendung von 5-ALA bereits an den unterschiedlichsten Tumorarten wie beispielsweise Blasenkarzinomen [86], Zervixkarzinomen [87, 88], Basalzellkarzinomen [89]

und Adenokarzinomen des Ösophagus [90] erprobt. Von diagnostischer Bedeutung ist diese Substanz bei gastrointestinalen Präkanzerosen und Tumoren [91]. Die intraoperative Applikation der Protoporphyrin IX-Fluoreszenz bei der Resektion von Hirntumoren stellt ein weiteres Einsatzgebiet dar. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Substanz ZNS-gängig ist und eine hirneigene Synthese von Protoporphyrin IX besteht [92, 93]. Zielstellung hierbei ist eine Totalresektion des malignen Gewebes unter der Prämisse, das umliegende gesunde Hirnparenchym maximal zu schonen und weitestgehend zu erhalten [94].

Stummer et al. zeigten 2006 [95] in einer randomisierten kontrollierten Studie (klinische multicenter Phase III-Studie) mit an malignen Gliomen erkrankten Patienten, dass durch die 5-ALA induzierte Tumorfluoreszenz die Durchführung von Totalresektionen besser möglich ist. Verglichen wurden hierbei 161 Patienten, welche zuvor gewichtsadaptiert 5-ALA für eine Fluoreszenz-geleitete Tumorresektion erhalten hatten, mit 161 weiteren Patienten, welche mittels konventioneller Mikrochirurgie operiert wurden. Resultat war eine verbesserte 6-Monats-Überlebensrate ohne Tumorprogress zuerst genannter Patientengruppe (41 % versus 21,1 %).

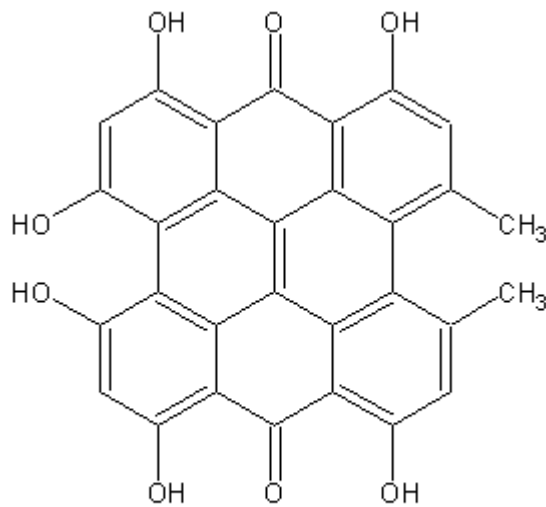
## **1.5 Der Photosensibilisator Hypericin**

### **1.5.1 Chemische Eigenschaften und Charakterisierung**

Hypericin ist ein 10,11-Dimethyl-1,3,4,6,8,12-Hexahydroynaphthodianthron [96] und gehört zur Familie der Phenanthroperylenchinone [97]. Die Gattung „Hypericum“ ist der Familie der „Guttiferae“ zuzuordnen und beinhaltet eine Vielzahl von Pflanzen, welche unter anderem den Bestandteil Hypericin enthalten.

Zu den am weitesten verbreiteten Arten hierunter zählen „Hypericum Perforatum“ (Synonyme: Johanniskraut, St John's worth, Tüpfel-Johanniskraut,

Jageteufel, Konradskraut), „Hypericum Crispum“ sowie „Hypericum Hirsutum“ [98, 99].



Hypericin

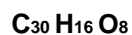


Abbildung 14: Hypericin-Molekül

In den 60iger Jahren isolierten Brockmann et al. Hypericin erstmals in reiner Form aus *Hypericum Perforatum* und konnten durch die Synthese der Substanz deren Konfiguration definieren [100, 101]. Erste Isolierungsversuche wurde bereits 1911 von Cerny unternommen [102].

Wie in Abbildung 14 ersichtlich, besitzt Hypericin die Summenformel C<sub>30</sub> H<sub>16</sub> O<sub>8</sub>. Sein Molekulargewicht beträgt nach Anker et al. 504,43 g/Mol [103]. Die für diese Arbeit verwendete geruchlose schwarz-pulvrige Substanz der Firma Phytochem besitzt ein Molekulargewicht von 504,45 g/Mol [96].

Diese zeichnet sich aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften durch gute Löslichkeit in DMSO und Aceton aus und ist umgekehrt in Wasser und Alkohol somit nur schwer löslich [96].

Das Fluorophor Hypericin fluoresziert im roten Spektralbereich, sein Exzitationsmaximum liegt bei 488 nm, sein Emissionsmaximum bei 595 nm [104].

pH-abhängige Untersuchungen des Spektrums von Hypericin zeigten, dass diese Substanz eine saure Verbindung darstellt [97]. Des Weiteren scheint



Hypericin mit Proteinen wie humanem Serumalbumin sowie den Lipoproteinen HDL und LDL zu interagieren. Mit letzteren weist Hypericin ein wesentlich höheres Bindungsverhältnis auf als mit humanem Serumalbumin, wie Meruelo et al. 1988 [105] veröffentlichten. Diese hohe Affinität zu Lipoproteinen im Allgemeinen lässt eine vermehrte Bindungsfähigkeit mit Phospholipidmembranen als wahrscheinlich annehmen und lässt sich auch durch die Lipophilie der Substanz erklären [97].

### 1.5.2 Geschichtliche Aspekte

Johanniskraut ist eine nicht nur in Europa, sondern auch in subtropischen Gebieten weit verbreitete Pflanze und zählt zu der Gattung der Hypericeae, auch Guttiferae genannt. Diese krautartige Pflanze ist bevorzugt an trockenen sonnenreichen Plätzen wie Wiesen und Weiden zu finden.



Abbildung 15: Johanniskraut

Während ihr deutscher Name sich auf die Zeit ihrer Blüte in Mitteleuropa, die um den Johannistag beginnt, zurückführen lässt, leitet sich das lateinische Synonym *Hypericum Perforatum* hingegen von der Morphologie der Pflanze ab. Denn aufgrund der runden Form ihrer Sekretbehälter erscheint die Blattstruktur der Pflanze wellartig [106].

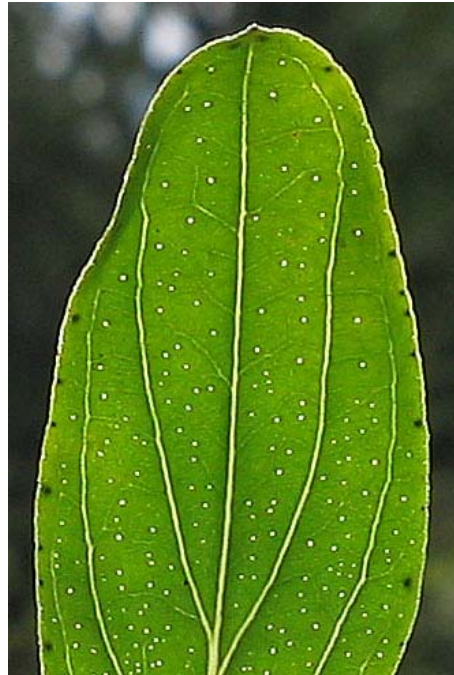


Abbildung 16: löchrige Blattstruktur von *Hypericum perforatum*

Neben Hypericin und dessen Derivaten (Pseudohypericin, Protohypericin, Protopseudohypericin und weitere) enthalten die gelben Blüten des Johanniskrauts einige weitere Inhaltsstoffe: Phloroglucinderivate (Hyperforin, Adhyperforin), Flavonoide (z.B. Hyperosid) und Biflavone, Procyanidine, Antrachinonderivate [107] und Xanthone [108], Aminosäuren, Sterole und Phenolcarbonsäuren sowie ätherische Öle und Gerbstoffe [106].

Hypericin und Pseudohypericin sind der Gruppe der Naphtodianthrone zuzuordnen.

Die Ursprünge des therapeutischen Einsatzes von Johanniskraut in der Medizin und Kräuterheilkunde lassen sich bis in die Antike zurückverfolgen. Nikandros berichtete bereits im zweiten Jahrhundert vor Christus über die Anwendung dieser Substanz, welche zur Verhinderung von durch Tiere verursachten Vergiftungen diente [106].

Im 16. Jahrhundert beschrieb Paracelsus die Extrakte des Johanniskrauts als äusserst heilsam bezüglich der Therapie unterschiedlichster Erkrankungen wie der Depression, Neurosen, Beschwerden des Magen-, Darm- und Urogenitaltraktes sowie zur Behandlung von Wunden und Verbrennungen [109]. Auch wurde es als heilend in der Behandlung von gastrointestinalen und

uterinen Blutungen (hemorrhage) betrachtet und fand auch bei der Malaria-Therapie seinen Einsatz [110].

Das Phänomen des Hypericismus, einer erhöhten Empfindlichkeit der Haut gegenüber Sonnenlicht nach der Einnahme von Johanniskraut, beobachteten, wie Blum 1964 [111] berichtete, bereits die Italiener, Tunesier und Araber und schützten ihre hellhäutigen Weidetiere ergo auf unterschiedlichste Weise vor Sonnenlicht. Diese sogenannte Lichtkrankheit zeichnet sich durch die Entstehung von Schwellungen bis hin zu Ödemen, durch Erytheme, Brandblasen sowie Nekrosen nach Lichtexposition aus [99].

Wurden Schafe, die *Hypericum Perforatum* fraßen, nicht dem Sonnenlicht ausgesetzt, entwickelten sie keinerlei Anzeichen eines Hypericismus; zurück auf der Weide kam dieses Phänomen jedoch erneut zum Vorschein. Dies konnte schon im frühen 20. Jahrhundert gezeigt werden. Auch blieb diese Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Licht über ein bis zwei Wochen bestehen, obwohl die Tiere bereits nicht mehr mit Pflanzen, die das Pigment hypericum enthielten, gefüttert worden waren [111].

Durch Pace et al. erfolgten im Jahre 1942 hierzu erste Laborversuche an weißen Kaninchen. So konnte gezeigt werden, dass für die durch Hypericin induzierte Photosensibilität das Vorhandensein von Sauerstoff notwendig war [112].

Durch den Beweis dieser Kausalität konnte das Syndrom Hypericismus dem Begriff der Photodynamik zugeordnet werden.

Johanniskraut hat bis zur heutigen Zeit seinen traditionell-medizinischen Stellenwert beibehalten und findet nach wie vor sowohl topische Anwendung bei der Behandlung von Entzündungen und Verbrennungen ersten Grades zur verbesserten Wundheilung, als Therapeutikum psychiatrischer Erkrankungen wie beispielsweise der Depression [103]. Johanniskraut-Präparate werden in zunehmendem Maße als Antidepressiva eingesetzt [113] und können ebenso bei Angstzuständen und nervöser Unruhe angewendet werden.

### **1.5.3 Wirkungsweisen von Johanniskraut und Hypericin**

Gegenwärtig steht die Substanz Hypericin, ein Extrakt des Johanniskrauts, bezüglich seiner vielfältigen Eigenschaften in den unterschiedlichsten Bereichen der medizinischen Wissenschaft im Mittelpunkt des Interesses. So beschäftigten sich bereits in den vergangenen Jahren, aber auch in jüngster Zeit, verschiedene Forschungsprojekte und wissenschaftliche Arbeiten mit antidepressiven, antiviralen, antibakteriellen Wirkungsweisen von *Hypericum perforatum*. Von besonderer Bedeutung im Rahmen dieser Arbeit sind jedoch sein antitumoraler Effekt sowie der Einsatz des Wirkstoffs innerhalb der Therapie maligner Gliome mittels PDT.

Im folgenden wird auf verschiedene charakteristische Eigenschaften des Johanniskrautes (*Hypericum perforatum*) Bezug genommen, insbesondere sollen allerdings die speziellen Wirkungsweisen seines Bestandteils Hypericin sowie dessen Anwendung in der Klinik beleuchtet werden.

#### **1.5.3.1 Antidepressive Eigenschaften von Johanniskraut**

Es wird angenommen, dass Hypericin und Hyperforin unter allen Bestandteilen von *Hypericum perforatum* (Johanniskraut) die Hauptkomponenten darstellen [114]. Allerdings wird auch anderen Bestandteilen der Pflanze wie beispielsweise Flavonoiden, Flavonoidderivaten, Xanthonderivaten, Mentoflavonen und Biagigenin eine antidepressive Wirksamkeit nachgesagt.

Von 13 durchgeführten klinischen Studien ergaben 10 unter diesen, dass Johanniskraut der Wirksamkeit von Placebo überlegen ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Therapie mit dieser Substanz mit der Therapie durch antidepressive Standardpräparate wie Amitriptylin (Elavil), Fluoxetin (Prozac), Imipramin (Tofranil) sowie Sertralin (Zoloft) gleichzusetzen ist. Allerdings gilt dies nur für leichte und mittelschwere Depressionen, nicht aber für die Therapie der „major depression“. Diese Erkenntnisse veröffentlichten Lawvere und

Mahoney im November 2005 [115]. Die genannte Wirkung wird vor allem der Komponente Hyperforin zugeschrieben [114].

Unter den Erklärungsansätzen der Ätiopathogenese der Depression ist der neurobiologische Aspekt einer von vielen. So werden als Ursache auch neurochemische Korrelate wie relativer Noradrenalinmangel oder verminderte Serotoninaktivität am synaptischen Spalt in Betracht gezogen. Einige Studien diskutierten die durch Johanniskraut verursachte Serotonin-, Noradrenalin- und Dopamin-Wiederaufnahmehemmung ebenso wie die Aktivierung von Gamma-Aminobutyrat und Glutamatrezeptoren durch deren Wirkstoffe [116].

Eine andere mögliche Erklärung gaben Suzuki et al. 1984 [117] mit ihrer Erkenntnis, dass Hypericin die Enzyme Monoaminoxidase A und B inhibiert, was wiederum zu einer erhöhten Noradrenalin-Konzentration führt. Im Gegensatz hierzu konnte jedoch im selben Jahr nachgewiesen werden, dass durch die Einnahme von Hypericin einer der Hauptmetabolite im Abbauzyklus der Monoamine in erhöhter Form vorliegt [118]. Auch Thiede et al. beschrieben, dass Hypericin in hoher Dosierung eine Hemmung der Monoaminoxidase zur Folge hat, dieser Effekt jedoch nicht bei denjenigen Mengen an Johanniskraut, die bei der Behandlung der „Major Depression“ erforderlich sind, zu verzeichnen war [119].

Im Jahre 1998 konnten Muller et al. in Untersuchungen von Rattenhirnen die Wiederaufnahmehemmung von Serotonin, Norepinephrin, Dopamin, GABA und L-Glutamat durch Hyperforin nachweisen [120]. Analog hierzu berichten Neary et al. 2001 [121] von einer beobachteten in vitro Hemmung des Reuptakes von Serotonin und Norepinephrin in Astrozytenkulturen von Ratten durch Hypericum LI-160. Schon 1997 waren als weitere Wirkmechanismen ebenfalls bei Ratten die Downregulation der  $\beta$ -Adrenorezeptor-Dichte und ein Zuwachs der 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren-Dichte im Frontalhirn beschrieben worden [122]. Allerdings erfolgte diese Veränderung über einen längeren Behandlungszeitraum hinweg. Andere in-vitro-Untersuchungen postulieren eine durch die Hemmung von Interleukin-6 induzierte antidepressive Wirkung von Hypericum [123]. Diese Theorie konnte 2001 von Calapai et al. bestätigt werden [124].

Wie Simmen et al. zeigten, konnte auch die Bindung an Corticotropin Releasing Factor (CRF 1)-, Opioid-, Serotonin-, Östrogen- $\alpha$ - und GABA (A)-Rezeptoren durch Extrakte von *Hypericum Perforatum* unterbunden werden [125].

### 1.5.3.2 Antivirale Eigenschaften

Hypericin besitzt eine umfassende antivirale Aktivität, die sowohl eine Vielzahl an Viren als auch Retroviren einschließt. Bislang wurden an Zellkulturen und in Tierversuchen, jedoch nicht in klinischen Studien, Untersuchungen zur antiviralen Wirksamkeit der Substanz durchgeführt. So wurde diese Eigenschaft unter anderem für das murine Friend Leukämie-Virus [105], das equine infektiöse Anämie-Virus [126], das murine und humane Cytomegalie-Virus [127], das Herpes simplex - und Influenza-A-Virus [128] sowie schließlich für das HIV-1-Virus [129] nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass Lichtexposition einen wesentlichen Beitrag zur Aktivierung der antiviralen Eigenschaften beiträgt, wobei diese in Abhängigkeit von metabolisch aktiven biologischen Systemen ebenso unter dunklen Bedingungen erfolgen kann.

Meruelo et al. [105] beschrieben bereits 1988 die antiretrovirale Aktivität von Hypericin bei nur geringer Toxizität im Tiermodell. Tang et al. [128] postulierten 1990 antivirale Effekte gegen Viren mit Hüllproteinen („enveloped viruses“). In Western-Blots und SDS Polyacrylamid-Gelen gewonnene Daten lassen darauf schließen, dass Hypericin eine kovalente Bindung mit dem viralen Kapsid eingeht. Des Weiteren scheint Hypericin aufgrund seiner hohen lipophilen Eigenschaften und der dadurch bedingten Interaktion mit Membransystemen den viralen Replikations-Zyklus zu beeinflussen [97]. Bezüglich der exakten Wirkung von Hypericin auf das Retrovirus wurden verschiedene Mechanismen diskutiert: So beschrieben Schinazi et al. [129] die Inhibition der reversen Transkriptase. Takashi et al. [130] führten die Hemmung der Proteinkinase des Wirtsorganismus als eine wahrscheinliche Ursache an, andere wiederum nahmen an, dass Hypericin in die letzten Schritte der Virusreplikation

interferierend eingreift [105, 131]. Ebenso wurde ein direkter virusschädigender Effekt diskutiert [128, 127].

Die intravenöse Verabreichung synthetisch hergestellten Hypericins in hohen Dosen von 0.5 mg/kg Körpergewicht resultierte im Rahmen einer Phase-I-Studie mit HIV positiven Patienten in schwerwiegenden phototoxischen Reaktionen der Haut [132]. Weiterhin zeigte sich in weiteren in vivo Studien keine signifikante antivirale Wirksamkeit [133, 134]. Zwei frühere Studien aus den Jahren 1990 und 1993 [135, 136] konnten allerdings positive Ergebnisse im Sinne einer verbesserten CD4-Zellzahl, eines verbesserten CD4/CD8 Verhältnisses und weniger Sekundärinfektionen bei oraler oder intravenöser Gabe von rasch verfügbaren Extrakten nachweisen.

### **1.5.3.3 Antibakterielle Eigenschaften**

Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass Hypericin sowie andere Bestandteile von Johanniskraut antibakterielle Aktivität aufweisen. Nicht nur Avato et al. [137] bewiesen, dass das Wachstum grampositiver Bakterien durch Hypericin und Hyperforin signifikant inhibiert werden kann. Hierbei wiesen *B. subtilis* und *B. cereus* die grösste Sensitivität auf.

Auch Schempp et al. konnten bereits 1999 nachweisen, dass Hyperforin wirksam ist gegen verschiedene Bakterien der grampositiven Spezies, wie unter anderem den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* [138].

### **1.5.3.4 Antiproliferative und antineoplastische Potenz**

Als potenter Inhibitor der Proteinkinase C und der Tyrosinkinase sowie als Induktor von Apoptose und Nekrose besitzt die Substanz Hypericin nicht nur antiproliferative und somit antineoplastische Eigenschaften, sondern gewinnt darüber hinaus zunehmend an Relevanz für die Therapie verschiedenster Tumoren. Besonders für die adjuvante Therapie von Hirntumoren gewinnt

dieses Agens vor dem Hintergrund seiner im Weiteren beschriebenen Eigenschaften an Bedeutung.

Johanniskraut wurde bereits im 9. Jahrhundert in der Tumorthherapie eingesetzt [139]. In den vergangenen zwei Jahrzehnten konnte für eine Vielzahl an Tumorentitäten die antineoplastische Wirksamkeit von Hypericin in vitro und in vivo gezeigt werden. Initial untersucht wurde diese Eigenschaft von Thomas et al. in Abhängigkeit von seinem photosensibilisierenden Potential [140]. Pisani et al. [141] hatten 6 Jahre zuvor bereits postuliert, dass die Inhibition der mitochondrialen Succinoxidase ein Korrelat für die antineoplastische Aktivität von Hypericin darstellt. Betrachtet man weiterhin andere Veröffentlichungen zu dieser Thematik bei unterschiedlichen Tumorarten, so resultiert bei fast allen Untersuchungen die Quintessenz der Korrelation eines zytotoxischen Effekts mit der Photoaktivierung von Hypericin [142, 143, 144, 145, 146, 147, 148].

Einige frühere Arbeiten hingegen beschreiben rein zytotoxische Effekte durch die Inkubation mit Hypericin, generiert ohne Lichtexposition bei transformierten Fibroblasten, Leukämiezellen sowie bei humanen Epidermoid-Karzinomzellen [130, 105]. Auch Blank et al. beschrieben eine Wachstumshemmung bei kultivierten stark metastasierenden Adenokarzinomen der Mamma und bei squamösen Zell-Karzinomen ohne jegliche Lichteinwirkung [149]. Aufgrund seines bedeutenden Potentials als Photosensibilisator erlangt Hypericin in zunehmendem Maße einen vielversprechenden Stellenwert für die Anwendung innerhalb der PDT maligner Erkrankungen [150, 151, 152].

Ein weiterer positiver Aspekt hinsichtlich der Anwendung von Hypericin in der PDT ist seine tumorselektive Akkumulation in höheren Konzentrationen im Vergleich zum Normalgewebe [153].

### **1.5.3.4.1 Inhibition der Proteinkinase C**

Tumorwachstum impliziert eine Reihe von intrazellulären Prozessen, welche auf der Aktivierung der DNA-Synthese sowie der Umfunktionierung des Zytoskeletts basieren und durch die Anregung von Transmembranfaktoren



initiiert werden. Diese binden lösliche Wachstumsfaktoren, unter denen einige wiederum an der Onkogenese mitwirken. Die Onkogene c-erb B, homolog zum „Epidermal Growth Faktor“ (EGF)-Rezeptorgen, welche in nahezu 40% aller Gliome amplifiziert werden, sind die in Gliomen am häufigsten vervielfältigten Onkogene [103]. So kommt es einerseits zu einer Überexpression von Wachstumsfaktoren. Außerdem ist andererseits die Veränderung von Wachstumsfaktoren ein mögliches Anzeichen dafür, dass externe Signale deren Phänotyp derart verändern, dass letztlich eine vermehrte Proliferation resultiert. Hinsichtlich der Fragestellung der Ursache dieser Deregulierung scheint die intrazelluläre Signaltransduktion von zentraler Bedeutung zu sein. Das Proteinkinase C System zählt zu einem dieser Signalwege [154]. Die Proteinkinase C ist eine Phospholipid-abhängige Serotonin-Threonin-Kinase, welche maßgeblich am Signalweg des EGF sowie an weiteren anderen rezeptor-vermittelten Signalwegen beteiligt ist [99]. Es wurde gezeigt, dass mindestens 10 Isoformen dieser Kinase in malignen Gliomen existieren [155]. In malignen Gliomzellen ist diese wesentlich aktiver, d.h. in viel höherem Maße vorhanden, als in ursprünglichen Gliazellen und korreliert eng mit der Tumorstadiumsrate *in vitro* [156]. Somit ist die Proteinkinase C vermutlich an der Regulation des Größenwachstums von malignen Gliomen mitbeteiligt [130] und übernimmt nach Tysnes et al. *in vitro* eine wesentliche Funktion bei der Zellinvasion von Gliomen [157]. Aufgrund ihrer enormen Bedeutung für das Zellwachstum führt deren Inhibition wiederum zu einer Wachstumshemmung der Zellen. Ausschlaggebend hierfür ist die partielle membrangebundene Aktivität der Proteinkinase C. Die im Plasma vorhandene Totalaktivität spielt hierbei eine nur geringe Rolle [154].

Die in der vorliegenden Arbeit zu untersuchende Substanz Hypericin besitzt das Potential diese irreversibel zu hemmen. Diese Inhibition funktioniert über eine kovalente Bindung an die regulatorische Domäne der Proteinkinase. Die Irreversibilität dieser Inaktivierung lässt annehmen, dass bereits relativ geringe Dosen an Hypericin – unabhängig von Licht - zu einer für seine klinische Anwendung suffizienten Hemmung der Kinase führen. Dies wurde so von Takashi et al. beschrieben [130]. Auch Zhang et al. induzierte bei

Neuroblastomkulturen durch Inkubation mit Hypericin den Effekt einer deutlichen Wachstumsreduktion [143]. Weiterhin konnte in vitro gezeigt werden, dass die Radiosensibilität humaner Glioblastomzellen durch Hypericin bei Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen verstärkt werden kann. Hierbei scheint die Inhibition der Proteinkinase ebenfalls eine Rolle zu spielen [158].

### **1.5.3.4.2 Inhibition der Tyrosinkinase**

Die Tyrosinekinase ist bei einigen Rezeptoren für die Vermittlung der intrazellulären Signaltransduktion von Bedeutung. Hierzu zählen beispielsweise der Insulinrezeptor und der EGF-Rezeptor. Auch bei diesem Enzym greift der inhibitorische Effekt von Hypericin. De Witte et al. [159] konnten diesen hemmenden Einfluss auf die Tyrosinkinase bezüglich des EGF-Rezeptor allerdings nur in Verbindung mit der Photoaktivierung von Hypericin nachweisen (Typ I Mechanismus). Auch Agostinis et al. [160] zeigten sowohl eine Hemmung von Proteinkinasen wie der Tyrosinkinase als auch der Proteinkinasen CK-1 und CK-2 durch photoaktiviertes Hypericin.

### **1.5.3.4.3 Induktion von Apoptose und Nekrose**

Als ursächlich für das antineoplastische Potential von photoaktiviertem Hypericin wurde die Induktion von Apoptose sowie unter Verwendung höherer Konzentrationen die Nekrose bezeichnet [144]. Couldwell et al. beschrieben außerdem eine Hemmung der Zellproliferation [161]. Die durch Hypericin induzierte Apoptose wird durch eine Enzymkaskade, sogenannte aktivierte Kaspasen initiiert und ist mit dem Tumor-Necrosis-Factor-Related-Apoptosis-Inducing-Ligand (TRAIL) assoziiert. Dies zeigten Schempp et al. in ihren Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der Apoptose [162]. Vantieghem et al. [144] postulierten sowohl eine zugrunde liegende Aktivierung der Kaspase-3 als auch eine mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C. In

Gliomzellen scheint Hypericin die Zytotoxizität in gleichem Maße zu aktivieren, wie es die Proteinkinase C zu inaktivieren scheint. Deshalb schlussfolgerten Anker et al. [103], dass diese miteinander korrelieren. Zytotoxizität ist nach dieser Hypothese das unmittelbare Resultat der durch Hypericin induzierten Inhibition der Proteinkinase C und führt letztlich zur Zellapoptose. Weller et al. zeigten hingegen, dass Hypericin in seiner Funktion als potenter Proteinkinase C-Inhibitor nicht mit der Zytotoxizität in Zusammenhang zu bringen ist [163].

### 1.5.3.5 Pharmakokinetische Interaktionen

Als sogenannter Enzym-Induktor interagiert Johanniskraut mit diversen Arzneimitteln (siehe Tabelle 4). Somit resultiert bei gleichzeitiger Einnahme von Johanniskraut mit anderen speziellen Medikamenten wie beispielsweise von Kontrazeptiva oder trizyklischen Antidepressiva wie Amitryptilin ein erniedrigter Plasmaspiegel des spezifischen Medikaments. Dieser verstärkten Metabolisierung liegt einerseits eine durch Hypericum-Extrakte hervorgerufene hepatische Induktion von Cytochrom P450-Isoenzymen zugrunde [164, 165]. Durr et al. als auch Perloff et al. wiesen andererseits nach, dass die Einnahme von Johanniskraut-Präparaten weiterhin zu einer beschleunigten Elimination der Medikamente aus der Zelle führt. Erklärungsansatz hierfür ist eine Überexprimierung von P-Glykoprotein, welches den transembranösen Transporterproteinen zuzuordnen ist [166, 167].

Es werden ungefähr 60 % aller Arzneimittel über CYP3A4 und weiterhin über das P-Glykoprotein metabolisiert.

Eine Übersicht über die wichtigsten mit Hypericin interagierenden Medikamente ist in Tabelle 4 dargestellt.

<b>Agens</b>	<b>Enzym</b>	<b>Effekt auf Medikamentenspiegel im Blut</b>
Amitriptylin	CYP P450 3A4	↓
Carbamazepine	CYP 3A4	-
Cyclosporine	CYP 3A4	↓
Digoxin	CYP 3A4	↓
Indinavir	CYP 3A4	↓
Irinotecan	CYP 3A4	↓
Midazolam	CYP 3A4	↓
Nevirapin	CYP 3A4	↓
Orale Kontrazeptiva	CYP 3A4	↓
Sertalin	CYP P450 3A4	↓
Simvastatin	CYP 3A4	↓
Tacrolimus	CYP 3A4	↓
Theophyllin	CYP 1A2	↓
Warfarin	CYP 2C9	↓

Tabelle 4: Interaktionen von Hypericin mit Medikamenten

## 1.6 Schwerpunkte dieser Arbeit

### 1.6.1 Charakterisierung von Photosensibilisatoren an Zellkulturen

Zusammenfassend gilt zu sagen, dass die PDT sich nicht nur zur Tumorvisualisierung und Tumorelimination einer Vielzahl unterschiedlicher Tumoren eignet, sondern ebenso in der Behandlung benignen oder entzündlicher Erkrankungen wie beispielsweise der Psoriasis vulgaris [168] und der Acne vulgaris [169] Anwendung findet. In Anbetracht der in dieser Arbeit aufgeführten Auswahl an Studien und Forschungsarbeiten wird deutlich, dass die PDT in der heutigen Zeit von großem Interesse ist und ihr in Zukunft eine bedeutende Rolle für eine Vielzahl an diagnostischen und therapeutischen Ansätzen bei den verschiedensten Erkrankungen, vor allem aber bei den Tumorerkrankungen, zukommen wird. Somit hat sich das Verfahren der PDT in

den letzten Jahrzehnten zu einer denkbaren Alternative nicht nur für palliative, sondern auch für kurative Behandlungsansätze innerhalb der Tumorthherapie entwickelt und als ein effektives Verfahren bewiesen.

Die Bedeutung einiger Photosensibilisatoren der neuen Generation gilt es unter dem Aspekt ihrer physikalischen, chemischen und pharmakologischen Eigenschaften jedoch noch unter Beweis zu stellen.

### **1.6.2 Fokus**

Inwieweit eignet sich der Photosensibilisator Hypericin für die Anwendung einer PDT bei malignen Gliomen?

