

**Einfluss verschiedener Faktoren
auf die durch 5-Aminolävulinsäure und ihre Ester
induzierte Protoporphyrin IX – Fluoreszenz in
Zervixkarzinomzelllinien**

vorgelegt von
Susanne Klein
aus Ulm
2005

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde
und Geburtshilfe - Großhadern
der Ludwig-Maximilians Universität München

Direktor Prof. Dr. med. H. Hepp

**Einfluss verschiedener Faktoren auf die durch 5-
Aminolävulinsäure und ihre Ester induzierte
Protoporphyrin IX – Fluoreszenz in
Zervixkarzinomzelllinien**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians Universität zu München

vorgelegt von
Susanne Klein
aus Ulm
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. P. Hillemanns

Mitberichterstatter: Prof. Dr. B. Gerber
Prof. Dr. M. Delius

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. W. Xiang

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2005

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	7
1.1 Photodynamische Therapie.....	7
1.1.1 Geschichtlicher Rückblick.....	7
1.1.2 Prinzip der Photodynamischen Therapie.....	8
1.2 5-Aminolävulinsäure und ihre Ester.....	11
1.2.1 Grundlagen.....	11
1.2.2 Tumorselektivität	14
1.3 Intraepitheliale Neoplasien der Zervix.....	14
1.4 Fragestellung.....	15
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Zellkulturen.....	17
2.1.1 Zelllinien.....	17
2.1.2 Herstellen von Zellkulturmedium.....	17
2.1.3 Subkultivierung der Zellen.....	17
2.2 Herstellung der verwendeten Versuchslösungen.....	18
2.3 Messung der Protoporphyrin IX-Fluoreszenz.....	18
2.4 Bestrahlung mittels Laser.....	19
2.5 Bestimmung der Zellvitalität mittels WST-1 Test.....	19
2.6 Statistik.....	20
3 Ergebnisse.....	21
3.1 Protoporphyrin IX- Fluoreszenz, Dunkeltoxizität und Photodynamische Wirksamkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert	21
3.2 Protoporphyrin IX-Fluoreszenz und Photodynamische Wirksamkeit in Abhängigkeit von Serum.....	25
3.3 Protoporphyrin IX-Fluoreszenz, Dunkeltoxizität und Photodynamische Wirksamkeit in Abhängigkeit von EDTA.....	28

3.4	Protoporphyrin IX-Fluoreszenz, Dunkeltoxizität und Photodynamische Wirksamkeit in Abhängigkeit von Desferrioxamin	32
3.5	Protoporphyrin IX-Fluoreszenz in CaSki-Zellen in Abhängigkeit von pH-Wert, Serum, EDTA und Desferrioxamin.....	36
4	Diskussion.....	41
4.1	Diskussion der Methodik.....	41
4.1.1	5-Aminolävulinsäure und ihre Ester.....	41
4.1.2	Messung der Protoporphyrin IX-Fluoreszenz.....	41
4.1.3	Bestrahlung mittels Laser und WST-1 Test.....	41
4.2	Diskussion der Ergebnisse der Versuche mit C33A-Zellen.....	42
4.2.1	Protoporphyrin IX- Fluoreszenz, Dunkeltoxizität und Photodynamische Wirksamkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert bei C33A-Zellen.....	42
4.2.2	Protoporphyrin IX- Fluoreszenz und Photodynamische Wirksamkeit in Abhängigkeit von Serum bei C33A-Zellen.....	46
4.2.3	Protoporphyrin IX- Fluoreszenz, Dunkeltoxizität und Photodynamische Wirksamkeit in Abhängigkeit von EDTA bei C33A-Zellen.....	47
4.2.4	Protoporphyrin IX- Fluoreszenz, Dunkeltoxizität und Photodynamische Wirksamkeit in Abhängigkeit von Desferrioxamin bei C33A-Zellen	49
4.3	Einfluss von pH-Wert, Serum, EDTA und Desferrioxamin auf die durch 5-ALA und ihre Ester induzierte PpIX-Synthese in CaSki-Zellen.....	51
4.4	Klinische Relevanz und Ausblick.....	53
5	Zusammenfassung.....	55
6	Literaturverzeichnis.....	57
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	66
	Danksagungen.....	67
	Veröffentlichungen.....	68
	Lebenslauf.....	69

1 Einleitung

1.1 Photodynamische Therapie

1.1.1 Geschichtlicher Rückblick

Schon vor tausend Jahren war die therapeutische Wirkung von Licht bekannt. Sie wurde im alten Ägypten, Indien und China zur Behandlung verschiedenster Krankheiten wie beispielsweise Psoriasis, Vitiligo und Psychosen genutzt (Spikes 1985, Epstein 1990).

Zu der damaligen Zeit wurde auch das Zusammenwirken von Licht mit bestimmten Bestandteilen von Pflanzen entdeckt, was heute unter dem Begriff Photochemotherapie bekannt ist und zur Therapie der Psoriasis eingesetzt wird.

Die Wurzeln der Photodynamischen Therapie reichen dagegen nicht so weit zurück. Den Grundgedanken der Photodynamischen Therapie, den Zelltod durch eine Interaktion zwischen Licht und chemischen Substanzen zu induzieren, kennt man seit ca. 100 Jahren (Ackroyd 2001). Die ersten Versuche wurden 1900 von Oskar Raab beschrieben. Er beobachtete, dass Infusorien, die mit Acridinlösung behandelt wurden, starben, wenn sie Sonnenlicht ausgesetzt wurden, während in Dunkelheit verbliebenen sowie unbehandelte Infusorien überlebten. Raab erklärte sich diesen Vorgang damals durch die fluoreszierende Eigenschaft von Acridin. Er vermutete eine Umsetzung der in den Lichtstrahlen enthaltenen Energie in chemische Energie, welche zum Tode der Infusorien führen sollte (von Tappeiner 1900).

Aufgrund des Wissens über dieses Verhalten fluoreszierender Stoffe versuchten v. Tappeiner und der Dermatologe Jesionek damals, karzinomatöse, tuberkulöse und luetische Krankheitsherde der Haut durch topische Applikation von Eosin mit Licht zu behandeln (v. Tappeiner und Jesionek 1903). Die Erkenntnis der Abhängigkeit dieser Reaktionen von Sauerstoff führten 1907 zur Einführung des von Jodlbauer und von Tappheimers geprägten Begriffes „Photodynamische Wirkung“ (v. Tappeiner und Jodlbauer 1907).

Im Jahre 1908 beschrieb Hausmann erstmals die Phototoxische Wirkung von Hämatoporphyrin. Hausmann nahm ferner an, dass die Zerstörung von Gefäßen ein wesentlicher Bestandteil der Wirkungsweise der Photodynamischen Therapie sei (Hausmann 1908, Hausmann 1911). Die erste Anwendung von Hämatoporphyrin am Menschen erfolgte 1912 durch Friedrich Meyer-Betz in einem Selbstversuch. Er injizierte sich Hämatoporphyrin und litt anschließend an lichtexponierten Arealen an Ödemen, Hyperpigmentation und Schmerzen (Meyer-Betz 1913). Dieser Selbstversuch bewies die photodynamische bzw. phototoxische Wirkung von Porphyrinen beim Menschen.

Im Laufe der Zeit entdeckte man auch die diagnostischen Möglichkeiten des Hämatoporphyrins. Policard berichtete 1924 über die charakteristische rötliche

Fluoreszenz des Hämatoporphyrins in Sarkomgewebe von Ratten nach Bestrahlung mittels ultravioletten Lichtes (Policard 1924).

Ausgehend von den Beobachtungen Policards nahm man an, dass sich Hämatoporphyrin bevorzugt in tumorösem Gewebe anreichert, was die Idee einer neuen diagnostischen und therapeutischen Möglichkeit von malignen Erkrankungen aufkommen lies. Diese Idee fand Bestätigung, als Figge 1948 durch seine Tierversuche eine erhöhte Affinität der Porphyrine gegenüber stark proliferierenden wie neoplastischen, embryonalen und regenerativen Geweben aufzeigen konnte (Figge 1948).

Erst ca. 70 Jahre nach den ersten Beobachtungen Raabs und von Tappeiners begann sich die Photodynamische Therapie (PDT) weiter zu entwickeln. Ein wichtiger Meilenstein in der Entwicklung der PDT wurde 1975 von Dougherty durch seine Versuche mit an Brustkrebs erkrankten Mäusen gelegt. Nach Behandlung der Mäuse mit 2.5-5.0 mg/kg Hämatoporphyrinderivat (HpD) und anschließender Bestrahlung mit rotem Licht konnte ein Rückgang des Tumors bei 48% der Mäuse beobachtet werden (Dougherty 1975).

Im Jahre 1978 fand erstmals die erfolgreiche Durchführung der PDT an Menschen, die an Hauttumoren litten, statt (Dougherty 1978). Von diesem Moment an versuchte man, verschiedenste maligne Erkrankungen mittels PDT zu therapieren.

Im Jahre 1984 wurde der erste *Photosensitizer* von der *American Food and Drug Administration* zugelassen, bei dem es sich um Dihämatoporphyrin-ether (DHE) handelt, welcher unter dem Namen Photofrin bekannt ist. Es folgten bis zum heutigen Tag viele klinische und experimentelle Studien im Bereich der PDT sowie die Entdeckung mehrerer neuer *Photosensitizer*, wie auch die der in dieser Arbeit verwendeten 5-Aminolävulinsäure (Levulan).

Genau ein Jahrhundert nach den ersten Versuchen Oskar Raabs, wird die Photodynamische Therapie zur Behandlung verschiedener Tumoren, wie beispielsweise der Haut, der Blase und des Ösophagus, aber auch bei gutartigen Erkrankungen erfolgreich eingesetzt.

1.1.2 Prinzip der Photodynamischen Therapie

Das Prinzip der Photodynamik beruht auf einer innerhalb der Zelle ablaufenden Wechselwirkung zwischen einem *Photosensitizer* und Licht einer bestimmten Wellenlänge. Während dieser Wechselwirkung wird Lichtenergie von der photosensibilisierenden Substanz absorbiert, wobei Fluoreszenz oder Photooxidation erzeugt werden kann. Die so entstandene Fluoreszenz wird zur Diagnostik von malignen und gutartigen Erkrankungen eingesetzt, während die Photooxidation zu einer Zellzerstörung führt und unter dem Namen Photodynamische Therapie zur Behandlung von Erkrankungen, meist von malignen Tumorerkrankungen eingesetzt wird. Abbildung 1.1.

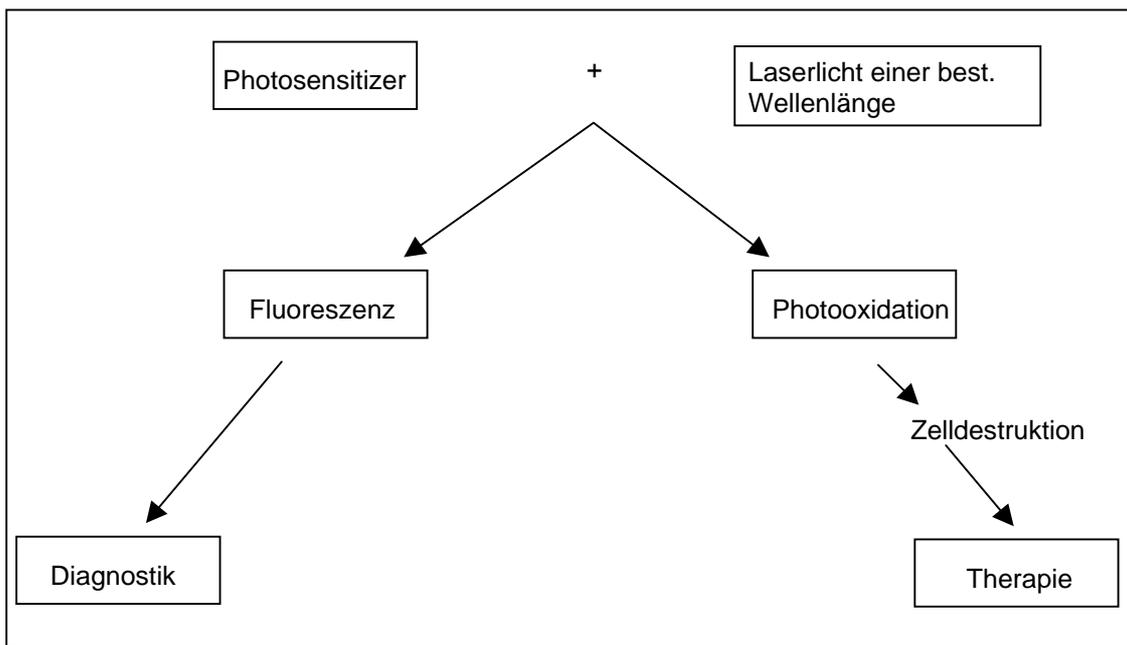


Abb. 1.1. Mechanismus der Photodynamik

Die Photodynamische Therapie besteht aus drei Komponenten. Sie benötigt eine photosensible Substanz, die sich bevorzugt in maligne entartetem oder krankhaft veränderten Gewebe anreichert. Die zweite Komponente stellt Licht einer bestimmten Wellenlänge dar, das dem Absorptionsspektrum des *Photosensitizers* entspricht. Die dritte Komponente ist der molekulare Sauerstoff. Diese drei Komponenten müssen gleichzeitig vorhanden sein, damit es zu einer Photodynamischen Wirkung kommen kann (Henderson and Dougherty 1992).

Durch Licht einer bestimmten Wellenlänge wird der *Photosensitizer* zu einem hoch reaktiven Zwischenprodukt angeregt. Dieses Zwischenprodukt reagiert entweder direkt oder indirekt über weitere Moleküle mit Sauerstoff, so dass Sauerstoffradikale wie z.B. Superoxid entstehen (Typ I Reaktion). Bei der Typ II Reaktion findet ein Energietransfer vom *Photosensitizer* zum Sauerstoff statt, bei dem Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) gebildet wird. Sowohl der Singulett-Zustand des Sauerstoffs als auch die während einer Typ I-Reaktion entstandenen Sauerstoffradikale sind in der Lage zelluläre Strukturen zu schädigen. Es wird vermutet, dass der Typ II-Mechanismus für die zytotoxische Wirkung von *Photosensitizern* verantwortlich ist (Weishaupt 1976).

Der Singulett-Sauerstoff ist in der Lage weniger als $0,02 \mu\text{m}$ innerhalb des Gewebes zu wandern (Moan 1991). Deswegen befindet sich meist in direkter Nachbarschaft zur Lage des *Photosensitizers* die Stelle der initialen Zell- und Gewebeschädigung (Peng 1996), d.h. abhängig von der Lokalisation der photosensiblen Substanz kommt die zelltoxische Wirkung des Singulett-Sauerstoffs zu tragen. Schädigungen werden an Mitochondrien, Lysosomen, biologischen Membranen, Endoplasmatischen Retikulum, Cytoskelett und dem Zellkern beobachtet (Moan 1989).

Die Inaktivierung der mitochondrialen Enzyme wird als ein sehr wichtiger Vorgang, sogar als das Schlüsselereignis, das zum Tod der Zelle führt, angesehen (Gibson 1989, Salet *and* Moreno 1990).

Es kommt zum Anschwellen der Mitochondrien und zu einer Zerstörung ihres Aufbaus. Die membrangebundenen mitochondrialen Enzyme wie z.B. die Cytochrom C Oxidase und die Succinat-Dehydrogenase werden durch die PDT inaktiviert. Dadurch kommt es zu einer Störung in der Atmungskette (Hilf 1984, Kessel 1986 a,b). Ebenso werden die Enzymsysteme der Lysosomen und des Cytosols durch die PDT geschädigt (Boegheim 1987, Moan 1989).

Weitere Auswirkungen der PDT sind an der Plasmamembran zu finden, dort kann es zu Depolarisationen und zu einer Störung bzw. Inaktivierung der membranständigen Pumpen wie z.B. der Na⁺/ K⁺-ATPase oder der Ca²⁺-ATPase kommen (Dubbelman 1984, Specht 1990, Joshi 1994) sowie zu Lipidperoxidation (Thomas 1989) und Protein *Crosslinking* (Shen 1996). Auch eine Schädigung an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lässt sich nach PDT beobachten, dabei kommt es u.a. zu einer Inaktivierung von Acyl-CoA (Acyl coenzyme A) welches im Stoffwechsel der Fettsäuren eine wichtige Rolle spielt (Candide 1989).

Das Zytoskelett wird durch Mikrofilament-Rupturen und Verhinderung der Polymerisation von Tubulin geschädigt (Wieman 1992, Berg *and* Moan 1997).

Da sich die *Photosensitizer* auch in der Kernmembran anreichern, kann der Singulett-Sauerstoff auch kernmembrannaher Desoxyribonukleinsäure (DNA) schädigen. Hier kommt es zu Strangbrüchen, DNA-Protein *Crosslinking*, Schwesterchromatin-Austausch, Chromosomen-Aberrationen und Mutationen.

Welche dieser Mechanismen letztendlich für den durch PDT induzierten Zelltod in Form von Apoptose und Nekrose verantwortlich sind, konnte bisher nicht ausreichend geklärt werden und scheint von verschiedenen Faktoren wie Zelltyp, Art des *Photosensitizers*, dessen Konzentration, der Inkubationszeit, der Lichtdosis und der Lichtquelle abzuhängen (He 1994, Dellinger 1996, Noodt 1996, Miyamoto 1999, Moor 2000).

Die photodynamische Therapie wirkt nicht nur auf zellulärer Ebene, sondern zeigt auch Effekte auf die Vaskularisation des Gewebes. Während der PDT wird die Mikrovaskularisation geschädigt, es kommt zur Stase und Thrombenbildung innerhalb des Gefäßes, zur Hämorrhagie, zu Gefäßverengungen und schließlich zum Verschluss des Gefäßes (Reed 1989, Jacobs 1990, Tromberg 1990, Fingar 1996). Dies führt zu einer verschlechterten bzw. sistierten Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Tumors, welche zu Ischämie und zum Untergang des tumorösen Gewebes führt.

Ferner wird in der Literatur berichtet, dass auch inflammatorische und immunologische Prozesse für die Zellzerstörung unter PDT verantwortlich sind. Hierbei spielen die Bildung von Stressproteinen, wie z.B. das *heat shock protein* (HSP) oder das *glucose regulated protein* (GRP), Akute Phase Proteinen, Peroxidasen, Cytokinen, Wachstumsfaktoren sowie Aktivierung von Komplement eine Rolle, die ihrerseits das spezifische Immunsystem in Form

von Lymphozyten aktivieren (Evans 1990, Nseyo 1990, Gomer 1991, Fisher 1993, de Vree 1997, Gollnick 1997, Ochsner 1997).

Zusammenfassend lassen sich drei Mechanismen anführen, die zum Zelltod nach erfolgter PDT führen. Zum Ersten führt die Photodynamische Therapie zur direkten Schädigung der malignen Zellen. Zweitens lassen sich an den Gefäßen, die den Tumor versorgen, schwere Schäden beobachten, die für den Gewebeuntergang verantwortlich gemacht werden können. Drittens konnte nach erfolgter PDT beobachtet werden, dass die behandelten Zellen eine Reihe von inflammatorischen Substanzen ausschütten, die weitere Zellen wie Lymphozyten und Phagozyten in die Nähe des Tumors anlocken, die wiederum die Tumorzellen angreifen.

1.2 5-Aminolävulinsäure und ihre Ester

1.2.1 Grundlagen

5-Aminolävulinsäure (5-ALA) (Abb.1.2) wird in der Hämbiosynthese des Menschen durch Kondensation von Succinyl-CoA und Glycin gebildet.

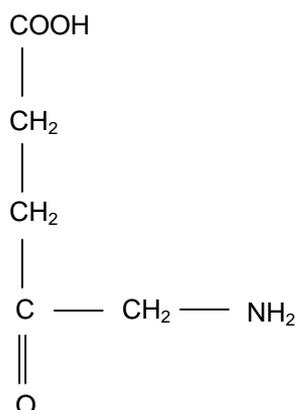


Abb. 1.2. Struktur von 5-Aminolävulinsäure

Während der Biosynthese von Häm entstehen Porphyrinvorstufen sowie Protoporphyrin IX (PpIX; Abb. 1.3), welches einen wirksamen *Photosensitizer* darstellt (Kennedy 1992). Die Bildung von Aminolävulinsäure aus Succinyl-CoA und Glycin wird durch Häm reguliert, es besteht eine negative Feedback-Hemmung (Abb. 1.4). Durch exogene Gabe von ALA kann diese negative Feedback-Hemmung umgangen werden, so dass PpIX vermehrt gebildet wird und innerhalb des Gewebes akkumuliert. Das PpIX kann dann nach Bestrahlung mittels Laser je nach verwendeter Wellenlänge entweder durch die entstehende Fluoreszenz zur Diagnostik (PDD, blaues Licht) oder durch Photodynamische Effekte zur Therapie (PDT, rotes Licht) eingesetzt werden.

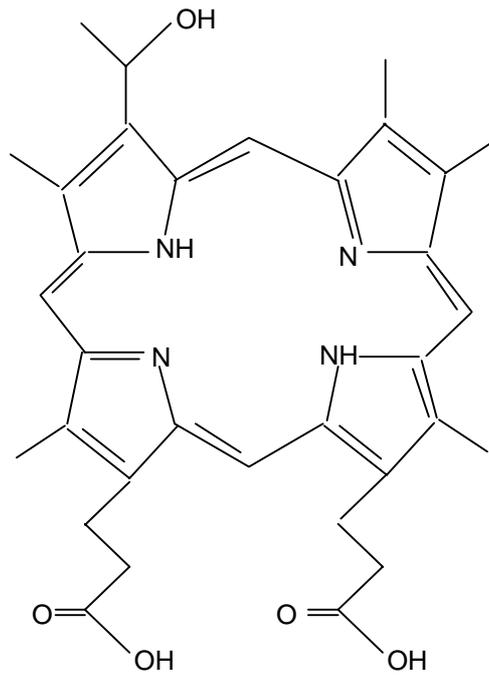


Abb. 1.3. Struktur von PpIX

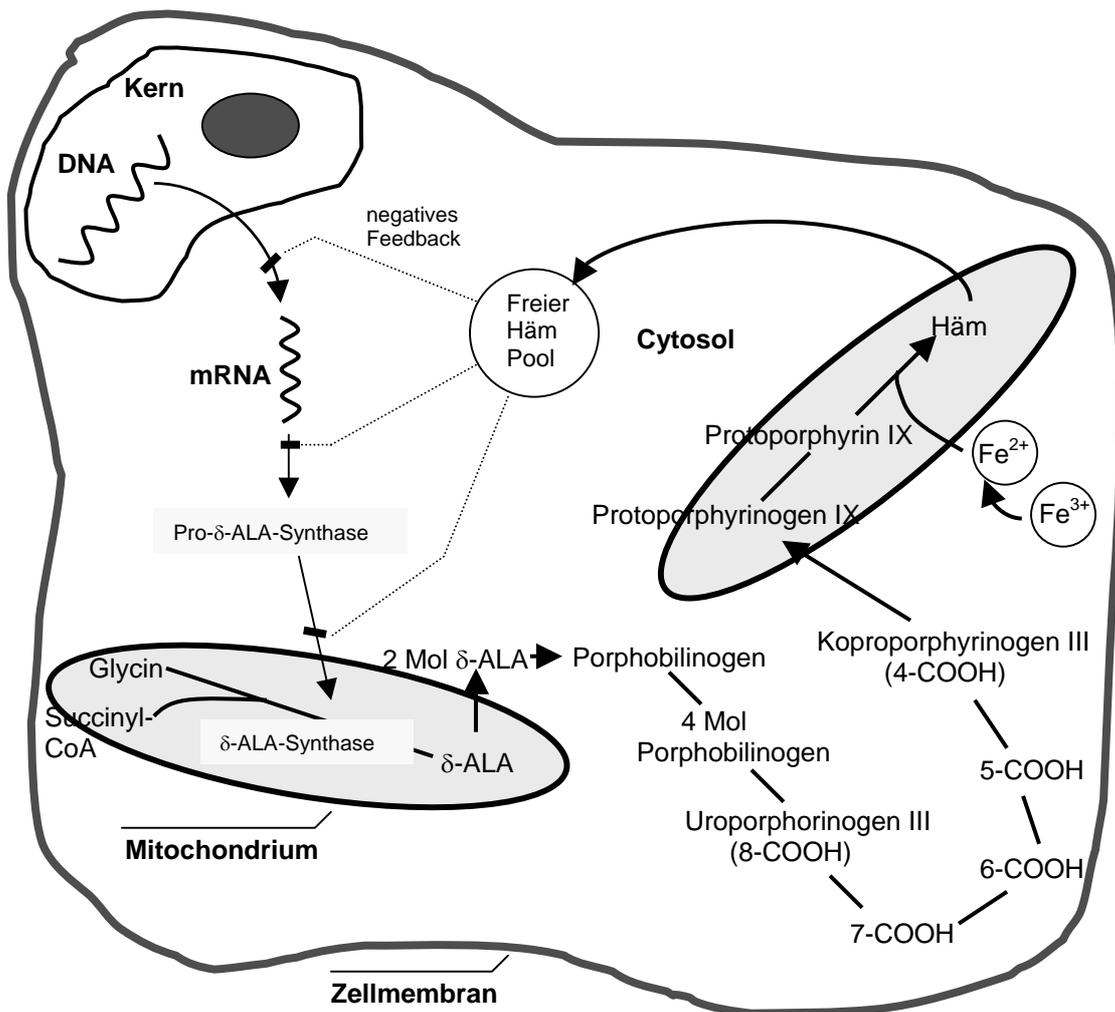


Abb. 1.4. Häm-Biosynthese

Dem Protoporphyrin IX wird eine hohe photodynamische Wirksamkeit zugeschrieben (Roeder, 1990). Dies und die Tatsache, dass es nicht in allen Zell- und Gewebearten zu einer Akkumulation von PpIX kommt, sondern eine gewisse Selektivität für Tumorzellen vorliegt (Kennedy, 1992), macht das durch 5-ALA induzierte PpIX zu einem geeigneten Photosensibilisator. Ein weiterer Vorteil von PpIX im Gegensatz zu anderen Photosensibilisatoren ist, dass aufgrund der kurzen Halbwertszeit von PpIX, die photodynamischen bzw. photosensiblen Wirkungen nicht länger als 24 Stunden anhalten (Kennedy, 1992) und die Patienten dem Sonnenlicht ausgesetzt werden können, ohne größere Hautschäden zu erleiden.

Ein Nachteil von 5-ALA ist seine niedrige Bioverfügbarkeit. Dadurch werden höhere Dosen benötigt, um einen klinisch wirksamen Spiegel von PpIX zu erhalten (Loh 1993, Szeimies 1994, Peng 1995). Das liegt an dem hydrophilen Charakter des 5-ALA-Moleküls. Diese Hydrophilie führt zu einer erschwerten Penetration des Moleküls durch biologische Barrieren mit lipophilen Eigenschaften, wie der Zellmembran. Aber gerade das Durchdringen des 5-ALA-Moleküls durch die Zellmembran und die Bildung des PpIX ist für das Zustandekommen der therapeutischen Wirkung wesentlich. Daraus wird deutlich, dass höhere Dosen von 5-ALA verwendet, sowie längere Inkubationszeiten in Kauf genommen werden müssen, um den Transport über die Zellmembran zu erhöhen. Dieses Defizit führt auch zu einer niedrigeren Eindringtiefe von 5-ALA in das Gewebe (Peng 1992, Loh 1993, Peng 1995, Hillemanns 1999).

Aus diesen Gründen haben die verschiedenen ALA-Ester, Methyl-, Butyl-, Hexyl-ALA, welche lipophile Derivate der 5-Aminolävulinsäure darstellen, eine wesentliche Bedeutung in den Forschungsarbeiten der letzten Jahre erlangt. Die ALA-Ester selbst sind pharmazeutisch inaktiv, sie werden aber über intrazelluläre, nichtspezifische Esterasen innerhalb der Zelle in ALA umgewandelt (Kloek 1998).

Die ALA-Ester zeichnen sich dadurch aus, dass ihre lipophilen Eigenschaften stärker ausgeprägt sind als die von 5-ALA. Dies führt zu einer verbesserten Diffusion über die Zellmembran in die Zelle, und damit zu einer höheren Bioverfügbarkeit, was sich letztlich in einer größeren PpIX-Synthese bemerkbar macht. Casas (2001) beobachtete bei seinen Untersuchungen, dass eine um den Faktor 60 niedrigere Konzentration von h-ALA im Vergleich zu 5-ALA notwendig ist, um dieselbe Menge von PpIX zu erhalten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Gaullier (1997) und Uehlinger (2000). In mehreren Untersuchungen konnte sowohl in vivo (Lange 1999, Van den Akker 2000, Gerscher 2000), als auch in vitro (Gaullier 1997, Peng 1997, Kloek 1998, Uehlinger 2000) eine höhere PpIX-Fluoreszenz bei Anwendung der ALA-Derivate im Vergleich zu 5-ALA beobachtet werden.

Zudem führen die ALA-Ester zu einer schnelleren Bildung von PpIX in der Zelle, dies kann kürzere Inkubationszeiten nach sich ziehen (Uehlinger 2000, Xiang 2001). Ein weiterer großer Vorteil der Ester besteht in einer homogeneren Verteilung der PpIX-Fluoreszenz und einem tieferen Eindringen

innerhalb des Gewebes. Weiterhin wird in der Literatur eine höhere Tumorselektivität der ALA-Ester beschrieben (Peng 1997, Uehlinger 2000).

Die bessere Bioverfügbarkeit, die verbesserte Penetration, die kürzere Inkubationszeit, die homogenere Verteilung des induzierten *Photosensitizer* PpIX und die bessere Selektivität der ALA-Ester, ermöglichen eine wesentlich effizientere Photodynamische Therapie.

1.2.2 Tumorselektivität

Eine Voraussetzung für die PDT von malignen Erkrankungen ist die bevorzugte Anreicherung des *Photosensitizers* im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Gewebe. Für diese Tumorselektivität gibt es verschiedene Theorien.

So beschreiben Kondo et al., dass die Aktivität der Ferrochelatase in malignen Zellen erniedrigt ist, so dass sich PpIX, welches normalerweise durch die Ferrochelatase in Häm umgewandelt wird, in solchen Zellen anreichert (Kondo 1993). Genauso führen Störungen im Eisenmetabolismus und –transport an dieser Stelle der Hämbiosynthese zu einer PpIX-Akkumulation (Elliott 1993, Torti 1994). Ebenso ist es denkbar, dass das in einer Tumorzelle veränderte Enzymprofil zu einer verstärkten PpIX-Synthese führen kann (Leibovici 1988, Navone 1990).

Auch die veränderte Struktur von Tumorgewebe, charakterisiert durch ein vergrößertes Interstitium, Veränderungen im Gefäßsystem, eingeschränkte Lymphdrainage und eine größere Menge von Kollagen, welches Porphyrine bindet, führt hier zu einer bevorzugten Anreicherung von 5-ALA bzw. PpIX (Dvorak 1979 a,b, Musser 1980).

Tumorzellen zeichnen sich ferner oft dadurch aus, dass sie verstärkt Membranrezeptoren für *low-density Lipoprotein* (LDL) exprimieren, welche mittels Endozytose die Aufnahme von LDL-gebundenen *Photosensitizern* fördern (Kessel 1986, Jori 1993).

1.3. Intraepitheliale Neoplasien der Zervix

Jährlich erkranken weltweit etwa 500.000 Frauen an einem Zervixkarzinom, und 350.000 Frauen sterben jährlich an dieser Erkrankung und deren Folgen. In Deutschland erkranken jährlich zwischen 6200 und 7100 Frauen (Inzidenz ca. 12 von 100.000), 1996 verstarben 2154. Diese stellen 4,5 Promille aller Sterbefälle der Frauen dar. Die Inzidenz von genitalen Präkanzerosen der Zervix liegt verglichen mit dem Zervixkarzinom um das 100-fache höher. Das Durchschnittsalter aller Patientinnen beträgt 54,7 Jahre.

Beim Zervixkarzinom unterscheidet man zwei größere histologische Gruppen: Plattenepithel- und Adenokarzinom. Es handelt sich in 77% der Fälle um ein Plattenepithelkarzinom und in 11% der Fälle um ein Adenokarzinom. In 2,5% der Fälle liegt eine adenosquamöse Differenzierung vor, der Rest wird als andere Zelltypen oder unspezifizierte epitheliale Tumoren deklariert (Schneider

2001, Tumorregister München 2002). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien handelt es sich um Plattenepithelkarzinomzellen.

Je nach Ausdehnung des Tumors und dem Vorhandensein von Lymphknoten- oder Fernmetastasen teilt man das Zervixkarzinom in verschiedene Stadien ein (Tabelle 1.1).

FIGO-Stadium	TNM-Klassifikation	Kriterien
0	Tis	Carcinoma in situ
I	T1	Zervixkarzinom begrenzt auf die Zervix
II	T2	Zervixkarzinom infiltriert jenseits des Uterus, aber nicht bis zur Beckenwand und nicht bis zum unteren Drittel der Vagina
III	T3	Zervixkarzinom breitet sich bis zur Beckenwand aus und/ oder befällt das untere Drittel der Vagina und / oder verursacht Hydronephrose oder stumme Niere
IVa	T4	Tumor infiltriert Schleimhaut von Blase oder Rektum und/ oder überschreitet die Grenzen des kleinen Beckens
IVb	M1	Fernmetastasen

Tabelle 1.1. Klassifikation des Zervixkarzinoms nach TNM oder FIGO
T= Primärtumor; N= regionäre Lymphknotenmetastasen; M= Fernmetastasen

Je nach Ausdehnung des Zervixkarzinoms erfolgt entweder eine operative Therapie, eine Radiatio oder eine Kombination von beiden. Neben diesen klassischen Therapieformen besteht auch die Möglichkeit der Chemotherapie oder der Radiochemotherapie, insbesondere in Verbindung mit den oben beschriebenen Therapien. Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate, unabhängig von Tumorstadium, Histologie, Alter und Therapie der Patientinnen liegt bei 55% (Schneider 2001, Klamert *and* Hölzel 1998).

1.4 Fragestellung

Wie oben beschrieben stellt die Photodynamische Therapie eine neue Methode zur Behandlung maligner Erkrankungen dar. Sie wird bereits in mehreren Fachbereichen der Medizin erfolgreich angewandt, so z.B. in der Urologie bei Blasenkarzinomen, in der Neurochirurgie bei Glioblastomen, in der Inneren Medizin beim obstruktivem Ösophaguskarzinom und Lungenkarzinom und in der Dermatologie bei Basalzellkarzinomen und aktinischer Keratose. Die PDT beruht auf dem Prinzip, dass durch Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge ein Photosensitizer zur Bildung von reaktivem Singulett-Sauerstoff angeregt wird, der wiederum den Zelltod verursacht.

Diese Arbeit soll nun *in vitro* untersuchen, ob mit dem durch 5-Aminolävulinsäure induzierten Photosensitizer PpIX eine photodynamische Therapie bei Zervixkarzinomen möglich ist.

Dazu soll an den Zervixkarzinomzelllinien C33A und CaSki untersucht werden, ob sich 5-ALA und die lipophileren ALA-Ester Methyl-ALA, Buthyl-ALA und Hexyl-ALA hinsichtlich ihrer Potenz zur PpIX-Synthese und damit in der photodynamischen Wirksamkeit unterscheiden.

Weiterhin soll untersucht werden, ob die PpIX-Synthese und photodynamische Wirksamkeit in Zervixkarzinom-Zellen pH-Wert-abhängig sind und welcher pH-Wert zu optimalen Ergebnissen führt.

Ferner soll ein möglicher Einfluss von Serum auf die durch 5-ALA und ihre Ester induzierte Protoporphyrin IX Fluoreszenz und damit auch auf die PDT erforscht werden, da es in der Literatur Hinweise gibt, dass Serum die Wirkung reduziert.

Außerdem soll überprüft werden, ob durch eine Kombination von 5-ALA bzw. ihrer Ester mit den Eisenchelatoren EDTA oder Desferrioxamin (DEF) die PpIX-Synthese und PDT verbessert werden kann. Eisenchelatoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie durch Komplexbildung mit Eisen die Umwandlung von PpIX in Häm verhindern und so zu einer verstärkten PpIX-Ansammlung führen.

2 Material und Methoden

2.1. Zellkulturen

2.1.1 Zelllinien

Als Modelle für zervikale Neoplasien dienen für die in vitro Versuche dieser Arbeit die beiden Zelllinien C33A (ATCC HTB 31) und CaSki (ATCC CRL 1550).

C33A sind humane, epithelial differenzierte Zellen eines Zervixkarzinoms einer 66-jährigen Frau, die durch Biopsie gewonnen wurden und als Monolayer wachsen. Sie enthält keine Virus-DNA (J Natl Cancer Inst 1964;32:135-148).

Die Zelllinie CaSki stammt aus der Metastase eines epidermoidal differenzierten Karzinoms der Zervix einer 40-jährigen Frau, welches ebenfalls als epithelialer Monolayer wächst. Die Zellen sezernieren humanes Choriongonadotropin (β -hCG) und enthalten humane Papillomavirus -DNA 16 (HPV-16; Science 1977;196:1456-1458).

Die Zellen wurden in 250 ml Kulturflaschen (Cellstar, Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen) im jeweiligen Medium suspendiert, auf 10^6 Zellen/ml verdünnt und im Brutschrank in einer 5 %-igen CO_2 -Atmosphäre bei 37°C kultiviert. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt, indem der Überstand abpipettiert und frisches Medium hinzugegeben wurde.

2.1.2 Herstellen von Zellkulturmedium

Für die C33A-Zellen wurde Minimum Essential Medium (MEM; GIBCO BRL, Eggenstein), für die CaSki-Zellen RPMI 1640 Medium (GIBCO BRL Eggenstein) verwendet, welchen jeweils 10 Vol % Fetales Kälberserum (FCS, GIBCO BRL Eggenstein), 1% Zienam (MSD Sharp & Dohme) und 200 U/mL Nystatin (Lederle) zugesetzt wurden.

Sämtliche Experimente und Manipulationen mit den Zellen wurden ausschließlich in der sterilen Atmosphäre einer biologischen Sicherheitswerkbank (Heraeus Lamin Air, Heraeus Sepatech, Osterode) durchgeführt.

2.1.3 Subkultivierung der Zellen

Um das Weiterwachsen der Zelllinien zu sichern, wurde eine Subkultivierung der Zellen notwendig, da eine konfluente Zellschicht aufgrund der Kontaktinhibition ihre Mitoseaktivität einstellt und es so ab einer hohen Zelldichte zu einem starken Absinken der Proliferationsrate kommt, was zum Absterben der Zellkultur führen kann (Sellner 1989).

Die Subkultivierung erfolgte durch das sogenannte „Passagieren“ der Zellen, indem die Zellen unter Verdünnung von dem alten Kulturgefäß in ein neues überführt wurden.

Von den adhärennten Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt. Der Zellrasen, der zuvor mikroskopisch betrachtet wurde, wurde mit 1,5 ml 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA (GIBCO BRL Eggenstein Deutschland) für 5-10 min inkubiert. Anschließend wurden 8,5 ml serumhaltiges Medium hinzupipettiert, um das Einwirken des Trypsin zu beenden. Mittels Trypanblau-Färbung wurde die Vitalität der Zellen überprüft und mittels eines elektronischen Zellzählers (Coulter Counter Z1, Coulter Electronics GmbH, Krefeld) die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen (Blue Max™, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen entsprechend der Zellzahl auf 10^6 Zellen/ml mit frischem Medium verdünnt und in Kulturflaschen inkubiert bzw. für die Versuche in 96 well Mikrotiterplatten (Costar 3595, NY, USA) verteilt.

2.2 Herstellung der verwendeten Versuchslösungen

Je nach gewünschter Menge und Konzentration wurde 5-Aminolävulinsäure (Medac, Hamburg) in serumfreien Medium aufgelöst. Dann wurde mittels pH-Meter (WTW Weilheim) der pH-Wert bestimmt und mit HCO_3^- auf den physiologischen pH-Wert titriert. Bei den Versuchen zur pH-Abhängigkeit wurden entsprechende Werte eingestellt. Anschließend wurde diese Stammlösung durch einen 0,2 μm Filter (Membrex 25, MembraPure GmbH, Bodenheim) steril filtriert und dann auf die gewünschten Konzentrationen mit serumfreien Medium verdünnt.

Das gleiche Verfahren wurde auch für die in dieser Arbeit untersuchten ALA-Ester Methyl-ALA, Butyl-ALA und Hexyl-ALA (Photocure, Oslo, Norwegen) angewandt.

Für die Versuche, bei denen verschiedene Faktoren untersucht wurden, die die PpIX-Syntheserate beeinflussen sollten, wurden die gewünschten Mengen EDTA, DEF oder Serum hinzugegeben.