Dieser Frage gerecht zu werden, bildet den Schwerpunkt dieser Arbeit.

Hierbei erschien die standardisierte in-vitro-Charakterisierung dieser Substanz mittels quantitativer und qualitativer Messverfahren eine sinnvolle Vorgehensweise zur Erforschung des zellulären Aufnahmemechanismus einerseits und seiner Eignung für die PDT von malignen Gliomen andererseits.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Evaluierung optimaler Hypericinkonzentrationen in minimal zytotoxischen und maximal phototoxischen Bereichen als Voraussetzung für letztlich optimale Bestrahlungsbedingungen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 Glioblastomzelllinien**

Für sämtliche Experimente wurden die humanen Glioblastomzelllinien der European Collection of Cell Cultures, Wiltshire, UK (U373 MG cells, ECACC No. 890811403) und der American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA (LN229, ATCC No. CRL-2611; T89G, ATCC No. CRL-1690) verwendet.

#### **2.1.2 Arbeitsmethoden**

Bei allen im nachfolgenden beschriebenen Versuchen wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Es erfolgte eine gründliche Desinfektion des Arbeitsbereichs vorab und im Anschluss an die Versuche mit Descosept AF, Dr. Schumacher GmbH, Deutschland. Unter der Sterilbank wurde konsequent mit „laminar flow“ gearbeitet sowie steriles Arbeitsmaterial verwendet.

#### **2.1.3 Kultivieren der Zellen**

##### **2.1.3.1 Anzucht der Zellen**

Alle drei Zelllinien (U373 MG, LN229, T89G) wurden routinemäßig in RPMI 1640 Medium (Gibco BRL, Paisley, UK; supplemented with GlutaMAX™), ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin, Deutschland) und Antibiotika, Penicillin (100 IU/ml) sowie Streptomycin (100 µg/ml); Gibco BRL), kultiviert und bei 37° C sowie 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator aufbewahrt (Cellstar; Nunc, Wiesbaden, Deutschland). Die Antibiotika wurden zur

Prävention bakterieller Infektionen zugegeben, deren Zusammensetzung bestand aus 100 IU/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin.

Die in flüssigem Stickstoff (-196° C) gelagerten Zellen wurden in -80° C überführt und anschließend zügig im Wasserbad bei 37° C aufgetaut. Nach 10 minütigem Abzentrifugieren bei 1000 Umdrehungen pro Minute (Varifuge K, Heraeus Christ, Deutschland) wurde der Überstand abgesaugt, und das Zellsediment in eine kleine T25 Zellkulturflasche (25ml Tissue Culture Flask Falcon, Becton Dickinson, France) überführt, mit 5 ml Medium versetzt und anschließend für einen Tag bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach zwei Tagen Inkubationszeit wurden die Zellen in die nächstgrößere Kulturflasche T75 (75cm<sup>2</sup>, Corning Incorporated, USA) umgesetzt, mit 15 ml Medium versehen und bei adhärentem Wachstum und dichtem Zellrasen für die Durchführung weiterer Experimente ausgezählt.

Die visuelle Kontrolle des Zellwachstums wurde mittels eines Auflichtmikroskops unter 20facher Vergrößerung (Zeiss IM, Deutschland) durchgeführt. Mediumwechsel erfolgte kontinuierlich alle zwei Tage. Bei dichtem Zellrasen, jedoch noch nicht konfluierenden Zellen, wurden die Zellen alle 7 Tage im Verhältnis 1:10 gesplittet. Hierfür wurde nachfolgender Ablauf durchgeführt: Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit 2 ml PBS (PBS, Gibco BRL) gewaschen, mit 1 ml Accutase<sup>TM</sup> (PAA Laboratories, Pasching, Austria) bei 37° C ungefähr 5 bis 10 Minuten im Inkubator vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und in neue Kulturgefäße mit jeweils 15 ml Medium überführt.

Nach durchschnittlich 2 bis 3 Tagen Wachstum wurden die Zellen bei dichtem Zellrasen für die Versuchsdurchführung in entsprechender Anzahl in 24-Well-Platten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) überführt.

### 2.1.3.2 Lagerung der Zellen

Überschüssige Zellen wurden für weitere Versuchsreihen bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert. Hierfür wurden pro Einfrierröhrchen (CryoTube Vials von Nunc, Dänemark)  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Medium (RPMI 1640 mit Phenolrot, Gibco BRL, Paisley, UK) mit 20 % fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom AG Berlin, Deutschland) sowie 5 % DMSO (DMSO Dimethyl Sulfoxide, Sigma-Aldrich Chemie ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$ ), Deutschland) eingefroren. Das Einfriermedium wurde auf Eis vorbereitet und gelagert. Die einzufrierenden Zellen wurden für 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellsediment mit kaltem Einfriermedium resuspendiert. Pro Einfrierröhrchen erfolgte eine Portionierung von jeweils 1 ml (siehe oben). Nachfolgend wurden die Röhrchen für eine Stunde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und anschließend für eine weitere Stunde in einen  $80^{\circ}\text{C}$  kalten Gefrierschrank umgelagert, um letztlich dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert werden zu können.

### 2.1.4 Wachstumskurven

Das Wachstumsverhalten der drei Zelllinien U373 MG, LN229 und T98G wurden vor allem unter dem Aspekt der Planung der zeitlichen Versuchsdurchführung analysiert. So sollte der optimale Zeitpunkt nach Aussaat für die Durchführung der Experimente bestimmt werden. Zur Beobachtung des Wachstumsverhaltens der drei Zelllinien U373 MG, LN229 und T98G wurden von jeder der drei Zelllinien 150 Zellen/ $\text{mm}^2$  in jeweils 2 kleine Petrischalen (Gewebe Kulturschalen Cellstar, 35 mm, Greiner bio-one, Deutschland) ausgezählt. Dies entspricht 144 000 Zellen/Petrischale. Über einen Beobachtungszeitraum von 5 Tagen wurden die Zellen pro Tag und Zelllinie ausgezählt, um so das Wachstumsverhalten jeder einzelnen Zelllinie beurteilen und zwischen den Zelllinien untereinander vergleichen zu können. Die erste Zellzählung erfolgte 6 Stunden nach Aussaat, vier weitere Zählungen



wurden exakt im 24 Stunden Abstand über 4 weitere Tage durchgeführt. Hierbei wurden je Zelllinie Doppelbestimmungen durchgeführt. Insgesamt erfolgten drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente in einwöchigem Abstand.

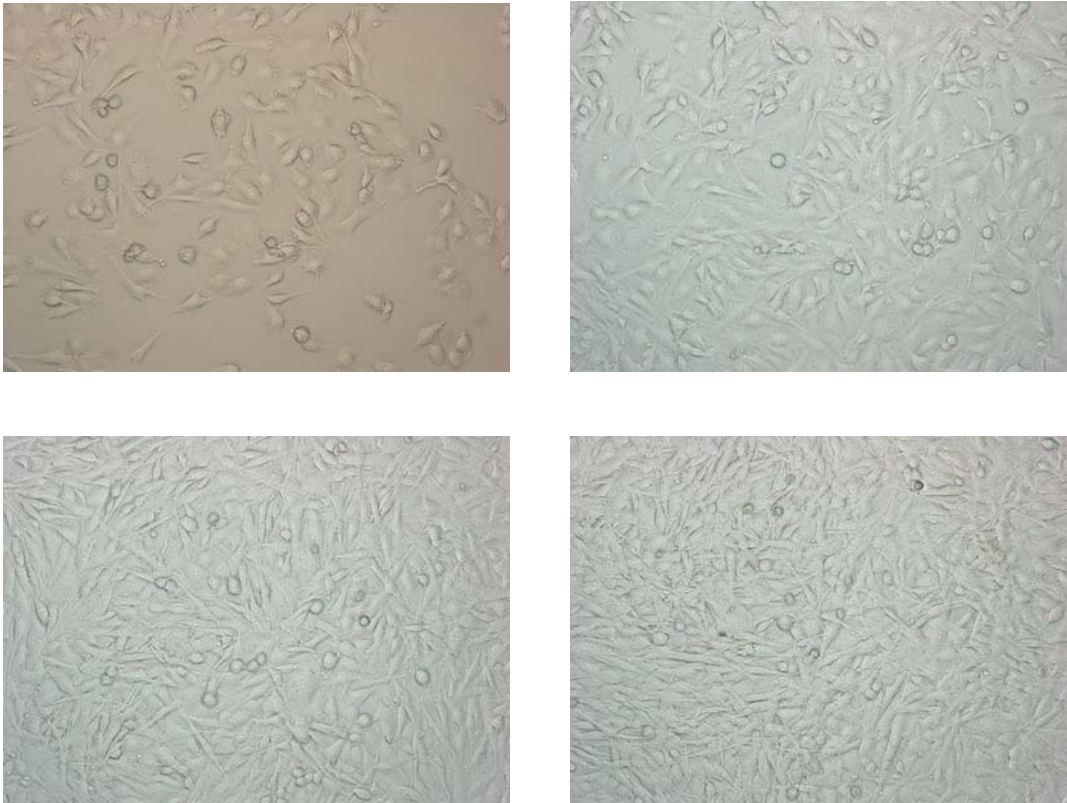


Abbildung 17: Zellwachstum der Glioblastomzelllinie U373 MG 6 Stunden (oben links), 24 Stunden (oben rechts), 4 Tagen (unten links) und nach 5 Tagen (unten rechts) nach Aussaat.

### 2.2 Ansetzen der Stammlösung von Hypericin

Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurde das in 99-prozentiger Reinheit vorliegende Hypericin der Firma Phytochem (Ichenhausen, Deutschland) mit einem Molekulargewicht von 504,45 g/Mol [96] verwendet.

Um für die folgenden Versuche verschiedene Hypericinkonzentrationen zügig zu gewinnen, wurde zunächst eine Stammlösung von 1 mM bzw. 2 mM angesetzt, welche bei -20° C im Dunklen gelagert wurde. Zum Erhalt der 1 mM- bzw. 2 mM-Stammlösung wurde die stark lipophile Substanz in der entsprechenden Menge DMSO gelöst und in je 300 µl pro Eppendorf-Röhrchen

(Eppendorf Reaktionsgefäße, 1.5 ml, Eppendorf-Nethelen-Hinz GmbH, Deutschland) portioniert und eingeforen.

Folgende Formel wurde zur Berechnung der Stammlösung verwendet:

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

Das Procedere beim Ansatz der Hypericinkonzentrationen für die Versuchsdurchführung der Konzentrationsreihen soll im Folgenden als anschauliches Beispiel dienen. Für alle weiteren Experimente war das Vorgehen analog, lediglich die Menge an Inkubationsmedium und somit auch der darin enthaltenen Einzelsubstanzen variierte.

Um die für die Versuchsdurchführung benötigten Hypericinkonzentrationen in  $\mu\text{M}$  zu erhalten, wurde folgendermaßen verfahren: Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde die benötigte Anzahl an Eppendorf-Röhrchen der Stammlösung zügig im Wasserbad bei  $37^\circ \text{C}$  aufgetaut und mit den entsprechenden Mengen an DMSO verdünnt, um die in der angefügten Tabelle (Tabelle 5) ersichtlichen verschiedenen Konzentrationen in mM (150 ml je Konzentration) zu erhalten.

Formel zur Berechnung der Hypericinkonzentrationen:

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

k: gewünschte Hypericinkonzentration

x: errechnete Menge in  $\mu\text{l}$

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

Tabelle 5: Ansatz der verschiedenen Hypericinkonzentrationen in  $\mu\text{M}$

Anschließend wurden hieraus 50 µl entnommen und in einem zweiten Verdünnungsschritt zügig in 0,5 ml FCS überführt, um eine optimale Löslichkeit zu erzielen. Anschließend wurden diese in 4,5 ml Medium (Zusammensetzung siehe unter 2.1.3.1) langsam resuspendiert. Somit ergab sich ein weiterer Verdünnungsschritt von 1:100 und die Konzentrationen lagen somit in der gewünschten Konzentrationseinheit (µM) vor.

### **2.3 Ansatz und Durchführung der Versuche**

Sämtliche im Folgenden beschriebenen Versuchabläufe wurden unter dunklen Bedingungen durchgeführt.

Zur Ermittlung der Autofluoreszenz der Zellen wurden sogenannte Kontrollproben erstellt, welche mit reinem Medium ohne Zusatz von Hypericin zeitgleich unter denselben Bedingungen inkubiert worden waren.

Diese wurden nach Auswertung als Negativ-Kontrollen von allen weiteren generierten Werten subtrahiert, um somit die tatsächliche durch Hypericin induzierte Fluoreszenz zu erhalten. Für jede Versuchsordnung wurden mindestens drei voneinander unabhängige Experimente mit Doppelbestimmungen bzw. Vierfachbestimmungen durchgeführt und die generierten Werte anschließend statistisch analysiert sowie in errechneten Verlaufskurven aufgetragen.

#### **2.3.1 Aussaat und Inkubation für die Zytotoxizität**

Zur Versuchsdurchführung wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zelllinien U373 MG, T98G und LN229 mit 2 ml PBS (Gibco BRL) gewaschen, zum Ablösen mit 1 ml Accutase™ (PAA Laboratories, Pasching, Austria) ungefähr 5 bis 10 Minuten bei 37° C inkubiert und in Eppendorf-Zählkammern unter dem Auflichtmikroskop gezählt. Anschließend wurden die Zellen zur weiteren Versuchsdurchführung in 24-Well-Platten, jeweils zu 150 Z/mm<sup>2</sup> (dies

entspricht umgerechnet 30 000 Zellen pro Well und 720 00 Zellen pro Platte), überführt und erneut für 48 Stunden bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator angezüchtet.

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von Hypericin wurden jeweils 4 Wells mit unterschiedlichen Hypericinkonzentrationen von 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 und 10µM jeweils über 2 und 24 Stunden bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Da Hypericin eine ausgeprägte Lipophilie aufweist, war die Substanz für die Versuchsdurchführung zur Bestimmung der Zytotoxizität bei einer Zelllinie (U373 MG) zuvor auf verschiedene Weise gelöst worden und die Ergebnisse verglichen. Somit sollte die geeignetste Methode für eine optimale Löslichkeit der Substanz im Inkubationsmedium bestimmt werden:

Einmal wurde das Hypericin (Trockenpulver), nachdem es zuvor in DMSO gelöst worden war, zunächst in FCS überführt und in einem letzten Schritt langsam in der benötigten Menge Nährmedium resuspendiert.

Bei der zweiten Vorgehensweise wurde das in DMSO gelöste Hypericin direkt in das bereits vorab mit FCS versetzte Medium pipettiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde das Inkubationsmedium abgesaugt, die Zellen wiederum mit 500 µl PBS je Well gespült und anschließend mit Kulturmedium ohne Photosensibilisator reinkubiert und bis zur abschließenden Versuchsauswertung mittels Neutralrot-Assay für weitere 48 Stunden kultiviert.

### **2.3.2 Aussaat und Inkubation für die Phototoxizität**

Für sämtliche Experimente zur Bestimmung der Phototoxizität wurden folgende Bestrahlungsmodalitäten durchgeführt:

Unmittelbar vor Beginn der Einzelbestrahlung wurde das mit Hypericin versehene Medium in jedem Well abgesaugt, die Zellen je Well mit 500 µl PBS gespült und anschließend in jedes Well 500 µl frisches Medium ohne Zusatz von Phenolrot (RPMI 1640 ohne Phenolrot, Gibco BRL, Paisley, UK) zur Bestrahlung pipettiert. Weiterhin wurde auf die sich zwischen den Wells befindliche Fläche auf jede Platte 2 ml Trypanblau (0,5% (w/v), Biochrom,

Berlin, Deutschland) zugegeben, um beim anschließenden Bestrahlungsvorgang eines einzelnen Wells eine Lichtexposition der Nachbar-Wells zu verhindern.

Die Bestrahlungsparameter wurden unmittelbar vor und nach Bestrahlung der Zellen mittels eines Leistungsmessgerätes (Power meter, Modell TPM-310 Gentec, Quebec, Canada) überprüft.

Sämtliche Versuchsabläufe wurden unter dunklen Bedingungen durchgeführt.

Im Anschluss an die Bestrahlung erfolgte dasselbe wie unter 2.3.1 beschriebene Procedere mit einer Reinkubation der bestrahlten Zellen für 48 Stunden bis zur abschließenden Versuchsauswertung. Die Bestimmung der Überlebensrate der Zellen nach photodynamischer Inaktivierung erfolgte photometrisch mittels Neutralrot-Assay (siehe unter 2.4.1).

### **2.3.2.1 Aussaat und Inkubation U373 MG, LN229 und T98G**

Zur Bestimmung der Phototoxizität von Hypericin wurden die Zellen in 4-Well Platten (Nunc, Dänemark) nach wie unter 2.3.1 beschriebener Aussaat von 30.000 Zellen/Well für 48 Stunden bei 37° C angezchtet und im Anschluss mit Hypericin in einer nicht-zytotoxischen Konzentration von 2.5 µM für zwei Stunden bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach einmaligem Spülen mit PBS wurden die Zellen mit Kulturmedium ohne Zusatz von Phenolrot (RPMI 1640 ohne Phenolrot, Gibco BRL, Paisley, UK) reinkubiert und anschließend mittels eines Dye Lasers (Modell 375, Spectra Physics, Mountain View, USA), gepumpt durch einen Argon Ionen Laser (Modell 2030, Spectra Physics; Mountain View, USA), bestrahlt. Die Bestrahlung aller drei Zelllinien erfolgte mit unterschiedlichen Energiedichten von 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4 und 0.5 J/cm<sup>2</sup> bei einer Wellenlänge von 595 nm und einer Leistungsdichte von 5 mW/cm<sup>2</sup> mit ansteigenden Expositionszeiten von 10 bis 100 Sekunden.

### **2.3.2.2 Aussaat und Inkubation von U373 MG und T98G zur Bestimmung der Phototoxizität in Abhängigkeit der Inkubationskonzentration**

Für die Zellkulturen T98G wurde die photodynamische Inaktivierung zusätzlich für verschiedene Inkubationskonzentrationen mit Hypericin (0.1 bis 2.5  $\mu\text{M}$ ) nach erfolgter Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37° C und 5%  $\text{CO}_2$  bestimmt. Die Zellen wurden mit Energiedichten von 0.1  $\text{J}/\text{cm}^2$  bis zu 1.5  $\text{J}/\text{cm}^2$  bei einer Wellenlänge von 595 nm und Leistungsdichten von 5  $\text{mW}/\text{cm}^2$  bis zu 10  $\text{mW}/\text{cm}^2$  wie unter 2.3.2.1 beschrieben bestrahlt.

Für die Glioblastomzelllinie U373 MG wurde die photodynamische Inaktivierung für aufsteigenden Hypericinkonzentrationen (0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5  $\mu\text{M}$ ) nach Inkubation der Zellen von ebenfalls 2 Stunden bei 37° C und 5%  $\text{CO}_2$  gemessen. Hierbei wurden die Zellen mit einer konstanten Energiedichte von 0.3  $\text{J}/\text{cm}^2$  und einer Leistungsdichte von 10  $\text{mW}/\text{cm}^2$  bei einer Wellenlänge von 595 nm bestrahlt.

### **2.3.2.3 Aussaat und Inkubation von LN229 zur Bestimmung des Aktionsspektrums von Hypericin**

Zur Bestimmung des Aktionsspektrums von Hypericin wurde zusätzlich die Zelllinie LN229 mit unterschiedlichen Wellenlängen von 575 nm bis 615 nm, in 5 nm Schritten aufsteigend, bestrahlt. Für jede Wellenlänge wurden die Zellen einem Licht einer Leistungsdichte von 10  $\text{mW}/\text{cm}^2$  für 30 Sekunden exponiert. Dies entspricht einer Energiedichte von 0.3  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Die Bestrahlungen erfolgten mittels eines Farbstofflasers (continuous wave broad-band dye Laser, Modell 375, Spectra Physics, Mountain View, USA).

### **2.3.3 Aussaat und Inkubation von U373 MG zur Bestimmung der intrazellulären Akkumulation**

Zur Bestimmung der Kinetik der intrazellulären Akkumulation von Hypericin in den Glioblastomzellen wurde die Zellkultur U373 in 24-Well-Platten über 48 Stunden kultiviert (Aussaat siehe unter 2.3.1) und anschließend bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> entweder mit verschiedenen Hypericin-Konzentrationen (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 5, 10, 15 und 20 µM) über einen Inkubationszeitraum von 2 Stunden (Konzentrationsabhängige Aufnahme) oder bei verschiedenen Inkubationszeiten (5, 10, 15, 30 min und 1.5, 2, 3, 4, 6 und 24 h) mit Hypericinkonzentrationen von jeweils 2.5, 5 and 20 µM (zeitabhängige Aufnahme) inkubiert. Die Versuchsmessung und damit die Messung der zellulären Fluoreszenz (siehe unter 2.4.2) erfolgte nach Spülen der Zellen mit PBS und Ablösen mit Accutase<sup>TM</sup> mittels Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACSSORT, Becton Dickinson, San Jose CA, USA, Anregung: 488 nm).

### **2.3.4 Aussaat und Inkubation von U373 MG zur Bestimmung des Transportmechanismus**

Zur Untersuchung des Aufnahmemechanismus von Hypericin in die Zelle wurden die Zellen der Zelllinie U373 MG nach Aussaat (siehe auch 2.3.1) in 24-Well-Platten für 48 Stunden bei 37° C kultiviert. Nach erfolgtem Vorkühlen sowohl der Zellen als auch des Inkubationsmediums bei 4° C für eine Stunde wurden die Zellen mit einer Konzentration von 2.5 µM Hypericin für 2 Stunden bei 4° C und anschließend für zwei weitere Stunden bei 37° C inkubiert. Analog hierzu erfolgte als Kontrollbestimmung die Inkubation weiterer Zellen ebenfalls mit 2.5 µM Hypericin über 4 Stunden, diese allerdings bei 37° C. Somit sollte eine Differenzierung zwischen aktivem und passivem Transportmechanismus ermöglicht werden. Kriterium für die Vitalität der Zellen war eine erneute Aufnahme der zuvor bei 4° C inkubierten Zellen bei erneuter Inkubation unter

warmen Bedingungen (37° C). Zur Untersuchung der Hypericinaufnahme der Zellen in kürzester Zeit – hierbei erfolgt wahrscheinlich eine Anheftung der Moleküle an die Zellmembran - wurde eine sogenannte Adsorptionsrate bestimmt. Hierfür wurde die Inkubationslösung auf die Zellen pipettiert und so rasch wie möglich wieder abgesaugt. Die Adsorptionsrate galt für diesen Versuch als negativer Kontrollwert. Nach einmaligem Spülen der Zellen mit PBS und Ablösen dieser mittels Accutase™ wurde die intrazelluläre Akkumulation von Hypericin mittels Durchflusszytometrie wie oben beschrieben bestimmt.

### **2.3.5 Intrazelluläre Lokalisation**

Die intrazelluläre Akkumulation von Hypericin wurde anhand von fluoreszenzmikroskopischen Messungen mit allen drei Zelllinien durchgeführt.

Hierzu wurden die Zellen auf Objektträgern (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany; Aussaat von  $2.85 \times 10^5$  Zellen/Objektträger) mit Hypericin-konzentrationen von 0.5, 1.5 und 2.5  $\mu\text{M}$  für 2 Stunden bei 37° Celcius inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen entweder mit dem mitochondrialen Marker Rhodamin 123 (R 123, Fluka, Buchs, Switzerland; 1  $\mu\text{M}$  / 1 h) oder mit dem lysosomalen Marker Akridin-Orange (acredine orange, molecular probes, Eugene, USA; 1  $\mu\text{M}$  / 1 h) inkubiert. Kurze Zeit vor den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen (Axioplan 1, Carl Zeiss Jena, Jena, Germany) wurden die Zellen allesamt mit gepufferter Salzlösung (EBSS, Sigma-Aldrich) gewaschen. Zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung von Hypericin als auch der Organellenmarker Rhodamin und Akridin-Orange wurden zwei unter 2.4.3 eingehend beschriebene Methoden der Fluoreszenzmikroskopie verwendet.



## 2.4 Versuchsauswertung

Im Folgenden sollen Abläufe zu den Versuchsauswertungen der im Vorfeld beschriebenen Experimente ausführlich dargestellt werden.

### 2.4.1 Auswertung der Experimente zur Zyto- und Phototoxizität

**Zytotoxizität** bedeutet die Fähigkeit einiger chemischen Substanzen (wie beispielsweise Pharmaka), Gewebezellen zu schädigen.

**Phototoxizität** heisst, dass aufgrund von Lichtexposition in Kombination mit einer bestimmten chemischen Substanz eine toxische Reaktion entsteht, welche zur Zellschädigung führt.

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden nach Inkubation mit Hypericin (Zytotoxizität) bzw. nach Bestrahlung (Phototoxizität) bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte die Auswertung sämtlicher Experimente zur Zytotoxizität und Phototoxizität. Hierbei wurde die Vitalität der Zellen photometrisch mittels Neutral-Rot-Assay bestimmt [170, 171]. Da sich Neutralrot in den Lysosomen der Zellen anreichert und bei Schädigung der Zellmembran durch schädigende Noxen wieder austritt, kann über die in der Zelle verbleibende Farbstoffmenge das Ausmaß der Zellschädigung bestimmt werden. Mit dieser Methode können somit toxische Einflüsse auf Zellen evaluiert werden. Bei der hier verwendeten „Uptake-Methode“ wurden die Zellen zunächst mit Hypericin inkubiert und bestrahlt (siehe unter Kapitel 2.3.2.1) und anschließend bei 37° C mit wässriger Neutralrot-Lösung (Biochrom, Berlin, Deutschland) für insgesamt 2 bis 3 Stunden inkubiert. In jedes Well wurden 500 µl der Neutralrot-Lösung zugegeben. Das Neutralrot war zuvor in einem Verhältnis 1:25 (V/V) in Kulturmedium gelöst worden, so dass eine endgültige Neutralrot-Lösung von 0.012% vorlag. Der pH-Wert wurde auf 7.4 adjustiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Überstände abgesaugt und die Zellen zweimal mit isotoner NaCl-Lösung gewaschen. Durch Zugabe von 300 µl Gamma3-Lösung (Wasser/ Ethanol / Essigsäure, 1 / 1 / 0.02, V / V / V) wurde Neutralrot

schließlich aus den Zellen extrahiert. Nach vorsichtigem Schütteln für 10 Minuten wurde ein 100 µl Aliquot einer jeden Probe in eine Micro-Titer-Platte (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt.

Die Absorption wurde bei 570 nm mit einer Referenz-Wellenlänge von 690 nm mittels eines Photometers (plate reader, Lucy 1, anthos Mikrosysteme, Krefeld, Deutschland) bestimmt und schließlich mit der anthos WinRead Software (Version 2.3) analysiert. Somit wurde über die Menge des während der Inkubationszeit aufgenommenen Neutralrots nach anschließender Entfärbung der gewaschenen Zellen photometrisch bestimmt und so Rückschluss auf das Ausmaß der Zellschädigung durch die zuvor applizierten Noxen (Hypericin und Licht) gezogen.

Die Vitalität der Zellen wurde für die Zytotoxizität in Prozent zu den mit reinem Kulturmedium ohne Hypericin inkubierten Kontrollen und für die Phototoxizität in Prozent zu den inkubierten, nicht-bestrahlten Kontrollen berechnet. Als ein quantitatives Maß für Phototoxizität wurden sogenannte ID<sub>50</sub>-Werte von den erstellten Dosis-Wirkungs-Kurven (siehe auch unter dem Kapitel Ergebnisse) abgeleitet. ID<sub>50</sub>-Werte sind Inaktivierungs- oder Energiedosen, welche die Zellüberlebensrate um 50 % im Verhältnis zur Kontrolle reduzieren. Sowohl für die Versuche zur Zytotoxizität, als auch für die Versuche zur Phototoxizität wurden für jede Zelllinie mindestens drei voneinander unabhängige Experimente in Vierfach-Bestimmungen durchgeführt.

### **2.4.2 Auswertung Durchflusszytometrie (FACS)**

Nach einmaligem Spülen mit PBS (500 µl) wurden die Zellen mit 300 µl Accutase™ wie bereits beschrieben (2.3.1) unmittelbar nach Ablauf der Inkubationszeiten abgelöst. Zellen von 4 zu identischen Bedingungen inkubierten Wells wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und durch ein Metallgitter (Porengröße 100–112 µM; Haver & Boecker, Oelde, Deutschland) gefiltert, um Zellkonglomerate möglichst zu vermeiden. Zur Erfassung der vitalen Zellen im FACS in Prozent wurde 10 µl Propidiumiodid (Propidiumiodide

Minimum 95%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), welches zuvor in PBS (2 mg/ml; 10 µL per 1 mL Zellsuspension) gelöst worden war, in je ein FACS-Röhrchen (120 000 Zellen/ 1200µl) zugegeben. Hiermit wurde die nekrotische und apoptotische Zellfraktion bestimmt. Anschließend wurde die Fluoreszenz der mit Hypericin behandelten Glioblastomzellen mittels Durchflusszytometrie (flow cytometry, Becton Dickinson, San Jose CA, USA; Exzitationswellenlänge von 488 nm) bestimmt.

Die FACS-Analyse der Fluoreszenzintensitäten in willkürlichen Einheiten wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) zur Identifizierung der Zellpopulation und anschließender Erstellung eines Punkthistogramms (FSc vs. SSc), Fluoreszenzkanal 2 (FL2, Emission-Wellenlänge von 585±21 nm) zur Bestimmung der intrazellulären Aufnahme von Hypericin sowie Fluoreszenzkanal 3 (FL3, Emissions-Wellenlänge von > 670 nm) schließlich zur Bestimmung der Zellvitalität (in Prozent).

Die nachfolgende Analyse der generierten Werte erfolgte mittels des Programms CellQuest™ software (Version 4.0.2, Becton Dickinson).

Für sämtliche Versuchsreihen wurden mindestens vier voneinander unabhängige Experimente mit Doppelbestimmungen durchgeführt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die mittlere Fluoreszenzintensität von 25 000 gemessenen Zellen.

### **2.4.3 Auswertung der Versuche zur Fluoreszenzmikroskopie**

Zur Bestimmung der intrazellulären Verteilung von Hypericin und den Organellenmarkern Rhodamin 123 und Akridin-Orange wurden zwei verschiedene fluoreszenz-mikroskopische Techniken angewendet:

**(1) Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie** (Lichtquelle: high pressure mercury lamp (HBO 50, Carl Zeiss)) in Kombination mit geeigneten Filtern (Bandpass-Filter, 510-560 nm für Hypericin und Akridin-Orange sowie 450 - 490

nm für Hypericin und Rhodamin 123) und dichroische Spiegel (580 nm für Hypericin und Akridin-Orange und 510 nm für Rhodamin 123) wurden eingesetzt, um die Distribution von Hypericin und den Organellen-Markern innerhalb der gesamten Zelle untersuchen zu können (sogenannte Epi-Illumination).