	Verwendete Konzentration	Hersteller
Serum	0%, 5%, 10%, 15%, 20%	Fetales Kälber Serum, GIBCO BRL Eggenstein
EDTA	0 μM , 100 μM , 1000 μM	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> , SIGMA-Aldrich Chemie GmbH Steinheim
DEF	0 μM , 100 μM , 1000 μM	<i>Deferoxamine Mesylate</i> , SIGMA-Aldrich Chemie GmbH Steinheim

Tabelle 1.1 Übersicht über die angewendeten Faktoren

2.3 Messung der Protoporphyrin IX-Fluoreszenz

Nachdem die Zellen 48 Stunden in den Mikrotiterplatten (100 μl ; 10000 Zellen/well) angezchtet wurden, wurde der Überstand abpipettiert und je nach Versuch die entsprechenden 5-ALA- bzw. Esterlösungen hinzugegeben (100 μl /well). Nach weiteren 4 Stunden Inkubation erfolgte die Messung der Protoporphyrin IX-Fluoreszenz mittels eines Fluoreszenzmessgeräts (Wallac

1420 Victor multilabel counter, Freiburg). Die PpIX-Fluoreszenz wurde durch Licht der Wellenlänge 405 nm angeregt und bei einer Wellenlänge von 640 nm gemessen. Jede Versuchsbedingung wurde drei Mal wiederholt. Die Autofluoreszenz der Kontrollprobe wurde vom Mittelwert der Fluoreszenzintensität einer jeden Probe abgezogen und die so erhaltenen Werte als *arbitrary fluorescence units* (a.u.) angegeben.

2.4 Bestrahlung mittels Laser

Am Ende der Inkubation mit 5-ALA bzw. den ALA-Estern wurde die Inkubationslösung abpipettiert und durch *Phosphat buffered saline* (PBS; GIBCO BRL, Eggenstein) ersetzt. Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit einem Argonionen-Laser (Coherent Innova; Coherent Laser Group Santa Clara, CA, USA) und einem Farbstofflaser (Coherent, 599 Standing Wave Dye Laser). Der Argonionen-Laser emittiert Licht im grünen Spektralbereich (488 nm und 514 nm) mit einer Ausgangsleistung von 15 W. Der Farbstofflaser enthält den Farbstoff Sulforhodamin B (Lambda Physik, Göttingen), welcher durch das vom Argon-Laser emittierte grüne Licht angeregt wird und seinerseits wieder im Bereich von 600 nm bis 680 nm emittiert. Die Lichtemission erfolgte kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 635 nm. Es wurde eine speziell konstruierte Bestrahlungskammer verwendet, die es ermöglicht, in Mikrotiterplatten kultivierte Zellen temperaturreguliert und computergesteuert zu bestrahlen (Knappe1995). Die Zellen wurden durch den transparenten Boden je nach Versuch mit einer unterschiedlichen Lichtdosis konstant (100 mW/cm²; 1 Joule = 10 sec) bestrahlt.

2.5 Bestimmung der Zellvitalität mittels WST-1 Test

Für die Bestimmung der Zellvitalität wurde in dieser Arbeit der WST-1 Test (Boehringer Mannheim GmbH) angewendet. Dieser *colorimetrische Assay* basiert auf der Reduktion eines wasserlöslichen, hellroten Tetrazoliumsals (WST-1) zu einem löslichen, dunkelroten Formazan. Diese Reaktion wird durch mitochondriale Dehydrogenasen katalysiert, die nur in vitalen Zellen aktiv sind. Die Menge des entstandenen Formazan-Farbstoffs korreliert direkt mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen.

Die optische Dichte des entstandenen Formazan wurde mittels *ELISA-Reader* (ICN Flow, Titertek plus, Meckenheim) bei einer Absorption von 450 nm quantifiziert.

Die Zellvitalität wurde einerseits nach Messung der PpIX-Synthese, andererseits 24 Stunden nach Bestrahlung der Zellen bestimmt. Dazu wurden den Zellen (100µl/ well) 10 µl des WST-1 Reagenz hinzugefügt und für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Absorption der Zelllösung bei 450 nm im *ELISA-Reader* gemessen. Jedes einzelne Experiment wurde dreimal wiederholt.

Die optische Dichte (O.D.) der zu analysierenden Lösung (O.D. _{Experiment}) wurde ins Verhältnis zur optischen Dichte eines Kontrollwertes (O.D. _{Kontrolle}; behandelte, aber nicht bestrahlte Zellen) gesetzt. Bei jeder Messung wurde die

Hintergrundabsorption (O.D. _{Blank}), die durch Zellmaterial, Reagenzien oder Lösungen verursacht wird, ermittelt. Dazu wurde unbehandelten Zellen unmittelbar vor der Messung WST-1 Reagenz zugesetzt und die optische Dichte dieser Zelllösung von den Test- und Kontrollwerten subtrahiert. Aus dem dargestellten Quotienten errechnete sich die optische Dichte und damit die Vitalität in Prozent.

$$\text{Optische Dichte (\%)} = \frac{\text{O.D. Experiment} - \text{O.D. Blank}}{\text{O.D. Kontrolle} - \text{O.D. Blank}} \times 100$$

2.6 Statistik

Die Ergebnisse, die in den Diagrammen dargestellt sind, werden als arithmetisches Mittel angegeben, die Streuung der Werte wird als Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dargestellt. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu berechnen, wurde folgendes Verfahren verwendet: Damit später ein dreifacher Gruppentest durchgeführt werden kann, muss zuerst die Voraussetzung nach Bonferroni und Holm zur Alpha-Adjustierung überprüft werden. Ein Globaltest prüft, ob die Nullhypothese „Alle 3 Gruppen sind gleich“ abgelehnt werden kann. Der Globaltest erfolgte mit dem Nichtparametrischen Friedmann-Test von k (k=3) verbundenen Stichproben, da die Daten in dieser Arbeit nicht normalverteilt sind.

Bei Ablehnung der Nullhypothese im Friedmann-Test wurde von Unterschieden bei den 3 Gruppen ausgegangen und dann mit dem Nichtparametrischen Wilcoxon-Tests zweier verbundener Stichproben getestet, zwischen welchen zwei Gruppen die Unterschiede auftreten.

Konnte bei dem Friedmann-Test die Nullhypothese nicht abgelehnt werden, wurde davon ausgegangen, dass keine Unterschiede zwischen den 3 Gruppen bestehen bestehen.

Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten < 0,05 angenommen. Für diese Berechnungen wurde das Programm SPSS verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Protoporphyrin IX-Fluoreszenz, Dunkeltoxizität und Photodynamische Wirksamkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert

Der pH-Wert kann die Synthese und die Wirkung des durch 5-ALA oder ihre Ester gebildeten Protoporphyrin IX beeinflussen. Deshalb wurden die C33A-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen von 5-ALA bzw. ihren Estern bei unterschiedlichen pH-Werten 4 Stunden inkubiert. Danach wurde die PpIX-Fluoreszenz mittels eines *Fluoreszenzreaders* bestimmt.

Im sauren Bereich (<pH 7) ließ sich unabhängig von der Konzentration für 5-ALA und ihre Ester nur eine geringe PpIX-Fluoreszenz messen. Wurden die Zellen allerdings in einem Medium mit pH>7 inkubiert, so führte die Erhöhung des pH-Wertes zu einem kontinuierlichen Anstieg der Fluoreszenz. Durch Verwendung einer höheren 5-ALA-/ Ester-Konzentration konnte ein höherer Anstieg der Fluoreszenz im Vergleich zu der niedrigeren Konzentration erreicht werden, wobei der Anstieg für die beiden Konzentrationen parallel verlief. Eine maximale PpIX-Fluoreszenz konnte für h-ALA (0,5 und 1 mM), ALA (10 mM) und m-ALA (7,5 mM) bei pH 8,5 beobachtet werden. Bei weiter ansteigendem pH-Wert (pH=9) kam es hier zu einem Abfall der Fluoreszenz. Im Unterschied dazu zeigte sich bei 5-ALA (5 mM), m-ALA (3,75 mM) und b-ALA (1,25 und 2,5 mM) kein Maximum bei pH 8,5, sondern die Fluoreszenz stieg auch bei pH 9 weiter an.

Unter den gegebenen Bedingungen war zu beobachten, dass b-ALA die höchste PpIX-Fluoreszenz induzierte, während ALA und h-ALA schwächer wirkten und m-ALA nur zu sehr geringer Fluoreszenz führte (Abbildung 3.1).

Im Anschluss an die Bestimmung der PpIX-Fluoreszenz wurde die Auswirkung des pH-Wertes auf die Vitalität der Zellen mittels WST-Test bestimmt.

Hierbei zeigte sich, dass die Vitalität der Zellen nicht eindeutig durch den pH-Wert beeinflusst wurde, sondern im gesamten untersuchten pH-Spektrum (pH 6-9) relativ konstant um 80% betrug (Abbildung 3.2).

Unter den oben genannten Bedingungen wurden die Zellen nach der 4-stündigen Inkubation mittels Laser bestrahlt und die Vitalität nach weiteren 24 Stunden bestimmt. Dabei ließ sich eine Abnahme der Überlebensrate der Zellen bei allen pH-Werten erkennen, wenn die Zellen bestrahlt wurden. Diese Abnahme ist bei allen Lichtdosen (5-ALA: 1 und 5 Joule; h-ALA: 2 und 10 Joule) zu beobachten und bei den höheren jeweils stärker ausgeprägt.

Ferner zeigte sich bei 5-ALA eine Abnahme der Vitalität bei pH 7,2 im Vergleich zu pH 6 und blieb bei noch höheren pH-Werten konstant auf diesem niedrigen Niveau. Ein ähnliches Ergebnis lieferten die Versuche mit h-ALA, wobei die Vitalität hier erst bei pH 8 abfiel (Abbildung 3.3).

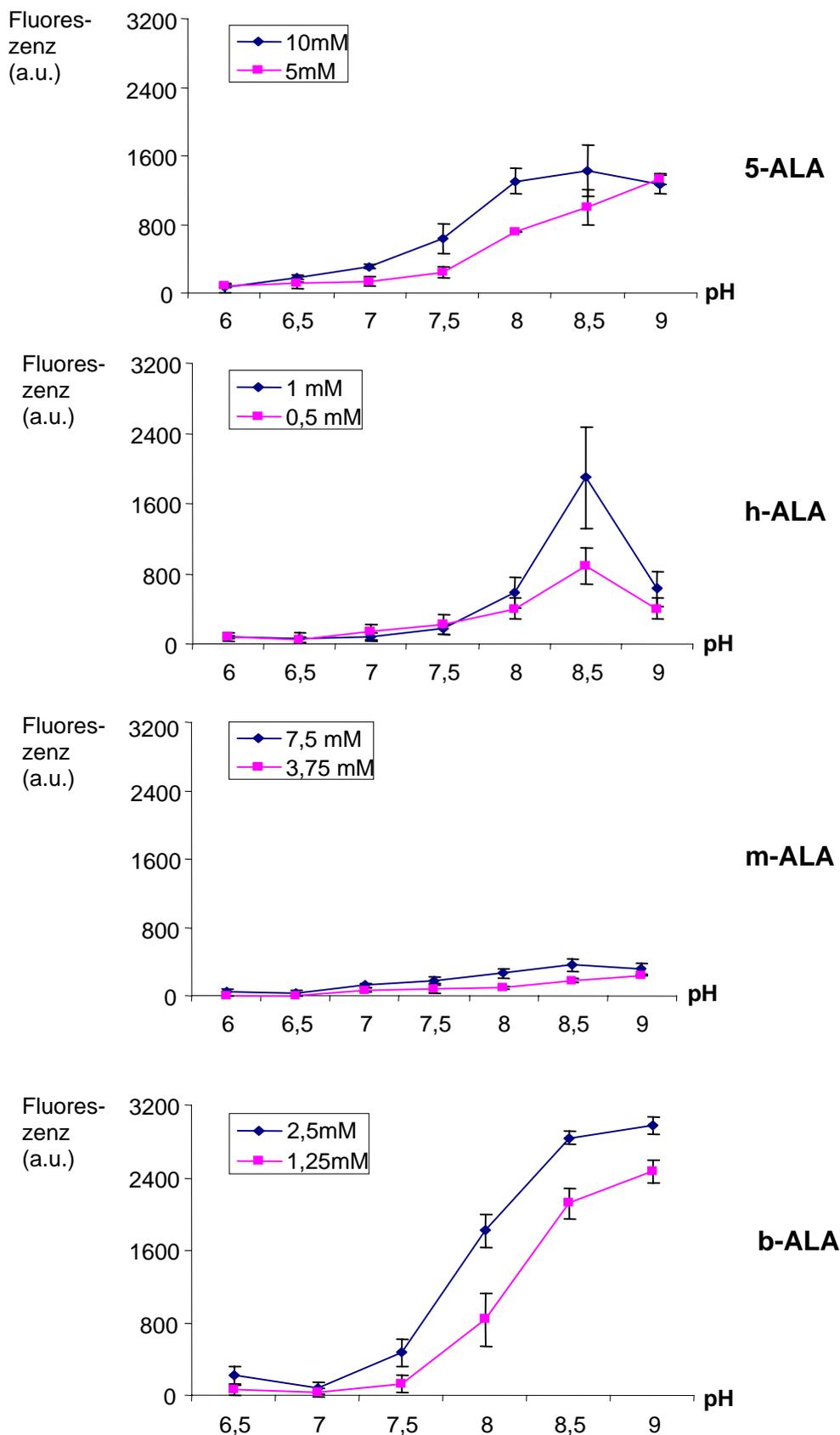


Abbildung 3.1. Protoporphyrin IX-Fluoreszenz von C33A-Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit 5-ALA, m-ALA, b-ALA und h-ALA bei verschiedenen pH-Werten. Verwendung von jeweils 2 verschiedenen Konzentrationen von 5-ALA und ihren Estern. Darstellung der Mittelwerte und des SEM aus 3 unabhängigen Versuchen.

Ergebnisse

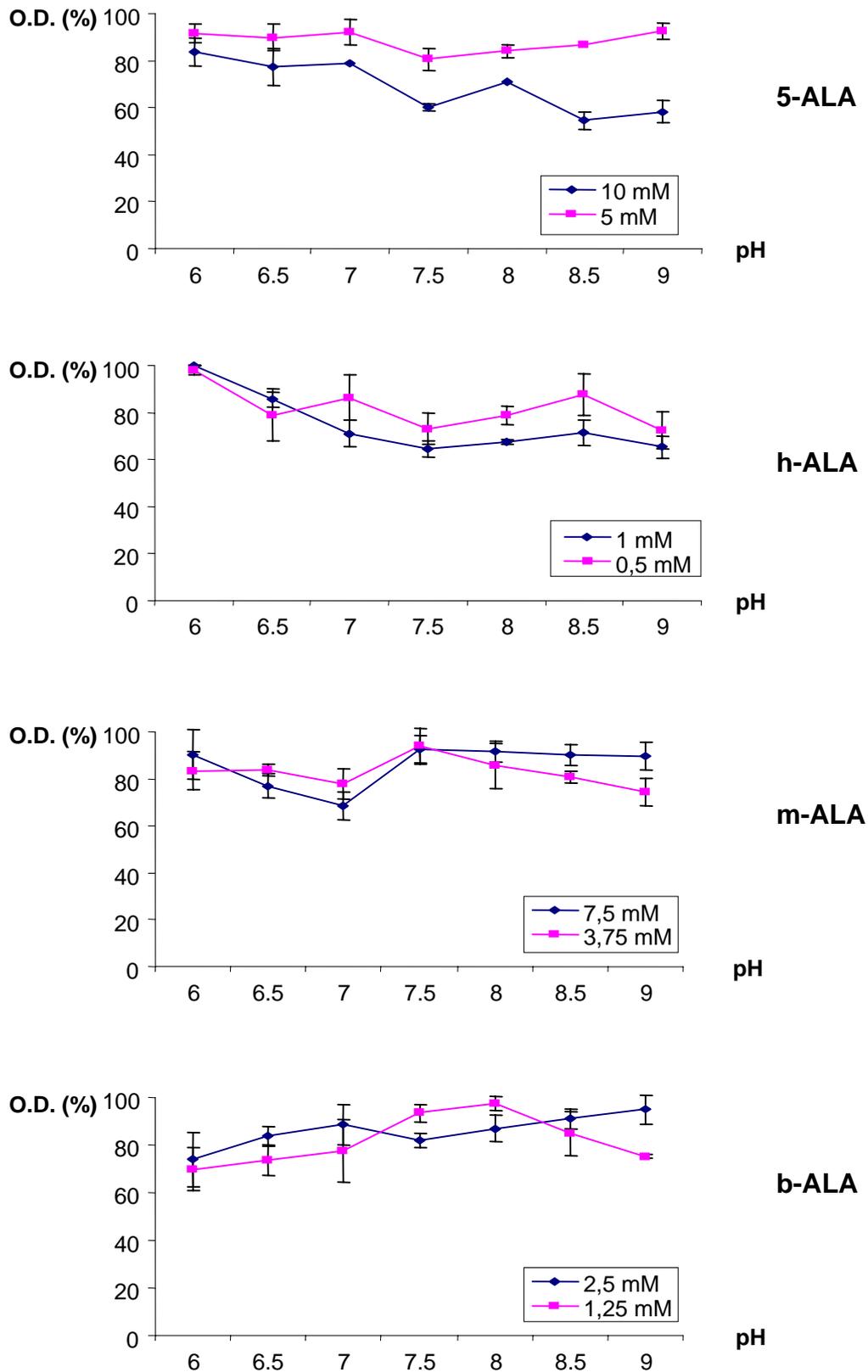


Abbildung 3.2. Messung der Mitochondrienaktivität (WST-1Test) von C33A-Zellen nach 4-stündiger Inkubation der Zellen mit 5-ALA, m-ALA, b-ALA und h-ALA bei verschiedenen pH-Werten. Darstellung der Mittelwerte und des SEM aus 3 unabhängigen Versuchen.

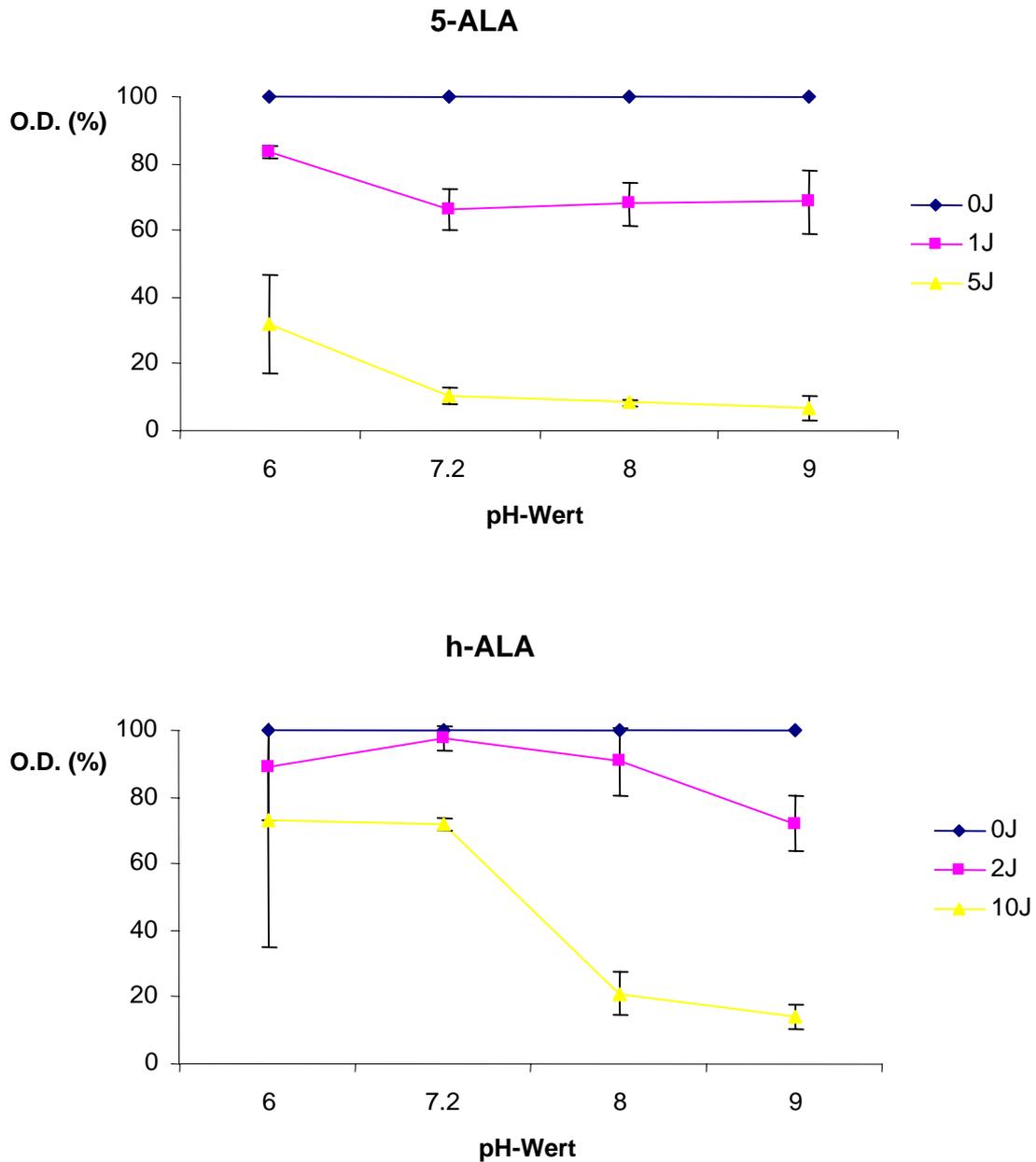


Abbildung 3.3. Mitochondrienaktivität (WST-1Test) von C33A-Zellen nach 4-stündiger Inkubation der Zellen mit 5-ALA und h-ALA bei verschiedenen pH-Werten und nachfolgender Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 635 nm. Die Durchführung und die Messung des WST-1Tests erfolgte 24 Stunden nach Bestrahlung mittels Laser. Darstellung der Mittelwerte und des SEM aus 3 unabhängigen Versuchen.

3.2 Protoporphyrin IX-Fluoreszenz und Photodynamische Wirksamkeit in Abhängigkeit von Serum

Aus der Literatur ist bekannt, dass Serum einen hemmenden Einfluss auf die Protoporphyrin IX-Synthese nach Inkubation mit 5-ALA und ihren Estern hat. Es sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss die Zugabe von FCS auf die PpIX-Fluoreszenz in C33A-Zellen hat. Dazu wurden die Zellen für 4 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von 5-ALA oder ihren Estern bei ansteigenden Serumkonzentrationen inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der PpIX-Fluoreszenz mittels *Fluoreszenzreaders*. Dann wurden die Zellen mit verschiedenen Lichtdosen bestrahlt und nach weiteren 24 Stunden ihre Vitalität durch einen WST-Test bestimmt.

Dabei zeigte sich mit zunehmender FCS-Konzentration eine kontinuierliche Abnahme der PpIX-Fluoreszenz. Dieser Effekt ließ sich bei 5-ALA, m-ALA, b-ALA, und h-ALA unabhängig von ihrer Konzentration nachweisen. Die Abnahme betrug bei Zugabe von 20% FCS im Vergleich zu den ohne FCS behandelten Zellen im Durchschnitt 64%. Auch eine Zugabe von 10% führte zu einer niedrigeren Fluoreszenz, wobei 20% FCS aber einen noch stärkeren Effekt aufwies. Außerdem ließ sich beobachten, dass das Fluoreszenzniveau höher lag, wenn eine höhere Konzentration von 5-ALA oder ihren Estern verwendet wurde (Abbildung 3.4).

Nach Bestrahlung überlebten nahezu alle Zellen, die nicht mit 5-ALA oder h-ALA behandelt wurden. Sowohl bei 5-ALA als auch bei h-ALA lag die Vitalität ohne Bestrahlung bei 100%, während sie bei der höher gewählten Bestrahlungsdosis unabhängig vom FCS-Gehalt unter 20% fiel. Bei einer 5-ALA-Konzentration von 5 bzw. 10 mM lässt sich ein geringfügiger Anstieg der Vitalität erkennen, wenn den Zellen Serum zugefügt wurde. Diese Zunahme der Überlebensrate ist bei der geringeren Bestrahlungsdosis sowohl bei 5-ALA, als auch bei h-ALA unabhängig von ihren Konzentrationen sehr deutlich ausgeprägt. Die Bedingung 10% FCS war der Bedingung 0% FCS für 5-ALA ($p < 0,001$) hinsichtlich der Vitalität signifikant überlegen. So ließ sich durch den Einsatz von 10% Serum eine Vitalität von bis zu 80% bei 5-ALA und bis zu 60% bei h-ALA erzielen im Gegensatz zu 20%, wenn kein Serum hinzugefügt wurde (Abbildung 3.5).

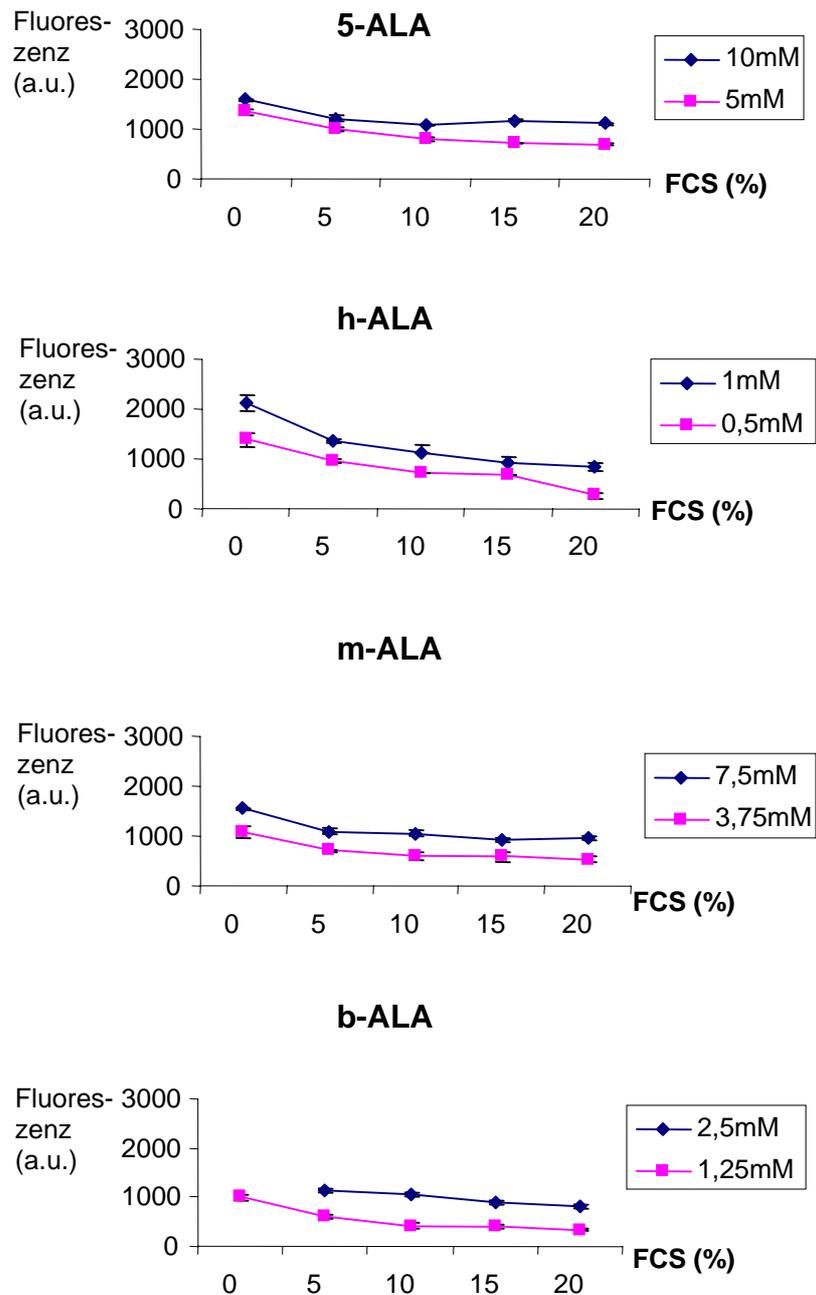


Abbildung 3.4. Intrazelluläre Protoporphyrin IX-Fluoreszenz von C33A-Zellen als Funktion der FCS-Konzentration (0-20%) nach 4-stündiger Inkubation mit 5-ALA, m-ALA, b-ALA und h-ALA bei verschiedenen Konzentrationen. Darstellung der Mittelwerte und des SEM aus 3 unabhängigen Versuchen.

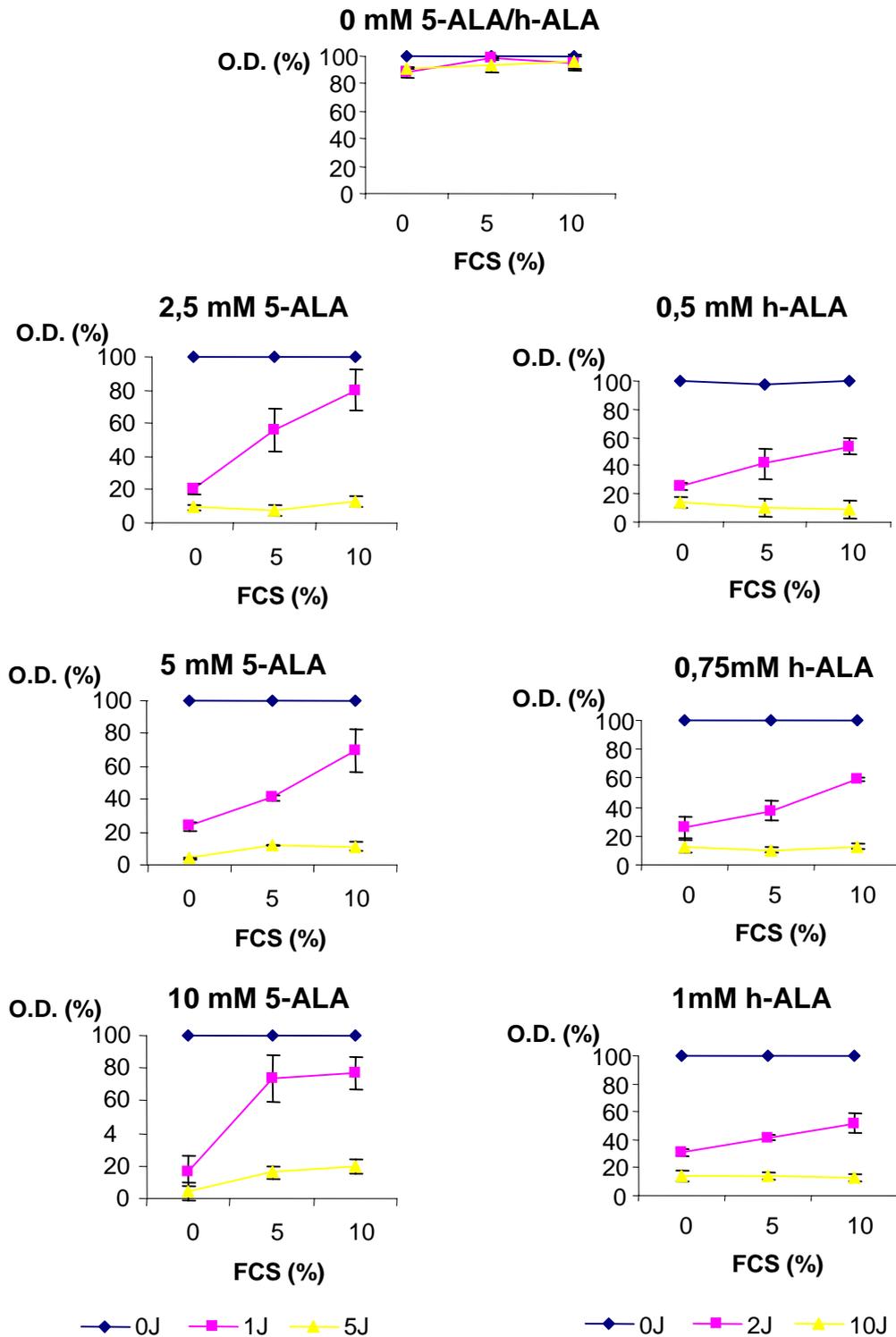


Abbildung 3.5. Mitochondrienaktivität (WST-1Test) von C33A-Zellen in Abhängigkeit von der FCS-Konzentration (0-20%) nach 4-stündiger Inkubation der Zellen mit 5-ALA und h-ALA bei verschiedenen 5-ALA bzw. h-ALA- Konzentrationen und nachfolgender Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 635 nm. Die Durchführung und die Messung des WST-Assays erfolgte 24 Stunden nach Bestrahlung mittels Laser. Darstellung der Mittelwerte und des SEM aus 3 unabhängigen Versuchen.

3.3 Protoporphyrin IX-Fluoreszenz, Dunkeltoxizität und Photodynamische Wirksamkeit in Abhängigkeit von EDTA

Um den Einfluss von EDTA auf die PpIX-Fluoreszenz, Dunkeltoxizität und Photodynamische Wirksamkeit zu untersuchen wurde die Zelllinie C33A mit verschiedenen Konzentrationen von 5-ALA oder ihren Estern bei ansteigenden EDTA-Konzentrationen für 4 Stunden inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Messung der PpIX-Fluoreszenz und der Dunkeltoxizität, 24 Stunden nach Bestrahlung wurde ebenfalls die Zellvitalität bestimmt.

Die PpIX-Fluoreszenz wurde durch den Einsatz von 100 μM oder 1000 μM EDTA gesteigert. Dies ließ sich bei allen verwendeten 5-ALA- und m-ALA-Konzentrationen außer bei 10 mM beobachten. Bei b-ALA zeigte sich dieser Effekt bei allen Konzentrationen außer bei 5 mM. Hingegen war dieser Effekt bei h-ALA allenfalls unter Hinzugabe von 100 μM EDTA zu erkennen, die Zugabe von 1000 μM führte dann wieder zu einem Abfall der Fluoreszenz (Ausnahme 0,1 und 2,5 mM) (Abbildung 3.6).

Konnte ein kontinuierlicher Anstieg von 0 auf 1000 μM EDTA beobachtet werden, so betrug er im Durchschnitt für 5-ALA 23%, für m-ALA 32% und für b-ALA 29%. Der Anstieg der PpIX-Fluoreszenz bei h-ALA nach Gabe von 100 μM EDTA machte jedoch im Mittel nur 6% aus. Die Tabelle 3.1. gibt Auskunft über die Statistik.

	p (0, 100 μM)	p (0, 1000 μM)	p (100 μM , 1000 μM)
5-ALA	<0,023	<0,002	<0,044
h-ALA	<0,016	<0,016	=0,306
m-ALA	<0,016	<0,006	<0,039
b-ALA	=0,211	<0,019	<0,001

Tabelle 3.1. Wilcoxon-Test für die durch 5-ALA und ihre Ester induzierte PpIX-Synthese bei C33A-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an EDTA.

EDTA zeigt keine toxischen Effekte auf die Zellen, wie aus den Versuchen zur Dunkeltoxizität und Bestrahlung ohne vorherige Behandlung mit 5-ALA bzw. h-ALA hervorging (Abbildung 3.7 und 3.8). Der Vitalitätsverlust bei der Dunkeltoxizität war allein auf hohe Konzentrationen von 5-ALA (10 mM) bzw. h-ALA (2,5 mM und 5 mM) zurückzuführen.

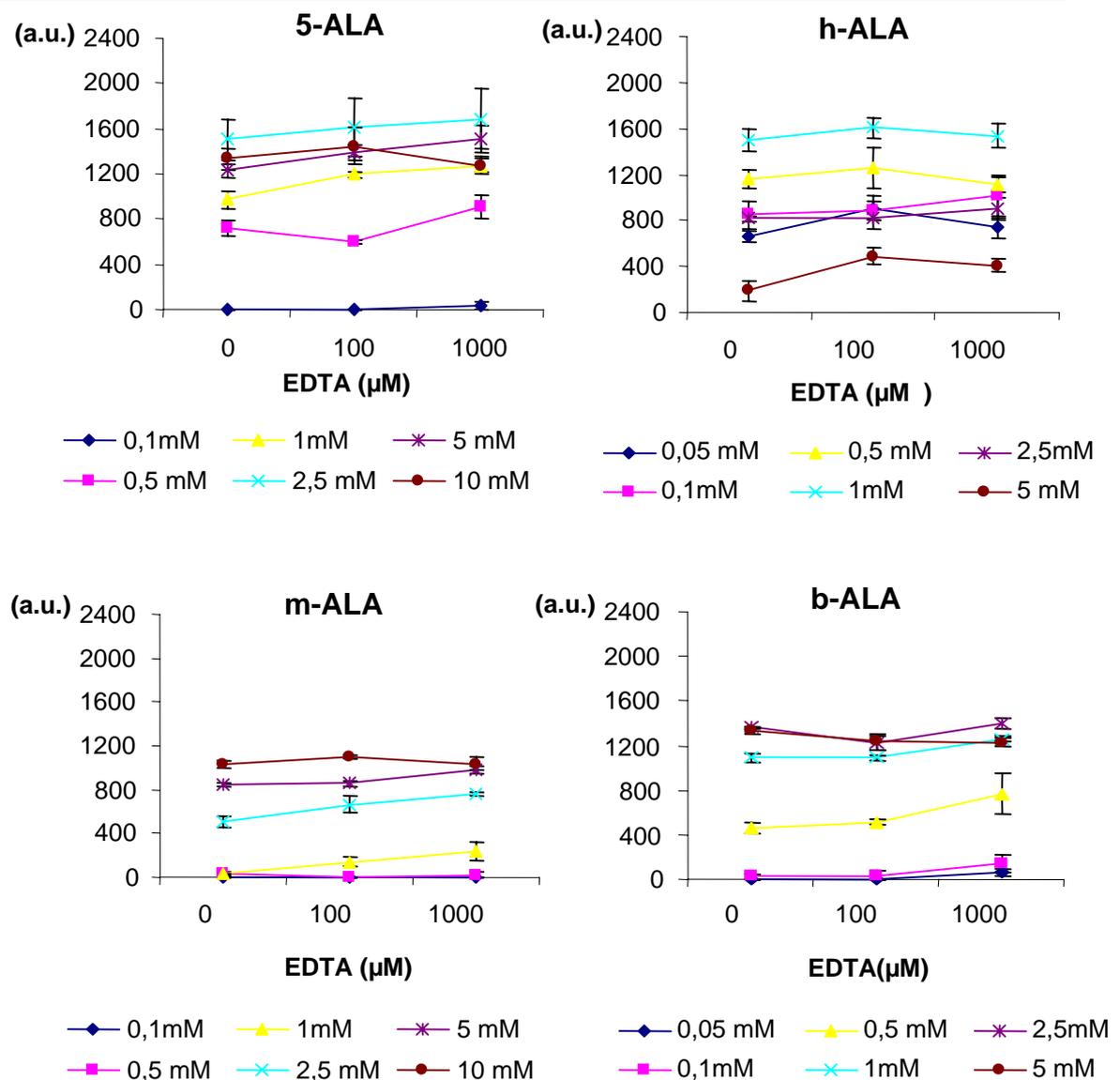


Abbildung 3.6. Intrazelluläre Protoporphyrin IX-Fluoreszenz von C33A-Zellen als Funktion der EDTA-Konzentration (0 µM, 100µM, 1000 µM), nach 4-stündiger Inkubation mit 5-ALA, m-ALA, b-ALA und h-ALA bei verschiedenen Konzentrationen. Darstellung der Mittelwerte und des SEM aus 3 unabhängigen Versuchen. a.u. = Fluoreszenz

24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 bzw. 10 Joule kam es zu einem drastischen Abfall der Überlebensrate der C33A-Zellen, die mit h-ALA inkubiert wurden, auf 20%. Durch Zugabe von 1000 µM EDTA ließ sich die Rate um 11% steigern. Die selben Effekte wurden auch bei 5-ALA nach Bestrahlung mit 1 bzw. 5 Joule beobachtet, wenn die 5-ALA-Konzentration 5 mM betrug. Diese Ergebnisse waren nicht signifikant. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei 1 mM 5-ALA außer dem durch 5-ALA hervorgerufenen Vitalitätsverlust eine weitere Reduktion der Vitalität, wenn die Zellen zusätzlich EDTA ausgesetzt waren.

Wiederum konnte man erkennen, dass die höheren Bestrahlungsdosen zu insgesamt stärkeren Verlusten der Vitalität der Zellen führte (Abbildung 3.8).