**(2) Interne Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskopie** (TIRFM, Lichtquelle: pulsed Laser-Diode (LDH C470 mit Treiber PDL 800-B, Picoquant, Berlin, Deutschland; Wellenlänge: 470 nm, Repetitionsrate: 40 MHz, durchschnittliche Leistung: 1.2 mW), mittels einer Einzelfaser an das Fluoreszenz-Mikroskop adaptiert (Point Source, Southampton, UK) wurde benutzt, um die Lokalisation von Hypericin innerhalb der Plasmamembran der Glioblastomzellen demonstrieren zu können (sogenannte TIR-Illumination). Eine detaillierte Beschreibung letzterer Methodik ist unter 2.6.3 gegeben.

Zur Detektion der Fluoreszenz wurde bei allen untersuchten Zellen eine sogenannte EMCCD Kamera (mit Peltier cooling, Sensitivität geringer  $10^{-17}$  W/Pixel; DV887DC-BV, ANDOR Technology, Belfast, UK) in Kombination mit passenden Langpass-Filtern ( $> 590$  nm für Hypericin und Acridin-Orange,  $> 520$  nm für Rhodamin 123) eingesetzt.

## 2.5 Statistische Analysen

Sämtliche Messwerte der einzelnen Experimente wurden statistisch ausgewertet.

Für die Experimente zur konzentrationsabhängigen Aufnahme von Hypericin in die Zellen der Glioblastomzelllinie U373 MG wurde ein nicht lineares Modell mit 4 Parametern mithilfe der Methode der kleinsten Quadranten (nonlinear least square estimation – Modell mit vier Parametern) erstellt.

Die zeitabhängige Aufnahmekinetik wurde über ein Kompartiment-Modell ebenfalls mit vier Parametern charakterisiert.

Für die Versuche zur Bestimmung der Phototoxizität wurde schließlich ein Modell mit drei Parametern erstellt.

Für den post-hoc paarweisen Vergleich (post-hoc pair-wise comparison) wurde der Tukey-Kramer HSD Test angewendet. Das Signifikanzniveau lag bei 5%. Für die Erstellung aller statistischen Analysen wurde das Statistik-Programm statistical software package, JMP version 5.1 ([www.JMP.com](http://www.JMP.com)), eingesetzt.

## 2.5.1 Analyse zur intrazellulären Akkumulation von Hypericin

### 2.5.1.1 Konzentrationsabhängige Aufnahmekinetik

Das Verhältnis zwischen der Inkubationskonzentration von Hypericin  $c_i$  und der zellulären Fluoreszenz  $I_F(c_i)$  wurde bestimmt durch ein nicht-lineares Modell mit vier Parametern entsprechend der Gleichung

$$I_F(c_i) = I_0 + \frac{I_{\max} - I_0}{1 + \left(\frac{K_{50}}{c_i}\right)^a} \quad \text{für } c_i > 0 \quad (1)$$

mit einer minimalen Intensität von  $I_0$  [w.E.] (äquivalent zur zellulären Autofluoreszenz), einer maximalen Intensität von  $I_{\max}$  [w.E.], einem  $K_{50}$ -Wert [ $\mu\text{M}$ ] bezogen auf  $c_i$  [ $\mu\text{M}$ ], wobei  $K_{50}$  die Hälfte der maximalen Fluoreszenz repräsentiert, sowie dem Anpassungsparameter  $a = 1.68$ .

### 2.5.1.2 Zeitabhängige Aufnahmekinetik

Für eine Inkubationskonzentration von  $2.5 \mu\text{M}$  wurde das Verhältnis zwischen der Inkubationszeit (Hypericin)  $t$  und der zellulären Fluoreszenz  $I_F(t)$  bestimmt.

Die Angleichung der Messdaten erfolgte entsprechend der Gleichung

$$I_F(t) = \frac{\nu}{\alpha} (1 - e^{-\alpha t}) \quad (2)$$

mit den zwei Anpassungsparametern  $\nu$  und  $\alpha$ , welche einmal den Anstieg ( $\nu$ ) und einmal den Abfall ( $\alpha$ ) der Hypericinfluoreszenz beschreiben.

Für Inkubationskonzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  wurde der Zusammenhang zwischen der Inkubationszeit von Hypericin und der zellulären Fluoreszenz  $I_F(t)$  über ein Kompartiment-Modell mit vier verschiedenen Parametern analysiert. Hierfür wurden folgende Formeln erstellt

$$I_F(t) = I_{\max} (1 - e^{-\gamma t}), \quad \text{für } t < t_{\max} \quad (3)$$

und

$$I_F(t) = I_{\infty} + (I_{\max} (1 - e^{-\gamma t_{\max}}) - I_{\max}) e^{-\alpha(t-t_{\max})} \quad \text{für } t \geq t_{\max} \quad (4)$$

mit einer maximalen Intensität von  $I_{\max}$  [w.E.], erreicht bei einer Inkubationszeit  $t_{\max}$  [h], und mit  $I_{\infty}$  [w.E.], entsprechend der Intensität bei einer unendlichen Inkubationszeit  $t_{\infty}$  von Hypericin. Parameter  $\gamma$  beschreibt die Aufnahme von Hypericin in die Zellen (bei kurzen Inkubationszeiten), Parameter  $\alpha$  beschreibt die zelluläre Wiederabgabe der Substanz in das Medium (bei längeren Inkubationszeiten).

### 2.5.2 Analyse zur Phototoxizität von Hypericin

Die Phototoxizität im Sinne der Relation von Zellüberlebensrate und Energiedosen wurde mit folgendem Modell

$$SF = \frac{100}{1 + \left( \frac{E}{ID_{50}} \right)^{c_i}} \quad (5)$$

bestimmt. Dabei stellt  $SF$  die Überlebensfraktion in Prozent der Kontrolle dar,  $E$  [ $\text{J}/\text{cm}^2$ ] steht für die Energiedichte,  $ID_{50}$  [ $\text{J}/\text{cm}^2$ ] für eine Inaktivierungsdosis von 50% der vitalen Zellen und  $c_i$  [ $\mu\text{M}$ ] schließlich für die Inkubationskonzentration von Hypericin.

### 2.6 Darstellung der für die Auswertung benötigten Methoden

Im Folgenden sollen die für die Versuchsauswertungen benötigten Methoden und Techniken ausführlich beschrieben werden.

#### 2.6.1 Laser [172]

Erfolgt der Übergang eines Elektrons oder eines Schwingungsmodus von einem energiereichen zu einem energieärmeren Zustand, so entsteht Licht. Die Energiedifferenz wird hierbei in Form eines Photons abgegeben. Bei diesem Vorgang handelt es sich bei herkömmlichen Lichtquellen um eine spontane Emission, was wiederum bedeutet, dass die Richtung einerseits und der Zeitpunkt andererseits bei Abgabe des Photons zufällig sind.

Der Begriff Laser steht für "Light amplification by stimulated emission of radiation" (Lichtverstärkung durch stimulierte Strahlenausendung). Gordon Gould prägte diesen Begriff im Jahre 1957.

Bei der Erzeugung von Laser-Licht liegt der Schwerpunkt jedoch auf der stimulierten Emission. Dies bedeutet, dass der oben genannte Übergang von einem höheren in einen niedrigeren energetischen Zustand durch ein Lichtteilchen angeregt wird, wobei ein weiteres Lichtteilchen entsteht. In Phase, Frequenz, Polarisation und Ausbreitungsrichtung ist letzteres mit ersterem identisch. Somit kann man bei diesem Vorgang vom Prinzip der Lichtverstärkung sprechen.

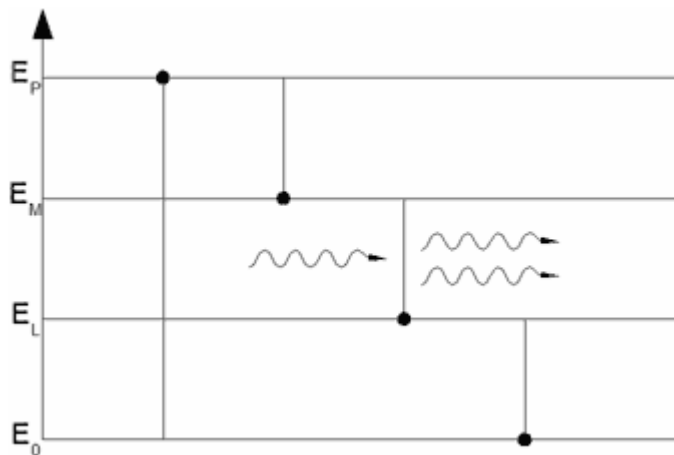


Abbildung 18: Stimulierte Emission - Lasing

Diese sogenannten energetisch angeregten Zustände in einem aktiven Medium (wie beispielsweise ein Gas, Halbleiter, ein Festkörper oder aber ein Farbstoff) sind für die Stimulation der Emission unabdingbar.

Die Abstimmung des Laserlichts auf das Absorptionsmaximum eines Fluoreszenzmarkers oder Photosensibilisators lässt sich genau abstimmen.

Damit eine Lasertätigkeit gewährleistet werden kann, muss der sich im aktiven Medium befindliche, angeregte Zustand stärker besetzt sein als der Grundzustand.

Dies bedeutet, dass mehr Zustände in einem höheren Niveau vorliegen müssen als in niedrigem, so dass aufgrund der Besetzung die Wahrscheinlichkeit für die stimulierte Emission höher ist als für die Absorption. Nur so ist eine Lichtverstärkung zu erreichen. Dieser Zustand wird auch als Besetzungsinversion bezeichnet und entsteht durch externe Zufuhr von Energie



(Vorgang des Pumpens) mittels verschiedenen Techniken wie elektrischem Strom, Gasentladung oder Blitzlampe.

Zum Erhalt eines optischen Resonators ist das aktive Medium von zwei Flächen umgeben, die sich spiegeln.

**Laserresonatoren** werden bei fast allen Lasergeräten verwendet um das optisch aktive Medium (Verstärkungsmedium) nicht über einen weit gestreckten Bereich ausdehnen zu müssen. Somit kann die Pumpeffizienz erhöht werden.

Aufgrund der entstehenden Reflexion mittels der Spiegel wird das aktive Medium mehrmals von Licht durchlaufen und es kommt somit zu einer Verstärkung der stimulierten Emission.

Ist die Lichtverstärkung im aktiven Medium größer als die im Laserresonator entstehenden Verluste, so setzt Lasertätigkeit ein. Hierbei spricht man von der sogenannten Laserschallwelle.

Der so entstehende Laserstrahl zeichnet sich durch Monochromatie, Kohärenz (Phasenkonstanz) sowie Parallelität (minimale Divergenz) aus.

Die Wellenlänge der Laseremission ist durch das Emissionsspektrum des aktiven Mediums determiniert. Durch einen Applikator, der sich am Ende des Laserleiters befindet, wird das austretende Licht möglichst homogen auf den zu bestrahlenden Bereich gestreut.

### **2.6.1.1 Farbstofflaser (Dye laser)**

Im Jahre 1966 beobachteten Sorokin und Lankard [173], dass bei Bestrahlung durch einen Rubinlaser Laseraktivität entstand. Diese Entdeckung erfolgte zufällig bei der Untersuchung von Fluoreszenz an organischen Farbstoff. So inspiriert setzten sie diesen Effekt in die Konstruktion des ersten Farbstofflasers um.

Das aktive Medium besteht bei diesem Lasertyp aus einem organischen Farbstoff in alkoholischer Lösung (meist Methanol, Ethanol). Beispiele für Farbstoffe sind Stilben, Rhodamin und Cumarin für unterschiedliche Wellenlängen.

Farbstofflaser werden in der Regel durch andere Laser gepumpt. Somit besteht das Prinzip des Lasersystems aus zwei verschiedenen Lasern, einerseits dem Pumplaser, welcher für die Inversion im Farbstoff verantwortlich ist, und andererseits dem Farbstofflaser selbst.

Pumplaser sind entweder ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser (532 nm), ein Argon-Laser (488 nm, 514 nm) oder aber ein Kupferdampf-Laser (511 nm, 578 nm).

Der endliche Wirkungsgrad des Farbstofflasers hat den Vorteil, dass verschiedene Wellenlängen erzeugt werden können. Durch diese breite, kontinuierliche Abstimmbarkeit der Lichtemission kann beispielsweise unter Verwendung des Farbstoffes Rhodamin ein Abstimmbereich von 570-670 nm erreicht werden. Dieses Lasersystem wird bevorzugt in der PDT eingesetzt.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde der sogenannte "continuous wave broadband dye Laser, Modell 375, Spectra Physics, Mountain View, USA" verwendet.

### **2.6.1.2 Argon-Laser**

Der Argon-Laser wurde im Jahre 1964 von William Bridges erfunden und zählt zur Gruppe der Ionenlaser, bei welchen Argongas als aktives Medium verwendet wird.

Zwar entstehen nach Anregung dieses Gases mehrere Emissionslinien im blaugrünen Spektralbereich, jedoch wird die optische Ausgangsleistung vor allem durch die Linien bei 488 nm und 514 nm gewährleistet.

Größtenteils wird diese Art von Laser lediglich als Pumphlichtquelle für den oben beschriebenen Farbstofflaser verwendet, jedoch findet der Argonlaser ebenfalls Anwendungen in medizinischen Disziplinen wie beispielsweise der Allgemein Chirurgie und ophthalmologischen Chirurgie.

Für die durchgeführten Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurde folgender Typus eingesetzt: „high power ion Laser, Modell 2030, Spectra Physics; Mountain View, USA“.

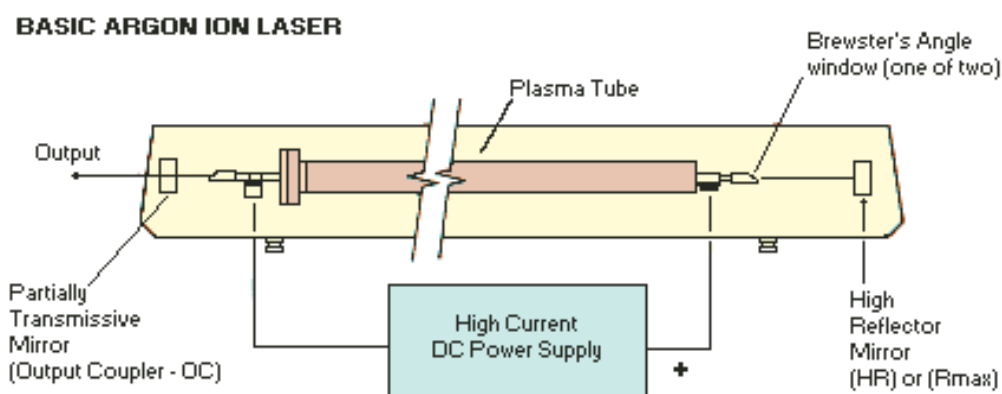


Abbildung 19: Argon-Ionen-Laser

### 2.6.1.3 Anwendungsgebiete

Die Kombination von Argon- und Dylaser wurde bereits in einigen Fachdisziplinen mit unterschiedlichen Photosensibilisatoren angewendet. Folgende Tabelle [172] soll hierzu eine kurze Übersicht geben:

Fachgebiet	Emission [nm]	Sensibilisator	Intensität [mW/cm <sup>2</sup> ]	Dosis [J/cm <sup>2</sup> ]	Behandlung Von	Literatur
Dermatologie	630	Foscan ®	100	5-20	Hauttumore, Hals und Nacken	174
Gastro-Enterologie	630	HpD	200	150	Ösophagus-Carcinome Kolon-Ca	175
	630	Photophrin ®	400	100-250		176
Gynäkologie	630	HpD	400	200	Neoplastische Erkrankungen	177
HNO	630	Foscan ®	100	50-100	Maligne erkrankungen der Mundhöhle und des Pharynx	178
Neurochirurgie	630	HpD	k.A.	240	Hirntumore	179
Urologie	630	Photophrin ®	k.A.	15	Blasen-Ca Oberflächliches Blasen-Ca	180
	635	5-ALA	k.A.	20		181

Tabelle 6: Anwendung der PDT in unterschiedlichen Fachdisziplinen mittels der Kombination von Argon- und Farbstofflaser (Dylaser)

## 2.6.2 Durchflusszytometrie (FACS)

### 2.6.2.1 Prinzip

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

Die Zellsuspension wird zunächst über eine Kapillare angesaugt und beschleunigt. Durch den Geschwindigkeitsgradient werden die Zellen vereinzelt, somit passieren die Zellen separat in konstantem Fluss den Laserstrahl. Dabei emittiert die Zelle abhängig von Zellgröße, Zellwandstruktur und intrazellulären Bestandteilen Streulicht [182]. Durch dieses Prinzip lassen sich unterschiedliche Eigenschaften der Zelle ableiten, und die Zellen können somit in unterschiedliche Fraktionen separiert werden.

Die Streuung des Lichtes erfolgt in zwei verschiedene Richtungen, welche als Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) detektiert werden können, wobei FCS Aufschluss über die Zellgröße, SSC über die Granularität der Zelle gibt.

Über Fluoreszenzkanäle können außerdem angeregte Fluoreszenzfarbstoffe erfasst werden. Diese Fluoreszenz kann sowohl durch zelleigene Proteine, markierte Antikörper, als auch durch angefärbte Zellbestandteile hervorgerufen werden. Auch aufgrund dieser zusätzlichen Eigenschaft kann eine Separation der Zellen erfolgen.

Das für die einzelnen Experimente zur Verfügung stehende Durchflusszytometer FACSSort (Becton Dickinson, San Jose CA, USA) regt mit einem Argon-Ionen-Laser (Excitation = 488 nm, 15 mW) an.

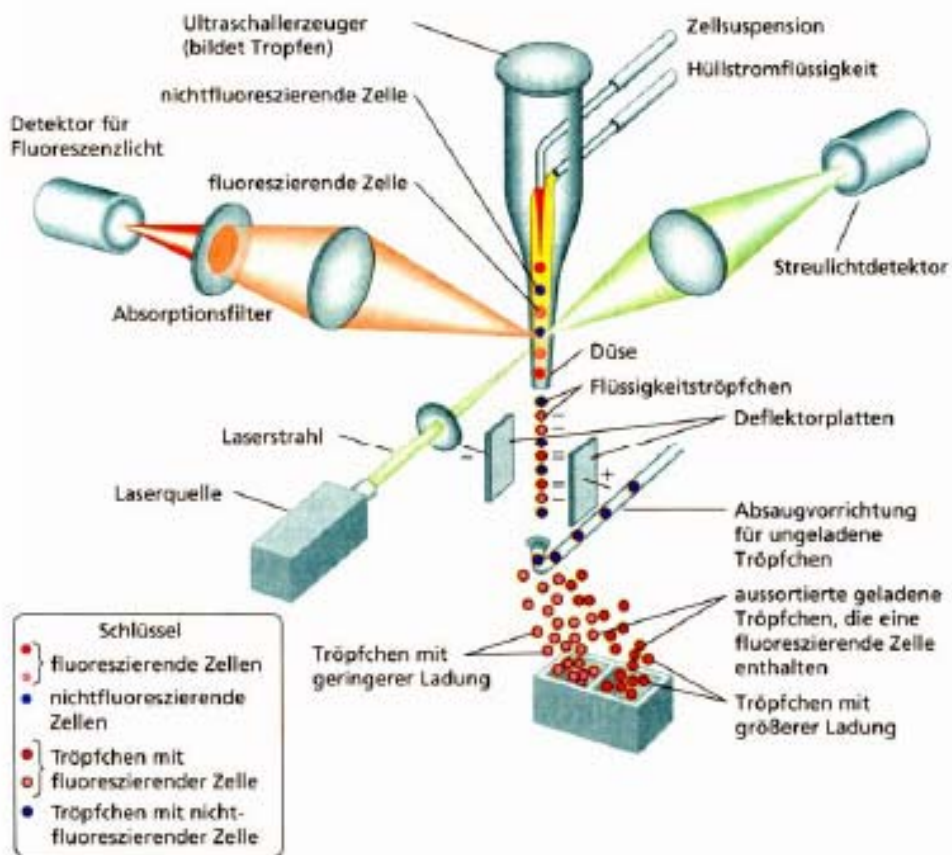


Abbildung 20: Darstellung eines fluoreszenzaktivierten Zellsorters (FACS)

### 2.6.2.2 Lichtdetektion

Passieren die Zellen den Laserstrahl, wird ein Teil des Anregungslichts in zwei Richtungen gestreut. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter light, FSC,  $488 \pm 5$  nm) wird in Richtung ( $1,5-10^\circ$ ) des Laserstrahls von einem Festkörpersiliziumdetektor, und das Seitwärtsstreulicht (side scatter light, SSC,  $488 \pm 5$  nm) wird senkrecht ( $90^\circ$ ) zum Laserstrahl vom einem Photomultiplier erfasst und verstärkt.

Das Fluoreszenzsignal wird ebenfalls in der  $90^\circ$ -Richtung detektiert. Über dichroitische Spiegel und Strahlenteiler wird dieses Signal vom SSC separiert und weiter aufgespaltet. Das Signal wird im folgenden an den drei

Fluoreszenzkanälen (FL) erfasst und mittels einem gekoppelten Photomultiplier verstärkt.

Die erfassten Parameter (SSC, FSC, FL1-3) werden anschließend an einen Computer übermittelt und über eine geeignete Software ausgewertet [183].

### 2.6.2.3 Fluoreszenzkanäle

Fluoreszenz 1 (FL1): 530 +/- 15 nm Bandpass

Fluoreszenz 2 (FL2): 585 +/- 21 nm Bandpass

Fluoreszenz 3 (FL3): 670 nm Langpass

### 2.6.2.4 Geräteparameter

Pro Messung wurden  $2 \times 10^5$  Events erfasst. Die Durchgangsgeschwindigkeit der Suspension wurde auf die höchste Stufe (hight =  $6 \mu\text{l}/\text{min}$ ) eingestellt.

Folgende Geräteparameter wurden für die Messungen verwendet:

Kanal	Verstärkung/Voltage	Modus
FSC	E- 01	Linear
SSC	258 V	Linear
FL 1	150 V	Linear
FL 2	350 V	Logarithmisch
FL 3	412 V	Logarithmisch

Tabelle 7: Geräteparameter des Durchflusszytometers

### 2.6.2.5 Auswertung der im FACS generierten Messdaten

Die anschließende FACS-Analyse der Fluoreszenzintensitäten wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC), FL2 (585 nm) sowie FL3 (670 nm). Für die Identifizierung der Zellpopulation wurde ein Punkthistogramm erstellt. Hierbei wurde das SSC Signal (Granularität) gegen FSC (Zellgröße) aufgetragen. FL2 diente als Parameter für die Hypericinaufnahme in die Zelle.

Der Anteil an toten Zellen innerhalb der Gesamtpopulation wurde über die Zugabe von 10 µl (100 µg/µl) Propidiumiodid zu den in 500 µl PBS resuspendierten Zellen ermittelt. Somit wurde schließlich indirekt die Anzahl der vitalen Zellen in Prozent über die FL3 bestimmt. Ein Leerwert wurde generiert, indem unbehandelte, nicht mit Hypericin inkubierte Kontrollen mit Propidiumiodid versehen und im FACS gemessen worden waren.

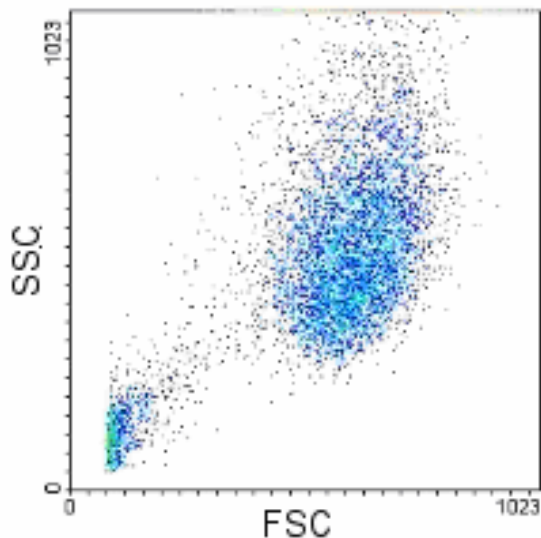


Abbildung 21: Punkthistogramm (Dot plot) zur Identifizierung der Zellpopulation. Hierbei wurde auf der x-Achse die Zellgröße (FCS-Signal) und auf der y-Achse die Granularität (SSC Signal) aufgetragen. Die größere Zellpopulation stellt die vitalen Zellen dar, die kleinere Population links die mit Propidiumiodid markierten avitalen Zelltrümmer.

Mittels der Software CellQuest (BD CellQuest™ Software Version 4.0.2., Beckton Dickinson, Deutschland) wurde ein gate (Region) über den Bereich

gelegt, in welchem sich die zu messenden Glioblastomzellpopulation akkumulierte. Events außerhalb dieses Bereiches wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt, da es sich hierbei um Zelltrümmer wie etwa Zellorganellen handelt. Bei der Messung wurden zwar alle events gezählt, bei der Auswertung jedoch letztendlich nur die sich im gesetzten gate befindlichen Zellen berücksichtigt.

Zur Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (in willkürlichen Einheiten) erfolgte die Erstellung eines Histogramms, bei welchem die events gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen wurden.

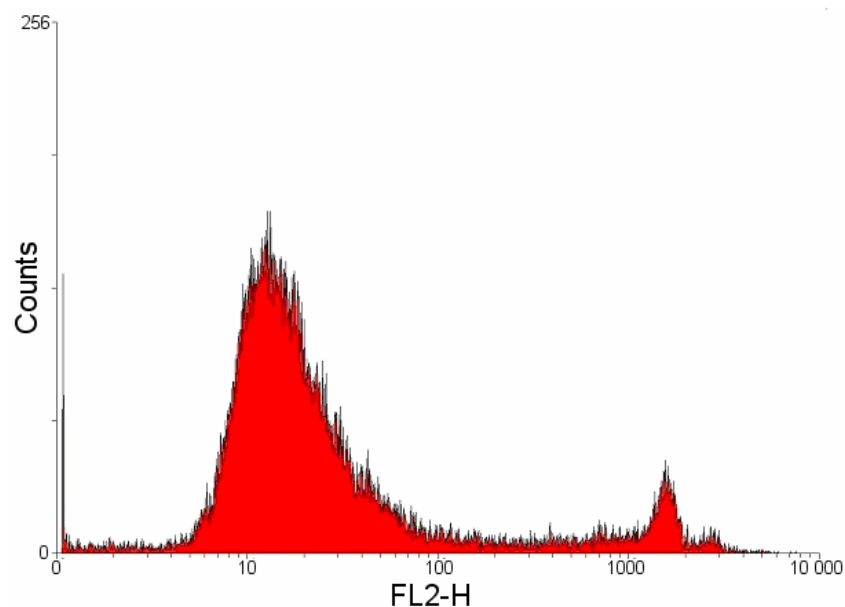


Abbildung 22: Histogramm zur Ermittlung der Fluoreszenzintensität

Die Erstellung dieses Histogrammes dient zur Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (in willkürlichen Einheiten). Hierbei wurden die events der FL-2 (Parameter für Hypericinaufnahme in Zelle) auf der y-Achse gegen die Fluoreszenzintensität (in willkürlichen Einheiten) auf der x-Achse aufgetragen.

### 2.6.3 Mikroskopie

Die Auflichtfluoreszenzmikroskopie (Epifluoreszenzmikroskopie) hat innerhalb der Fluoreszenzdiagnostik einen großen Stellenwert und ist für die in-vitro-Diagnostik unerlässlich. Prozesse auf zellulärer Ebene sind jedoch von



komplexen Interaktionen diverser Moleküle und zellulärer Komponenten geprägt. Da sich diese Abläufe im Bereich von Nanometern abspielen, sind diese durch die herkömmliche Lichtmikroskopie im Sinne einer Epi-Fluoreszenzmikroskopie bei einer optischen Auflösung von ungefähr 200 nm kaum mehr darstellbar. Mit der internen Totalreflektions-Fluoreszenz-Mikroskopie (TIRFM) wurde ein Verfahren entwickelt, mit welchem sich derartige zelluläre Mechanismen bis in die kleinsten Größenordnungen sichtbar machen lassen. Diese sei im Folgenden beschrieben.

### **2.6.3.1 Interne Totalreflektions-Fluoreszenz-Mikroskopie (TIRFM)**

Bei der internen Totalreflektions-Fluoreszenz-Mikroskopie (TIRFM – Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) handelt es sich um eine Methode, welche abstandsabhängig ist. Die Entstehung einer Totalreflektion lässt sich folgendermaßen erklären: Licht fällt beim Durchdringen eines Mediums in einem über dem Grenzwert liegenden Winkel auf die Trenn-Fläche zwischen einem Medium, welches einen grossen Brechungsindex aufweist und einem Medium, welches einen niedrigeren Brechungsindex aufweist, ein. Nichtsdestotrotz wird nicht das gesamte Licht reflektiert. Ein kleiner Anteil davon fällt nämlich in dasjenige Medium mit dem niedrigeren Brechungswinkel ein. Dies wird als eine elektromagnetische Welle oder als eine sogenannte evaneszente Welle bezeichnet. Mit abnehmender Intensität dieser Welle ändert sich auch die Eindringtiefe – und zwar exponentiell. Abhängig ist diese Eindringtiefe einerseits von der Wellenlänge des Lichts, andererseits von dem Einfallswinkel sowie schließlich auch von dem jeweiligen Brechungs-Index der Medien. Im Durchschnitt liegt sie in z – Richtung (senkrecht) unter 200 nm. Die TIRFM ermöglicht eine selektive Exzitation von Fluorophoren (in Probe) bis zu circa 100 nm. Eine solche Auflösung in z – Richtung entspricht ungefähr einem Fünftel der vertikalen Auflösung, welche mit einem herkömmlichen konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gewonnen werden kann. Die TIRFM ist somit ideal für Experimente und Beobachtungen an der Zellmembran, der extrazellulären Matrix, am Zytoskelett sowie insgesamt an zellulären Bewegungsabläufen und

Transportmechanismen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der TIRFM für eine exaktere Detektion von Hypericin innerhalb der Plasmamembran eingesetzt. Hierbei wird die Fluoreszenz durch ein evaneszentes elektromagnetisches Feld angeregt, ansteigend bis zur totalen internen Reflexion des angeregten Laserlichts an der Grenzfläche des Zellsubstrats. Die Eindringtiefe  $d(\theta, \lambda)$  beträgt ungefähr 100 nm. Abhängig vom Einfallswinkel  $\theta$  und der Wellenlänge des Anregungslichts  $\lambda$  liegt die Eindringtiefe in Bereichen zwischen 70 nm und 250 nm. Hierdurch wird eine nahezu selektive Begutachtung der Plasmamembran ermöglicht, wobei angrenzende zelluläre Strukturen kaum mit einbezogen werden. Die mit einem variablen Winkel ausgestattete Vorrichtung der TIRFM wurde kürzlich von Stock et al. bereits detailliert beschrieben [184].