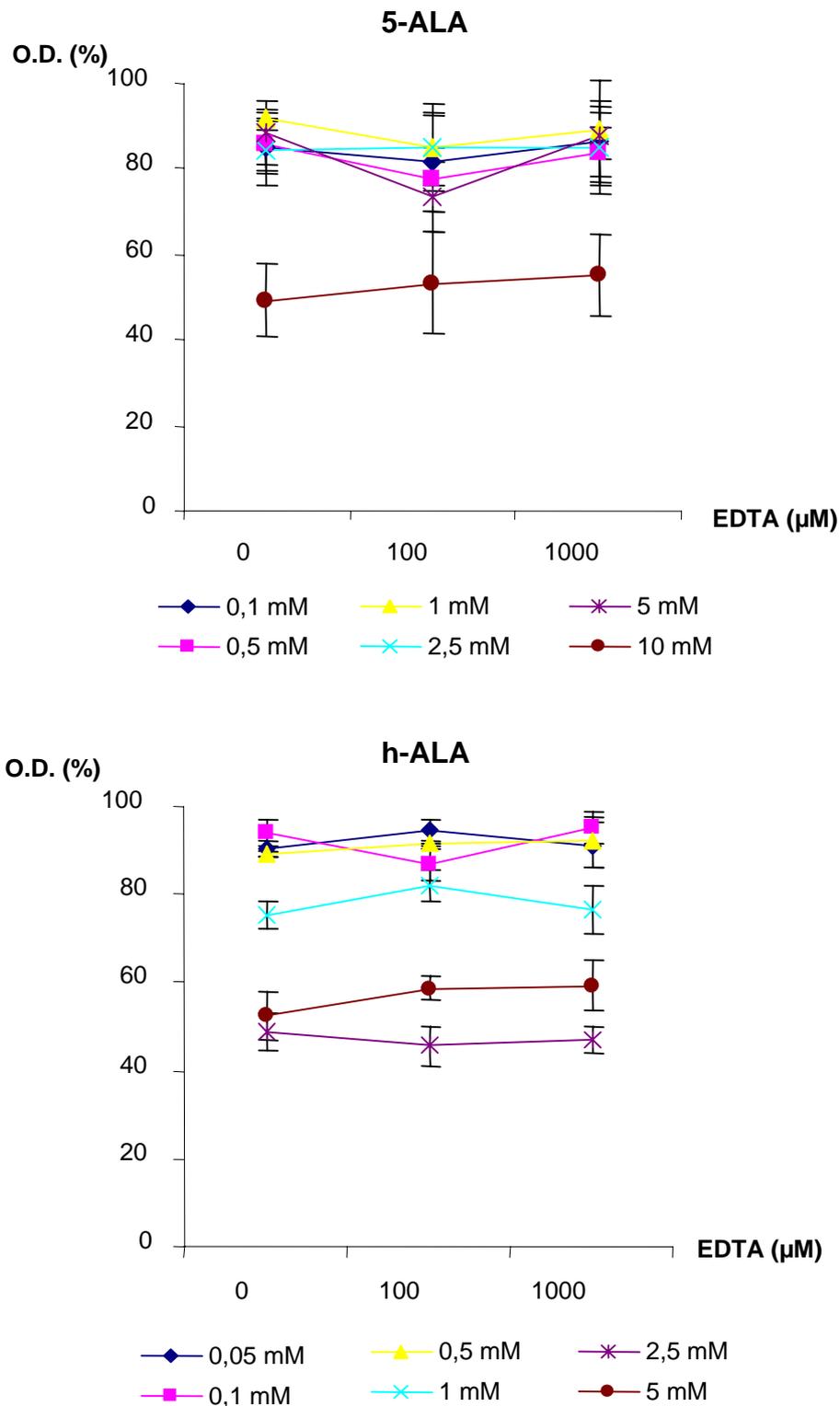


Abbildung 3.7. Messung der Mitochondrienaktivität (WST-1Test) von C33A-Zellen in Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration (0 µM, 100µM, 1000µM), nach 4-stündiger Inkubation der Zellen mit 5-ALA und h-ALA bei verschiedenen Konzentrationen. Darstellung der Mittelwerte und des SEM aus 3 unabhängigen Versuchen.

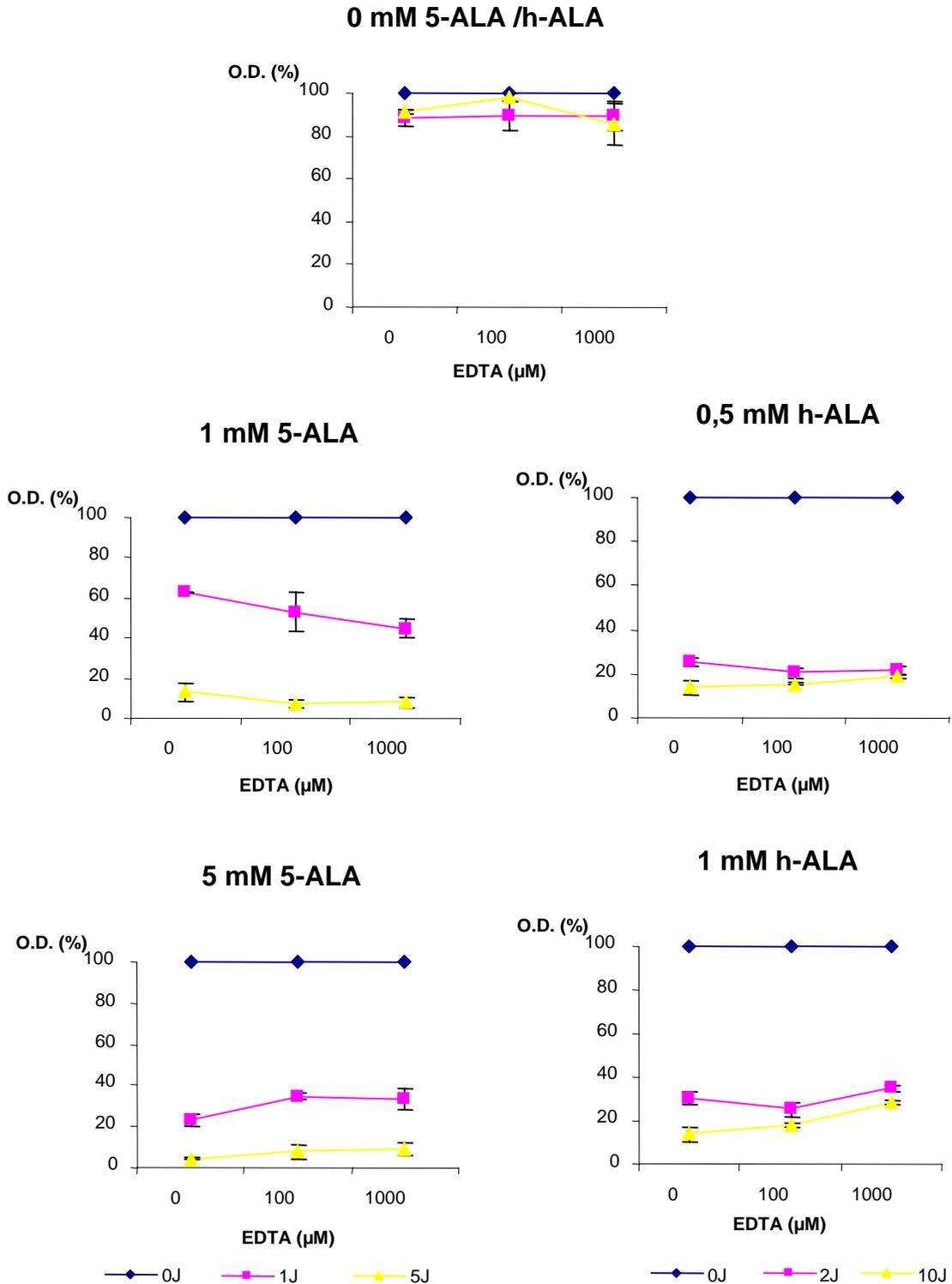


Abbildung 3.8. Mitochondrienaktivität (WST-1Test) von C33A-Zellen in Abhängigkeit von der EDTA- Konzentration (0 µM, 100µM, 1000µM), nach 4-stündiger Inkubation der Zellen mit 5-ALA und h-ALA bei 2 verschiedenen Konzentrationen und nachfolgender Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 635 nm. Die Durchführung und die Messung des WST-1Test erfolgte 24 Stunden nach Bestrahlung mittels Laser. Darstellung der Mittelwerte und des SEM aus 3 unabhängigen Versuchen.

3.4 Protoporphyrin IX-Fluoreszenz, Dunkeltoxizität und Photodynamische Wirksamkeit in Abhängigkeit von Desferrioxamin

Wie Berg 1996 beschrieb, lässt sich durch Kombination von DEF und 5-ALA bzw. deren Derivaten eine Steigerung der PpIX-Fluoreszenz erreichen.

In den Versuchen sollte dieser Effekt bei der Zelllinie C33A untersucht werden. Ferner sollte gezeigt werden, ob sich durch DEF die Dunkeltoxizität und die Photodynamische Wirksamkeit verändert. Dazu wurden die Zellen für 4 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von 5-ALA oder ihren Estern bei ansteigenden DEF-Konzentrationen inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der PpIX-Fluoreszenz und die Dunkeltoxizität. Dann wurden die Zellen mit verschiedenen Lichtdosen bestrahlt und ihre Vitalität nach weiteren 24 Stunden durch einen WST-1 Test erneut bestimmt.

Bei der Bestimmung der PpIX-Fluoreszenz konnte gezeigt werden, dass die durch 5-ALA und ihre Ester induzierte Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration von DEF zunahm (Abbildung 3.9).

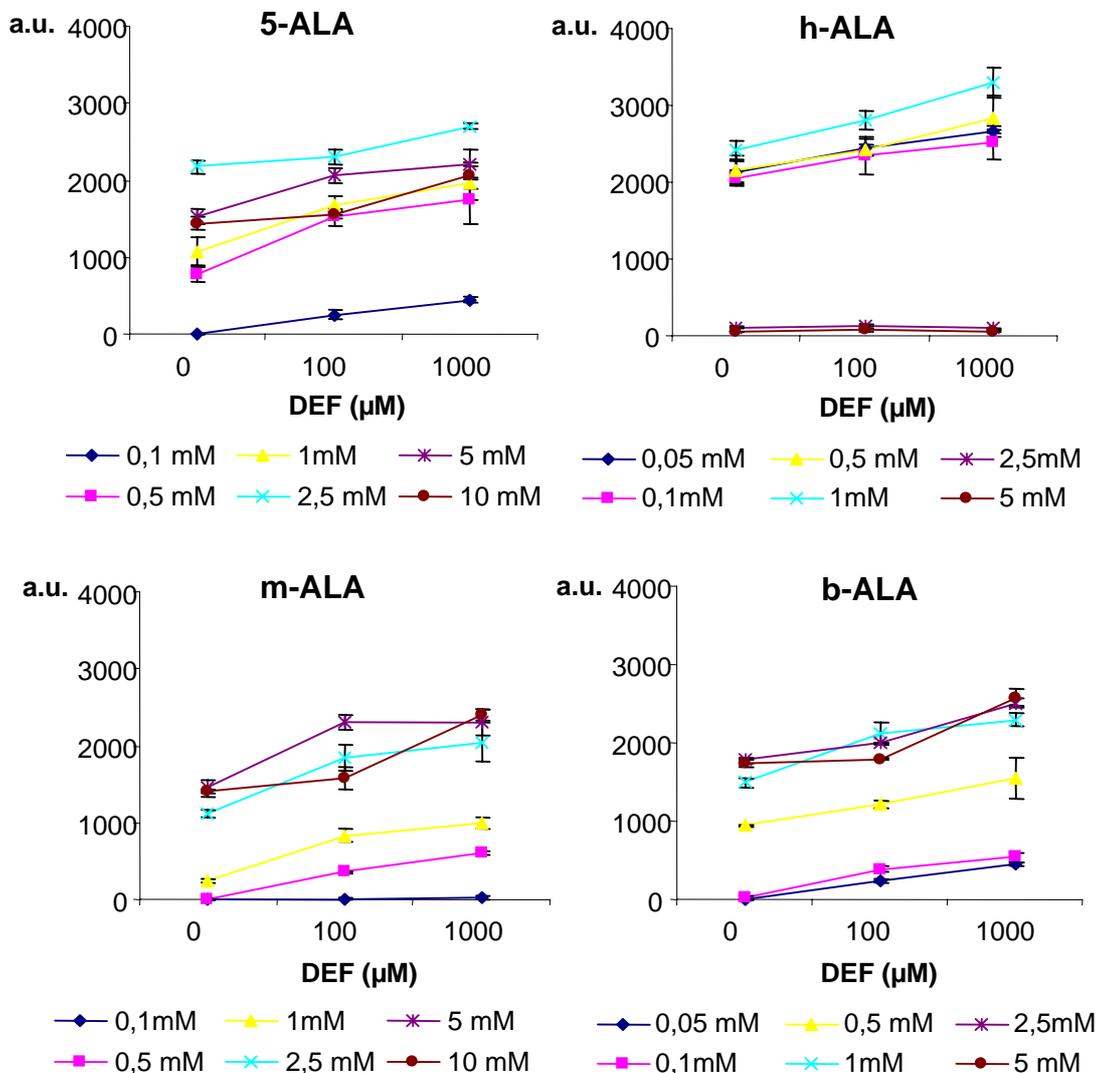


Abbildung 3.9. Intrazelluläre Protoporphyrin IX-Fluoreszenz von C33A-Zellen in Abhängigkeit von der DEF-Konzentration (0 µM, 100 µM, 1000 µM), nach 4-stündiger Inkubation mit 5-ALA, m-ALA, b-ALA und h-ALA bei verschiedenen Konzentrationen. Darstellung der Mittelwerte und des SEM aus 3 unabhängigen Versuchen. Fluoreszenz = a.u.

Der Anstieg ließ sich für alle untersuchten Konzentrationen von 5-ALA oder ihren Derivaten sowohl von 0 μM auf 100 μM DEF als auch von 100 μM auf 1000 μM DEF beobachten (Ausnahme: 2,5 mM h-ALA, 5 mM h-ALA, 0,1 mM m-ALA). Er betrug je nach verwendeten 5-ALA/ Ester-Konzentrationen bei 5-ALA im Mittel 63%, bei h-ALA 29%, bei m-ALA 71% und bei b-ALA 52%, jeweils von 0 auf 1000 μM DEF. Tabelle 3.2. zeigt einen Überblick über die Statistik.

	p (0, 100 μM)	p (0, 1000 μM)	p (100 μM , 1000 μM)
5-ALA	<0,001	<0,001	<0,001
h-ALA	<0,002	<0,003	<0,004
m-ALA	<0,001	<0,001	<0,001
b-ALA	<0,001	<0,001	<0,001

Tabelle 3.2. Wilcoxon-Test für die durch 5-ALA und ihre Ester induzierte PpIX-Fluoreszenz in C33A-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an DEF.

In Abbildung 3.10. lässt sich erkennen, dass die Substanz DEF per se keine Toxizität aufwies. Es zeigte sich sogar, dass die mit 1000 μM DEF inkubierten Zellen besser überlebten, als die Zellen, die ohne DEF behandelt wurden. Außerdem konnte wieder eine leichte Abnahme (ca. 20%) der Vitalität bei zunehmender 5-ALA/ Ester-Konzentration beobachtet werden.

Im WST-Test 24 Stunden nach Bestrahlung zeigte sich ein Verlust der Lebensfähigkeit der Zellen in Abhängigkeit von sowohl dem Einsatz an DEF als auch von deren Konzentration. Dieser Effekt ist bei höherer und niedrigerer Lichtdosis zu erkennen, wobei er bei der höheren schwächer ausgeprägt war (Abbildung 3.11). Die Vitalitätsverluste durch den Einsatz von 100 μM bzw. 1000 μM DEF waren bei h-ALA statistisch signifikant ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,004$), bei 5-ALA hingegen ließen sich keine statistisch signifikanten Vitalitätsverluste nachweisen. Wiederum zeigte sich, dass die Verwendung einer höheren Lichtdosis insgesamt zu stärkeren Einbußen der Vitalität führte und dass nahezu alle Zellen überlebten, die nicht mit 5-ALA oder h-ALA behandelt wurden.

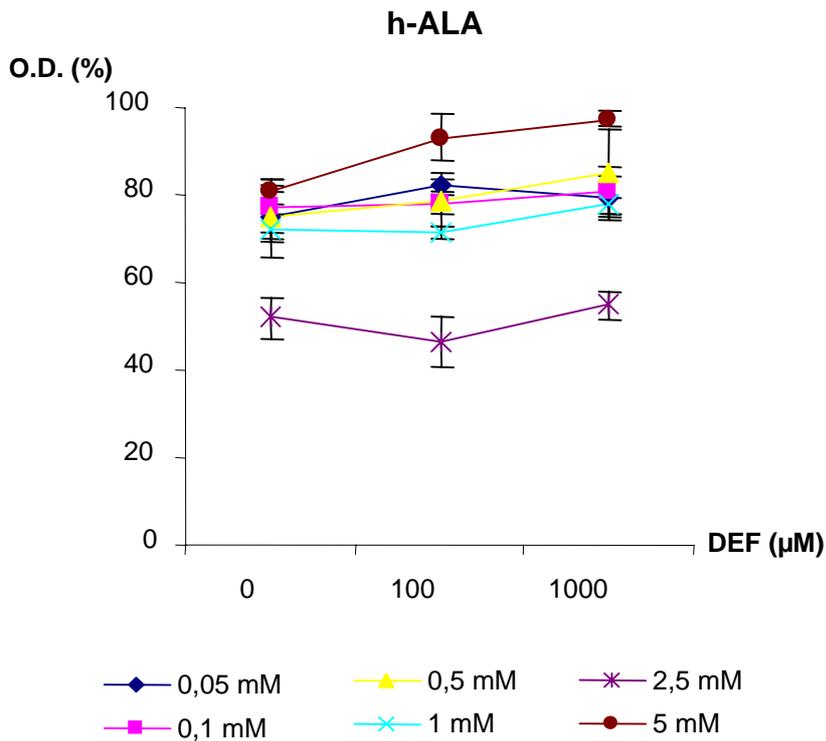
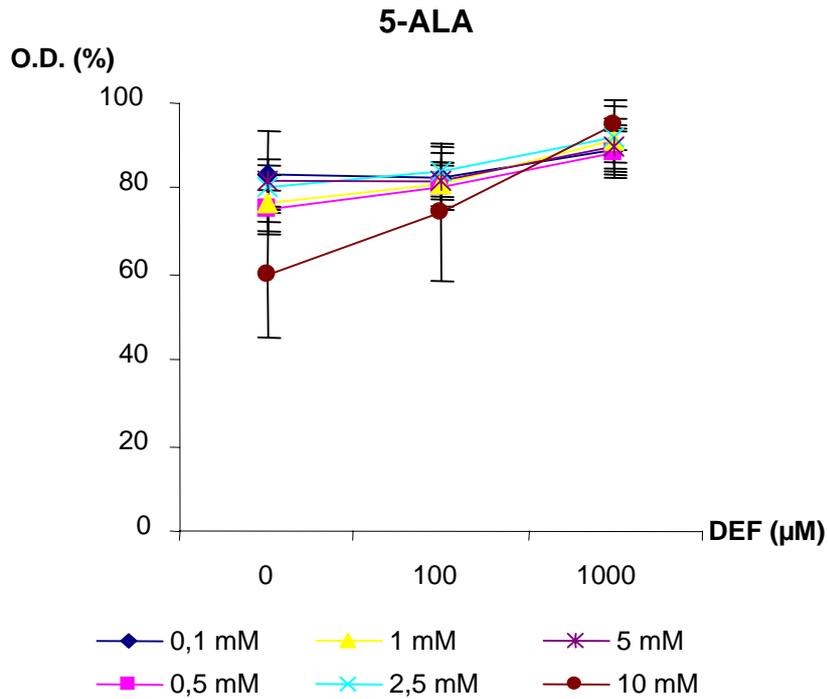


Abbildung 3.10. Messung der Mitochondrienaktivität (WST-1 Test) von C33A-Zellen in Abhängigkeit von der DEF-Konzentration (0 µM, 100µM, 1000µM), nach 4-stündiger Inkubation der Zellen mit 5-ALA und h-ALA bei verschiedenen Konzentrationen. Darstellung der Mittelwerte und des SEM aus 3 unabhängigen Versuchen.

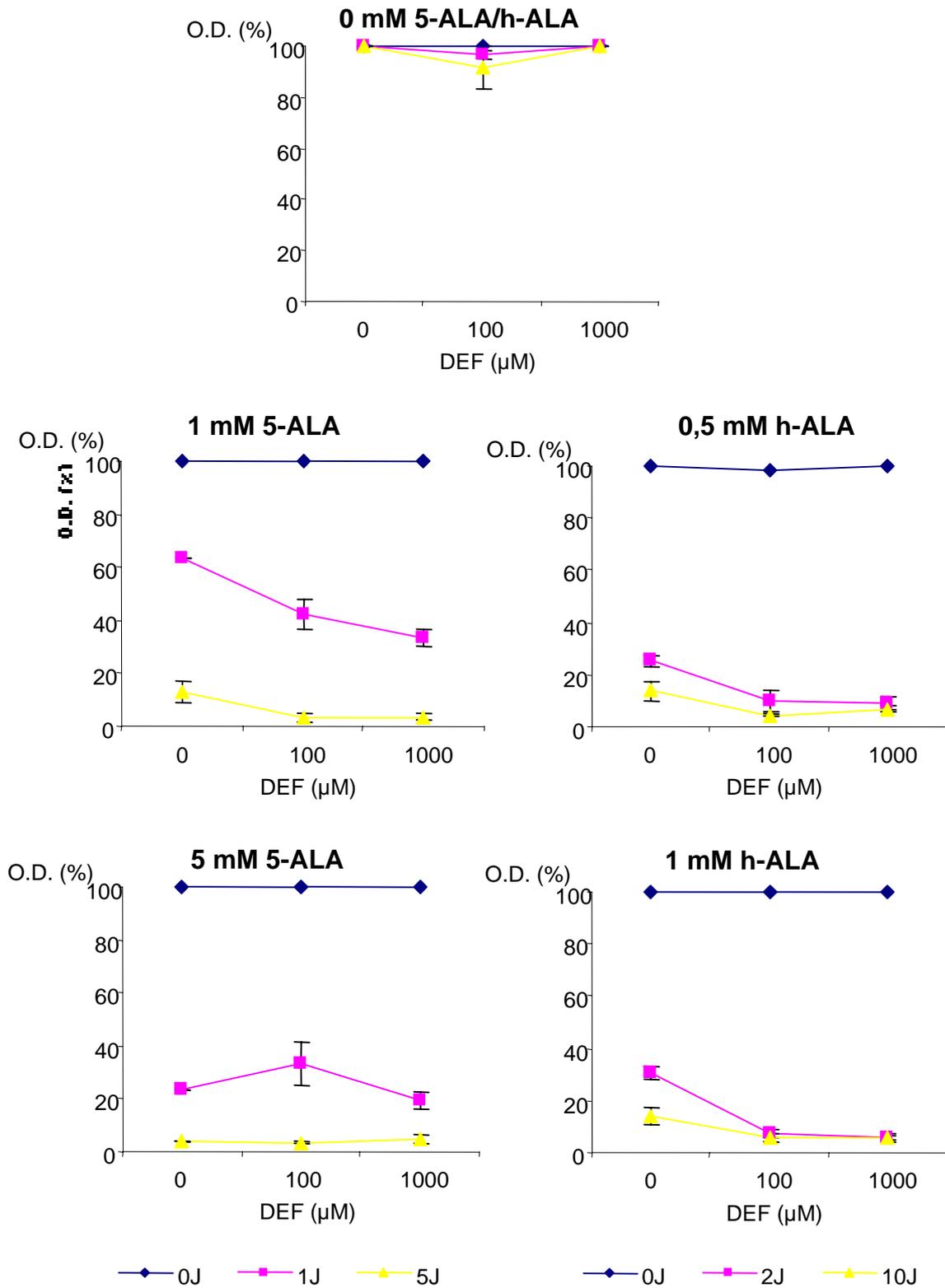


Abbildung 3.11. Mitochondrienaktivität (WST-1 Test) von C33A-Zellen in Abhängigkeit von der DEF-Konzentration (0 µM, 100µM, 1000µM), nach 4-stündiger Inkubation der Zellen mit 5-ALA und h-ALA bei 2 verschiedenen 5-ALA bzw. h-ALA- Konzentrationen und nachfolgender Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 635 nm. Die Durchführung und die Messung des WST-1 Test erfolgte 24 Stunden nach Bestrahlung mittels Laser. Darstellung der Mittelwerte und des SEM aus 3 unabhängigen Versuchen.