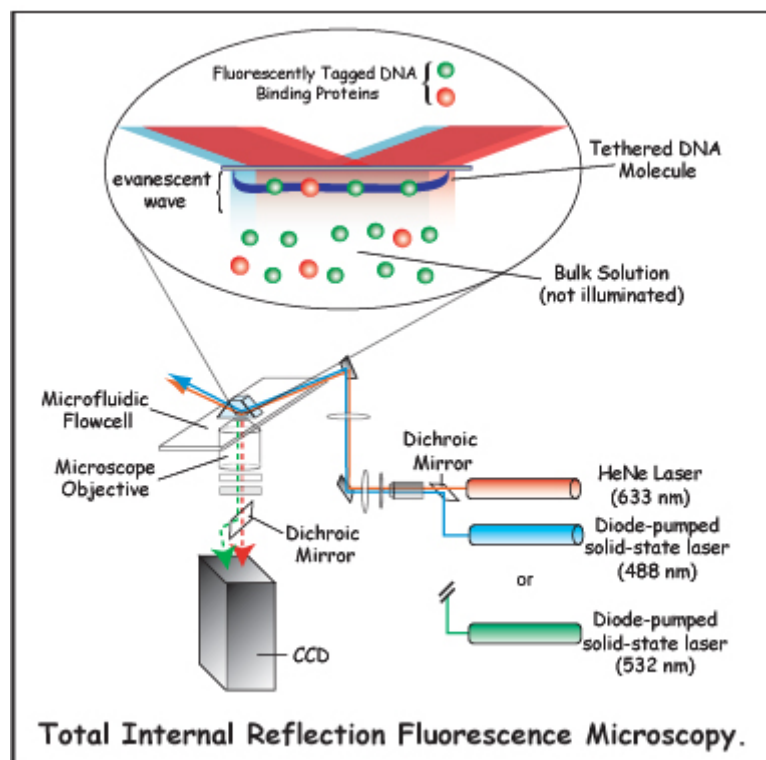


Abbildung 23: Interne Totalreflexions-Fluoreszenz-Mikroskopie und das Prinzip der evaneszenten Illumination

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Wachstumskurven der Glioblastomzelllinien

Zur Beobachtung des Wachstumsverhaltens der Zellen wurden über 5 Tage Wachstumskurven der drei Zelllinien U373, T98G und LN229 erstellt, um somit den zeitlichen Versuchsablauf planen zu können und den optimalen Zeitpunkt für die Versuchsdurchführung nach Aussaat der Zellen zu bestimmen.

In drei voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweiliger Doppelbestimmung wurden hierfür Wachstumskurven erstellt. Tabelle 8 zeigt die bei diesen Versuchsreihen gewonnenen Messwerte, welche mittels Median-Bildung gebildet wurden. Wie in Tabelle 8 ersichtlich zeigten alle drei Zelllinien ein ähnliches Wachstumsverhalten. Dieses sowie der zeitliche Versuchsablauf sind in Abbildung 24 für eine der drei Zelllinien exemplarisch dargestellt.

Bei der Darstellung der zeitlichen Verlaufskurve wurde zur Bestimmung des Fehlerquotienten der MAD (median absolute deviation; Median der absoluten Abweichung des Medians) jedes Wertes in Bezug zum Median errechnet und hiervon wiederum der Median gebildet. Der Median des MAD ist in Abbildung 24 als Balken parallel zur y-Achse zu aufgetragen.

[h]	Zellen / mm <sup>2</sup>					
	LN229		T98G		U373 MG	
	Median	MAD	Median	MAD	Median	MAD
0	150	n.b.	150	n.b.	150	n.b.
24	164	13	158	4	173	14
48	345	57	348	18	393	61
72	896	85	877	63	968	110
96	1392	96	1562	162	1574	201

Tabelle 8: Messwerte zu Wachstumskurven aller drei Zelllinien.

n.b. = nicht bestimmt

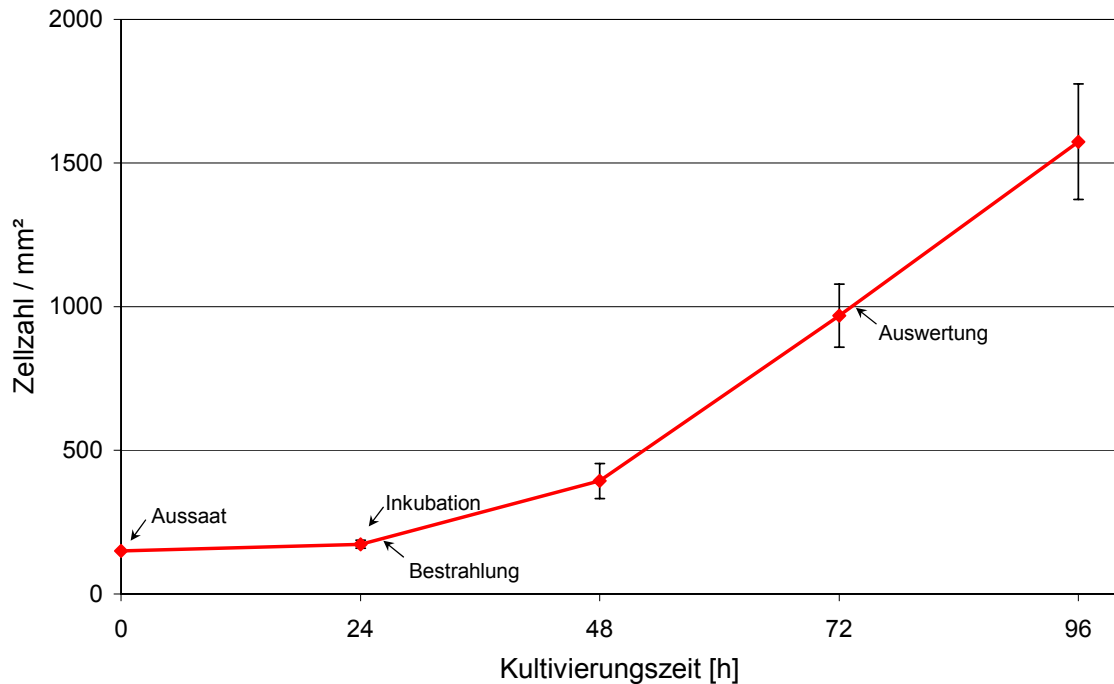


Abbildung 24: Wachstumskurve. Dieses Schaubild zeigt beispielhaft anhand der Zelllinie U373 MG den zeitabhängigen Wachstumsverlauf der Zellen. In den Kurvenverlauf eingezeichnet ist der Ablauf der Experimente für die Bestimmung der Phototoxizität.

### 3.2 Zytotoxizität von Hypericin

Zur weiteren Planung und Durchführung der Experimente zur Phototoxizität war es von Bedeutung, vorab die Zytotoxizität (Dunkeltoxizität) von Hypericin zu bestimmen.

Tabelle 9 zeigt die Überlebensrate der mit unterschiedlichen Hypericin-konzentrationen inkubierten Zellen für alle drei Glioblastomzelllinien. Die unter Anwendung des Neutralrot-Assays und photometrischer Messungen generierten Extinktionswerte wurden in Bezug zur Kontrollprobe (100%) in Prozent umgerechnet, um so ein Bewertungskriterium für die Zellvitalität zu erhalten. Es wurden wiederum drei voneinander unabhängige Experimente mit Vierfachbestimmungen durchgeführt.

Beim Vergleich der verschiedenen Ansätze der Inkubationslösung (siehe Kapitel 2.3.1) ließ sich kein messbarer Unterschied zwischen den beiden

Inkubationsprotokollen nachweisen. Aufgrund der stark lipophilen Eigenschaften von Hypericin wurde für alle weiteren Versuche dennoch das exaktere Verfahren, nämlich die Substanz vor Zugabe ins Medium zunächst in FCS zu lösen, umgesetzt.

Konz [µM]	Vitale Zellen [% der Kontrolle]							
	LN229		T98G		U373		U373 MG <sup>1)</sup>	
	Median	MAD	Median	MAD	Median	MAD	Median	MAD
0,0	100	1,5	100	1,9	100	0,8	100	2,2
0,5	99,4	3,7	95,9	2,6	99,6	3,9	101,9	6,1
1,0	98,9	6,9	93,9	4,1	96,0	4,1	99,1	8,1
2,5	101,5	3,2	99,2	2,1	97,6	5,1	99,1	4,9
5,0	99,9	1,8	95,8	5,9	93,7	3,4	94,8	7,9
10,0	93,5	4,1	91,3	6,2	87,5	3,3	94,6	5,5

Tabelle 9: Zytotoxizität. In dieser Tabelle ist für alle drei Zelllinien die Vitalität der Zellen in Prozent nach 2-stündiger Inkubationszeit mit unterschiedlichen Hypericin-konzentrationen veranschaulicht.

<sup>1)</sup> Hypericin wurde direkt ins Medium pipettiert

Für die Bestimmung der Zytotoxizität von Hypericin wurden die humanen Glioblastomzelllinien U373 MG, LN229 und T98G Zelllinien für jeweils 2 und 24 Stunden mit unterschiedlichen Hypericinkonzentrationen inkubiert. Die Zellvitalität wurde nach 48 Stunden Inkubationszeit mittels der Neutralrot-Methode und anschließender photometrischer Auswertung bestimmt (siehe 2.4.1 Kapitel Material und Methoden). Als Bewertungskriterium für Vitalität galten mehr als 95% vitale Zellen, errechnet in Relation zu nicht inkubierten Kontrollproben. Das Vorhandensein von mehr als 95% vitalen Zellen bedeutete somit das Fehlen eines zytotoxischen Effektes.

Wie in Abbildung 25 (2 h) und Abbildung 26 (24 h) ersichtlich, zeigten sich bis zu einer Inkubationskonzentration von 5 µM Hypericin, sowohl für eine Inkubationszeit von 2 als auch für 24 Stunden, keine durch den Photosensibilisator induzierten zytotoxischen Effekte, wohingegen sich eine schwach

ausgeprägte Zytotoxizität (Zellvitalität größer als 90% in Relation zur Kontrolle) bei entweder ansteigender Inkubationskonzentration bis zu 10  $\mu\text{M}$  oder andererseits verlängerter Inkubationszeit von bis zu 24 Stunden abzeichnete. Somit zeigte sich eine Inkubationskonzentration von 2.5  $\mu\text{M}$  für alle weiteren Experimente als sinnvoll, da hierbei keine Zellschädigungen (unter dunklen Bedingungen) zu erwarten waren.

Für die drei untersuchten Zelllinien ergaben sich unter den untersuchten Inkubationsbedingungen keine wesentlichen Unterschiede.

Lediglich für Zelllinie U373 MG zeigte sich eine geringfügig höhere Zytotoxizität für höhere Inkubationskonzentrationen.

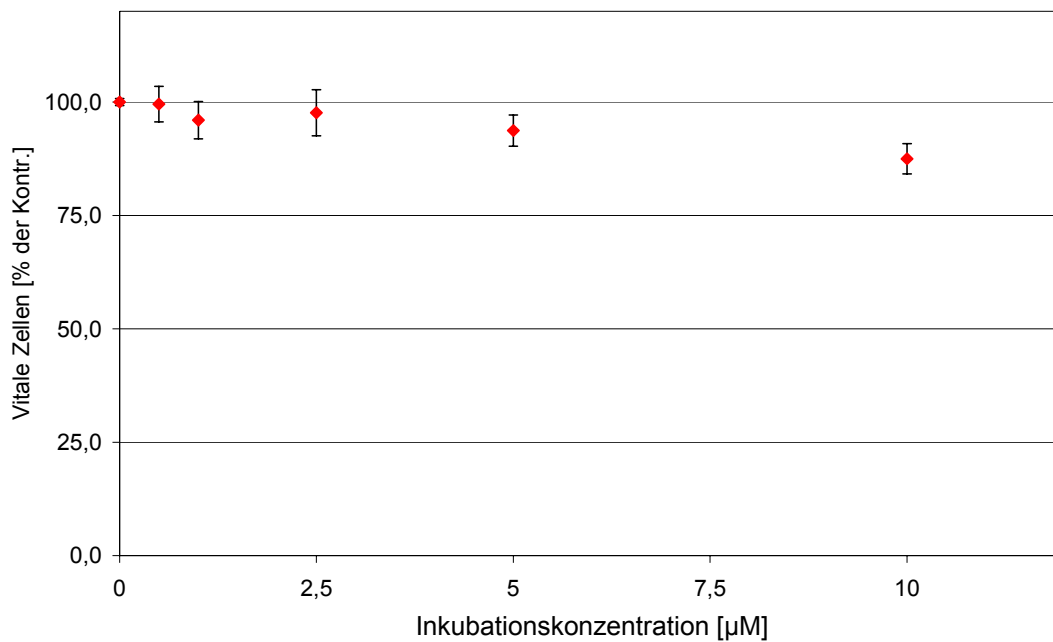


Abbildung 25: Zytotoxizität (2h). Diese Grafik veranschaulicht exemplarisch für die Zelllinie U373MG die Messungen zur Zytotoxizität von Hypericin bei unterschiedlichen Hypericinkonzentrationen. Bis zu einer Inkubationskonzentration von 5  $\mu\text{M}$  zeigten sich keinerlei zellschädlichen Effekte bei einer Inkubationszeit von zwei Stunden.

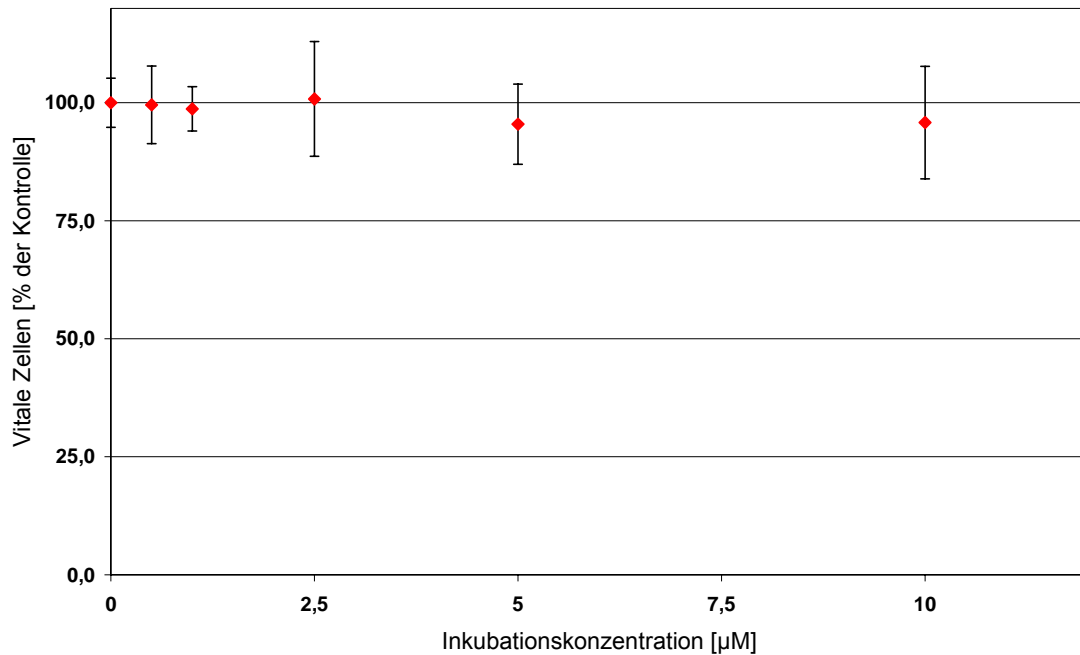


Abbildung 26: Zytotoxizität (24h). Diese Grafik veranschaulicht exemplarisch für Zelllinie U373MG die Messungen zur Zytotoxizität von Hypericin bei unterschiedlichen Hypericinkonzentrationen über einen Inkubationszeitraum von 24 Stunden. Bis zu einer Inkubationskonzentration von 5  $\mu\text{M}$  zeigten sich keinerlei zellschädlichen Effekte bei einer Inkubationszeit von zwei Stunden.

### 3.3 Intrazelluläre Akkumulation von Hypericin

Zur Bestimmung der intrazellulären Akkumulation von Hypericin (sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig) wurde die humane Glioblastomzelllinie U373 MG anhand der Methode der Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei diente die zelluläre Fluoreszenz als eine Methode zur Bestimmung der intrazellulären Hypericinakkumulation. Die Zellen wurden sowohl in Abhängigkeit der Konzentration, als auch der Zeit entweder mit aufsteigenden Hypericinkonzentrationen bis zu 20  $\mu\text{M}$  über 2 Stunden oder mit Hypericinkonzentrationen von jeweils 2,5, 10 oder 20  $\mu\text{M}$  über einen Zeitraum bis zu 24 Stunden inkubiert. Bei jeder Versuchsreihe war die Fraktion der vitalen Zellen innerhalb jeder Probe durchgehend größer als 90%. Die

Bestimmung der vitalen Zellen wurde von den nicht mehr vitalen Zellen mittels Färbung der Proben mit Propidiumiodid abgegrenzt und so die Anzahl der überlebenden Zellfraktion bestimmt. Für kurze Inkubationszeiten von 2 Stunden stieg die zelluläre Fluoreszenz bis zu Inkubationskonzentrationen um 5  $\mu\text{M}$  an, wohingegen keine weitere Zunahme der zellulären Hypericinakkumulation bei höheren Inkubationskonzentrationen zu beobachten war. Konzentrationen größer 5  $\mu\text{M}$  führten somit zur Sättigung im Sinne eines steady states. Die gemessenen Werte, ebenso wie die berechnete Kurve, entsprechend Gleichung 1 (siehe unter 2.5.1.1), sind in Abbildung 27 dargestellt.

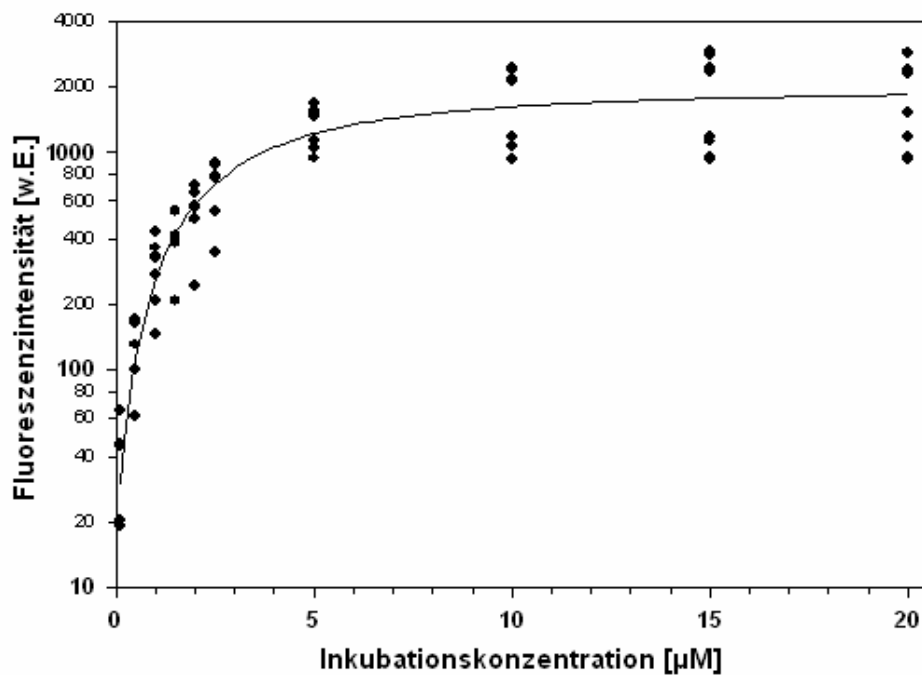


Abbildung 27: Konzentrationsabhängige Aufnahmekinetik von Hypericin in U373MG Glioblastomzellen nach einer Inkubationszeit von 2 h. Die Messung erfolgte mittels FACS-Analyse mit 25 000 counts. Der Kurvenverlauf ist durch Gleichung 1 dargestellt, die Einzelpunkt-Auftragung stellt die mittlere Fluoreszenzintensität über 25 000 Zellen dar, welche mittels FACS-Analyse ermittelt wurden.

Nach Inkubation der Zellen der Zelllinie U373 MG mit einer Hypericin-konzentration von 2.5  $\mu\text{M}$  zeigte sich ein nahezu linearer Anstieg der zellulären Fluoreszenz bis zu einer Inkubationszeit von 6 Stunden. Die Ausweitung des



Inkubationszeitraums bis zu 24 Stunden resultierte in einer weiteren Zunahme der Anreicherung von Hypericin in der Zelle, mit einer Verdopplung der Fluoreszenzintensität. Im Gegensatz hierzu zeigte sich die Kinetik der zellulären Hypericinakkumulation als signifikant verschieden bei höheren Konzentrationen wie etwa 10 und 20  $\mu\text{M}$  Hypericin. Unter beiden Bedingungen erfolgte eine rasche Aufnahme des Photosensibilisators; die höchste intrazelluläre Anreicherung konnte nach einem Inkubationszeitraum von 2 Stunden festgestellt werden. In Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Ergebnissen waren die Fluoreszenzintensitäten für beide Hypericin-konzentrationen nahezu gleich.

Eine Erweiterung des Inkubationszeitraumes bis zu 6 Stunden führte zu einer um circa 20 bis 30% geringeren Fluoreszenz im Vergleich zur maximalen Fluoreszenz. Eine weitere Reduktion der zellulären Fluoreszenz war bei einem Inkubationszeitraum von 24 Stunden zu beobachten, wobei die Fluoreszenzintensität ungefähr in derselben Größenordnung lag wie sie bereits bei einer Inkubationskonzentration von 2.5  $\mu\text{M}$  erreicht worden war. Die gemessenen Werte ebenso wie die berechneten Kurven, entsprechend Gleichung 2 (Inkubation mit 2.5  $\mu\text{M}$  Hypericin), sowie Gleichungen 3 und 4 (Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  Hypericin), siehe unter Absatz 2.5.1.2, sind in Abbildung 28 dargestellt.

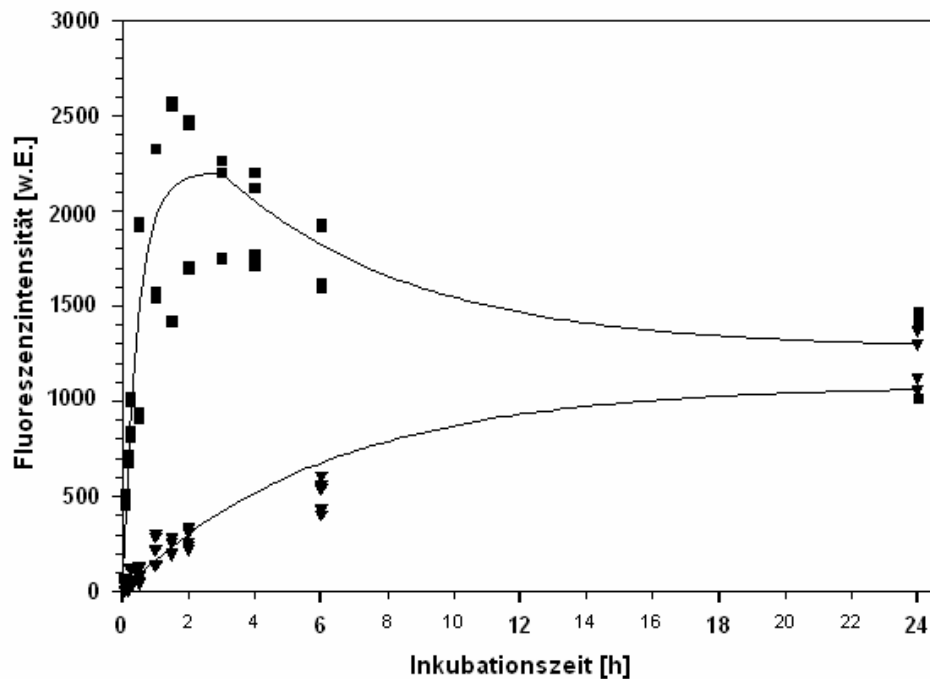


Abbildung 28: Intrazelluläre Aufnahme von Hypericin in Abhängigkeit der Zeit bei einer Inkubations-Konzentration von  $2.5 \mu\text{M}$  ( $\blacktriangledown$ ), entsprechend Gleichung 2, sowie  $20 \mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ ), entsprechend Gleichung 3 und 4. Die Punktauftragung stellt die real mittels FACS-Analyse gemessenen Fluoreszenzintensitäten (Mittelwert, gemittelt über 25 000 Zellen) dar. Der Kurvenverlauf ergibt sich aus den mit Hilfe der Gleichungen 2, 3 und 4 errechneten Werten. Auffallend für die  $20 \mu\text{M}$  ist hier die rasche Aufnahme der Substanz für  $t < T_{\text{max}}$  sowie der nachfolgende geringfügige Abfall der Fluoreszenzintensität bis zum 24-Stunden-Wert.

In Abbildung 29 sind vier beispielhaft ausgewählte Diagramme einer solchen konzentrationsabhängigen Aufnahmekinetik der Glioblastomzelllinie U373 MG zu sehen ( $0.1$ ,  $0.5$ ,  $10 \mu\text{M}$  sowie eine Kontrollprobe). Die Daten wurden mittels der Methode der Durchflusszytometrie gewonnen.

Zur Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (in willkürlichen Einheiten) erfolgte die Erstellung eines Histogramms, bei welchem die events der FL-2 (Parameter für Hypericinaufnahme in Zelle) gegen die Fluoreszenzintensität (in willkürlichen Einheiten) aufgetragen wurden. So beschreibt der erste peak die Hypericinaufnahme bei  $585 \text{ nm}$ , wohingegen der zweite kleinere peak die avitalen Zellen (Zugabe von Propidiumiodid) bei  $670 \text{ nm}$  darstellt.

Das jeweils oben rechts bzw. links zu sehende kleine Diagramm ist ein sogenanntes Punktdiagramm. Hierbei wurde das SSC Signal (Granularität) gegen FSC (Zellgröße) aufgetragen.

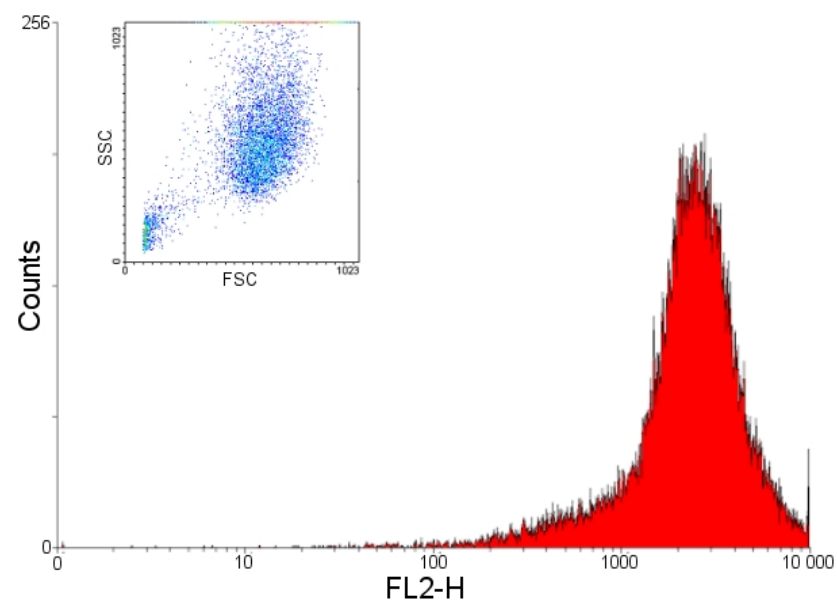
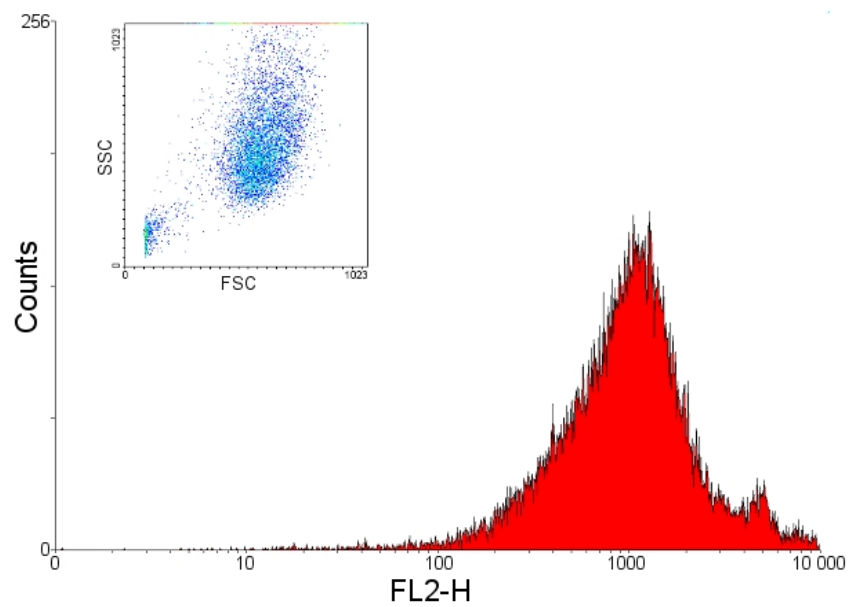
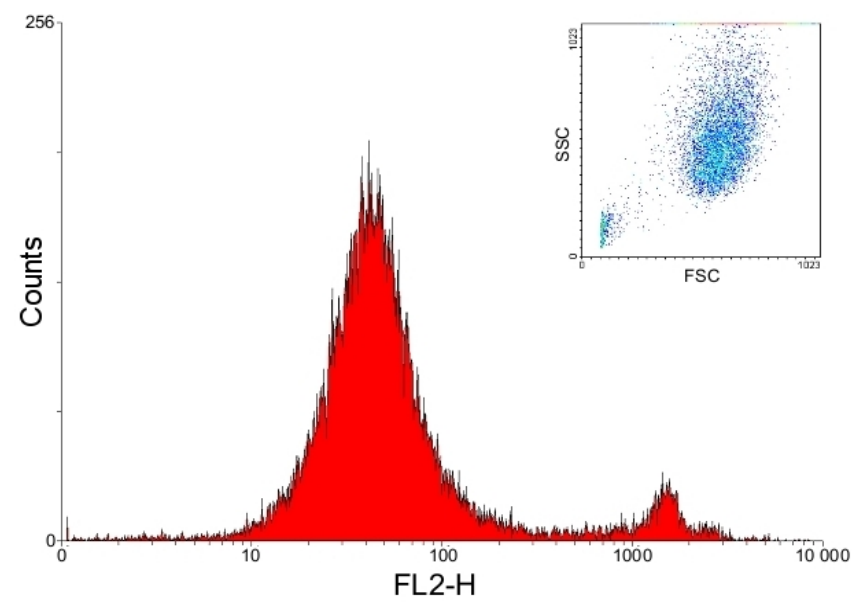
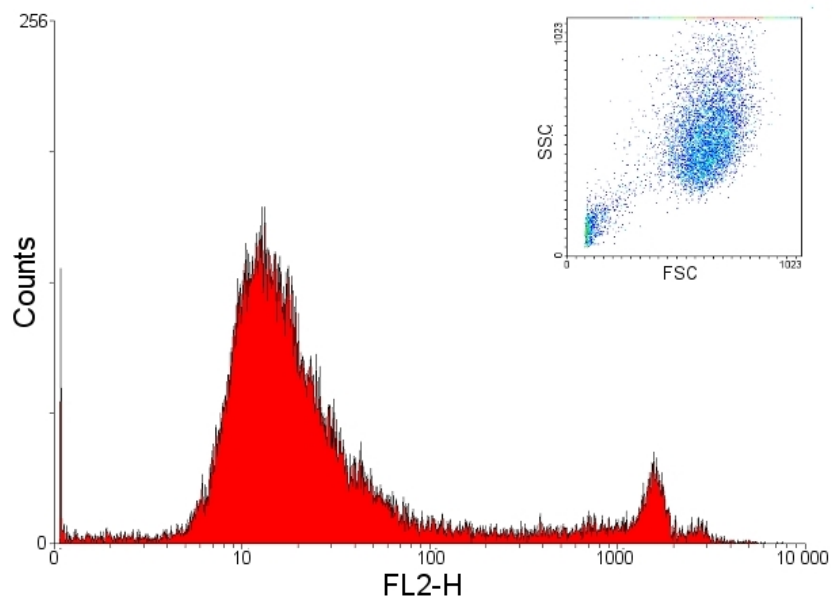


Abbildung 29: Histogramme. FACS-Analyse der Glioblastomzelllinie U373 MG. Zu sehen sind vier beispielhafte Histogramme aus einer Konzentrationsreihe. Das Histogramm oben links stellt die Inkubation der Zellen mit einer Kontrollprobe dar. Die anderen Zellen wurden mit 0.1  $\mu\text{M}$  (oben rechts), 0.5  $\mu\text{M}$  (unten links) sowie 10  $\mu\text{M}$  (unten rechts) Hypericin für 2 Stunden inkubiert. Die in die Histogramme integrierten kleineren Diagramme stellen Punktdiagramme dar.