3.5 Protoporphyrin IX-Fluoreszenz in CaSki-Zellen in Abhängigkeit von pH-Wert, Serum, EDTA und Desferrioxamin

Um den Einfluss von pH-Wert, Serum, EDTA und DEF auf die PpIX-Fluoreszenz in Zervixkarzinomzellen zu verdeutlichen, wurden die oben beschriebenen Versuche zur PpIX-Fluoreszenz auch an CaSki-Zellen durchgeführt. Dabei konnten ähnliche Resultate wie bei der Zelllinie C33A beobachtet werden.

Genau wie bei der Zelllinie C33A war die PpIX-Fluoreszenz bei niedrigen pH-Werten auf einem konstant niedrigen Niveau. Ein Anstieg konnte je nach verwendeten 5-ALA/Ester bei unterschiedlichen pH-Werten beobachtet werden. Wie in Abbildung 3.12. ersichtlich stieg die Fluoreszenz bei 5-ALA bei pH 7,5, bei b-ALA bei pH 8 und bei h-ALA bei pH 9. Bei diesen erhöhte sich die Fluoreszenz mit steigendem pH-Wert kontinuierlich bis pH 9. Im Gegensatz dazu konnte bei m-ALA nach einem Anstieg ab pH 7,5 ein Maximum der Fluoreszenz bei pH 8,5 für die höhere m-ALA-Konzentration (7,5 mM) und pH 8 für 3,75 mM m-ALA gesehen werden. Bei noch höheren pH-Werten fiel die PpIX-Fluoreszenz hier wieder auf ein geringeres Niveau ab.

Der die PpIX-Synthese beeinflussende Faktor Serum (FCS) zeigte ebenso wie bei C33A-Zellen die selbe Wirkung bei der hier untersuchten CaSki-Zelllinie. Es fand sich nämlich bei allen verwendeten 5-ALA-/Ester-Konzentrationen ein vom FCS-Gehalt abhängiger Abfall der PpIX-Fluoreszenz. Je mehr FCS eingesetzt wurde, desto geringer die beobachtete Fluoreszenz (Abbildung 3.13). Im Durchschnitt fiel die Fluoreszenz um 39 % ab, wenn man die Bedingung ohne FCS mit der Bedingung 20 % FCS vergleicht.

EDTA führte bei CaSki-Zellen wie bei C33A-Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der PpIX-Fluoreszenz. Dieser Effekt war sowohl bei 5-ALA, als auch ihren Derivaten zu erkennen, allerdings je nach eingesetzter 5-ALA-/Ester-Konzentration unterschiedlich ausgeprägt (Abbildung 3.14).

Vergleicht man die Fluoreszenz bei 0 μM mit der von 1000 μM EDTA so ergab sich bei 5-ALA eine durchschnittliche Fluoreszenzzunahme von 59%, bei h-ALA von 72%, bei b-ALA von 55% und bei m-ALA von 50%. Tabelle 3.3. gibt einen Überblick über die Statistik.

	p(0, 100 μM)	p(0, 1000 μM)	p(100, 1000 μM)
5-ALA	=0,600	=0,109	<0,006
h-ALA	=0,193	<0,001	<0,001
m-ALA	<0,005	<0,008	=0,140
b-ALA	<0,028	<0,001	<0,013

Tabelle 3.3. Wilcoxon-Test für die durch 5-ALA und ihre Ester induzierte PpIX-Fluoreszenz in CaSki-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an EDTA.

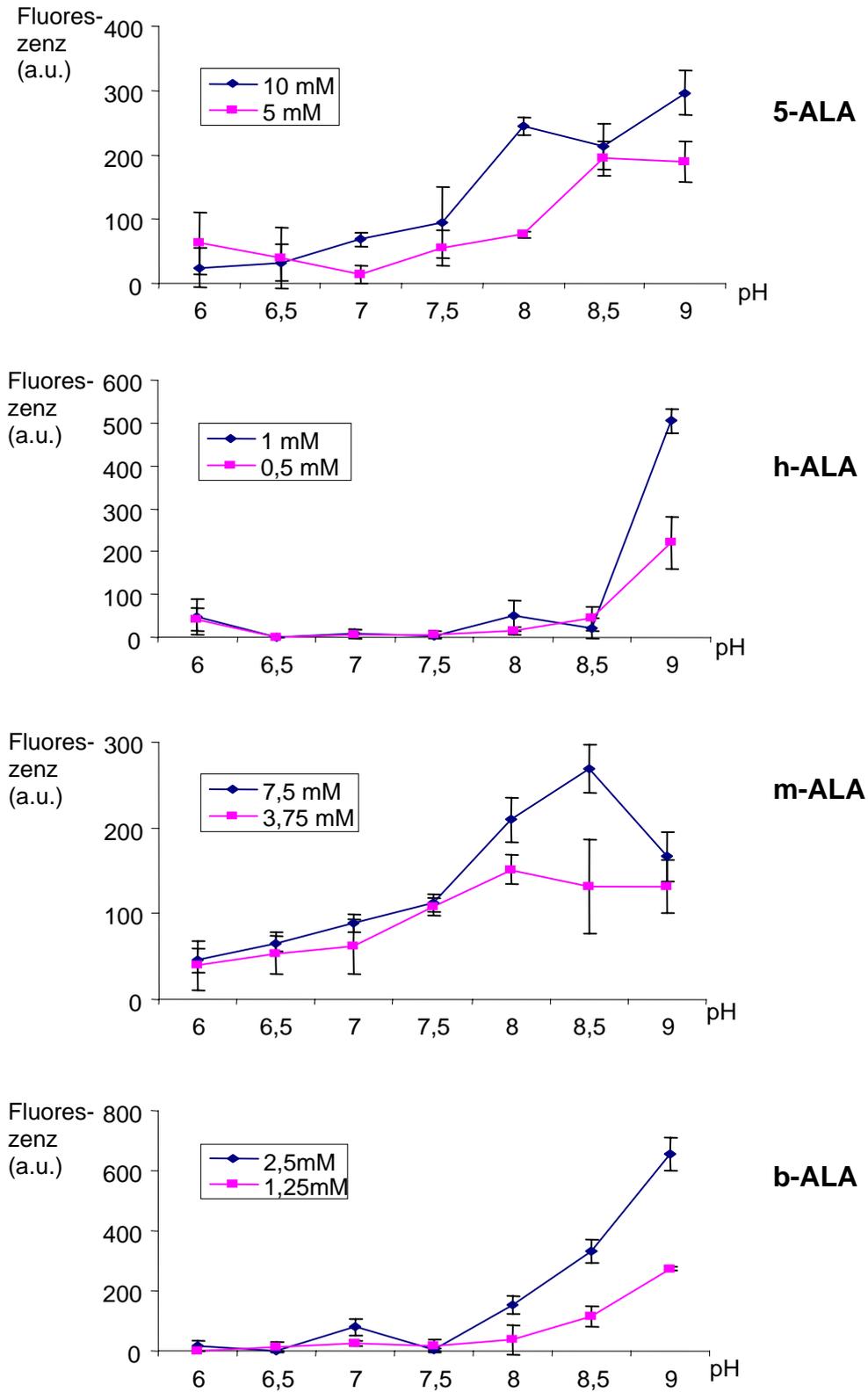


Abbildung 3.12. Protoporphyrin IX-Fluoreszenz von CaSki-Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit 5-ALA, m-ALA, b-ALA und h-ALA bei verschiedenen pH-Werten. Verwendung von jeweils 2 verschiedenen Konzentrationen von 5-ALA und ihren Estern. Darstellung der Mittelwerte und des SEM aus 3 unabhängigen Versuchen.

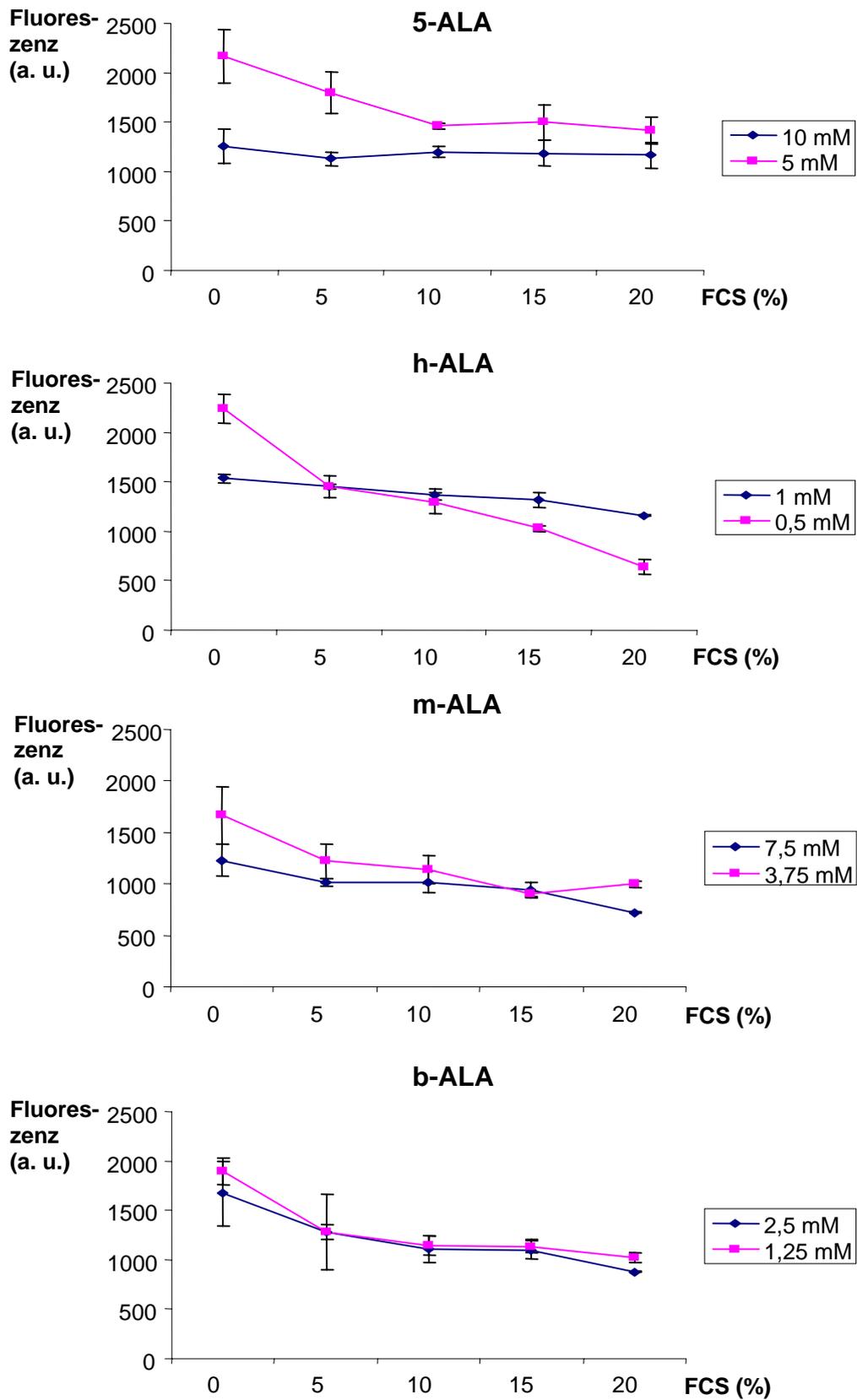


Abbildung 3.13. Intrazelluläre Protoporphyrin IX-Fluoreszenz von CaSki-Zellen als Funktion der FCS-Konzentration (0-20%), nach 4-stündiger Inkubation mit 5-ALA, m-ALA, b-ALA und h-ALA bei verschiedenen Konzentrationen. Darstellung der Mittelwerte und des SEM aus 3 unabhängigen Versuchen.

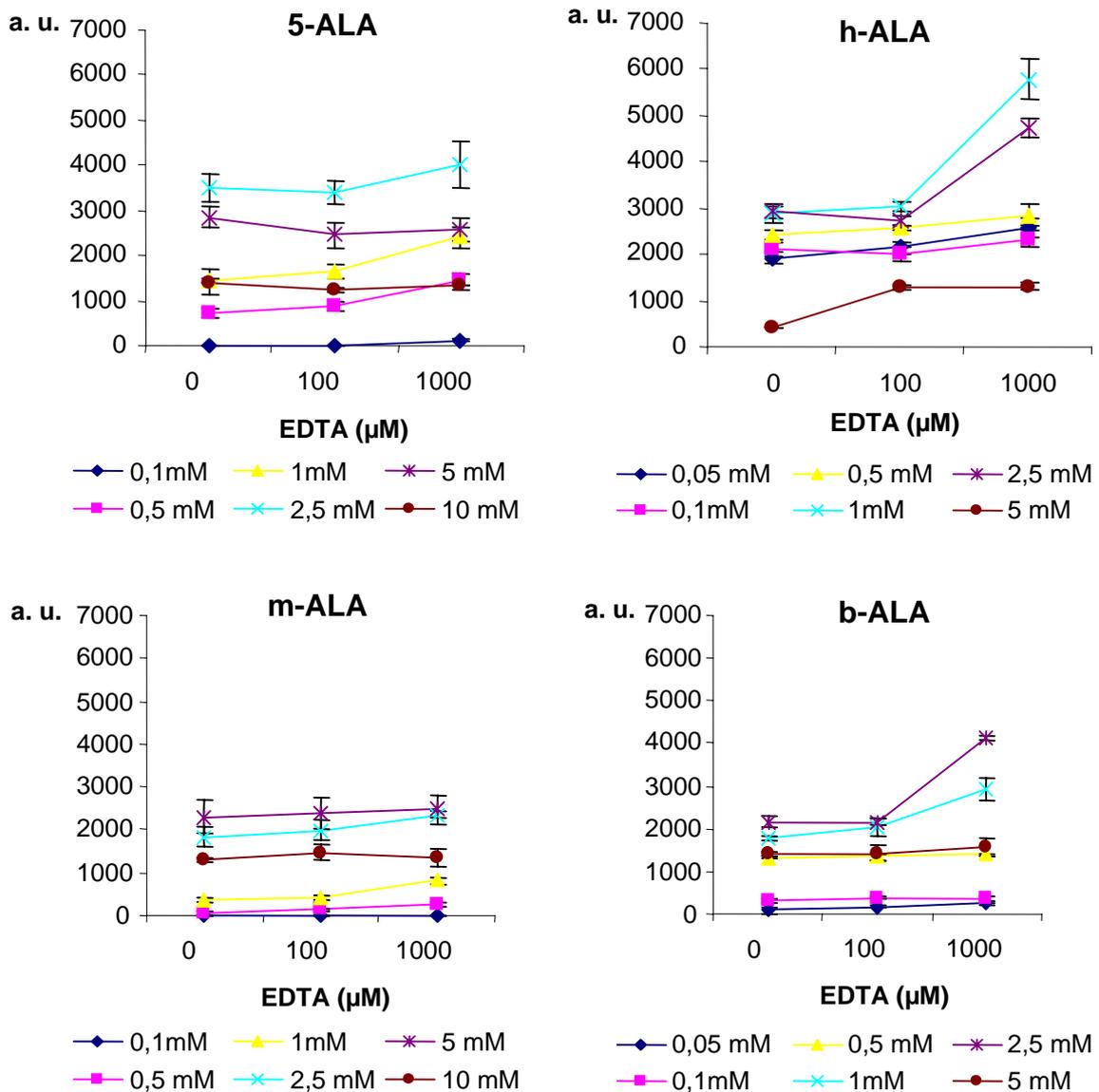


Abbildung 3.14. Intrazelluläre Protoporphyrin IX-Fluoreszenz von CaSki-Zellen als Funktion der EDTA-Konzentration (0 µM, 100µM, 1000 µM), nach 4-stündiger Inkubation mit 5-ALA, m-ALA, b-ALA und h-ALA bei verschiedenen Konzentrationen. Darstellung der Mittelwerte und des SEM aus 3 unabhängigen Versuchen. Fluoreszenz = a.u.

Auf der Abbildung 3.15. sieht man den Einfluss von DEF auf die PpIX-Fluoreszenz in CaSki-Zellen. Es ist erkennbar, dass die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der DEF-Konzentration zunahm. Der Einsatz von 1000 µM DEF im Vergleich zu 0 µM bewirkte bei 5-ALA bei allen Konzentrationen einen Anstieg der Fluoreszenz um 53% und bei b-ALA um 17%. Hingegen konnte bei m-ALA und h-ALA beobachtet werden, dass hier nicht alle verwendeten Konzentrationen zu einer Fluoreszenzzunahme führten. Bei den Konzentrationen, die zu einer Erhöhung der Fluoreszenz durch Einsatz von 1000 µM DEF führten, betrug die Zunahme im Mittel bei m-ALA 63% und bei h-ALA 25%. Einzelheiten und die zugehörige Statistik sind in der Abbildung 3.15. und der Tabelle 3.4. dargestellt.

	p(0, 100µM)	p(0, 1000µM)	p(100, 1000µM)
5-ALA	<0,001	<0,001	<0,010
h-ALA	<0,008	<0,002	=0,647
m-ALA	<0,015	<0,001	<0,005
b-ALA	<0,001	<0,003	=0,981

Tabelle 3.4. Wilcoxon-Test für die durch 5-ALA und ihre Ester induzierte PpIX-Fluoreszenz in CaSki-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an DEF.