### 3.4 Zellulärer Transportmechanismus

Zur Evaluation des Transportmechanismus von Hypericin in die Zelle wurden Zellen der Glioblastomzelllinie U373 MG mit 2.5  $\mu\text{M}$  Hypericin für insgesamt 4 Stunden bei unterschiedlichen Temperaturen (sowohl im Kühlschrank bei 4° C, als auch im Brutschrank, bei 37° C) inkubiert, wobei die Zellen, die ursprünglich bei 4° C inkubiert worden waren, unmittelbar nach den ersten 2 Stunden zur weiteren Inkubation für 2 Stunden ebenfalls in den Brutschrank umgelagert wurden.

Somit sollte eine Differenzierung zwischen aktivem, passivem oder aber einem teils aktiven, teils passiven Transportmechanismus erfolgen. Kriterium für den aktiven Transport war die Messung von weniger als 20% fluoreszierenden vitalen Zellen nach zwei-stündiger Inkubationszeit bei 4° C. Beweisend für einen ATP-abhängigen Mechanismus sollte eine erneute Anregung der Aufnahmeaktivität nach weiteren 2 Stunden Inkubation unter warmen Bedingungen und somit gleichzeitig beweisend für die Vitalität der Zellen sein. Im Gegensatz zu den unter warmen Bedingungen inkubierten Zellen war unter einer Inkubationstemperatur von 4° C für 2 Stunden kaum eine intrazelluläre Aufnahme von Hypericin messbar. Nach Umlagerung der Zellen in den 37° C warmen Brutschrank zeigte sich dieses Verhalten innerhalb der zweiten Hälfte der Inkubationszeit jedoch als reversibel und ein rascher Anstieg der zellulären Fluoreszenz war zu verzeichnen. Nach einem Inkubationsintervall von 4 Stunden zeigte sich eine ähnliche hohe Fluoreszenzintensität wie sie bei den über 4 Stunden bei 37° Celsius inkubierten Kontrollen gemessen worden war. Diese Messdaten sind in Abbildung 30 ersichtlich. Da der Zellmetabolismus bei niedrigen Temperaturen stark beeinträchtigt ist, weisen diese Daten eindeutig darauf hin, dass dem Aufnahmemechanismus von Hypericin in die

Glioblastomzellen ein aktiver Transport zugrunde liegt wie zum Beispiel eine rezeptor-vermittelte Endozytose.

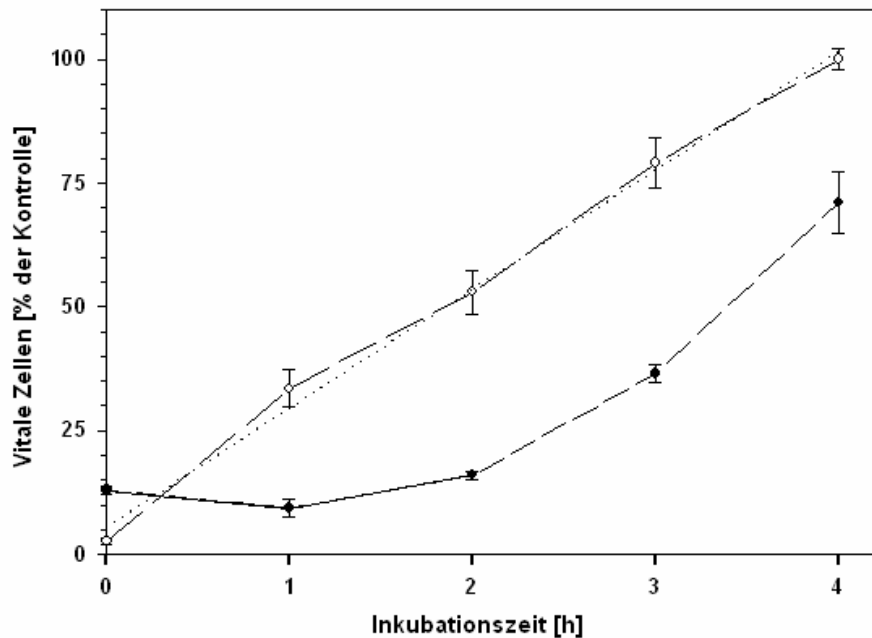


Abbildung 30: Aktiver Aufnahmemechanismus von Hypericin (Durchflusszytometrie). Darstellung des aktiven Transports von Hypericin in die Glioblastomzellen der Zelllinie U373 MG. Die gestrichelte Kurve beschreibt den Verlauf der Aufnahme von 2.5 µM Hypericin in die Zelle über 4 Stunden ( O ), wohingegen die durchgehende Kurve zunächst die Kinetik über zwei Stunden bei 4° Celcius darstellt ( ● ). Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation der Zellen für 2 Stunden im Brutschrank (37° Celcius). Ab dem 120-Minuten-Wert ist ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität zu beobachten (gestrichelte Linie).

### 3.5 Phototoxizität von Hypericin

#### 3.5.1 Phototoxizität von Hypericin U373 MG, T98G und LN229

In der ersten Versuchsreihe wurde die Phototoxizität von Hypericin für alle drei humane Glioblastomzelllinien U373 MG, LN229 und T98G bei einer nicht-zytotoxischen Inkubationskonzentration von 2.5 µM über einen Inkubationszeitraum von jeweils 2 Stunden bestimmt. Die Bestrahlung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm (5 mW/cm<sup>2</sup>) mit unterschiedlichen Energiedichten (0.05 – 0.5 J/cm<sup>2</sup>). Die Bestrahlung der mit Hypericin inkubierten

Zellen resultierte in einer Reduktion der Überlebensrate der Zellen mit  $ID_{50}$ -Werten zwischen 0.15 und 0.22  $J/cm^2$  mit signifikantem Unterschied der Photosensitivität zwischen den Zelllinien U373 MG und T98G (Tukey-Kramer-Test,  $p < 0.05$ , oneway Analyse des  $ID_{50}$ -Wertes in Bezug auf die Zelllinien). Die berechneten  $ID_{50}$ -Werte sind in Tabelle 10 ersichtlich. Die Exposition der Zellen mit einer Energiedosis von 0.4  $J/cm^2$  resultierte in einem Rückgang der Zell-Vitalität von ungefähr einer Größenordnung; die Überlebensrate der Zellen variierte zwischen 9% (U373 MG) und 12 – 13% (LN229 und T98G).

Tabelle 11 stellt eine Übersicht über alle generierten Daten der drei Zelllinien dar.

Die Abbildungen 31 A bis 31 C veranschaulichen die Phototoxizität in Abhängigkeit der Energiedichte bei Bestrahlung.

In Abbildung 32 ist schließlich ein Vergleich der Phototoxizität zwischen allen drei Zelllinien dargestellt.

<b>Zelllinie</b>	<b><math>ID_{50}</math>-Wert [<math>J/cm^2</math>]</b>
U373 MG	0.15
LN229	0.19
T98G	0.22

Tabelle 10: Phototoxizität von Hypericin bei den humanen Glioblastomzelllinien U373MG, LN229 und T98G (Inkubation mit 2.5  $\mu M$  Hypericin über 2 Stunden) nach einer Bestrahlung bei 595 nm (5  $mW/cm^2$ ).

[J/cm <sup>2</sup> ]	Vitale Zellen [% der Kontrolle]					
	LN229		T98G		U373 MG	
	Median	MAD	Median	MAD	Median	MAD
0,0	100	5,1	100	2,8	100	6,9
0,05	96,2	5,7	91,9	5,5	91,1	3,7
0,1	83,9	12,9	86,6	2,9	67,7	2,6
0,15	65,7	10,3	80,5	7,3	50,3	4,4
0,2	44,9	5,9	50,6	8,6	34,6	5,3
0,25	37,3	11,5	38,8	8,6	19,6	3,4
0,3	28,4	7,3	24,0	5,5	13,9	2,8
0,4	12,5	4,1	12,5	4,6	8,9	4,9
0,5	5,4	2,4	7,5	2,6	3,0	2,3

Tabelle 11: Darstellung der Überlebensrate der humanen Glioblastomzelllinien U373MG, LN229 und T98G, nach Inkubation mit 2.5 µM Hypericin über 2 Stunden und nachfolgender Bestrahlung bei 595 nm (5mW/cm<sup>2</sup> ). Die Überlebensrate wurde in Prozent zur nicht-bestrahlten inkubierten Kontrolle angegeben.

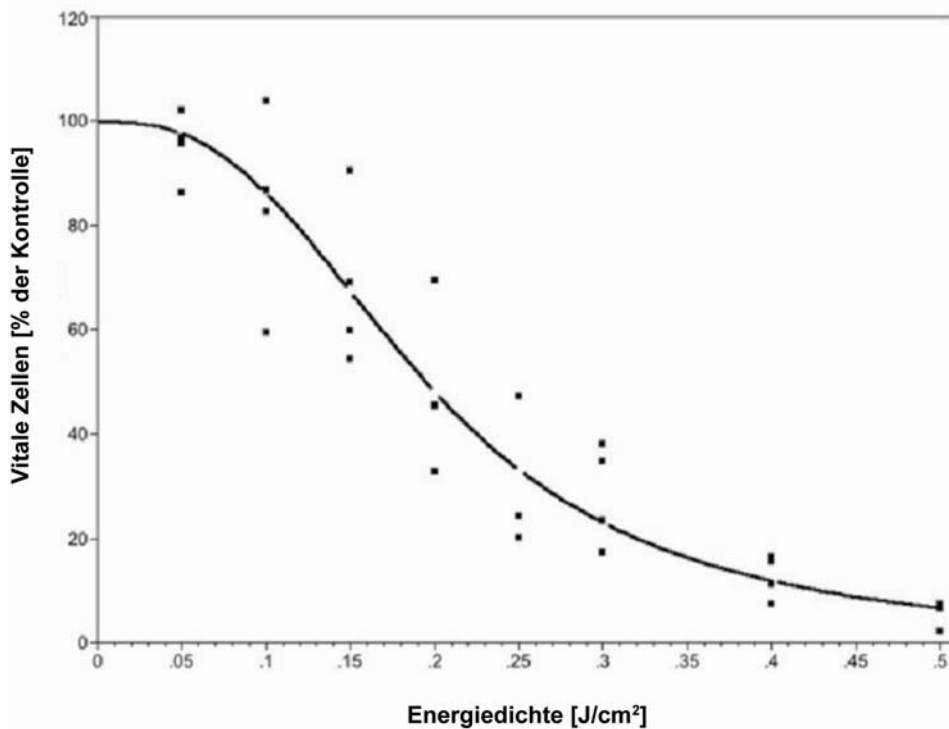


Abbildung 31 A: Phototoxizität, Zelllinie LN229.



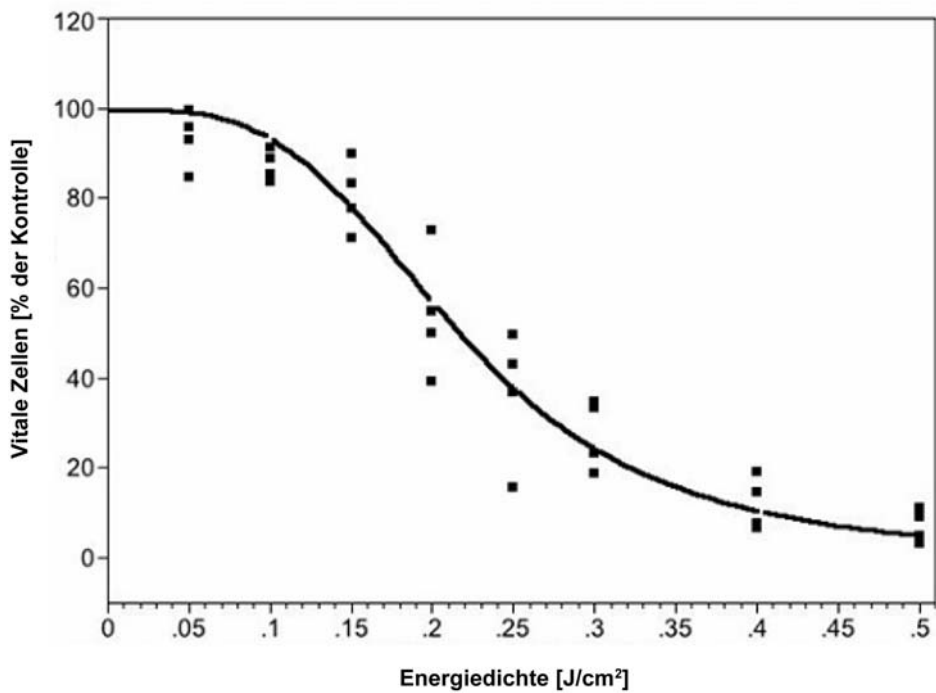


Abbildung 31 B: Photoxizität , Zelllinie T98G

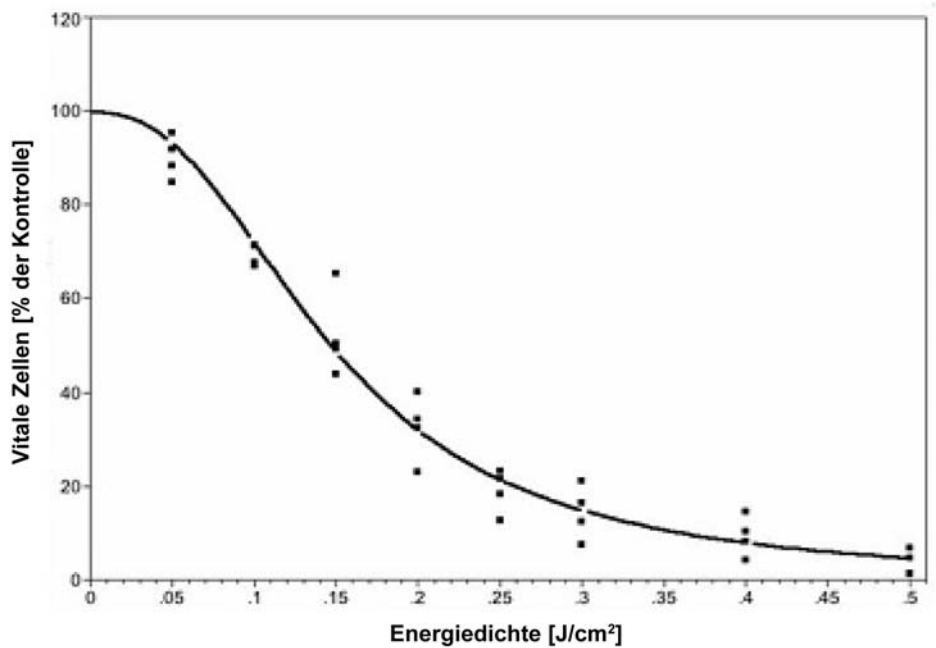


Abbildung 31 C: Phototoxizität, Zelllinie U373MG.

Abbildungen 31 A, B und C. Versuche zur Photoxizität von Hypericin in Abhängigkeit der Energiedichte. Die Zellen wurde mit 2.5  $\mu\text{M}$  Hypericin über 2 Stunden inkubiert und im Anschluss bei einer Wellenlänge von 595 nm ( $5 \text{ mW}/\text{cm}^2$ ) bestrahlt. Gemessen wurde bei unter-schiedlichen Energiedichten (0.05, 0.1, 1.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4 und 0.5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Die Vitalität der Zellen wurde photometrisch mittels der Neutral-Rot-Methode bestimmt (siehe 2.4.1).

Die Abbildungen 31 A bis 31 C zeigen die Phototoxizität in Abhängigkeit der Energiedichte. Die Zelllinien LN229, T98G und U373MG wurden mit unterschiedlichen Energiedichten (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5  $\text{Joule}/\text{cm}^2$ ) im Anschluss an eine zweistündige Inkubationszeit mit  $2.5 \mu\text{M}$  Hypericin bestrahlt. Die gemessenen Werte sind als Punkte aufgetragen, wohingegen die dargestellten Kurven die in Formel 5 berechneten Werte repräsentieren.

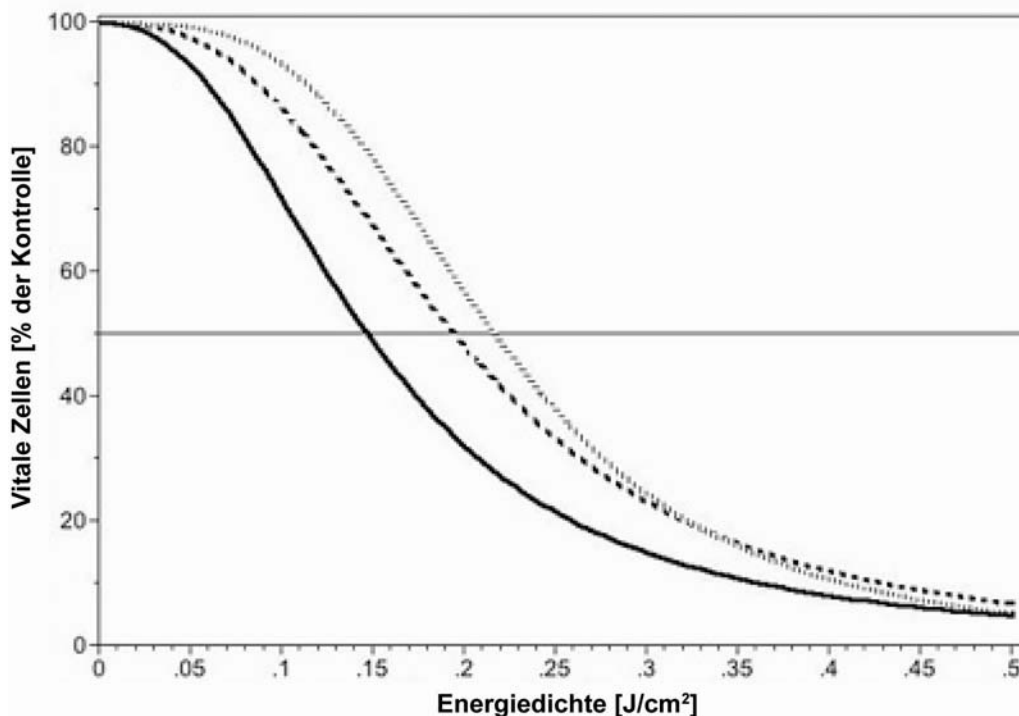


Abbildung 32: Diese Abbildung stellt einen Vergleich aller drei Zelllinien dar: Die durchgezogene Linie stellt Zelllinie U373MG dar, die Kurve mit den kräftigen Punkten repräsentiert Zelllinie LN229 und die Linie mit den feinen Punkten beschreibt Zelllinie T98G. Zelllinie U373MG zeigte sich als signifikant verschieden von Zelllinie T98G (Tukey-Kramer-Test,  $p < 0.05$ ).

### 3.5.2 Phototoxizität in Abhängigkeit der Inkubationskonzentration

Anschließend wurde der Zusammenhang zwischen der Inkubationskonzentration von Hypericin und der photodynamischen Inaktivierung der Glioblastomzellen detaillierter untersucht. Hierfür wurde die Phototoxizität von Hypericin bei den Zelllinien T98G und U373 MG zusätzlich

für verschiedene nicht-zytotoxische Inkubationskonzentrationen bei einer Bestrahlungs-Wellenlänge von 595 nm untersucht. Im Falle der Zelllinie T98G wurden vollständige Dosis-Wirkungs-Kurven für Inkubationskonzentrationen von 0.5, 1.5 and 2.5  $\mu\text{M}$  Hypericin über einen Inkubationszeitraum von jeweils 2 Stunden bei unterschiedlichen Energiedichten von 0.1 bis 1.5  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  erstellt. Hierbei zeigte sich bei abnehmenden Hypericinkonzentrationen ein Anstieg der  $\text{ID}_{50}$ -Werte von 0.2  $\text{J}/\text{cm}^2$  (2.5  $\mu\text{M}$ ) über 0.34  $\text{J}/\text{cm}^2$  (1.5  $\mu\text{M}$ ) bis zu 0.88  $\text{J}/\text{cm}^2$  (0.5  $\mu\text{M}$ ). Eine Übersicht über diese Daten ist in Tabelle 12 gegeben, die Dosis-Wirkungs-Kurven sind in Abbildung 33 aufgetragen.

<b>HYP-Konzentration [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b><math>\text{ID}_{50}</math>-Wert [<math>\text{J}/\text{cm}^2</math>]</b>
0.5	0.88
1.5	0.34
2.5	0.20

Tabelle 12: Phototoxizität von Hypericin bei der humanen Glioblastomzelllinie T98G nach Inkubation mit verschiedenen Inkubationskonzentrationen über 2 Stunden und einer Bestrahlung mit 595 nm (10  $\text{mW}/\text{cm}^2$ )

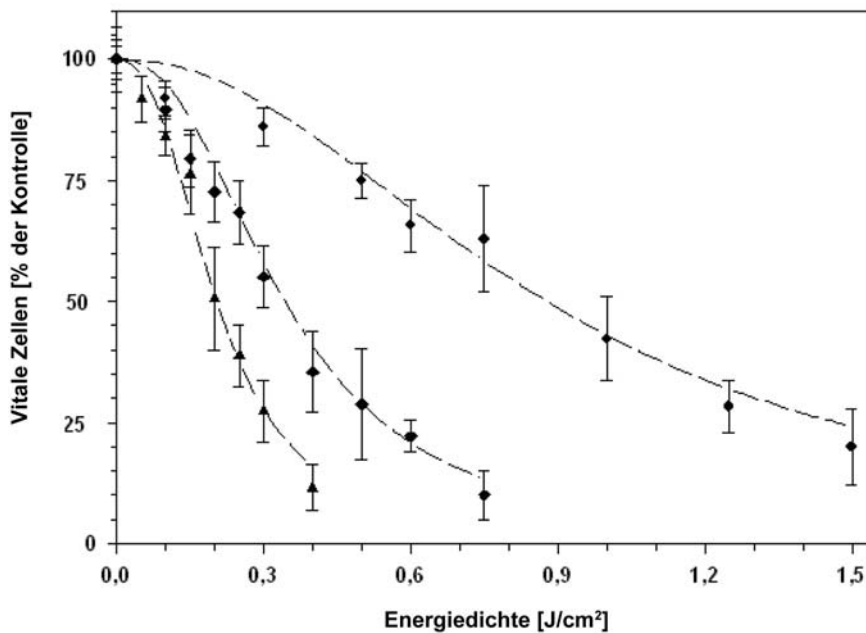


Abbildung 33: Phototoxizität bei der Glioblastomzelllinie T98G [ 0,5 µM (●), 1,5 µM (◆) und 1,5 µM (▲) ] in Abhängigkeit der Energiedichte bei einer Inkubationszeit von 2 Stunden. Die Bestrahlung erfolgte bei 595 nm und einer Leistungsdichte von 5-10 mW/cm<sup>2</sup>. Die Vitalität der Zellen wurde mittels Neuralrot-Assay, 48 Stunden nach erfolgter Bestrahlung, bestimmt. Die Überlebensrate der Zellen wurde in Prozent zur inkubierten, nicht-bestrahlten Kontrolle bestimmt. Jeder Wert repräsentiert den Median ± MAD mindestens drei verschiedener, unabhängig voneinander durchgeführter Experimente mit Vierfach-Bestimmungen.

Hierbei ist zu sehen, dass für die Konzentrationen 0,5 µM, 1,5 µM und 2,5 µM ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen einer Zellinaktivierung und der Energiedichte besteht. Im Falle der Zelllinie U373MG wurden die Zellkulturen mit Hypericin-konzentrationen im Bereich zwischen 0,1 µM and 2,5 µM über einen Zeitraum von jeweils 2 Stunden bei einer konstanten Energiedichte von 0,3 J/cm<sup>2</sup> inkubiert. Die photodynamische Behandlung der Zellen resultierte bei Inkubationskonzentrationen von bis zu 1 µM Hypericin in einer schwachen bis moderaten Inaktivierung der Zellen mit einer Überlebensrate der Zellen größer 75% im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrolle (100%). Bei Hypericin-konzentrationen größer oder gleich 1,5 µM zeigte sich hingegen eine verstärkte Zell-Inaktivierung mit einer Zellüberlebensrate von nur 25%. Dies ist in Abbildung 34 dargestellt.

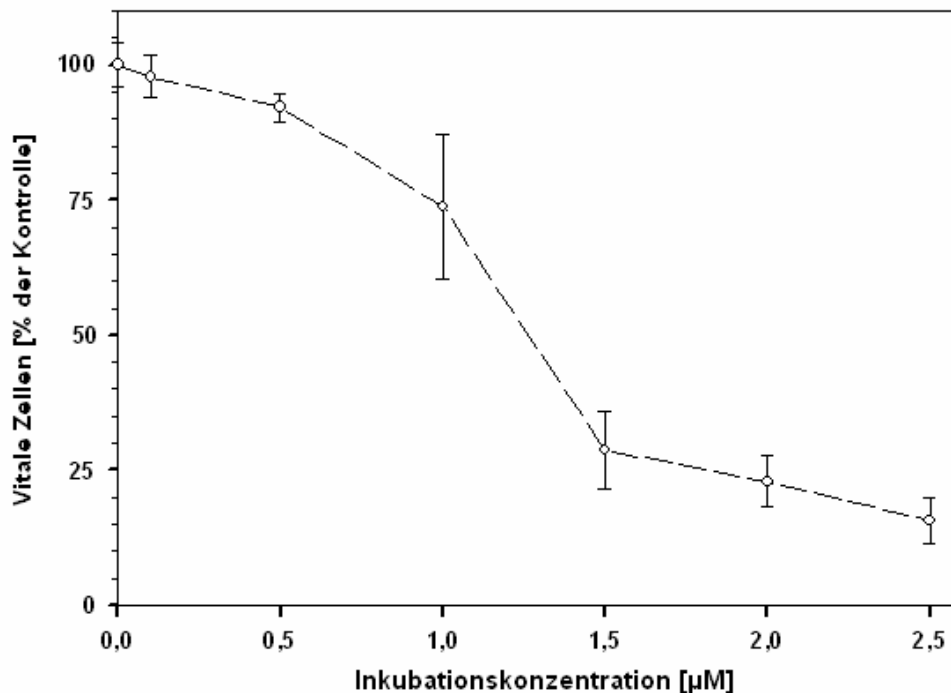


Abbildung 34: Die in dieser Abbildung dargestellte Kurve beschreibt die Phototoxizität in Abhängigkeit der Hypericinkonzentration der Zelllinie U373 MG. Bei Inkubationskonzentrationen zwischen 0.5 µM und 1.5 µM Hypericin ist eine deutliche Zellinaktivierung zu verzeichnen. Die einzelnen Auftragungspunkte wurden durch den Median über vier voneinander unabhängige Experimente mit Vierfach-Bestimmungen errechnet. Die zur Y-Achse parallelen Balken (Fehlerindikatoren) stellen den MAD über diese 16 Werte dar.

Wie in obiger Abbildung ersichtlich, besteht bei Inkubationskonzentrationen von 0.1 µM bis 0.5 µM eine nur geringe Zellinaktivierung, wohingegen diese im Bereich von 0.5 µM bis 1.5 µM deutlich ansteigt. Noch höhere Inkubationskonzentrationen steigern die Zellinaktivierung allerdings nur noch unwesentlich.

### 3.5.3 Aktionsspektrum

Zur präziseren Bestimmung der optimalen Wellenlänge wurden die Zellen der Glioblastomzelllinie LN229 nach einer 2-stündigen Inkubationszeit mit 2.5 µM Hypericin mit variierenden Wellenlängen von 575 nm bis 615 nm in 5 nm-Intervallen bestrahlt. Die Energiedosis lag für jede einzelne Wellenlänge

bei  $0.3 \text{ J/cm}^2$ . Für Wellenlängen im Bereich zwischen 575 nm und 590 nm resultierte hierbei eine schwache bis moderate Zelinaktivierung mit Überlebensraten absteigend von 90% (bei 575 nm) bis zu 60% (bei 590 nm). Eine Bestrahlung bei Wellenlängen von 595 nm und 600 nm ergab eine beträchtliche photodynamische Schädigung der Zellen mit Überlebensraten von nur 20%. Bei höheren Wellenlängen zeigte sich ein rascher Anstieg der Zell-Überlebensrate und war bei Wellenlängen größer 610 nm vernachlässigbar. Die beschriebenen Ergebnisse sind als Aktionsspektrum von Hypericin in Abbildung 35 dargestellt.