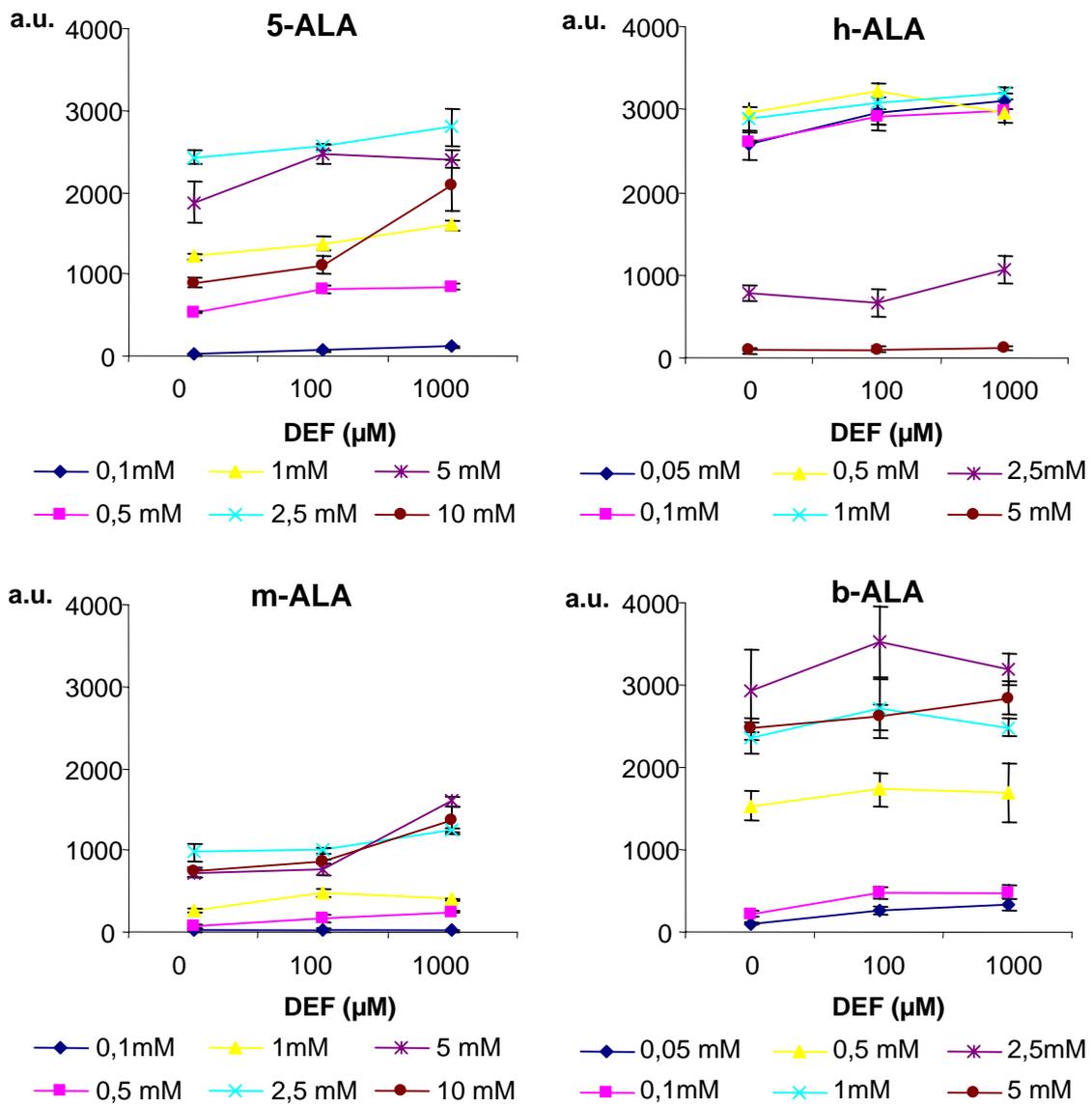


Abbildung 3.15. Intrazelluläre Protoporphyrin IX-Fluoreszenz von CaSki-Zellen in Abhängigkeit von der DEF-Konzentration (0 µM, 100µM, 1000 µM), nach 4-stündiger Inkubation mit 5-ALA, m-ALA, b-ALA und h-ALA bei verschiedenen Konzentrationen. Darstellung der Mittelwerte und des SEM aus 3 unabhängigen Versuchen. Fluoreszenz = a.u.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 5-Aminolävulinsäure und ihre Ester

5-ALA wurde in dieser Arbeit als Photosensitizer ausgewählt da es gegenüber anderen Photosensitizern wie z.B. Photofrin (DHE) entscheidende Vorteile besitzt. 5-ALA kann sowohl oral als auch topisch appliziert werden, zeichnet sich durch seine bessere Tumorselektivität aus und besitzt eine schnellere Pharmakokinetik und *Clearance*. Dadurch kommt es zu einer kürzeren Periode der Nebenwirkungen, insbesondere der Photosensitivität der Haut. Da es sich bei 5-ALA um eine Vorstufe des eigentlichen, endogenen d.h. intrazellulär, gebildeten Photosensitizers PpIX handelt, ist eine Anhäufung innerhalb der Zelle im Vergleich zu anderen exogenen Photosensitizern wahrscheinlicher (Kennedy *and* Pottier 1992).

Ferner wurden in dieser Arbeit Derivate der 5-ALA (ALA-Ester) untersucht. Diese zeichnen sich durch eine höhere Lipophilität aus und können so biologische Membranen leichter penetrieren, so dass sie zu einer effektiveren PpIX-Synthese führen könnten (Gaullier 1997).

Je nach verwendeter Substanz (5-ALA oder Derivate) wurden unterschiedliche Konzentrationen getestet, da jede ihre eigene optimale Konzentration besitzt (Xiang 2001).

4.1.2 Messung der Protoporphyrin IX-Fluoreszenz

Da die PpIX-Fluoreszenz direkt aus den Mikrotiterplatten gemessen wurde, in denen sich außer den Zellen auch die Inkubationslösung befand, wurde sowohl die intra- als auch die extrazelluläre PpIX-Fluoreszenz gemessen. Da PpIX aber nur in der Zelle gebildet werden konnte, beeinflusst diese Methode nicht die gewonnenen Ergebnisse zur PpIX-Synthese. Allerdings könnte dadurch erklärt werden, warum nicht in allen beobachteten Fällen eine gesteigerte PpIX-Fluoreszenz mit einer erniedrigten Überlebensrate einherging. Wenn PpIX vermehrt extrazellulär lokalisiert ist, könnten die reaktiven Sauerstoffteilchen, die den Zelltod verursachen, zu weit von ihrem Schädigungsort entfernt und damit unwirksam sein.

4.1.3 Bestrahlung mittels Laser und WST-1 Test

Nach 4-stündiger Inkubation mit 5-ALA bzw. h-ALA wurden die Zellen, die mit 5-ALA inkubiert wurden, mit 1 und 5 Joule, diejenigen, denen h-ALA hinzugefügt wurde, mit 2 und 10 Joule bestrahlt. In früheren Untersuchungen mit C33A-Zellen konnte ein Zusammenhang zwischen Lichtdosis und Toxizität nachgewiesen werden. Die Toxizität bzw. Überlebensrate war außerdem abhängig von der verwendeten Zelllinie und Substanz. Mit steigender Lichtdosis erwies sich h-ALA als der effektivere bzw. stärkere Photosensitizer. Während 5-ALA bei höheren Lichtdosen als 5 Joule nicht mehr zu einem weiteren Vitalitätsverlust führte, sank die Überlebensrate bei h-ALA auch noch bei höheren Lichtdosen weiter ab (Xiang 2001). Daher wurden in dieser Arbeit die oben erwähnten Lichtdosen gewählt.

Da sich h-ALA als das am besten wirksame Ester herausstellte, wurde dieses zusammen mit 5-ALA in den Bestrahlungsversuchen verwendet.

Außerdem wurde die Zelllinie C33A für die Bestrahlungsversuche ausgewählt, da sich bei ihr bessere Ergebnisse bei der PpIX-Induktion durch 5-ALA und seine Ester zeigten.

Aus den selben Gründen wurde auch die Vitalität nur bei 5-ALA und h-ALA in C33A-Zellen bestimmt. Dies erfolgte einmal unmittelbar nach Messung der PpIX-Fluoreszenz, um die Dunkeltoxizität ohne Bestrahlung zu erhalten, und außerdem 24 Stunden nach Bestrahlung der Zellen, um die Photodynamische Wirksamkeit zu bestimmen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse der Versuche mit C33A-Zellen

4.2.1 Protoporphyrin IX- Fluoreszenz, Dunkeltoxizität und Photodynamische Wirksamkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert bei C33A-Zellen

Im Ergebnisteil konnte gezeigt werden, dass sowohl die ProtoporphyrinIX-Fluoreszenz als auch die Photodynamische Wirksamkeit vom pH-Wert abhängig sind. Auch in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es einen Einfluss des pH-Werts auf die 5-ALA induzierte PpIX-Fluoreszenz gibt (Krammer 1996, Fuchs 1997, Bech 1997, Wyld 1998, Uehlinger 2000).

Im Stoffwechsel einer Zelle sind viele Prozesse pH-abhängig, unter anderem auch die Aktivität von Enzymen und die Aufnahme von Substanzen über die Zellmembran. Dies impliziert, dass die Wirksamkeit, und somit die Effektivität eines Therapeutikums vom intra- und extrazellulären pH-Wert abhängig sind.

Der physiologische pH eines gesunden Gewebes schwankt zwischen 7,0 und 7,4, während man im Tumorgewebe Werte von 6,5 bis 6,8 vorfindet (Vaupel 1989). Die im Tumor häufig bestehende anaerobe Stoffwechsellage führt hauptsächlich zur Bildung von Laktat, was zu einer Ansäuerung des Gewebes führt. Diese Veränderungen des pH-Wertes können sich auf die Synthese von PpIX und damit auch auf die Photodynamische Therapie mit 5-ALA und ihren Derivaten auswirken.

P. Uehlinger (2000) untersuchte den Einfluss verschiedener Faktoren (pH-Wert, Konzentration, Zeit und Lipophilie) auf die durch 5-ALA bzw. ihre Ester induzierte PpIX-Synthese. Dabei fand er heraus, dass die PpIX-Synthese bei physiologischen pH-Werten von $7,5 \pm 0,5$ am höchsten war. Für seine Untersuchungen verwendete er vier verschiedene humane Zelllinien: Lungenkarzinomzellen (A549), Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) und Blasenkarzinomzellen (J82 und T24).

Wie im Ergebnisteil gezeigt wurde, konnte aber für die Zervixkarzinom-Zelllinien C33A und CaSki ein PpIX-Fluoreszenzmaximum im Bereich von pH 8,5 bzw. eine bis zu pH 9 ansteigende Fluoreszenz beobachtet werden.

Eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien sein. Der physiologische pH-Wert sowohl der Lungenepithelien und der Bronchien, als auch der des Übergangsepithels der

Blase unterscheiden sich von dem der Zervix. Die normalen Zellen der Zervix sind an das saure Milieu der Scheide adaptiert, daher ist auch zu vermuten, dass ihre Enzyme in einem saureren Milieu ihre optimale Wirkung entfalten. Maligne Zervix-Zellen sind nun transformierte Zervix-Zellen. So könnten Karzinomzellen der Zervix ihre maximale Enzymaktivität nicht mehr im sauren oder physiologischen Milieu besitzen, sondern es könnte eine Verschiebung der optimalen Aktivität in den alkalischen Bereich stattgefunden haben. Der pH-Wert beeinflusst die Aktivität der Enzyme in den jeweiligen Geweben also in einem unterschiedlich ausgeprägten Ausmaß.

Dies würde auch für die an der Biosynthese des Protoporphyrins IX beteiligten Enzyme gelten. Von diesen Enzymen weist die Porphobilinogen-Deaminase die niedrigste Aktivität auf (Bottomley 1988), was sie zu einem Schrittmacherenzym in der Biosynthese des PpIX macht. Tatsächlich zeigten Anderson (1980) und Sassa (1982), dass die Aktivität der Porphobilinogen-Deaminase in Abhängigkeit vom pH-Wert einer glockenförmigen Kurve folgt, die ihr Maximum bei pH 7,8 bis 8,2 hat.

Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse geht aus Untersuchungen Uehlingers (2000) hervor. Er beobachtete nämlich, dass der ursprüngliche pH-Wert während der Inkubation sank, d. h. dass nach mehrstündiger Inkubation mit 5-ALA und ihren Estern ein anderer pH-Wert gemessen werden konnte als zu Inkubationsbeginn. Dieser Effekt ist durch einen Protonenverlust in das nicht gepufferte Medium zu erklären. Dieser Effekt war unter alkalischen Bedingungen stärker ausgeprägt ($\Delta\text{pH}\sim 0,3/\text{h}$ bei 8,5) als unter sauren, wo sich der pH-Wert praktisch nicht änderte ($\Delta\text{pH}\sim 0,01/\text{h}$ bei pH 6,5). In der hier vorliegenden Arbeit wurde der pH-Wert nur zu Inkubationsbeginn eingestellt und bestimmt. Wenn man den beschriebenen Effekt bei der Interpretation der Ergebnisse mit einbezieht, könnte es sein, dass sich das PpIX-Fluoreszenzmaximum bei niedrigeren pH-Werten befindet, als hier tatsächlich beobachtet wurde und somit mit den in der Literatur beschriebenen Fluoreszenzmaxima bei physiologischem pH übereinstimmt, denn bei einer 4 stündigen Inkubation bei anfangs pH 8,5 würde nach Abzug von 4 mal 0,3 ein pH-Wert von 7,3 resultieren.

Auch Krammer (1996) und Bech (1997) erforschten an menschlichen Fibroblasten der Haut bzw. Adenokarzinomzellen den Einfluss des pH-Wertes auf die durch 5-ALA induzierte PpIX-Synthese. Dabei beobachteten sie eine mit ansteigendem pH-Wert zunehmende PpIX-Fluoreszenz von pH 6-8 bzw. pH 6 bis 7,5. Ein ähnliches Ergebnis wurde im Ergebnisteil beschrieben. Verantwortlich hierfür könnte einerseits sein, dass bei höheren pH-Werten die Aufnahme von ALA über die Zellmembran erleichtert ist. Andererseits ändert sich möglicherweise auch die Struktur von 5-ALA und ihrer Derivate, so dass sie je nach pH-Wert nicht mehr für die PpIX-Synthese zur Verfügung stehen (Diddens 1994). Auch die geringe PpIX-Synthese im sauren Bereich wurde von den anderen Autoren beobachtet und lässt sich durch die bisher diskutierten Theorien erklären.

Bei der Dunkeltoxizität konnte keine pH-Abhängigkeit festgestellt werden. Die Beobachtung von Bech (1997), dass die metabolische Aktivität bzw. Vitalität der Zellen im alkalischen Bereich abnimmt konnte somit nicht bestätigt werden und

kommt daher auch nicht als mögliche Erklärung für eine geringere PpIX-Fluoreszenz in Frage, wie sie unter manchen Bedingungen beobachtet wurde.

Nach Bestrahlung fiel die Vitalität der Zellen, die mit 5-ALA inkubiert wurden, drastisch ab. Bei pH 6 betrug die Überlebensrate 84 % (1J) bzw. 32 % (5J), bei pH 7,2 und höheren Werten betrug sie um die 66 % bzw. 11 %. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch Fuchs (1997) mit Fibrosarkomzellen der Maus. Für pH 7,4 betrug die Überlebensrate ca. 70 % (1J) bzw. 20 % (5J), für pH 6 allerdings konnten keine Vitalitätsverluste nachgewiesen werden. Die insgesamt etwas besseren Überlebensraten bei Fuchs sind wahrscheinlich auf die 5-ALA Konzentration zurückzuführen, da nur 0,6 mM verwendet wurden, im Gegensatz zu 5 mM in der vorliegenden Arbeit. Der stärkere Vitalitätsverlust im höheren pH-Bereich ist durch den PpIX-Gehalt zu erklären, der unter diesen Bedingungen, wie oben beschrieben, höher lag.

Fraglich bleibt allerdings, warum schon bei pH 7,2 die geringste Überlebensrate zu erkennen war und diese auch nicht weiter abfiel, während in den Versuchen zur PpIX-Synthese bei pH 8,5 oder 9 die höchsten Werte gesehen wurden und man daher auch in diesem Bereich die geringste Überlebensrate erwarten würde. So konnte man nämlich bei h-ALA andererseits genau diesen Effekt beobachten, dass im pH-Bereich mit der höchsten PpIX-Synthese (pH 8,5) auch der stärkste Vitalitätsverlust nach Bestrahlung auftrat (Überlebensrate bei 2J ca. 82 % und bei 10 J ca. 18 %). Daraus ergibt sich, dass die Vitalität nach Bestrahlung nicht nur von dem PpIX-Gehalt der Zellen abhängig ist, sondern dass hier möglicherweise auch andere Faktoren eine Rolle spielen. Zu diesem Ergebnis kamen auch schon Iinuma (1994), die keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen PpIX-Gehalt in verschiedenen Zelllinien und der Überlebensrate nach Bestrahlung fanden und daher weitere Eigenschaften der Zellen bzw. Gewebe als Einflussfaktoren für die Phototoxizität postulierten.

Zu diesen gehört der Zellzyklus bzw. die proliferative Aktivität. Sowohl Wyld (1998) als auch Moan (1998) fanden heraus, dass die Zellen ca. doppelt soviel PpIX synthetisieren, wenn sie sich in der G2- oder M-Phase befinden bzw. wenn ihre Zellgröße zunimmt, als wenn sie in der G1- oder S-Phase sind. Wyld beobachtete ferner, dass auch die Überlebensrate der Zellen in der G2-Phase nach Bestrahlung am niedrigsten ist, während sie in der G1- und S-Phase höher lag.

Ein weiterer Einflussfaktor ist die Zelldichte. So wurde beobachtet, dass mit zunehmender Zelldichte auch der PpIX-Gehalt sowie die Phototoxizität anstieg (Steinbach 1995, Moan 1998). Georgakoudi (1999) beschrieb außerdem noch einen Einfluss des Sauerstoffgehalts der Zellen. So produzierten die Zellen unter normoxiden Bedingungen mehr PpIX als in hypoxischer Umgebung, wobei auch hier wieder die Zelldichte und Proliferation eine Rolle spielten.

Es zeigte sich für 5-ALA und alle verwendeten Derivate, dass jeweils eine höhere Konzentration zu einer höheren PpIX-Fluoreszenz führte als die jeweils niedrigerere eingesetzte Konzentration. Außerdem wurde deutlich, dass, wenn man die unterschiedlichen Konzentrationen in die Interpretation mit einbezieht, h-ALA zu der stärksten PpIX-Synthese führte, gefolgt von b-ALA, 5-ALA und m-ALA, welches sich als das schwächste Derivat erwies.

Schon andere Autoren beschrieben die Überlegenheit von h-ALA gegenüber anderen 5-ALA-Estern und 5-ALA selbst und erklärten dies damit, dass sich h-ALA über eine höhere Bioverfügbarkeit auszeichnet (Gaullier 1997, Marti 1999, Uehlinger 2000, Xiang 2001). Diese könnte einerseits dadurch zustande kommen, dass h-ALA durch seine längere lipophile Kette leichter die Zellmembran permeieren kann. Andererseits könnte h-ALA eine höhere Affinität zu unspezifischen Esterasen aufweisen, die nötig sind, um h-ALA bzw. andere ALA-Ester in 5-ALA umzuwandeln, welches dann für die PpIX-Synthese zur Verfügung steht.

Der Mechanismus der 5-ALA/Ester-Aufnahme in die Zellen ist bisher nicht eindeutig geklärt und scheint in unterschiedlichen Zellen verschieden zu sein. Generell kommen drei Wege in Frage, erstens die einfache Diffusion durch die Plasmamembran, zweitens über aktive Transportmoleküle und drittens über Membrankanäle. Döring (1998) einerseits und Rud (2000) andererseits fanden für 5-ALA in unterschiedlichen Zellen verschiedene Transportmoleküle, wobei Rud außerdem noch nachwies, dass ALA-Ester nicht über das von ihm untersuchte Transportmolekül in die Zelle gelangten, sondern im Gegensatz zu 5-ALA über andere Mechanismen in die Zelle gelangen müssen.

Ebenso wurde schon beschrieben, dass die PpIX-Synthese dosisabhängig von 5-ALA und ihren Estern verläuft (Krammer 1996, Rossi 1996, Moan 1997, Uehlinger 2000, Xiang 2001). Der PpIX-Gehalt erhöht sich zunächst mit ansteigender 5-ALA/Ester-Konzentration, erreicht dann je nach Derivat an einem bestimmten Punkt ein Maximum, um danach wieder abzufallen. Den Anstieg bis zu einem Maximum erklärt man damit, dass ein höheres Angebot an 5-ALA/Estern zu einer höheren PpIX-Synthese führt, bis die beteiligten Enzyme gesättigt sind. Der anschließende Abfall bei Überschreiten der optimalen Konzentration ist durch die Zytotoxizität der Substanzen zu erklären, was sich auch in der Abnahme der Vitalität bemerkbar machte (Uehlinger 2000).

Eine weitere Erklärung für die beschriebenen Effekte könnte die Inkubationszeit darstellen. 5-ALA und ihre Derivate besitzen ein unterschiedliches kinetisches Verhalten bei der Permeation der Zellmembran und bei der Deesterifikation, welches allerdings auch wieder von der Konzentration abhängig ist (Gibson 1997, Marti 1999, Gerscher 2000, Uehlinger 2000). So passieren Ester mit längeren Ketten die Zellmembran nicht nur in einem größeren Ausmaß, sondern auch schneller (Marti 1999).

Auch könnte die Lokalisation des PpIX je nach Zelllinie, verwendetem Ester oder je nach Konzentration verschieden sein und dadurch zu unterschiedlichen Vitalitätsverlusten nach Bestrahlung führen. Durch mehrere Studien mittels Fluoreszenzmikroskopie und Fluoreszenzmikrographie wurde aber gezeigt, dass sich die PpIX-Lokalisation bei verschiedenen Bedingungen nicht veränderte, sondern stets überwiegend in den Mitochondrien lag (Berg 1996, Gaullier 1997).

Wiederum ein weiterer die PpIX-Synthese bzw. Phototoxizität beeinflussender Faktor ist die Zahl der Mitochondrien bzw. die Aktivität ihrer Enzyme innerhalb einer Zelle, wie Gibson zeigen konnte. So führt eine große Anzahl von Mitochondrien bzw. eine hohe Aktivität der mitochondrialen Enzyme in solchen Zelllinien zu einer gesteigerten PpIX-Synthese (Gibson 1999).