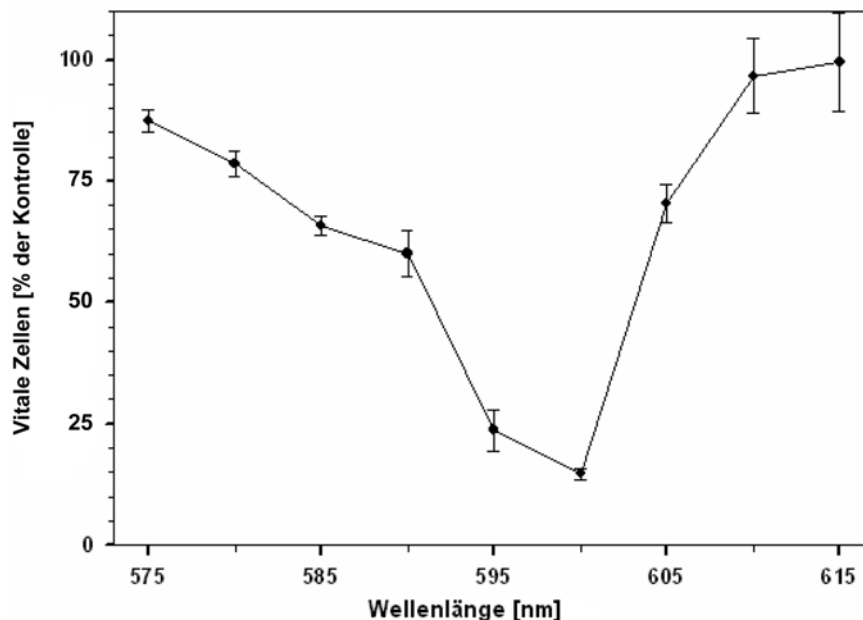


Abbildung 35: Aktionsspektrum von Hypericin. Bestimmung der maximalen Zelinaktivierung in Abhängigkeit der Wellenlänge. Die Zelllinie LN229 wurde für 2 Stunden mit  $2.5 \mu\text{M}$  Hypericin inkubiert und mit einer konstanten Energiedichte von  $0.3 \text{ J/cm}^2$  bei einer Leistung von  $10 \text{ mW/cm}^2$  bestrahlt. Die Zellvitalität wurde mittels photometrischer Messungen (Neutralrot-Assay) 48 Stunden nach PDT bestimmt und in Prozent zur inkubierten nicht-bestrahlten Kontrolle dargestellt.

### 3.6 Intrazelluläre Lokalisation

Die intrazelluläre Lokalisation von Hypericin wurde anhand der drei Glioblastomzelllinien U373 MG, LN229 und T98G für nicht-zytotoxische Hypericinkonzentrationen von  $0.5$ ,  $1.5$  und  $2.5 \mu\text{M}$  bei einer Inkubationszeit von

2 Stunden mittels zwei verschiedener fluoreszenz-mikroskopischer Techniken untersucht. Für alle drei Zelllinien zeigte sich bei der Auflicht-Mikroskopie eine Hypericinfluoreszenz vorwiegend in der perinukleären Region (bevorzugt auf der Nukleus-Seite, welche einige kleine Granula aufwies) sowie innerhalb der nukleären Membran. Weiterhin konnte eine schwache Fluoreszenz innerhalb des gesamten Zytoplasmas nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 36 ersichtlich [Abbildung A1 (U373 MG), B1 (T98G) and C1 (LN229)], konnten keine evidenten Unterschiede zwischen den drei Glioblastomzelllinien bei einer Inkubationskonzentration von 2.5  $\mu\text{M}$  Hypericin beobachtet werden. Darüber hinaus blieb das intrazelluläre Verteilungsmuster auch bei niedrigeren Hypericinkonzentrationen praktisch unverändert, obwohl die Fluoreszenzintensität mit abnehmenden Hypericinkonzentrationen ebenfalls zurückging. Dies ist exemplarisch für die Zelllinie T98G dargestellt [Schaubild 36, Abbildungen B1 (2.5  $\mu\text{M}$ ), B2 (1.5  $\mu\text{M}$ ) and B3 (0.5  $\mu\text{M}$ )]. Deutlich sichtbare Zellgrenzen während der Mikroskopie deuten auf eine Lokalisation der Substanz innerhalb der Plasmamembran hin.

Deshalb kam nun die interne totale Reflexionfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) zum Einsatz. Diese mikroskopische Technik ermöglicht eine weitgehend selektive Anregung von Fluorophoren innerhalb der oder in unmittelbarer Nachbarschaft zur Plasmamembran, da die Eindringtiefe  $d(\Theta)$  des Anregungslichtes limitiert ist (siehe 2.4.3). Eine Hypericinfluoreszenz konnte für alle drei Zelllinien mittels der TIRFM leicht detektiert werden. Dies wird beispielhaft anhand der Zelllinie LN229 in Abbildung 36 (Abbildungen C2 ( $d(\Theta) \approx 150 \text{ nm}$  bei  $\Theta = 66^\circ$ ) und C3 ( $d(\Theta) \approx 80 \text{ nm}$  bei  $\Theta = 70^\circ$ ) demonstriert. In allen drei Fällen zeigte die Illumination mittels TIRFM ein strukturiertes Verteilungsmuster mit höchster Fluoreszenzintensität in derjenigen Region, in welcher die Plasmamembran sich in unmittelbarer Umgebung zum Glasträger befand. Bei den Anfärbungen der drei Glioblastomzelllinien mit dem mitochondrialen Marker Rhodamin 123 (R123) und dem lysosomalen Marker Acridin-Orange (AO) unterschieden sich die intrazellulären Verteilungsmuster der Substanzen völlig zur intrazellulären Anreicherung von Hypericin. Somit

scheint Hypericin weder in Mitochondrien noch in Lysosomen von Glioblastomzellen lokalisiert zu sein.

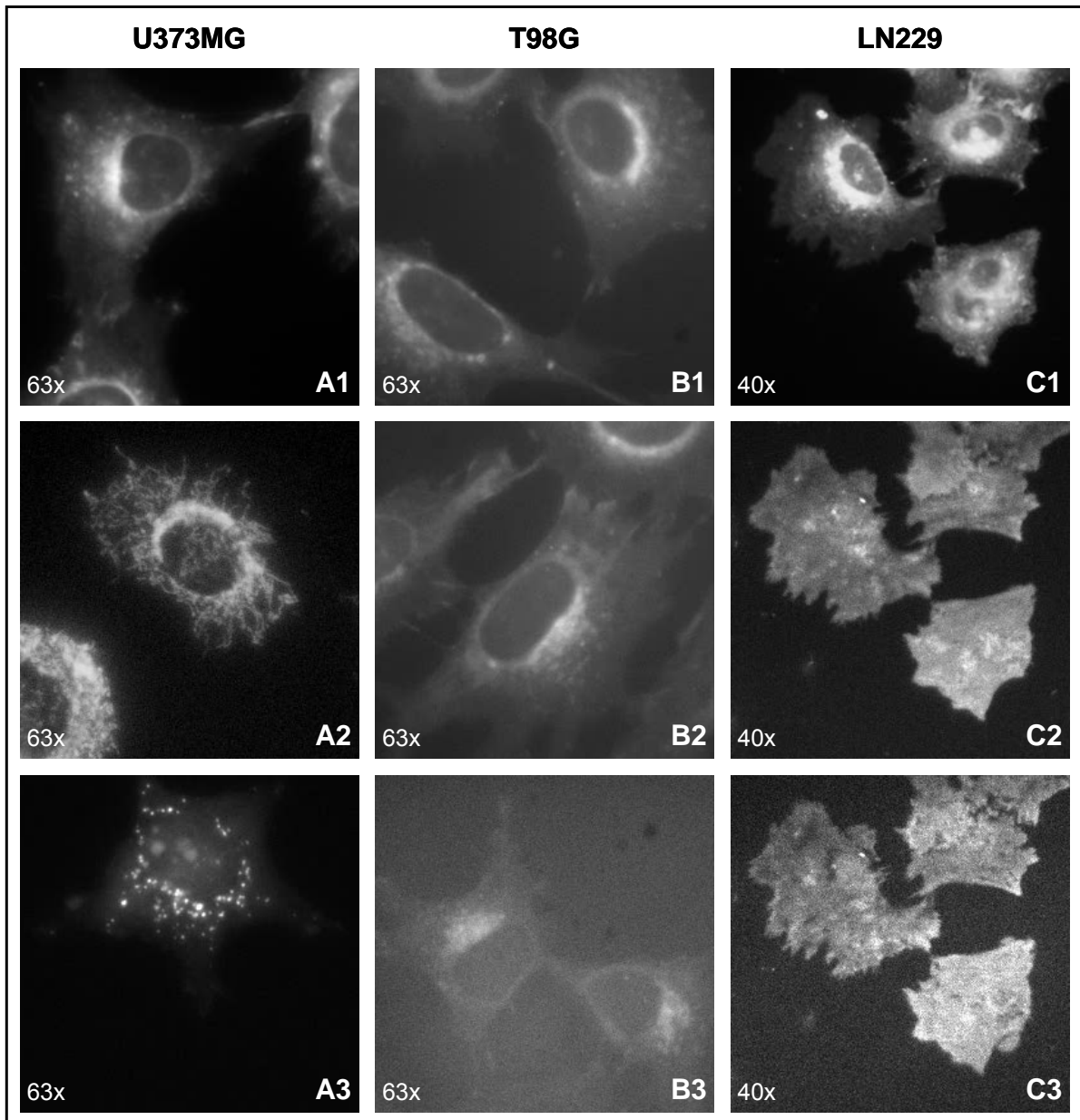


Abbildung 36: Fluoreszenzmikroskopische Abbildungen von Glioblastomzellen. Alle 3 Zelllinien wurden mit Hypericin (2.5  $\mu\text{M}/2\text{h}$ ; Abbildung 1), Rhodamin 123 (1  $\mu\text{M}/1\text{h}$ ; Abbildung 2) und Akridin-Orange (1 mM/1h; Abbildung 3) inkubiert, T98G Zellen wurden mit Hypericinkonzentrationen von 2,5  $\mu\text{M}$  (Abbildung B1), 1.5  $\mu\text{M}$  (Abbildung B2) und 0.5  $\mu\text{M}$  (Abbildung B3) für jeweils 2 Stunden inkubiert. Zelllinie LN229 wurde mit Hypericin (2.5  $\mu\text{M}/2\text{h}$ ) inkubiert. Die Darstellung erfolgte mittels Auflicht-Mikroskopie (Abbildung C1) und mittels TIR-Illumination ( $\theta = 66^\circ$  (Abbildung C2) und  $\theta = 70^\circ$  (Abbildung C3) mit  $\theta$  korrespondierend zum Einfallswinkel). Die Fluoreszenz wurde bei 590 nm (Hypericin/Acridin-Orange) oder bei 520 nm (Rhodamin 123) gemessen.



#### 4. Diskussion

Das Glioblastom stellt unter den Gliomen den Tumor mit dem höchsten Malignitätsgrad dar [13]. Innerhalb der Gruppe der intrakraniellen Tumoren bildet es einen Anteil von 15 bis 23%, unter den Astrozytomen sogar von 50% [185] und ist der häufigste primäre Hirntumor beim Erwachsenen [20].

Die chirurgische Intervention, kombiniert mit Radiatio und simultaner Chemotherapie hat sich in der Behandlung von Gliomen etabliert, stellt allerdings unter Anbetracht der geringen Überlebensrate [14] nach wie vor keine suffiziente Therapie dar. Weiterhin kann die Notwendigkeit einer radikalen Tumorchirurgie mit Sicherheitsabstand oftmals nicht erfüllt werden, da Glioblastome erstens aufgrund ihres invasiven Wachstums schlecht von gesundem Hirnparenchym zu differenzieren sind und zweitens die Schädigung funktioneller Hirnareale ein bedeutendes Risiko darstellt.

Deshalb sind innovative Therapiekonzepte vor allem unter dem Aspekt der exakten Visualisierung und Tumorlokalisierung für die Optimierung der Radikalität der Resektion erforderlich. Aber auch die konservative Therapie wie die Radiatio bedarf neuer methodischer Ansätze.

Innerhalb dieser beiden Bereiche konnten sich Fluorophore und Photosensibilisatoren bereits im letzten Jahrzehnt zunehmend etablieren.

Hierbei erwies sich die PDT unter Einsatz der Photosensibilisatoren als ein vielversprechendes Novum innerhalb der Tumorthherapie und wird in den Fachbereichen der Urologie und Dermatologie bereits klinisch angewendet. Zudem gewinnt sie in anderen medizinischen Disziplinen wie unter anderem in der Gastroenterologie [186], der Pulmonologie [187] und der Ophthalmologie mehr und mehr an Bedeutung [188].

Zusätzlich zu seiner Eigenschaft der Fluoreszenz, bietet der Photosensibilisator Hypericin aufgrund seiner chemisch-biologischen Eigenschaften das Potential für die Anwendung einer höchst effektiven Methode wie der PDT und stellt somit eine interessante Alternative zu den bisherigen kurativen und palliativen Therapieverfahren in der Onkologie dar. Dies wurde bereits mehrfach in-vivo

und in-vitro an diversen malignen Zelllinien und Tumor-Modellen untersucht [147, 189, 190, 191, 150, 192, 193, 143].

Hypericin weist somit unter Betrachtung seiner unter 1.5 beschriebenen Eigenschaften großes Potential in seiner Funktion als Fluoreszenzmarker wie auch Photosensibilisator auf.

Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels standardisierter experimenteller Vorgehensweise unter Beweis gestellt. Es wurden optimale Hypericinkonzentrationen mit minimaler Zytotoxizität und maximaler Phototoxizität sowie optimale Bestrahlungsparameter für die PDT ermittelt.

### **Zytotoxizität**

Vor Durchführung der Experimente zur PDT musste zunächst die Zytotoxizität von Hypericin bestimmt werden. Darüber hinaus war es notwendig, eine optimale Inkubationskonzentration für die später durchzuführenden Bestrahlungsexperimente zu ermitteln. Bei den zur Bestimmung der Zytotoxizität von Hypericin durchgeführten Experimenten (siehe 3.2, Abbildung 25 und 26) zeigten sich bei den konzentrationsabhängigen Versuchsreihen (2- als auch 24-stündige Inkubationszeit) bis zu einer Inkubationskonzentration von 5  $\mu\text{M}$  Hypericin keinerlei zytotoxische Effekte. Somit erwies sich eine Inkubationskonzentration von 2.5  $\mu\text{M}$  für alle weiteren Experimente zur PDT als sinnvoll, da hierbei keine Zellschädigungen zu erwarten waren.

Weber et al. [194] konnten bei ihren Versuchen mit humanen Epitheloid-Zervixkarzinom-Zellen (HeLa) und humanen hepatozellulären Karzinomzellen (Hep 3B) ebenfalls keine Zytotoxizität von Hypericin bei Inkubationskonzentrationen von 0.1-5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (entspricht 0,2  $\mu\text{M}$  bis zu 10  $\mu\text{M}$ ) feststellen. Auch Uzdensky et al. [195] stellten fest, dass bei ihren Versuchen mit Adenokarzinom-Zellen (WiDr Zellen), welche mit Hypericinkonzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  inkubiert worden waren, im Dunklen keinerlei zytotoxische Effekte hervorgerufen werden konnten.

### **Intrazelluläre Akkumulation**

Die intrazelluläre Akkumulation von Hypericin wurde für die Zelllinie U373 MG in sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängigen Versuchsreihen mittels der Methode der Flowzytometrie bestimmt.

Maximale intrazelluläre Hypericinfloureszenz wurde nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden und bei Inkubationskonzentrationen größer 5  $\mu\text{M}$  erreicht (siehe Abbildung 27). Diese Ergebnisse stimmen mit einer kürzlich durchgeführten Studie am Fluoreszenzmikroskop gut überein [11]. Hierbei exhibierten 20 verschiedene Gliomzellen (8 permanente Zelllinien und 12 Primärkulturen) maximale Fluoreszenz nach 90 bis 120-minütiger Inkubationszeit bei einer Inkubationskonzentration von 20  $\mu\text{M}$ . Bei vorliegender Arbeit konnten vergleichbare Fluoreszenzintensitäten nach einer 24-stündigen Inkubationszeit mit Inkubationskonzentrationen von 2.5 und 20  $\mu\text{M}$  Hypericin beobachtet werden.

Jedoch bleibt zu erwähnen, dass sich die Reliabilität der Fluoreszenzmessungen verringert, sobald sich das Fluoreszenzquantenfeld des Chromophors, wie beispielsweise die zelluläre Umgebung, ändert. In einer Studie mit murinen Keratinozyten, PAM-212 Zellen, wurde bei Versuchen mit höheren Hypericinkonzentrationen von bis zu 50  $\mu\text{M}$  eine intrazelluläre Formation von schwach fluoreszierenden Hypericin-Aggregaten angenommen [196]. Durch Bildung von Aggregaten kommt es zu einer geringeren Fluoreszenzquantenausbeute und somit zu einer geringeren Fluoreszenzintensität. Auch Umverteilungsprozesse von Hypericin in hydrophile Räume könnten erklärend für eine Reduktion der Fluoreszenzquantenausbeute sein. Hinsichtlich des Umverteilungsprozesses von Hypericin konnte bislang außerdem nicht klar definiert werden, ob nach seiner initialen Aufnahme in die Zelle eine Metabolisierung oder Sezernierung der Substanz stattfindet [194].

Wie in Abbildungen 27 und 28 ersichtlich, resultierte eine Inkubation der U373 MG Glioblastomzellen mit einer Hypericinkonzentration von nur 2.5  $\mu\text{M}$  in einem nahezu linearen Anstieg der intrazellulären Hypericinfloureszenz bei Inkubationszeiten von bis zu 4 Stunden. Diese Daten sind wiederum äquivalent zu Ergebnissen früherer Untersuchungen mit anderen Zelllinien [171,197].

### **Zellulärer Transportmechanismus**

Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse verschiedenster Studien bezüglich des zellulären Aufnahmemechanismus von Hypericin in die Zelle, wurde diese Problematik im Rahmen dieser Arbeit systematisch untersucht. Nach zweistündiger Inkubationszeit der Glioblastomzellen U373 MG bei 4° C war keinerlei zelluläre Akkumulation der Substanz zu beobachten (siehe Abbildung 30).

Da der zelluläre Metabolismus bei einer Temperatur von 4° C weitestgehend inhibiert wird, implizieren diese Daten eindeutig, dass die Aufnahme des Stoffes ins Zellinnere über einen energieabhängigen Transportmechanismus erfolgt. Sie findet somit wahrscheinlich über eine rezeptorvermittelte Endo- oder Pinozytose statt und nicht mittels einer passiven Diffusion. Uzdensky et al. [195] fanden in 2001 konträr hierzu allerdings keinen relevanten Unterschied im Anfärbeverhalten sogenannter WiDr Zellen (humane Kolonkarzinom-Zelllinie) beim Vergleich der Fluoreszenz-Bilder im Anschluss an eine einstündige Inkubationszeit bei 4° C und bei Raumtemperatur. Die oben genannte Arbeitsgruppe schlussfolgerte demnach, dass Hypericin die Zellen vornehmlich durch Diffusion penetriert. Der Aufnahmemechanismus von Hypericin in Zellen unterschiedlicher Herkunft mag zwar variieren, dennoch sollte darauf hingewiesen werden, dass eine Inhibition des energetischen Metabolismus der Zelle schon frühzeitig vor Inkubation der Proben offensichtlich von grosser Relevanz ist. Dies kann jedoch wie bereits unter 2.3.4 beschrieben beispielsweise durch ein Vorkühlen sowohl der Zellproben als auch des Inkubationsmediums erfolgen.

Andererseits korreliert unsere Beobachtung eines aktiven Aufnahmemechanismus von Hypericin in die Zelle mit den bei Untersuchungen von Caco-2-Zell-Monolayern gewonnenen Daten. Dies ist ein Modellsystem zur Untersuchung der intestinalen Absorption. Der transzelluläre Transport von Hypericin bei 4° C war hierbei wesentlich geringer (6.5% +/- 0.8 %) als bei einer Temperatur von 37° C (12.7% +/- 2.6%). Gleichzeitig ergaben Untersuchungen zum Bindungsverhalten von Hypericin an diesen Zellen eine relative niedrige Affinitätskonstante (0.1 mM).

In Zusammenschau ist in Anbetracht dieser unter serumfreien Bedingungen für Caco-2-Zellen gewonnenen Daten anzunehmen, dass Hypericin aktiv in die Zellen aufgenommen wird und zwar nach nicht-spezifischer Bindung an Membranlipide [198].

Außerdem ließ sich zeigen, dass eine Veränderung verschiedener Schritte der Endozytose und des Membranzyklus im Sinne einer Inhibierung eine intrazelluläre Änderung der Lokalisation von Hypericin zur Folge hatte [194].

Weber et al beschrieben, wie bereits erwähnt und mit unseren Ergebnissen übereinstimmend, eine Assoziation von Hypericin mit der zytoplasmatischen Membran und im Verlauf eine vornehmliche Anreicherung innerhalb der Region der intrazellulären Membran wie beispielsweise im Golgi-Apparat sowie im endoplasmatischen Retikulum. Durch eine effektive Blockade der Endozytose und des Membranzyklus veränderten sich konsekutiv diese Anreicherungsprozesse. Dies lässt rückschließen, dass energieabhängige Prozesse bei der intrazellulären Aufnahme und Distribution von Hypericin innerhalb der lebenden Zelle involviert sind.

Aufgrund der Hydrophobie von Hypericin sind für den Transport der Substanz in die Zelle sogenannte Serumproteine notwendig; ersatzweise waren Lösungsmittel wie beispielsweise Cyclodextrine oder Liposomen unter serumfreien Bedingungen essentiell [198]. Abschließend ist zu erwähnen, dass die intrazelluläre Akkumulation von Hypericin entscheidend von der Komposition des Mediums beeinflusst wird [150, 198, 199], weshalb eine Vergleichbarkeit der Resultate individueller Studien nur bedingt möglich ist.

### **Phototoxizität**

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten erwies sich Hypericin für alle drei Zelllinien als eine effektive photoaktive Substanz bei gleichzeitiger nur geringfügiger Zytotoxizität (Dunkeltoxizität).

So resultierte die Bestrahlung der über 2 Stunden mit 2.5  $\mu\text{M}$  Hypericin inkubierten Zellen bei einer Wellenlänge von 595 nm mit geringsten Energiedosen von 0.15 bis 0.20  $\text{J}/\text{cm}^2$  bereits in einer Reduktion der überlebenden Zellzahl auf 50% ( $\text{ID}_{50}$ -Werte). Nach erfolgter Exposition der

Zellen mit einer Energiedichte von  $0.4 \text{ J/cm}^2$  verringerte sich die Anzahl der überlebenden Zellen im Vergleich zu den nicht-bestrahlten Kontrollen auf ungefähr 10%.

Diese Resultate stimmen weitestgehend mit denjenigen für andere Zelllinien (wie Nasopharyngeal-Karzinom-, Kolon-Karzinom- sowie Blasen-Karzinomzellen) beobachteten Untersuchungs-Ergebnissen überein [197, 189, 195].

Das transitionale Zell-Karzinom der Blase, AY-27, wurde mit Hypericin-Konzentrationen von  $0.05 \text{ }\mu\text{M}$  bis  $10 \text{ }\mu\text{M}$  über 2 Stunden inkubiert und unter ähnlichen wie für diese Arbeit angewandten Bedingungen (Wellenlänge von  $595 \text{ nm}$ ) bestrahlt. Die Autoren ermittelten eine Konzentration von ungefähr  $2.5 \text{ }\mu\text{M}$  Hypericin, welche notwendig war, um eine 50%ige Reduktion der Anzahl der überlebenden Zellen ( $\text{IC}_{50}$ -Wert) zu erzielen. Die Zellen wurden mit einer Energiedichte von  $0.45 \text{ J/cm}^2$  bestrahlt [200].

Wie bereits vorab erwähnt, verglichen Ali et al. [197] die Hypericin-Sensitivität vier verschiedener Zelllinien miteinander. Hierbei konnte die Überlebensrate der Zellen ebenfalls auf 50% bei Inkubationskonzentrationen von  $1.25 \text{ }\mu\text{M}$  und  $2.5 \text{ }\mu\text{M}$ , einer Inkubationszeit von 5 Stunden und Lichtexposition von  $0.4 \text{ J/cm}^2$  verringert werden [197].

### **Aktionsspektrum**

Neben der Ermittlung einer möglichst geringen Energiedichte zur Inaktivierung der Tumorzellen, galt es im Rahmen dieser Arbeit die optimale Wellenlänge für eine PDT mit Hypericin systematisch zu ermitteln. Wie in Abbildung 35 beispielhaft für die Zelllinie LN229 dargestellt, könnte eine effektive photodynamische Zellinaktivierung auch bei einer geringfügig höheren Wellenlänge als  $595 \text{ nm}$  erzielt werden. In Anbetracht des Versuchsprotokolls dieser Arbeit wird ersichtlich, dass bei Bestrahlungsparametern von Wellenlängen im Bereich von  $595 \text{ nm}$  bis  $615 \text{ nm}$  (in Abständen von  $5 \text{ nm}$ ) eine Wellenlänge von  $600 \text{ nm}$  optimal für eine PDT mit Hypericin ist.

Dieses Resultat stimmt weitestgehend mit den Ergebnissen früher durchgeführter Studien überein. Hierbei handelt es sich um Versuche mit

humanen transitionalen Zellkarzinomen der Linie RT-112, welche mit unterschiedlichen Wellenlängen von 592, 595 and 598 nm bestrahlt worden waren. Dies führte im Gegensatz zu den oben beschriebenen Resultaten zu dem Ergebnis einer nahezu identischen Zellüberlebensrate [201]. Erwähnenswert ist allerdings, dass die Überlebensfraktionen der RT-112 sich hierbei mit weit unter 10% als sehr niedrig erwiesen. Eine solche Zellinaktivierung auf unter 10% stellt die Reliabilität von Daten, welche mittels eines optischen Verfahrens generiert werden, bezüglich des Zellüberlebens grundsätzlich in Frage, da eine genauere Differenzierung der Überlebensrate unter 10% mittels eines solchen Verfahrens kaum möglich ist.

Außerdem konnte bei in-vivo durchgeführten Experimenten bereits gezeigt werden, dass sich eine Anwendung der PDT mit Hypericin (subkutane Applikation bei C26 Kolon-Karzinom-Zellen) bei einer Wellenlänge von 590 nm effektiver erwies, als bei einer Wellenlänge von nur 550 nm, was sich wiederum mit den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten deckt. Dies lässt sich auf eine stärker ausgeprägte, tiefer gehende Tumornekrose zurückführen. Blank et al. wiesen somit bei einer Wellenlänge von 595 nm und applizierter Energiedosis von 120 J/cm<sup>2</sup> eine Tumornekrose von 9,9 +/- 0.8 mm mm Eindringtiefe nach.

Diese ist allerdings nicht ausschließlich auf eine verstärkte Eindringtiefe von gelbem Licht gegenüber grünem Licht erklärbar, sondern wird auch durch andere Mechanismen wie beispielsweise durch vaskuläre Effekte beeinflusst [189].

Bei den zur Zytotoxizität von Hypericin durchgeführten Experimenten scheint die Linie U373 MG innerhalb der Gruppe der Glioblastomzelllinien eine etwas höhere Hypericin-Sensitivität gegenüber den zwei anderen untersuchten Zelllinien LN229 und T98G aufzuweisen.

Dem könnte eine gesteigerte Aufnahme von Hypericin in die Zelle zugrunde liegen, oder aber auch eine verstärkte Sensitivität dieser Zelllinie gegenüber oxidativem Stress.

Dies ist insofern interessant, als auch eine erhöhte Sensitivität der Zelllinie U373 MG im Rahmen der Bestrahlungsexperimente gezeigt werden konnte.

Diese Beobachtung bestätigt einen Zusammenhang zwischen photodynamischen Effekt und intrazellulärer Anreicherung der photosensibilisierenden Substanz.

Somit variierte der photodynamische Effekt der Substanz Hypericin von Zelllinie zu Zelllinie (siehe Abbildung 32) mit einer erhöhten Sensitivität der Zelllinie U373 MG gegenüber der PDT. Hierbei zeigte sich diese als signifikant verschieden zur Zelllinie T98G.

Diese Beobachtungen stimmen mit einer im Jahre 1997 publizierten Arbeit überein, welche ebenfalls zeigte, dass dieser photodynamische Effekt in direkter Beziehung zur intrazellulären Akkumulation des Photosensibilisators steht [171].

### **Phototoxizität in Abhängigkeit der Energiedichte**

Bei einem weiteren Experiment zur PDT zeigte sich eine verstärkte Zell-Inaktivierung bei Hypericinkonzentrationen größer oder gleich 1.5  $\mu\text{M}$  mit einer Zellüberlebensrate von nur 25%. Hierbei waren die Zellen der Linie U373 MG mit unterschiedlichen Hypericinkonzentrationen (0.1  $\mu\text{M}$  bis 2.5  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und anschließend konstant mit einer Energiedichte von 0.3  $\text{J}/\text{cm}^2$  bestrahlt worden waren. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass zwischen der photodynamischen Effektivität von Hypericin und seiner Inkubationskonzentrationen kein einfacher Zusammenhang besteht (Abbildung 34).

### **Intrazelluläre Lokalisation**

Zum genaueren Verständnis intrazellulärer Prozesse im Rahmen der PDT war es notwendig, fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von Hypericin durchzuführen.

Nach Anfärbung und Inkubation der Glioblastomzellen mit den Zellorganellen-Markern Akridin-Orange (lysosomal) und Rhodamin 123 (mitochondrial) einerseits und Hypericin andererseits wurde zunächst mittels Auflichtmikroskopie das Färbeverhalten der Zellen bei diesen drei Substanzen verglichen (siehe 2.3.5, 3.6).



Beim Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften von Hypericin mit jenen der zwei Marker für Zellorganellen, Acridinorange und Rhodamin 123, stellte sich dabei heraus, dass weder Mitochondrien noch Lysosomen die primäre Lokalisation der Photosensibilisators sind. Die intrazelluläre Verteilung von Hypericin erwies sich für alle drei Glioblastomzelllinien als ähnlich und als nicht von der Inkubationskonzentration des Stoffes abhängig. Eine Fluoreszenz des Photosensibilisators zeigte sich vornehmlich perinukleär sowie innerhalb der nukleären Membran. Dies war so auch bereits von Sattler et al. [198] sowie Weber et al. beschrieben worden [194]. In Übereinstimmung mit zuvor durchgeführten Studien [194, 197, 202, 191] kann somit vermutet werden, dass sich Hypericin vornehmlich innerhalb der Membran des endoplasmatischen Retikulums sowie im Golgi-Komplex anreichert. Jedoch sollte ebenso erwähnt werden, dass für andere Zelllinien die Akumulation von Hypericin in Mitochondrien und Lysosomen beobachtet worden war [197, 199].

Da während der mikroskopischen Untersuchungen die Zellgrenzen für alle drei Zelllinien deutlich sichtbar waren, war anzunehmen, dass Hypericin ebenfalls in der Plasmamembran der Glioblastomzellen lokalisiert war. Dies konnte in anschließenden Versuchen mittels der Methode der TIRFM bewiesen werden.

Im Hinblick auf die Lokalisation von Hypericin innerhalb der Plasmamembran wurden ebenso widersprüchliche Ergebnisse in verschiedenen Untersuchungen publiziert [195, 198]. Zur detaillierteren Untersuchung dieser Kontroversitäten wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode der TIRFM eingesetzt. Die Exzitation des Fluorophors erfolgt hierbei durch ein evaneszentes Feld mit einer Eindringtiefe von ungefähr 100 nm, vornehmlich abhängig vom Einfallswinkel. Bei dieser Technik handelt es sich somit um eine einzigartige Form der Mikroskopie, insbesondere vor dem Hintergrund seiner axialen Auflösung in unmittelbarer Umgebung zur Grenzfläche des Zellsubstrats. Unter Anwendung dieser Technik konnte im Rahmen der durchgeführten Versuche eine Hypericinfluoreszenz sogar unter Penetrationstiefen von 100 nm detektiert werden. Hierbei ist die Verteilung intrazellulärer Fluorophore fast unerheblich. Somit ist die Hypericinlokalisierung innerhalb der und/oder in nächster Umgebung der Plasmamembran für alle drei Zelllinien bewiesen.

Die bei vorliegender Arbeit mittels der Methode der Fluoreszenzmikroskopie gewonnenen Erkenntnisse lassen nunmehr postulieren, dass sich Hypericin weder in den Lysosomen, noch in den Mitochondrien, jedoch in der Plasmamembran der Glioblastomzellen anreichert.

Wie bereits erwähnt, sind für den intrazellulären Transport von Hypericin Serumproteine notwendig [202]. Hypericin ist vornehmlich an low-density-Proteine (LDL) gebunden. Kleinere Anteile konnten mit high-density-Proteinen (HDL) oder very low-density-proteins durch Ultrazentrifugation [191] sowie Spektroskopie assoziiert werden [191, 203]. Die Bindung von Hypericin an HDL könnte somit darauf hinweisen, dass ein möglicher Aufnahmemechanismus von Hypericin in die Zelle die rezeptor-vermittelte Endozytose sein könnte. Dies konnte zuvor schon von Dougherty et al. für Photosensibilisatoren der Porphyringruppe gezeigt werden [204]. Diese weisen bei Körpertemperatur eine Affinität zu low-density-Lipoproteinen (LDL) auf. Diese Assoziation zwischen Photosensibilisator und Lipoprotein, so Soncin et al. [205] könnte in einer selektiven Abgabe der Substanz in Tumorzellen resultieren, da viele verschiedene Tumorzellen eine große Anzahl an LDL-Rezeptoren exprimieren. Letztere vermitteln schließlich die Internalisation des an das Protein gebundenen Photosensibilisator mittels Endozytose [205].

Diese Hypothese könnte insbesondere für Glioblastomzellen von besonderer Relevanz sein, da diese eine sehr große Anzahl von LDL-Rezeptoren (mehrere Hundert bis Tausend pro Einzel-Zelle) aufweisen.

Nach zellulärer Aufnahme über LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose erfolgt eine direkte Weiterleitung an das lysosomale Kompartiment für den Ablauf weiterer Prozesse [206]. Allerdings brachten die experimentellen Untersuchungen zur Fluoreszenzmikroskopie bei vorliegender Arbeit wiederum zum Vorschein, dass Lysosomen, wie in Abbildung 36 ersichtlich, nicht der primäre Lokalisationsort von Hypericin in Glioblastomzellen nach zweistündiger Inkubation zu sein scheinen.

Aufgrund einer nur sehr kurzen Überlebenszeit ist die Diffusionslänge von Singulett-Sauerstoff auf ein paar Dutzend Nanometer innerhalb der zellulären Umgebung begrenzt [207]. Deshalb ist die unmittelbare Nachbarschaft des

Lokalisationsortes der Substanz und der Schädigungsort Voraussetzung für eine PDT.

Obwohl wie bereits beschrieben für alle drei untersuchten Glioblastomzelllinien keine Akkumulation innerhalb von Mitochondrien gefunden worden war, gibt es hierzu genügend Hinweise innerhalb der Literatur, dass Mitochondrien bei der Anwendung der PDT den primären Schädigungsort darstellen [197, 208, 209, 210]. Somit scheint eine äußerst geringe Menge an Hypericin bereits ausreichend zu sein, um eine suffiziente licht-induzierte Zellschädigung auf mitochondrialer Ebene hervorzurufen, welche schließlich zum apoptotischen Zelltod führt. Dies wurde, wie kürzlich von Agostinis et al. [211] veröffentlicht, bereits für eine Vielzahl von Zelllinien, einschließlich der Glioblastomzellen, untersucht.

Wie jedoch aktuell mit der Methode der TIRFM im Rahmen der vorliegenden Arbeit demonstriert, induziert die Lokalisation von Hypericin in der Zellmembran wahrscheinlich die Schädigung einzelner Membrankomponenten [212, 213] und daraus resultierend einen nekrotischen Zelltod.

Schließlich wurde bewiesen, dass das Verhältnis von durch einer photodynamischen Therapie mittels Hypericin induziertem apoptotischen und nekrotischen Zelltod sowohl von der applizierten Dosis der Substanz und der Lichtdosis als auch vielleicht von der genetischen Herkunft der Zelle an sich abhängt [211].

### **Schlußfolgerung**

Abschließend ist zu sagen, dass mit vorliegender Arbeit bewiesen werden konnte, dass Glioblastomzellen effektiv unter Anwendung der PDT mittels Hypericin inaktiviert werden können. Dies gilt bereits für kurze Inkubationszeiten (2 h) und einer Exposition mit nur geringen Lichtdosen. Aufgrund seiner Lipophilie scheint sich Hypericin vorzugsweise innerhalb zellulären Membranen, einschließlich der Plasmamembran, anzureichern. Zusätzlich zu seiner geringfügigen Zytotoxizität (Dunkeltoxizität) weist Hypericin verschiedene biologische Eigenschaften wie die Inhibition von Zellproliferation und Signaltransduktion [214, 215] auf, was wiederum von zusätzlichem Vorteil für

die Behandlung maligner Gliome sein könnte. Diese in vitro gewonnenen Ergebnisse sind ermutigend und wegweisend für den Einsatz der photodynamischen Therapie mit dem Photosensibilisator Hypericin und rechtfertigen eine weitere Evaluation dieser Therapieform von malignen Gliomen im Rahmen von Tierexperimenten.

## 5. Zusammenfassung

Gliome imponieren morphologisch durch ausgeprägte Heterogenität und wachsen diffus infiltrierend. Bei einer mittleren Überlebenszeit von weniger als einem halben Jahr (4,9 Monate) ist die Prognose erschreckend. Die bisher therapeutisch etablierten und applizierten Methoden wie die radikale Resektion sowie adjuvante Radiatio und simultane Chemotherapie verbessern diese nur unerheblich.

Gerade in Anbetracht des diffus-infiltrierenden Wachstums dieser Tumorentität ist eine exakte nicht nur präoperative, sondern vor allem intraoperative Tumoridentifizierung und -lokalisierung erforderlich, um die initial notwendige Radikalität des chirurgischen Eingriffs umsetzen zu können. Weiterhin sind suffizientere und effektivere adjuvante Therapieformen nicht nur zur Verlängerung der Überlebenszeit, sondern auch für eine humane palliative Verbesserung der Lebensqualität gefragt.

Die photodynamische Therapie ist ein Verfahren in der Tumorthherapie, welches mittels der Kombination aus Licht, einem Photosensibilisator und Sauerstoff Tumorgewebe selektiv zu schädigen vermag und eine vielversprechende Erweiterung der Therapie der konventionellen Radiatio darstellt.

Die Substanz Hypericin weist vielerlei chemische und biologische Eigenschaften auf und gewann in den letzten Jahren im Bereich der onkologischen Forschung, Diagnostik und Therapie mehr und mehr an Bedeutungen. In vielen Fachbereichen wie beispielsweise der Dermatologie, und Urologie hat sich das Fluorophor in ersten klinischen Studien bereits als erfolgversprechend erwiesen.

Hinsichtlich seines Einsatzgebietes in der Neuroonkologie wurde gerade im letzten Jahrzehnt neues Forschungsterrain von größter Brisanz erschlossen. Klinische Studien hierzu wurden bereits durchgeführt.

Die Substanz Hypericin bietet nicht nur Potential als Fluoreszenzmarker, sondern auch als Photosensibilisator. Diese Eigenschaften sind optimal für eine intraoperative wie auch adjuvante photodynamische Anwendung von Hypericin bei malignen Gliomen, insbesondere hinsichtlich der erwähnten Problematik

des invasiven Wachstums dieser Tumorspezies und deren konsekutiver schlechter Prognose.

Diese These konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels einer standardisierten in-vitro-Charakterisierung von Hypericin unter Anwendung quantitativer (FACS) und qualitativer Messverfahren (Fluoreszenzmikroskopie) bestätigt werden.

Fokus vorliegender Arbeit war allerdings nicht nur die Eignung der Substanz für die PDT von Gliomen, sondern damit verbunden auch das genauere Verständnis ihres zellulären Aufnahmemechanismus. Es wurden somit als quantitative Parameter Zytotoxizität, Phototoxizität sowie die intrazelluläre Akkumulation und Lokalisation von Hypericin systematisch ermittelt. Nach Bestimmung der optimalen Bestrahlungs-Wellenlänge wurde die Phototoxizität in Abhängigkeit von der Wellenlänge und der Energiedichte evaluiert.

Fluoreszenzmikroskopische und -spektroskopische Untersuchungen ermöglichten es darüber hinaus, qualitative Aussagen über die intrazelluläre Lokalisation und die mikrozelluläre Umgebung des Photosensibilisators zu treffen.

### **Zytotoxizität**

Bei der Evaluation der optimalen Inkubationskonzentration für alle weiteren Experimente erwiesen sich 2.5  $\mu\text{M}$  Hypericin unter dem Aspekt einer geringen Zytotoxizität am optimalsten.

Die zytotoxischen Effekte von Hypericin erwiesen sich nämlich bei allen im Rahmen dieser Fragestellung durchgeführten Experimente als äusserst gering und waren allenfalls bei ansteigenden Inkubationskonzentrationen ( $> 5 \mu\text{M}$ ) oder längeren Inkubationszeiten (24 Stunden) zu beobachten.

Die Zellvitalität betrug hierbei jedoch für sämtliche Versuche und alle Zelllinien nie weniger als 87,5% für eine maximale Inkubationskonzentration mit 10  $\mu\text{M}$  Hypericin.

### **Intrazelluläre Akkumulation**

Versuche zur intrazellulären Akkumulation von Hypericin ergaben eine optimale Inkubationzeit von 2 Stunden für alle weiterführenden Experimente. Bei diesen

experimentellen Untersuchungen zeigte sich ein Anstieg der zellulären Fluoreszenz bis zu einer Inkubationskonzentration von 5  $\mu\text{M}$ . Inkubationskonzentrationen größer 5  $\mu\text{M}$  resultierten in einem steady state. Bis zu einer Inkubationszeit von 6 Stunden war ein nahezu linearer Anstieg der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen, wohingegen bei höheren Konzentrationen eine rasche Aufnahme der Substanz bis zu 2 Stunden und anschließend eine Sättigung zu verzeichnen war. Außerdem führte eine Verlängerung der Inkubationszeit bis zu 6 Stunden zu einer deutlich verringerten Hypericinfluoreszenz im Vergleich.

Somit erwiesen sich eine Hypericinkonzentration von 2.5  $\mu\text{M}$  und eine Inkubationszeit von 2 Stunden als optimale Parameter für die im Anschluss erfolgten Experimente zur Phototoxizität.

### **Zellulärer Transportmechanismus**

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass es sich beim Transportmechanismus von Hypericin unter Anbetracht der zum Zellmetabolismus durchgeführten Versuche um einen energieabhängigen und somit aktiven Transport handelt. Hierbei ist anzunehmen, dass dieser über eine rezeptorvermittelte Pino- oder Endozytose erfolgt.

### **Phototoxizität und Aktionsspektrum**

Hypericin zeigte zusätzlich zu seiner Eigenschaft der minimalen Zytotoxizität außerdem das Potential einer maximal phototoxischen Substanz und ist also für eine PDT von zweifachem Vorteil.

Ein selbst generiertes Aktionsspektrum ergab eine optimale Wellenlänge von 595 nm für alle weiteren Versuche zur Phototoxizität von Hypericin.

Eine Reduktion der Zellzahl um 50% wurde bereits bei geringen Energiedichten zwischen 0.15 und 0.20  $\text{J}/\text{cm}^2$  und dies bei einer Inkubationskonzentration von nur 2.5  $\mu\text{M}$  erreicht.

Bei den Untersuchungen zur Zytotoxizität hatte sich bereits eine erhöhte Sensitivität der Zelllinie U373 MG im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien (LN 229 und T98G) gezeigt. Auch bei den Experimenten zur Phototoxizität erwies

sich diese Zelllinie erneut als sensitiver. Schlussfolgerung dieser Beobachtungen ist demnach das Vorliegen eines Zusammenhanges zwischen intrazellulärer Akkumulation und photodynamischem Effekt.

### **Intrazelluläre Lokalisation**

Die qualitative Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von Hypericin zeigte, dass sich die Substanz massgeblich in der perinukleären Region und der Nukleusmembran akkumuliert. Weiterhin konnte mittels der innovativen Methode der TIRFM bewiesen werden, dass sich Hypericin aufgrund seiner Lipophilie ebenfalls in der Plasmamembran anreichert. Eine Lokalisation von Hypericin in Mitochondrien und/oder Lysosomen konnte im Rahmen dieser Arbeit ausgeschlossen werden.

### **Schlußfolgerung**

Unter Zusammenschau aller durchgeführten Experimente kann subsummiert werden, dass Hypericin einen geeigneten, minimal zytotoxischen und maximal phototoxischen Photosensibilisator für eine effektive PDT bei malignen Gliomen darstellt. Mit dieser Arbeit konnten somit neue wissenschaftlich interessante Erkenntnisse für eine weiterführende in-vivo-Evaluation im Rahmen von Tierexperimenten gewonnen werden.



## 6. Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, (2002)
2. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 64(19):6892-9, (2004)
3. Radhakrishnan K, Bohnen NI, Kurland LT. Epidemiology of brain tumors. In: Brain tumor. A comprehensive Text. Morantz R, Walsh JW (Eds.). Marcel Dekker: New York, 1-18, (1994)
4. Codd MB, Kurland LT. Descriptive epidemiology of primary intracranial neoplasms. *Prog Exp Tumor Res* 29:1-11, (1985)
5. Stupp R, Janzer RC, Hegi ME, Villemure JG, Mirimanoff RO. Prognostic factors for low-grade gliomas. *Semin Oncol.* 30(6 Suppl 19):23-8, (2003)
6. Lesser GJ, Grossman SA. Tumor review. The chemotherapy of adult primary brain tumors. *Cancer Treat Rev* 19:261-81, (1993)
7. Kim TS, Haliday AL, Hedley-Whyte ET, Convery K. Correlates of survival and the Daumas-Duport grading system for astrocytomas. *J Neurosurg* 74:27-37, (1996)
8. Ammirati M, Vick N, Liao Y, Ciric I, Mikhael M. Effect of the extent of surgical resection on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastomas and anaplastic astrocytoma, *Neurosurgery* 21(2):201-206, (1987)
9. Buckner JC. Factors influencing survival in high-grade gliomas, *Semin Oncol.* 30(6 Suppl 19):10-4. Review, (2003 Dec.)
10. Fadul C, Wood J, Thaler H, Galicich J, Patterson RH jr, Posner JB. Morbidity and mortality of craniotomy for excision of supratentorial gliomas. *Neurology* 38:1374-9, (Sep.1988)
11. Ritz R, Müller M, Weller M, Dietz K, Kuci S, Roser F and Tatagiba M. Hypericin: a promising fluorescence marker for differentiating between glioblastoma and neurons in vitro. *Int J Oncol.* 27:1543-1549, 2005
12. Furnari FB, Huang H-J S, Cavenee WK. Genetics and malignant progression of human brain tumors, *Cancer Surv.*, 25, 233-275, (1995)
13. Bruner, J M Neuropathology of malignant gliomas. *Semin Oncol* 21: 126-138, (1994)
14. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas, *Acta Neuropathol (Berl)* 109(1):93-108, (2005)
15. Kleihues, P, Louis, DN, Scheithauer, BW, Rorke, LB, Reifenberger, G, Burger, PC, Cavenee, WK. The WHO classification of tumors (2002), *Neuropathol Exp Neurol* 61 (3):215-225 (2002)
16. Russell, DS, Rubinstein, LJ. Tumors of central neuroepithelial origin, in *Pathology of Tumors of the Nervous System* (ed 5), Baltimore, MD, Williams & Wilkins, 83-219, (1989)
17. Burger PC, Heinz ER, Shibata T, et al. Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme, *J Neurosurg* 68: 698-704, (1998)
18. Kelly PJ, Daumas-Duport C, Scheithauer BW, et al. Stereotactic histologic correlations of computed tomography and magnetic resonance imaging-defined abnormalities in patients with glial neoplasms *Mayo Clin Proc* 62:450-459, (1987)
19. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.*114(2):97-109, (2007)
20. Hufschmidt A, Lücking CH. *Neurologie compact*, 3. Auflage, Thieme Verlag, S 165, (2003)
21. Burger PC, Green SB. Patient age, histologic features and length of survival in patients with glioblastoma multiforme, *Cancer* 59: 1617-1625, (1987)
22. Fulling KH, Nelson JS. Cerebral astrocytic neoplasms in the adult: Contribution of histologic examination to the assessment of prognosis *Semin Diagn Pathol* 1:152-163, (1984)
23. Nelson JS, Tsukada Y, Schoenfeld D, et al. Necrosis as a prognostic criterion in malignant supratentorial, astrocytic gliomas, *Cancer* 52:550-554, (1983)

24. Riede UN, Schaefer HE. Allgemeine und spezielle Pathologie, Thiemeverlag, 3. Auflage, S 1078, (1993)
25. Giese A, Westphal M. Glioma invasion in the central nervous system, *Neurosurgery* 39:235-53, (1996)
26. Burger PC, Dubois PJ, Schold SC, Odom GL, Crafts DC, Giangaspero F. Computerized tomographic and pathologic studies of untreated, quiescent and recurrent glioblastoma multiforme, *Neurosurg* 58:159-169, (1983)
27. Maxwell HP. The incidence of interhemispheric extension of glioblastoma multiforme through the corpus callosum, *Neurosurgery* 3:54-57, (1946)
28. Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities, *Cell* 64:867-869, (1991)
29. Matsukado J, MacCarty CS, Kernaghan JW. The growth of glioblastoma multiforme in neurosurgical practice, *J Neurosurg* 18:636-644, (1961)
30. Arita N, Taneda M, Hayakawa T. Leptomeningeal dissemination of malignant gliomas: Incidence, diagnosis and outcome, *Acta Neurochir (Wien)* 126:84-92, (1994)
31. Ehrlich SS, Davis RL. Spinal subarachnoid metastasis from primary intracranial glioblastoma multiforme, *Cancer* 42:2854-2864, (1978)
32. Berger MS, Baumeister B, Geyer JR, Milstein J, Kanev PM, LeRoux PD. The risks of metastases from shunting in children with primary central nervous system tumors, *J Neurosurg* 74:872-877, (1991)
33. Pasquier P, Pasquier B, N'Golet A, Panh MH, Couderc P. Extraneural metastases of astrocytomas and glioblastomas: Clinicopathological study of two cases and review, *Cancer* 45: 112-125, (1980)
34. Ferlay J, Bray F, Parkin DM. *Globocan 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide*, IARC Press Lyon
35. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. *Cancer incidence in five continents*, IARC Press, Lyon, (2002)
36. Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, Rohde V, Opperl F, Turowski B, Woiciechowsky C, Franz K, Pietsch T; ALA-Glioma Study Group. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery* 62(3):564-76; discussion 564-76 (2008)
37. Gilbert, MR. The treatment of malignant gliomas. *Curr Treat Options Neurol* 7 (4): 293-303 (2005)
38. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *N Engl J Med.* Mar 10;352(10):987-96, (2005)
39. Commission Internationale de l'Eclairage CIE: Blue light photochemical retinal hazard. 138/1 CIE TC 6-14, report, Wien (2000)
40. Hippokrates in: Fuchs R (Hrsg). *Sämtliche Werke*. München, 1895-1900, Bd 2, S 254-5
41. Wiedenmann R, Nienhaus GU. Leuchtende Proteine als Forschungsobjekte – und Assistenten. *Uni Ulm intern* 256: 8-10 (2002)
42. Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M, *Klinische Fluoreszenzdiagnostik und PDT*, BlackWell Verlag, S 1-11
43. Lentner A. *Von der Heliotherapie der Antike zur Ultravioletten Phototherapie*. Promotionsarbeit, Düsseldorf, (1990)
44. Kuske H. Percutane Photosensibilisierung durch pflanzliche Wirkstoffe. *Dermatologica* 82:274-338, (1940)
45. Raab O. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Z. Biol.* 39: 524-526 (1900);
46. Von Tappeiner H. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. *Muench. Med. Wochenschr.* 47: 5-7 (1900)
47. Von Tappeiner H, Jesionek A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Muench. Med. Wochenschr.* 47: 2042-2044 (1903)

48. Von Tappeiner H. Die photodynamische Erscheinung. In: Ergebnisse der Physiologie, L. Asher, K. Spiro (eds). Verlag von J. F. Bergmann, Wiesbaden: 698-741 (1909)
49. Hausmann W. Die sensibilisierende Wirkung tierischer Farbstoffe und ihre physiologische Bedeutung. Wien Klin Wochenschr 21:1527-8 (1908)
50. Meyer-Betz F. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenstoffs. Dtsch. Arch. klin. Med. 112: 476-503 (1913)
51. Policard A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinées a la lumière de Wood. C. R. Soc. Biol. 91: 1423-1428 (1924)
52. Auler, H, Banzer G. Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei Geschwulstkrankheiten von Menschen und Tieren. Z. Krebsforsch. 53: 65-68 (1942)
53. Figge FJH, Weiland GS, Manganiello LOJ. Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 68: 640-641 (1948)
54. Figge FJH. Relationship of pyrrol compounds to carcinogenesis. In: F. R. Moulton (ed.) A. A. S. Res. Conf. on Cancer, Washington, Am. Assoc. Adv. Sc.: 117-128 (1944)
55. Lipson RL, Baldes EJ. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivate. Arch. Dermatol. 82: 508-516 (1960)
56. Lipson L. The photodynamic and fluorescent properties of a particular hematoporphyrine derivate and its use in tumor detection. Masters thesis, University of Minnesota, Minneapolis, (1960)
57. Lipson L, Baldes EJ, Olsen AM Hematoporphyrine derivate: a new aid of endoscopic detection of malignant disease J Thoracic Cardiovasc surg 42:623-9, (1961)
58. Lipson L, Baldes EJ, Olsen AM. A further evaluation of the use of hematoporphyrine derivate as a new aid for the endoscopic detection of malignant disease. Dis Chest 46:676-9, (1964)
59. Lipson L, Pratt JH, Baldes EJ, Dockerty MB Hematoporphyrine derivate for detection of cervical cancer Obstet Gynecol 24:78-84, (1964)
60. Dougherty J, Kaufmann JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors Cancer res 38:2628-35, (1978)
61. Kennedy JC, Pottier RH & Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. J. Photochem, Photobiol. B, Biol. 6:143-148, (1990)
62. Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M, Klinische Fluoreszenzdiagnostik und PDT, BlackWell Verlag, 15-27
63. Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M, Klinische Fluoreszenzdiagnostik und PDT, BlackWell Verlag, 73
64. Spikes DJ. Photochemotherapy: molecular and cellular processes involved. Advances in Photochemotherapy, Proc. SPIE Vol. 997: 92-100, (1988)
65. Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M, Klinische Fluoreszenzdiagnostik und PDT, BlackWell Verlag, 31
66. Chatlani PT et al. Selective necrosis in hamster pancreatic tumours using photodynamic therapy with phthalocyanine photosensitization. Br J Surg 79:786-790, (1992)
67. Gad F, Viau G, Boushira M, Bertrand R and Bisonette R. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid induces apoptosis and caspase activation in malignant T cells. J Cutan Med Surg 5:8-13, (2001)
68. Kim HR, Luo Y, Li G and Kessel D. Enhanced apoptotic response to Photodynamic therapy after bcl-2 transfection. Cancer Res 59:3429-3432, (1999)
69. Salet C, Moreno G and Ricchelil F. Effects of Photofrin photodynamic action on mitochondrial respiration and superoxide radical generation. Free Radic. Res. 26, 201-208, (1997)
70. Krammer B. Vascular effects of photodynamic therapy. Anticancer Research 21: 4271-4277, (2001)
71. Ris HB, Altermatt HJ, Inderbitzi R, Hess R, Nachbur B, Stewart CM, Wang Q, Lim CK, Bonnett R, Berenbaum MC, Althaus U. Photodynamic therapy with chlorins for diffuse malignant mesothelioma: initial clinical results. British Journal of Cancer 64: 1116-1120, (1991)

72. Gollnick SO, Liu X, Owczarczak B, Musser DA and Henderson BW. Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy in vivo. *Cancer Res* 57:3904-3909, (1997)
73. Herman S, Kalechman Y, Gafter U, Sredni B and Malik Z. Photofrin II induces cytokine secretion by mouse spleen cells and human peripheral mononuclear cells. *Immunopharmacology* 31:195-204,(1996)
74. Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M, *Klinische Fluoreszenzdiagnostik und PDT*, BlackWell Verlag, 29-38
75. Wolf, P. PDT (PDT). *Der Hautarzt* 48(2): 137-148 (1997)
76. Pass H I. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *Journal of the National Cancer Institut* 85(6): 443-456 (1993)
77. Ma L, Moan J, Berg K. Evaluation of a new Photosensitizer, meso-tetra-hydroxyphenylchlorin, for use in Photodynamic Therapy: A Comparison of its Photobiological Properties with those of two other Photosensitizers. *Int. Journal of Cancer* 57: 883-888, (1994)
78. Ell CH, May A, Gossner L, et al. Endoscopic mucosal resection of early gastric cancer and highgrade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology*. 118: 670-7, (2000)
79. Wilson BC. Photodynamic therapy for cancer: principles. *Can. J. Gastroenterol* 16: 393-396, (2002)
80. Kennedy JC and Pottier RH. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 14, 275-292, (1992)
81. Hausmann F. *Neue 5-Aminolävulinsäureester in Tumorthherapie und Tumordiagnostik*. Dissertation 2002, Regensburg.
82. Navone NM, Polo CF, Frisardi AL, Andrade NE, Battle AM. Heme biosynthesis in human breast cancer--mimetic "in vitro" studies and some heme enzymic activity levels. *Int. J. Biochem*:1407-1411, (1990)
83. Norata G, Cauti G, Ricci L, Nicolin A, Trezzi E, & Catopano AL. In vitro assimilation of low density lipoproteins by a fibrosarcoma tumor line in mice. *Cancer Lett.*, 25: 203, (1984)
84. Divaris DX, Kennedy JC, Pottier RH. Phototoxic damage to sebaceous glands and hair follicles of mice after systemic administration of 5-aminolevulinic acid correlates with localized protoporphyrin IX fluorescence. *Am J Pathol.* Apr;136(4):891-7, (1990)
85. Pariser DM, Lowe NJ, Stewart DM, Jarratt MT, Lucky AW, Pariser RJ, Yamauchi PS. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: results of a prospective randomized multicenter trial. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48: 227-232, (2003)
86. Shackley DC, Briggs C, Gilhooley A, Whitehurst C, O'Flynn KJ, Betts CD, Moore JV, Clarke NW Photodynamic therapy for superficial bladder cancer under local anaesthetic. *BJU Int.* 89: 665-670, (2002)
87. Barnett AA, Haller JC, Cairnduff F, Lane G, Brown SB, Roberts DJ. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Cancer* 103: 829-832, (2003)
88. Keefe KA, Tadir Y, Tromberg B, Berns M, Osann K, Hashad R, Monk BJ. Photodynamic therapy of high-grade cervical intraepithelial neoplasia with 5-aminolaevulinic acid. *Laser Surg. Med.* 31: 289-293, (2002)
89. Varma S, Willson H, Kurwa HA, Gambles B, Charma C, Pearse AD, Taylor D, Vanstey A. Bowen's disease, solar keratoses and superficial basal cell carcinomas treated by photodynamic therapy using a large-field incoherent source. *Br. J. Dermatol.* 144: 567-574, (2001)
90. Tan WC, Fulljames C, Stone N, Dix AJ, Shepherd N, Roberts DJ, Brown SB, Krasner N, Barr H. Photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid for oesophageal adenocarcinoma associated with Barrett's metaplasia. *J. Photochem. Photobiol.* 53: 75-80, (1999)
91. Mlkvy P, Messmann H, Regula J, Conio M, Pauer M, Millson CE, MacRobert AJ, Bown SG. Sensitization and photodynamic therapy (PDT) of gastrointestinal tumors with 5-aminolaevulinic acid (ALA) induced protoporphyrin IX (PPIX). A pilot study. *Neoplasma*. 42(3):109-13, (1995)
92. Prince FG, Juknat AA, Battle C. Porphyrinogenesis in rat cerebellum. Effect of high  $\delta$ -aminolaevulinic acid concentration. *Gen. Pharmacol.* 25: 761-766, (1994)

93. Juknat AA, Kotler ML, Batlle AM. High  $\delta$ -aminolaevulinic acid uptake in rat cerebral cortex: effect on porphyrin biosynthesis. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 111: 143-150, (1995)
94. Stummer W, Stocker S, Wagner W, Stepp H, Fritzscher C, Goetz C, Goetz AE, Kiefmann R, Reulen HJ. Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence. *Neurosurgery* 42: 518-526, (1998)
95. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ; ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 7(5):359-60 (2006)
96. Reference Substance-Masterfile – Phytochem – Natural Compounds – 2005. *Phytochem Referenzsubstanzen GbRmbH*
97. Lavie G, Mazur Y, Lavie D, Meruelo D. The chemical biological properties of hypericin- a compound with a broad spectrum, *Med Res Rev* 1995; 15 (2):111-19 (1995)
98. Brockmann H. *Progress. In Org. Chem*, pp 66-82
99. Giese, AC. *Photochem. Photobiol. Rev.* 5, 229 (1980)
100. Brockmann H, von Falkenhausen EH, Neeff R, Dorlars A, Budde G. Die Konstitution des Hypericins, *Chem.Ber.* 84: 865-887 (1951)
101. Brockmann H, Kluge F, Muxfeldt H. Totalsynthese des Hypericins. *Chem. Ber.* 90: 2302-2318 (1957)
102. Cerny C. Hoppe Seyler's. *Z. Physiol. Chem.* 73: 371-382 (1911)
103. Anker L, Gopalakrishna R, Jones KD, Law RE, Couldwell WT. Hypericin in adjuvant brain tumor therapy, *Drugs of the Future*, 20 (5): 5111-517, (1995)
104. Ehrenberg B, Anderson JL, Foote CS. Kinetics and yield of singlet oxygen photosensitized by hypericin in organic and biological media, *J. Photochem. Photobiol.*68(2): 135-40 (1998)
105. Meruelo D, Lavie G, Lavie D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: Aronatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin, *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5230-4, (1988)
106. Roth L. *Hypericum-Hypericin. Botanik, Inhaltsstoffe, Wirkung., In: Editor. Ecomed Arzneipflanzen-Monographie, ed. Series. Landsberg/Lech: Ecomed., (1990)*
107. Wirz A, Simmen U, Heilmann J, Calis I, Meier B, Sticher O. Bisanthraquinone glycosides of *Hypericum perforatum* with binding inhibition to CRH-1 receptors *Phytochemistry* 55: 941-947, (2000)
108. Frohne D, Jensen U. *Systematik des Pflanzenreichs - unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen* Wiss. Verl. Ges. mbH, Stuttgart, (1998)
109. Duran N and Song PS. Hypericin and its photodynamic action. *Photochem. Photobiol.* 43, 677 (1986)
110. Perry LM. *Medical plants of East and Southeast Asia.* The MIT Press: Cambridge/London 176, (1980)
111. Blum H. *Photodynamic Action and diseases caused by light*, Hafner New York, (1964)
112. Pace N. The etiology of Hypericism, a photosensitivity produced by *St. Johnswort*, *Am J Physiol* 136:650-656, (1942)
113. Harrison, P. Herbal medicine takes root in Germany. *Cmaj* 158(5):p. 637-9, (1998)
114. Chatterjee SS, Noldner M, Koch E, Erdelmeier C. Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: the neglected possibility. *Pharmacopsychiatry* 31(suppl 1):7-15, (1998)
115. Lawvere S und Mahoney M. *St.John's wort*, *American Family Physician* 72:2249-2254, (2005)
116. Muller WE. Current *St John's wort* research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol Res* 47:101-9), (2003)
117. Suzuki O, Katsumata Y, Oya M, Bladt S, Wagner H. Inhibition of monoaminoxidase by hypericin. *Planta Med* 50 (3): 272-4, (1984)
118. Müldner H, Zoller M. Antidepressive effect of a Hypericin extract standardized to the active hypericin complex. *Biochemical and clinical studies, Arzneim-Forschung/Drug Res*, 918-20, (1984)
119. Thiede HM, Walper A. Inhibition of MAO and COMT by hypericum extracts and hypericin. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7(suppl 1):S54-6, (1994)

120. Muller WE, Singer A, Wonnemann M, Hafner U, Rolli M, and Schafer C. Hyperforin represents the neuro-transmitter reuptake inhibiting constituent of hypericin extract, *Pharmacopsychiatry*, 31 Suppl 1: p.16-21, (1998)
121. Neary JT, Whittemore SR, BU Y, Mehta H, Shi YF. Biochemical mechanisms of action of Hypericum LI 160 in glial and neuronal cells: inhibition of neurotransmitter uptake and stimulation of extracellular signal regulated protein kinase. *Pharmacopsychiatry* 34:103-107, (2001)
122. Muller WE, Rolli M, Schafer C and Hafner U. Effects of hypericum extract (LI 160) in biochemical Models of antidepressant activity., *Pharmacopsychiatry*, 30 Suppl 2:102-7, (1997)
123. Thiele B, Brink I and Pwell M. Modulation of cytokine expression by hypericum extract, *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 7 Suppl 1: p. S602, (1994)
124. Calapai G, Crupi A, Firenzuoli F, Inferrera G, Ciliberto G, Parisi A, De Sarro, G, and Caputi AP. Interleukin-6 involvement in antidepressant action of Hypericum perforatum, *Pharmacopsychiatry*, 34 Suppl1: p. S8-10, (2001)
125. Simmen U, Higelin J, Berger-Buter K, Schaffner W and Lundstrom K. Neurochemical studies with St. John's wort in vitro, *Pharmacopsychiatry*,34 Suppl 1:137-42, (2001)
126. Kraus GA, Pratt D, Tossberg J, Carpenter S. Antiretroviral activity of synthetic hypericin and related analogs. *Biochem Biophys Res Commun* (1990), 172(1): p. 149-53.
127. Hudson JB, Lopez-Bazzocchi I, Towers GH. Antiviral activities of hypericin. *Antiviral Res* (1991), 15(2): p. 101-12.
128. Tang J, Colacino JM, Larsen SH, Spitzer W. Virucida activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses, *Antiviral Res* 13:313-26, (1990)
129. Schinazi RF, Chu CK, Babu JR et al. Anthraquinones are a new class of antiretroviral agents against immunodeficiency virus, *Antiviral Res* 13:265-72, (1990)
130. Takashi I, Nakanishi S, Kobayashi E, Nakano H, Suzuki K, Tamaoki T. Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: Possible relation to their antiretroviral activity. *Biochem Biophys Res Commun* 165:1207-12, (1989)
131. Lavie G, Valentine F, Levin B et al. Studies of the mechanisms of action of the antiretroviral agents hypericin and pseudohypericin, *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5963-8, (1989)
132. Gulick R, Lui H, Anderson R, Kollias N, Hussey S, Crumpacker C. Juman hypericism: A photosensitivity reaction to hypericin (St. John's wort). 8<sup>th</sup> Int Conf AIDS (July 19-24, Amsterdam) Abst PoB3018, (1992)
133. Jacobson JM, Feinman L, Liebes L, Ostrow N, Koslowski V, Tobia A, Cabana BE, Lee D, Spritzler J, Prince AM. Pharmacokinetics, safety, and antiviral effects of hypericin, a derivative of St. John's wort plant, in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 45(2): p. 517-24, (2001)
134. Gulick RM, McAuliffe V, Holden-Wiltse J, Crumpacker C, Liebes L, Stein DS, Meehan P, Hussey S, Forcht J, Valentine FT. Phase I studies of hypericin, the active compound in St. John's Wort, as an antiretroviral agent in HIV-infected adults. *AIDS Clinical Trials Group Protocols*, (1999)
135. Cooper WC, James J. An observational study of safety and efficacy of hypericin in HIV+subjects. 6<sup>th</sup> Int Conf AIDS (June 20-24, San Francisco), Abst 2063, (1990)
136. Steinbeck-Klose A, Wernet P. Successful long term treatment over 40 months of HIV patients with intravenous hypericin. 9<sup>th</sup> Int Conf AIDS (June 6-11, Berlin), Abst PO-B26-2002, (Berlin)
137. Avato P, Raffo F, Guglielmi G, Vitali C, Rosato A). Extracts from St John's Wort and their antimicrobial activity; *Phytother Res*.18(3):230-2), (2004)
138. Schempp CM, Pelz K, Wittmer A, Schopf E and Simon JC. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant Staphylococcus aureus and gram-positive bacteria. *Lancet*, 353(9170):2129, (1999)
139. Hartwell JL, Guttiferae. In: *Plants used against cancer: a survey*. Hartwell JL (Ed).Quaternary Publications 239-41, (1982)
140. Thomas C, MacGill RS, Miller GC, Patdini RS. Photoactivation of hypericin generates singlet-oxygen in mitochondria and inhibits succinoxidase *Photochem Photobiol* 55:47-53, (1992)

141. Pisani DE, Elliot AJ, Hinmann DR, Aaronson LA, Pardini RS. Relationship between inhibition of mitochondrial respiration by naphtoquinones, their antitumot activity, and their redox potential, *Biochem Pharamcol* 35:3791-8, (1986)
142. Thomas C and Pardini RS. Oxygen dependence of hypericininduced phototoxicity to EMT6 mouse mammary carcinoma cells, *Photochem Photobiol*, 55(6):831-7, (1992)
143. Zhang W, Lawa RE, Hinton DR, Su Y and CouldWell WT. Growth inhibition and apoptosis in human neuroblastoma SK-N-SH cells induced by hypericin, a potent inhibitor of protein kinase C *Cancer Lett* 96:31-35, (1995)
144. Vantiegheem A, Assefa Z, Vandenabeele P, Declercq W, Courtois S, Vandenheede JR, Merlevede W, de Witte P and Agostinis P. Hypericin-induced photosensitization of HeLa cells leads to apoptosis or necrosis. Involvement of cytochrome c and procaspase-3 activation in the mechanism of apoptosis. *FEBS Lett*, 440(1-2):19-24, (1998)
145. Colasanti A, Kisslinger A, Liuzzi R, Quarto M, Riccio P, Roberti G, Tramontano D and Villani F. Hypericin photosensitization of tumor and metastatic cell lines of human prostate. *J Photochem Photobiol B*, 54(2-3):103-7, (2000)
146. Ali SM, Olivo M, Yuen GY and Chee SK. Induction of apoptosis by Hypericin through activation of caspase-3 in human carcinoma cells. *Int J Mol Med*, 8(5):521-30, (2001)
147. Blank M, Lavie G, Mandel M and Keisari Y. Effects of photodynamic therapy with hypericin in mice bearing highly invasive solid tumors. *Oncol Res* 12:409-418, (2000)
148. Xie X, Hudson, JB and Guns ES. Tumor-specific andphotodependent cytotoxicity of hypericin in the human LNCaP prostate tumorModell. *Photochem Photobiol*, 74(2):221-5, (2001)
149. Blank M, Mandel M, Hazan S, Keisari Y and Lavie G. Anticancer activities of hypericin in the dark. *Photochem Photobiol*, 74(2):120-5, (2001)
150. Kamuhabwa AR, Agostinis P, D'Hallewin MA, Kasran A and de Witte PA. Photodynamic activity in human urinary bladder carcinoma cells. *Anticancer Res* 20:2579-2584, (2000)
151. Koren H, Schenk GM, Jindra RH, Alth G, Ebermann R, Kubin A, Koderhold G and Kreitner M. Hypericin in phototherapy. *J Photochem Photobiol B*, 36(2):113-9, (1996)
152. Alecu M, Ursaciuc C, Halalau F, Coman G, Merlevede W, Waelkens E and de Witte P. Photodynamic treatment of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma with hypericin. *Anticancer Res*, 18(6B):4651-4, (1998)
153. Chung PS, Saxton RE, Paiva MB, Rhee CK, Soudant J, Mathey A, Foote C, Castro DJ. Hypericin uptake in rabbits and nude mice transplanted with human squamous cell carcinomas: study of a newn sensitizer for laser phototherapy. *Laryngoscope*, 104(12): p. 1471-6, (1994)
154. Nishizuka Y. The family of protein kinase C for signal transduction. *JAM* 262:1826-1933, (1989)
155. Chen CC. Protein kinase C alpha, delta, epsilon, and zeta in C6 glioma cells: TPA induces translocation and down-regulation of conventional and new PKC isoforms but not atypical PKC zeta. *FEBS lett* 332:189-173, (1999).
156. Couldwell WT, Uhm JH, Antel JP, Yong VW Enhanced Protein kinase C activity correlates with the growth rate of malignant gliomas in vitro. *Neurosurgery* 29:880-6, (1991)
157. Tysnes OB, Laerum OD. Differential effects of 12-O-tetradecanoyl-13-phorbol acetate (TPA) on human glioma cell growth. *Anticancer Res*.13(5A):1325-30, (1993)
158. Zhang W, Anker L, Law RE, Hinton DR, Gopalakrishna R, Pu, Q, Gundimeda, U, Weiss MH and CouldWell WT. Enhancement of radiosensitivity in human malignant glioma cells by hypericin in vitro. *Clin Cancer Res*, 2(5):843-6, (1996)
159. De Witte P, Agostinis P, Van Lint J, Merlevede W, Vandenheede JR Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by hypericin *Biochem Pharmacol*. 46(11):1929-36, (1993)
160. Agostinis P, Donella-Deana A, Cuveele J, Vandenbogaerde A, Sarno S, Merlevede W, de Witte P. A comparative analysis of the photosensitized inhibition of growth-factor regulated protein kinases by hypericin-derivatives, *Biochem Biophys Res Commun*. 220(3):613-7, (1996)
161. Couldwell WT, Gopalakrishna R, Hinton DR, He S, Weiss MH, Law RE and Apuzzo M. Hypericin: a potential antiglioma therapy. *Neurosurgery*, 35(4):705-9; discussion 709-10, (1994)

162. Schempp CM, Simon-Haarhaus B, Termeer CC, Simon, JC: Hypericin photoinduced apoptosis of Jurkat cells involves the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and activation of caspase-8. *FEBS Lett.* 493:26-30, (2001)
163. Weller M, Trepel M, Grimm C, Schabet M, Bremen D, Krajewski S and Reed JC. Hypericin-induced apoptosis of human malignant glioma cells is light-dependent, independent of bcl-2 expression, and does not require wild-type p53. *Neurol Res*, 19(5):459-70, (1997)
164. Roby CA, Anderson GD, Kantor E, Dryer DA and Burstein AH. St John's Wort: effect on CYP3A4 activity. *Clin Pharmacol Ther*, 67(5):451-7, (2000)
165. Moore LB, Goodwin B, Jones SA, Wisely GB, Serabjit-Singh CJ, Willson TM, Collins JL and Kliewer SA. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(13):7500-2, (2000)
166. Durr D, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Rentsch KM, Steinert HC, Meier PJ and Fattinger K. St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther*, 68(6):598-604, (2000)
167. Perloff MD, von Moltke LL, Stormer E, Shader RI and Greenblatt DJ. Saint John's wort: an in vitro analysis of P-glycoprotein induction due to extended exposure. *Br J Pharmacol*, 134(8):1601-8, (2001)
168. Bisonnette R, Tremblay J., Juzenas P, Boushira M, Lui H. Systemic photodynamic therapy with aminolaevulinic acid induces apoptosis in lesional T Lymphocytes of psoriatic plaques. *J. Invest. Dermatol.* 119: 77-83, (2002)
169. Itoh Y, Ninomiya Y, Tajima S, Ishibashi A. Photodynamic therapy of acne vulgaris with topical delta-aminolaevulinic acid and incoherent light in Japanese patients. *Br. J. Dermatol.* 144: 575-579, (2001)
170. Fautrel A, Chesné C, Guillouzo A, de Sousa G, Placidi M, Rahmani R, F. Braut F, J. Pichon J, H. Hoellinger H, P. Vintézou P, Diarte I, Melcion C, Cordier A, Lorenzon G, Benicourt M, Vannier B, Fournex R, Peloux AF, Bichet N, Gouy D, Cano JP and Lounes R. A multicentre study of acute in vitro cytotoxicity in rat liver cells, *Toxicol in Vitro*, 5, 543-547, (1991)
171. Vandenberghe AL, Cuveele JF, Proot P, Himpens BE, Merlevede WJ, de Witte PA. Differential cytotoxic effects induced after photosensitization by Hypericin, *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 38, 136-142, (1997)
172. Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M, *Klinische Fluoreszenzdiagnostik und PDT*, BlackWell Verlag, Bäuml W, Lichquellen, 39-58
173. Sorokin JJ & Lankard JR Stimulated emission observed from an organic dye, -aluminum phthalocyanine. *IBM J. Res. Develop.* 10:162-3, 1966
174. Kubler AC, Haase T, Staff C, Kahle B, Rheinwald M, Muhling J. Photodynamic Therapy of primary nonmelanomatous skin tumours of the head and the neck. *Lasers Surg Med* 25:60-8, (1999)
175. Messmann H, Szeimies RM, Bäuml W, Knuchel R, Zirngibl H, Scholmerich J, Holsteg A. Enhanced effectiveness of photodynamic therapy with laser light fractionation in patients with esophageal cancer. *Endoscopy* 29:275-80, (1997)
176. Barr H, Krasner N, Boulos PB, Chatlani P, Bown SG. Photodynamic therapy for colorectal cancer: a quantitative pilot study. *Br J Surg* 77:93-6, (1990)
177. Corti L, Mazzarotto R, Belfontali S, De Luca C, Baiocchi C, Boso C, Calzavara F. Photodynamic therapy in gynaecological neoplastic diseases. *J Photochem Photobiol B* 36:193-7, (1996)
178. Schweitzer VG. Photofrin-mediated photodynamic therapy for treatment of early stage oral cavity and laryngeal malignancies. *Laser Surg Med* 29:305-13, (2001)
179. Kostron H, Obwegeser A, Jakober R. Photodynamic therapy in neurosurgery: a review. *J Photochem Photobiol B* 36:157-68, (1996)
180. Nseyo UO, Shumaker B, Klein EA, Sutherland K. Photodynamic therapy using porfimer sodium as an alternative to cystectomy in patients with refractory transitional cell carcinoma in situ of the bladder. Bladder Photofrin Study Group. *J Urol* 160:39-44, (1998)



181. Waidelich R, Stepp H, Baumgartner R, Weninger E, Hofstetter A, Kriegmair M. Clinical experience with 5-aminolevulinic acid and photodynamic therapy for refractory superficial bladder cancer. *J Urol* 65:1904-7, (2001)
182. Knüchel R, *Pathologie*, 15, 1 (1994)
183. Krieg R, Dissertation, Universität Regensburg, (2001)
184. Stock K, Sailer R, Strauss W, Lyttek M, Steiner R, and Schneckenburger H. Variable-angle total internal reflection fluorescence microscopy (VA-TIRFM); realization and application of a compact illumination device. *J Microsc* 211:19-29, (2003)
185. Vandenberg SR. Current diagnostic concepts of astrocytic tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 51:644-657, (1992)
186. Barr H et al. Eradication of high-grade dysplasia in columnar-lined (Barrett's) oesophagus by photodynamic therapy with endogenously generated protoporphyrin IX. *Lancet* 348:584-585, (1996)
187. Kato H, Okunaka T and Shimatani H. Photodynamic therapy for early stage bronchogenic carcinoma. *J Clin Laser Med Surg* 14:235-238, (1996)
188. Donati G, Kapetanios AD and Pournaras CJ. Principles of treatment of choroidal neovascularization with photodynamic therapy in age-related macular degeneration. *Semin. Ophthalmol.* 14:2-10, (1999)
189. Blank M, Kostenich G, Lavie G, Kimel S, Keisari Y and Orenstein A. Wavelength-dependant properties of photodynamic therapy using hypericin in vitro and in animal Modell. *Photochem Photobiol* 76: 335-340, (2002)
190. Couladis M, Badisa RB, Baziou P, Chaudhuri SK, Pilarinou E, Verykokidou E and Harvala C. Antioxidant and cytotoxic activities of *Hypericum* sp. on brine shrimps and human cancer cell lines. *Phytother Res* 16:719-22, (2002)
191. Delaey EM, Obermueller R, Zupko I, De Vos D, Falk H and de Witte PA. In vitro study of the phototoxicity of some hypericin analogs on different cell lines. *Photochem Photobiol* 74:164-171, (2001)
192. Liu CD, Kwan D, Saxton RE and McFadden DW. Hypericin and photodynamic therapy decreases human pancreatic cancer in vitro and in vivo. *J Surg Res* 93:137-143, (2000)
193. Vanderwerf QM, Saxton RE, Chang A, Horton D, Paiva MB, Anderson J, Foote CS, Soaudant J, Mathey A and Castro DJ. Hypericin: A new laser phototargeting agent for human cancer cells *Laryngoscope* 06:479-483, (1996)
194. Weber ND, Murray BK, North JA, and Wood SG. The antiviral agent hypericin has in vitro activity against HSV-1 through non-specific association with viral and cellular membranes. *Antiviral Chem Chemother* 5:83-90, (1994)
195. Uzdensky AB, Ma LW, Lani V, Hjortland GO, Steen HB and Moan J. Intracellular localisation of hypericin in human glioblastoma and carcinoma cell lines. *Lasers Med.Sci.* 16:276-284, (2001)
196. Theodossiou T, Spiro MD, Jacobson J, Hothersall JS and MacRobert AJ. Evidence for Intracellular Aggregation of Hypericin and the Impact on its Photocytotoxicity in PAM 212 Murine Keratinocytes. *Photochem.Photobiol.* ( 2004)
197. Ali SM and Olivo M. Bio-distribution and subcellular localization of Hypericin and its role in PDT induced apoptosis in cancer cells. *Int.J Oncol.* 21:531-540, (2002)
198. Sattler S, Schaefer U, Schneider W, Hoelzl J, and Lehr CM. Binding, uptake, and transport of hypericin by Caco-2 cell monolayers. *J Pharm.Sci.* 86:1120-1126, (1997)
199. Siboni G, Weitman H, Freeman D, Mazur Y, Malik Z, and Ehrenberg B. The correlation between hydrophilicity of hypericins and helianthone: internalization mechanisms, subcellular distribution and photodynamic action in colon carcinoma cells. *Photochem.Photobiol.Sci.* 1:483-491, (2002)
200. Kamuhabwa AR, Agostinis PM, D'Hallewin MA, Baert L, and de Witte PA. Cellular photodestruction induced by hypericin in AY-27 rat bladder carcinoma cells. *Photochem.Photobiol.* 74: 126-132, (2001)
201. Huygens A, Huyghe D, Bormans G, Verbruggen A, Kamuhabwa AR, Roskams T and de Witte PA. Accumulation and photocytotoxicity of Hypericin and analogs in two- and three-dimensional cultures of transitional cell carcinoma cells. *Photochem. Photobiol.* 78:607-614, (2003)

202. Vandenberghe AL, Delaey EM, Vantieghem AM, Himpens BE, Merlevede WJ, and de Witte PA. Cytotoxicity and antiproliferative effect of hypericin and derivatives after photosensitization. *Photochem.Photobiol.* 67:119-125, (1998)
203. Kascakova S, Refregiers M, Jancura D, Sureau F, Maurizot JC, and Miskovsky P. Fluorescence Spectroscopic Study of Hypericin-photosensitized Oxidation of Low-density Lipoproteins. *Photochem.Photobiol.* 81:1395-1403, (2005)
204. Dougherty T, Gomer C, Henderson B, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, and Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 90:889-905, (1998)
205. Soncin M, Polo L, Reddi E, Jori G, Kenney ME, Cheng G, Rodgers MA. Effect of axial ligation and delivery system on the tumour-localising and -photosensitising properties of Ge(IV)-octabutoxy-phthalocyanines. *Br J Cancer.* 71(4): 727-32 (1995)
206. Li Y, Cam J, and Bu G. Low-density lipoprotein receptor family: endocytosis and signal transduction. *Mol Neurobiol* 23:53-67, (2001)
207. Moan J and Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem.Photobiol.* 53:549-553, (1991)
208. Miccoli L, Beurdeley-Thomas A, De Pinieux G, Sureau F, Oudard S, Dutrillaux B, and Poupon MF. Light-induced photoactivation of hypericin affects the energy metabolism of human glioma cells by inhibiting hexokinase bound to mitochondria. *Cancer Res* 58:5777-5786, (1998)
209. Johnson SA and Pardini RS. Antioxidant enzyme response to hypericin in EMT6 mouse mammary carcinoma cells. *Free Radic.Biol.Med.* 24:817-826, (1998)
210. Theodossiou T, Noronha-Dutra A, and Hothersall JS. Mitochondria are a primary target of hypericin phototoxicity: synergy of intracellular calcium mobilisation in cell killing. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1946-1956, (2006)
211. Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, and de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int.J Biochem.Cell Biol.* 34:221-241, (2002)
212. Hadjur C, Richard MJ, Parat MO, Jardon P, and Favier A. Photodynamic effects of hypericin on lipid peroxidation and antioxidant status in melanoma cells. *Photochem.Photobiol.* 64:375-381, (1996)
213. Chaloupka R, Obsil T, Plasek J, and Sureau F. The effect of hypericin and hypocrellin-A on lipid membranes and membrane potential of 3T3 fibroblasts. *Biochim.Biophys.Acta* 1418:39-47, (1999)
214. Zhang W, Law RE, Hinton DR, and Couldwell WT. Inhibition of human malignant glioma cell motility and invasion in vitro by hypericin, a potent protein kinase C inhibitor. *Cancer Lett.* 120:31-38, (1997)
215. Blank M, Lavie G, Mandel M, Hazan S, Orenstein A, Meruelo D, and Keisari Y. Antimetastatic activity of the photodynamic agent hypericin in the dark. *Int.J Cancer* 111:596-603, (2004)

## 6.2 Literaturverzeichnis zu den Abbildungen

Abbildung 1:  
Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Tübingen

Abbildung 2 A und 2 B:  
Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Tübingen

Abbildung 3:  
Prof. Dr. Antje Bornemann, Institut für Hirnforschung, Neuropathologie, Universität Tübingen

Abbildungen 4 A bis 4 D:  
Prof. Dr. Antje Bornemann, Institut für Hirnforschung, Neuropathologie, Universität Tübingen

Abbildung 6:  
Ehrhardt A: Inkohärente Lichtsysteme für die Fluoreszenzdiagnostik und die PDT (2005)

Abbildung 8:  
[http://laser.klinikum.unimuenchen.de/dt/forschung/fluoreszenzdiag\\_info.htm](http://laser.klinikum.unimuenchen.de/dt/forschung/fluoreszenzdiag_info.htm)

Abbildung 9:

[http://ourworld.compuserve.com/homepages/Markus\\_Arndt](http://ourworld.compuserve.com/homepages/Markus_Arndt)

Abbildung 10:

<http://www.mmw.de/jarticleDisplayAction.do;jsessionId=1A6A5AF3D4AE1D17241ADF99A73D2454?articleId=110513>

Abbildung 11:

<http://www.mmw.de/jarticleDisplayAction.do;jsessionId=1A6A5AF3D4AE1D17241ADF99A73D2454?articleId=110513>

Abbildung 12:

Schöneborn PW, Effekte der UVA1- und UVB-Strahlung: Apoptose- und Nekroseinduktion humaner T-Lymphozyten in vitro und Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung, Dissertation, Klinik für Dermatologie und Allergologie des St. Josef Hospitals, Universitätsklinikum der Ruhr-Universität Bochum, (2002)

Abbildung 15:

<http://home.bn-paf.d>

Abbildung 16:

Gasperl, Michael; Photographie, Botanischer Garten Salzburg, (2005)

Abbildung 20:

Lodish et al., (2001)

### 6.3 Literaturverzeichnis zu den Tabellen

Tabelle 1:

Modifiziert nach Kleihues

Tabelle 3:

In Anlehnung an: Ehrhardt A, Inkohärente Lichtsysteme für die Fluoreszenzdiagnostik und die PDT, (2005)

Tabelle 4:

In Anlehnung an: [113] Lawvere S and Mahoney MC, (2005)

## 6.4 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt folgenden Personen, die zur Durchführung meiner Arbeit durch ihre vielfältige Unterstützung einen wesentlichen Teil beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. med. Marcos Tatagiba, Ärztlicher Direktor der Klinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Tübingen, für die Ermöglichung meiner Promotion in seiner Abteilung sowie für die Bereitstellung der Ressourcen.

Herrn PD Dr. med. Rainer Ritz, Klinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum in Tübingen, für die Konzeption dieser Arbeit, die Bereitstellung der Ressourcen sowie für die Betreuung während der Erstellung meiner Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Martin Schenk und Herrn Roland Klaffschenkel, Abteilung für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie am Universitätsklinikum Tübingen, für die Ermöglichung der Nutzung ihres FACS-Gerätes sowie für Präsenz und kompetente Hilfe bei Problemen.

Frau Annelie Gruber, medizinisch-technische Assistentin der Neurochirurgie Tübingen, für positive Laboratmosphäre und freundschaftliche Unterstützung und Hilfe während meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Steiner, ehemaliger Chef des Instituts für Lasertechnologien in der Medizin und Meßtechnik an der Universität Ulm, für die Möglichkeit der Durchführung eines Großteils dieser Arbeit an seinem Institut.

Herrn Wolfgang Strauss, Diplom-Chemiker am Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Meßtechnik an der Universität Ulm, für wissenschaftliche Anleitung und Einweisung in die experimentelle Arbeit mit Zellkulturen,

kompetente Hilfestellung während der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit sowie insgesamt für konstruktive Anregungen und Vorschläge.

Petra Kruse und Eva Winkler, medizinisch-technische Assistentinnen am Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Meßtechnik an der Universität Ulm, sowohl für kompetente Einweisung in die Laborarbeit und bereitwillige Hilfe bei Fragestellungen, als auch tatkräftige Unterstützung bei der Versuchsdurchführung sowie für sehr nettes und angenehmes Arbeitsklima.

Herrn Dr. rer. nat. Mayr, für die Bereitstellung, Wartung und Justierung des Lasers.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Herbert Schneckenburger und seinen Mitarbeitern, Fachhochschule Aalen für die Ermöglichung der Mikroskopie. Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Diplom-Ingenieur Michael Wagner für die tatkräftige Hilfe und Unterstützung während der Erstellung der Photos.

Ganz besonderer Dank gilt:

Herrn Christian Scheidle für seine kompetente Unterstützung und Hilfe vor allem bei technischen Fragestellungen, für Rat, Tat und Teamgeist.

Meinen Eltern Ingrid und Arnulf Wein für stets guten Rat, Empathie und Präsenz sowie für seelische, moralische und finanzielle Unterstützung während meines Medizinstudiums und der Erstellung meiner Dissertation.

Sowie schließlich

Meinen lieben Großeltern Friedrich und Maria Vollmeyer für ihre Fürsorge, Aufmerksamkeit und finanzielle Unterstützung während meines Medizinstudiums und der Erstellung meiner Dissertation.

## 6.5 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Hannah Teresa Wein  
geb. am 18. Juni 1981 in Ulm an der Donau

Vater Arnulf Wein  
geb. am 10. November 1946, Sonderschullehrer

Mutter Ingrid Maria Wein, geb. Vollmeyer  
geb. am 31. März 1950, Sonderschullehrerin

Bruder Moritz Johannes Wein  
geb. am 23. Juni 1984, gestorb. am 22. Febr. 1985

### Schulischer Werdegang

1987-1991                      Grundschule in Süßen

1991-2000                     Gymnasium in Donzdorf  
Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

### Sonstiger Werdegang

2000-2001                     Praktikum bei der NWZ Göppingen  
Praktikum in der Pressestelle der Allianz  
Pflegepraktikum in der Helfensteinklinik Geislingen

### Studium

April 2001                     Beginn des Medizinstudiums an der  
Eberhard Karls Universität Tübingen

März 2003                     Ärztliche Vorprüfung in Tübingen

Feb 2004 - März 2007        Dissertation in der Klinik für Neurochirurgie  
am Universitätsklinikum Tübingen

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

Nov 2007                      Staatsexamen in Tübingen

Seit März 2008                Assistenzärztin in der Fachabteilung für Neurologie  
am Marienhospital Stuttgart