Insgesamt lässt sich also sagen, dass es, neben den in dieser Arbeit untersuchten Faktoren wie Lichtdosis und 5-ALA/Ester-Konzentrationen, noch eine Reihe anderer Faktoren gibt, die die PpIX-Synthese und Phototoxizität beeinflussen.

4.2.2 Protoporphyrin IX- Fluoreszenz und Photodynamische Wirksamkeit in Abhängigkeit von Serum bei C33A-Zellen

Die Zusammensetzung des Mediums, insbesondere der Gehalt von Serum spielt eine wichtige Rolle bei der durch 5-ALA und ihre Ester induzierten PpIX-Fluoreszenz. Im Ergebnisteil konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von 10% bzw. 20% FCS zu einer Abnahme der PpIX-Fluoreszenz in C33A-Zellen führte. Die Überlebensrate der bestrahlten Zellen ließ sich dadurch bei mit 5-ALA und Serum inkubierten Zellen mehr als vervierfachen, bei h-ALA mehr als verdoppeln.

In der Literatur wurden ähnliche Beobachtungen von verschiedenen Autoren beschrieben. Steinbach untersuchten die durch 5-ALA induzierte PpIX-Fluoreszenz in Abhängigkeit vom Serumgehalt in Urothelkarzinom-Zelllinien (Steinbach 1995). Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von Serum. Andere Autoren, die den Einfluss von Serum auf die durch 5-ALA induzierte PpIX-Fluoreszenz in Leukämiezellen bzw. Fibroblasten untersuchten, beschrieben, dass sich 80% - 95% des normalerweise intrazellulären PpIX im umgebenden Medium befand, während in Abwesenheit von FCS eine intrazelluläre Anhäufung des PpIX zu beobachten war (Hanania 1992, Weir 1995).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass es im Serum Bestandteile gibt, die für den Ausfluss der gebildeten Porphyrine in das umgebende Medium verantwortlich sind. Einerseits kommt der PpIX-Ausfluss durch einfache Diffusion zustande, andererseits durch Interaktion mit im Serum enthaltenen Proteinen (Fukuda 1993, Granick 1975). So erwies sich z. B. Albumin als ein Faktor, der durch seine Fähigkeit, mehrere Phorphyrinringe binden zu können, den Ausfluss von PpIX fördert (Böhmer 1985, Moan 1985, Steinbach 1995). Dagegen beobachtete Weir in Fibroblasten, dass Albumin nur eine geringe Rolle bei der Ausschleusung des gebildeten PpIX in das extrazelluläre Medium spielt, sondern vielmehr das *high density lipoprotein* (HDL), das *low density lipoprotein* (LDL) und weitere Proteine für den PpIX-Verlust der Zellen verantwortlich sind (Weir 1995).

Nach Bestrahlung der Zellen und Messung der Vitalität mittels WST-Assay zeigte sich bei der niederen Bestrahlungsdosis eine Zunahme der Überlebensrate, wenn die Zellen mit Serum behandelt wurden. Dies zeigt, dass nicht nur die PpIX-Fluoreszenz, sondern auch die Photodynamische Wirksamkeit von der An- bzw. Abwesenheit von Serum im Inkubationsmedium beeinflusst wird.

Auch dieser Effekt wird in der Literatur beschrieben. So fand sich nach Bestrahlung von Urothelkarzinom-Zelllinien eine fünffach erhöhte Vitalität in den Zellen, die nur mit 5-ALA, aber ohne Serum behandelt wurden im Vergleich zu in 5-ALA und Serum inkubierten Zellen (Riesenberg 1996). Weir beschrieb sogar einen praktisch vollständigen Verlust der Photodynamische Wirksamkeit mit 5-ALA nach Inkubation von Fibroblasten in FCS-haltigem Medium (Weir 1995).

Durch die Anwesenheit von Serum in der 5-ALA- Inkubationslösung kommt es wahrscheinlich zu einer extrazelluläre Anhäufung des PpIX. Somit steht das für die Photodynamische Wirksamkeit verantwortliche intrazelluläre PpIX nur noch in kleiner Menge zur Verfügung, was zu einer verminderten Sensibilität der Zellen gegenüber der Bestrahlung führen könnte. Der phototoxische Effekt kommt, wie unter 1.2.2 beschrieben, bekanntlich dadurch zustande, dass aus bestrahltem PpIX entstehende reaktive Sauerstoffteilchen Zellstrukturen schädigen. Da diese Teilchen aber nur eine sehr geringe Reichweite besitzen, sind sie für die Zelle weitgehend ungefährlich, wenn sie außerhalb der Zelle gebildet werden.

Die hier beobachtete höhere Überlebensrate der Zellen ist aber weniger darauf zurückzuführen, dass das PpIX vom Intra- in den Extrazellularraum verschoben wurde, sondern vielmehr darauf, dass überhaupt weniger PpIX synthetisiert wurde. Denn die hier mittels Fluoreszenz gemessene PpIX Synthese beinhaltet sowohl das intra- als auch das extrazelluläre PpIX, da vor der Messung der Überstand nicht verworfen wurde. Somit muss der offensichtlich protektive Effekt des Serums eine andere Ursache haben, wobei am wahrscheinlichsten ist, dass das Serum die Aufnahme von 5-ALA und ihren Estern in die Zelle blockiert und deshalb weniger PpIX gebildet wird.

Da das Serum einen Einfluss auf die PpIX-Synthese und die Überlebensrate der mit 5-ALA und ihren Estern inkubierten Zellen zeigte, wurden die übrigen Versuche dieser Arbeit in Abwesenheit von FCS im Inkubationsmedium durchgeführt.

4.2.3 Protoporphyrin IX- Fluoreszenz, Dunkeltoxizität und Photodynamische Wirksamkeit in Abhängigkeit von EDTA bei C33A-Zellen

Die Zugabe von 100 bzw. 1000µM EDTA zu 5-ALA und ihren Estern führte zu einer Induktion der PpIX-Synthese in C33A-Zellen. Ferner sank die Überlebensrate der Zellen nach Bestrahlung bei EDTA-Einsatz stärker, als wenn die Zellen nicht mit EDTA inkubiert wurden. EDTA per se erwies sich nicht als toxisch.

EDTA ist ein Eisenchelator, der die Zellmembran nicht permeiert. Eisenchelatoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie freies Eisen binden können. Die Konversion von PpIX zu Häm wird durch das Enzym Ferrochelatase katalysiert, wobei in das PpIX-Molekül Eisen eingelagert wird. Ist nun ein Eisenchelator wie EDTA anwesend, so steht für diesen Schritt weniger Eisen zur Verfügung, folglich können weniger PpIX-Moleküle zu Häm umgewandelt werden. Steigt die intrazelluläre PpIX-Menge an, so sind die

Zellen sensitiver für die PDT. Der PpIX-Anstieg resultiert aber nicht nur daraus, dass PpIX nicht weiter zu Häm umgewandelt wird, sondern auch daraus, dass die negative Rückkopplung der nun in geringerer Menge gebildeten Hämmoleküle auf die ALA-Synthese der Zelle selbst weniger stark ausgeprägt ist. Diese Theorie wurde in der Vergangenheit für verschiedene histologische Zelltypen sowohl in vitro als auch in vivo bestätigt. So fanden sich nach EDTA-Zugabe ein erhöhter PpIX-Gehalt in Leukämiezellen (Hanania 1992), Adenokarzinomzellen und Lungenfibroblasten (Berg 1996), in weiterer Kombination mit Dimethylsulfoxid (DMSO) kam es zu einem PpIX-Anstieg in Basalzellkarzinomen, Zellen des Morbus Bowen, Hautzellen und Colonkarzinomzellen (Malik 1995, Harth 1998, De Rosa 2000). Harth et al. erreichten durch topische Applikation einer 20 % ALA - EDTA 2 % - DMSO 2 % - creme auf den Tumor und Bestrahlung nach 12 Stunden über 80 % vollständige Remission bei ihren Patienten.

Die vorliegende Arbeit zeigt nun erstmals für Zervixkarzinomzellen, dass auch hier EDTA den PpIX-Gehalt um bis zu 23 % (5-ALA) bzw. 6 % (h-ALA) zu erhöhen vermochte. Gleichzeitig wurde aber die Überlebensrate der Zellen nach Bestrahlung teilweise um bis zu 19 % verringert (1 mM 5-ALA, 1J), während sie unter anderen Bedingungen um bis zu 11% anstieg. Dabei ist auffällig, dass sich die Veränderung des PpIX-Gehalts nicht genauso stark in einer Veränderung des Anteils toter Zellen nach Bestrahlung widerspiegelt. Hierfür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Zunächst einmal beträgt die Überlebensrate auch ohne EDTA-Einsatz nur zwischen 4 und 30 % (Ausnahme 1 mM 5-ALA, 1J: 63%), so dass es gar nicht mehr zu starken Abfällen kommen kann. Wären geringere Lichtdosen oder 5-ALA/Ester-Konzentrationen verwendet worden, läge die Überlebensrate ohne Zusatz wahrscheinlich höher und der durch EDTA vermittelte Effekt wäre vermutlich stärker ausgeprägt gewesen, was ja auch bei 1 mM 5-ALA nach Bestrahlung mit 1J zu erkennen ist. Auch täuschen evtl. die statistischen Zahlen. So sank hier die Überlebensrate der Zellen zwar nur von 63 % auf 44 %, dies entspricht aber einem Anteil von 30 % weiteren Zellen, deren Tod auf die Zugabe von EDTA zurückzuführen ist. Die Wirkung von EDTA würde unter optimalen Bedingungen also wahrscheinlich noch viel deutlicher werden.

Wie sich in den Versuchen zur Dunkeltoxizität herausstellte, hatte EDTA per se keinen toxischen Effekt, die Überlebensrate der Zellen hing hier allein von der 5-ALA- bzw. h-ALA-Konzentration ab und verringerte sich mit zunehmender Konzentration.

Auch in der Literatur finden sich unterschiedliche Auswirkungen von EDTA auf die PpIX-Synthese, wobei sich erneut herausstellte, dass diese auch von anderen Faktoren abhängig sind. So spielt z.B. die Konzentration von 5-ALA bzw. ihren Estern eine Rolle, wobei die optimalen Konzentrationen für die einzelnen ALA-Derivate unterschiedlich ausfielen. Für 5-ALA und m-ALA wurden dabei Konzentrationen zwischen 0,1 und 10 mM, für b-ALA und h-ALA hingegen zwischen 0,05 und 5 mM untersucht. Die Konzentrationen wurden für 5-ALA und m-ALA deshalb höher gewählt, weil diese beiden Substanzen, wie unter 4.2.1. beschrieben, eine geringere Bioverfügbarkeit besitzen als b-ALA und h-ALA.

5-ALA führte in Verbindung mit EDTA bei einer Konzentration von 2,5 mM zu der höchsten PpIX-Synthese, während h-ALA bei 1mM, b-ALA bei 2,5 mM und m-ALA bei 10 mM eine maximale PpIX-Fluoreszenz bewirkten (vgl. Abb. 3.6). Xiang (2001) beobachtete in ähnlichen Versuchen mit der Zelllinie C33A etwas andere optimale Konzentrationen (5-ALA: 10 mM, m-ALA: 7,5 mM, b-ALA: 1 mM, h-ALA: 0,75 mM), allerdings ohne Einsatz von EDTA. Diese Unterschiede beruhen aber nicht auf dem Einsatz von EDTA, da jeweils als Kontrolle auch Zellen ohne EDTA bei den jeweiligen Konzentrationen inkubiert wurden, deren PpIX-Synthese ebenfalls für die oben angegebenen Konzentrationen am höchsten lag.

Die unterschiedlichen Wirkungen von EDTA in Kombination mit 5-ALA bzw. h-ALA auf die Photodynamische Wirksamkeit, insbesondere die Tatsache, dass eine erhöhte PpIX-Synthese nicht unbedingt zu einer erniedrigten Überlebensrate führt, wie dies von anderen (Hanania 1992, Berg 1996) beschrieben wurde, sind wiederum dadurch zu erklären, dass hier weitere Faktoren eine Rolle spielen. Diese wurden unter 4.2.1. diskutiert. Eine weitere Erklärung könnte darin bestehen, dass das synthetisierte PpIX nicht in den Mitochondrien, sondern in anderen Zellkompartimenten abgelagert wird, wenn EDTA hinzugegeben wird und dass die Zellen deswegen nicht sensibler gegenüber der Bestrahlung sind. Diese Vermutung wurde aber von Berg (1996) widerlegt, der mit fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigte, dass die PpIX-Lokalisation nicht durch EDTA verändert wurde.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass durch Einsatz von EDTA die PpIX-Fluoreszenz unter geeigneten Bedingungen gesteigert werden konnte, dass aber unter den hier untersuchten Bedingungen kein eindeutiger Einfluss auf die Wirksamkeit der PDT zu erkennen war. Die Ergebnisse bei 1mM 5-ALA, 1J legen allerdings nahe, dass unter optimalen Bedingungen, wie geeigneter Lichtdosis und 5-ALA/Ester-Konzentration die PDT durch EDTA verbessert werden könnte. Die Steigerung der PpIX-Fluoreszenz könnte sich positiv auf die PDD auswirken, da geringere Dosen von 5-ALA/Ester eingesetzt und damit Nebenwirkungen und Kosten gesenkt werden könnten.

4.2.4 Protoporphyrin IX- Fluoreszenz, Dunkeltoxizität und Photodynamische Wirksamkeit in Abhängigkeit von Desferrioxamin bei C33A-Zellen

Wie im Ergebnisteil dargestellt, konnte durch Zugabe von 100 μ M bzw. 1000 μ M DEF in das Inkubationsmedium eine signifikante Zunahme der PpIX-Fluoreszenz in C33A-Zellen beobachtet werden. Ferner sank auch hier die Überlebensrate der Zellen nach Bestrahlung unter DEF-Einsatz stärker, als wenn die Zellen ohne DEF inkubiert wurden. DEF selbst erwies sich nicht als toxisch, zeigte sogar eher einen protektiven Effekt hinsichtlich der Zellvitalität.

Desferrioxamin (DEF) ist wie EDTA ein Eisenchelator, der im Gegensatz zu EDTA allerdings spezifisch ist, d.h. eine hohe Affinität für Eisen besitzt. Ein weiterer Unterschied zu EDTA ist seine gute Membranpermeabilität (Keberle 1964). So kann DEF das Eisen aus dem intrazellulären Eisenpool binden,

wodurch wiederum weniger Eisen für die Ferrochelatase zur Verfügung steht, so dass wie unter 4.5.3 beschrieben letztlich ein PpIX-Anstieg resultiert kann, der auch schon in Urothelzellen (Marti 1999), Basalzellkarzinomen (Fijan 1995), transformierten Keratinozyten (PAM 212-Zellen; Ortel 1993), Adenokarzinomzellen des Rektosigmoids und Lungenfibroblasten (Berg 1996) beobachtet wurde.

Erstmals wurden diese Effekte in dieser Arbeit für Zervixkarzinomzelllinien untersucht. DEF steigerte den PpIX-Gehalt um bis zu 121% für 5-ALA bzw. 37% für h-ALA. Für 2,5 mM h-ALA und 5 mM h-ALA konnte ebenso wie für 0,1 mM m-ALA kein Anstieg der PpIX-Fluoreszenz durch Zugabe von DEF beobachtet werden. Während es für h-ALA keine Erklärung gibt, kann der fehlende Anstieg bei 0,1 mM m-ALA dadurch erklärt werden, dass eine zu geringe Konzentration vorlag, um zu einer PpIX-Synthese führen zu können. Die maximale PpIX-Synthese wurde 2,5 mM 5-ALA, 1 mM h-ALA, 10 mM m-ALA und 5 mM b-ALA erzielt. Somit bestätigen diese Ergebnisse die optimalen Konzentrationen von 5-ALA bzw. ihren Estern, die auch schon bei den Versuchen mit EDTA beobachtet wurden. Jedoch lässt sich durch DEF eine stärkere PpIX-Synthese induzieren als durch EDTA (5-ALA: 121% [DEF], 23% [EDTA]; h-ALA: 37% bzw. 6%). Dies lässt sich durch die Eigenschaften von DEF erklären, das im Gegensatz zu EDTA membranpermeabel ist und intrazelluläres Eisen spezifisch bindet.

Gleichzeitig wurde die Überlebensrate der Zellen nach Bestrahlung um bis zu 80% bei h-ALA (1 mM, 2J) bzw. 47% bei 5-ALA (1 mM, 1J) verringert, wenn 1000 μ M DEF verwendet wurde.

Somit zeigt sich für 5-ALA, dass eine Verdopplung der PpIX-Synthese in einer Halbierung der Überlebensrate nach Bestrahlung resultiert. Bei h-ALA führte sogar ein Anstieg von 37% zu einer Reduktion der Vitalität um 80%. Das stärkere Abfallen der Überlebensrate bei h-ALA im Gegensatz zu 5-ALA lässt sich dadurch erklären, dass h-ALA unter optimalen Bedingungen zu einer insgesamt höheren PpIX-Synthese führte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen gesteigerten Sensibilität der Zellen gegenüber PDT nach Inkubation mit DEF und 5-ALA bzw. ihren Estern (Ortel 1993, Berg 1996). Auch hinsichtlich des Absinkens der Überlebensrate erwies sich damit DEF als potenterer Eisenchelator im Vergleich zu EDTA, da letzteres nur zu einem Absinken um 19 % (1 mM 5-ALA, 1J) und teilweise sogar zu einem Anstieg der Überlebensrate führte.

Genau wie bei EDTA ist die Überlebensrate abhängig von der verwendeten Lichtdosis. So ist die Vitalität bei höherer Lichtdosis (5J bei 5-ALA bzw. 10J bei h-ALA) deutlich erniedrigt, so dass auch kein weiterer Abfall durch DEF erzeugt werden konnte, da auch ohne DEF der Anteil der vitalen Zellen schon geringer als 20% war.

Aus den Ergebnissen der Versuche mit DEF wird ersichtlich, dass sowohl die PpIX-Synthese als auch der Vitalitätsverlust von der DEF-Konzentration abhängig ist, da es bei beiden zu stärkeren Effekten kommt, wenn unter sonst gleichen Bedingungen statt nur 100 μ M 1000 μ M DEF eingesetzt wurden. Bei den Überlebensraten zeigt sich, dass eine Erhöhung der DEF-Konzentration von 100 μ M auf 1000 μ M allerdings nicht mehr zu einem so starken Abfall führt,

wie es der Anstieg der PpIX-Synthese erwarten ließe. Es scheint sich vielmehr eine Sättigung einzustellen, wie sie auch für die PpIX-Synthese ab ca. 1000 μM DEF beschrieben ist (Berg 1996).

Betrachtet man die Ergebnisse der Bestrahlungsversuche mit der jeweils geringeren Lichtdosis (1J bei 5-ALA und 2 J bei h-ALA), so erkennt man dass eine Verringerung der Überlebensrate auf niedrigste Werte entweder dadurch erreichbar ist, dass höhere Konzentrationen von 5-ALA eingesetzt werden oder ein lipophilerer ALA-Ester wie in diesem Fall h-ALA eingesetzt wird oder DEF hinzugefügt wird. Wie zu erwarten war, wurden weit niedrigere Konzentrationen von h-ALA benötigt, um dieselben Effekte wie bei 5-ALA zu erzielen. Bei den Versuchen mit 0,5 mM h-ALA liegt die Überlebensrate auch ohne DEF nur bei 25% und lies sich durch Zugabe von 1000 μM DEF auf 9% senken. Dies lässt vermuten, dass auch mit einer noch niedrigeren Konzentration von h-ALA in Kombination mit DEF eine maximal niedrige Überlebensrate erreicht werden könnte.

Wie sich in den Versuchen zur Dunkeltoxizität herausstellte, hatte DEF per se keine toxischen Effekte, wirkte im Gegenteil eher protektiv auf die Zellen. Dies ist daran erkennbar, dass die Überlebensrate bei Einsatz von 1000 μM DEF höher lag, als wenn die Zellen ohne DEF inkubiert wurden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Verwendung von DEF eine vielversprechende Methode darstellt, um die PpIX-Synthese und damit auch die Photodynamische Wirksamkeit zu verbessern. So ermöglicht es DEF, niedrigere Lichtdosen und niedrigere Konzentrationen von 5-ALA und ihren Estern einzusetzen, ohne dass es dadurch zu Einbußen in der Photodynamischen Wirksamkeit kommt. Auf diese Weise lassen sich einerseits Nebenwirkungen der PDT reduzieren und andererseits Kosten einsparen.

4.3 Einfluss von pH-Wert, Serum, EDTA und Desferrioxamin auf die durch 5-ALA und ihre Ester induzierte PpIX-Synthese in CaSki-Zellen

Bei den Untersuchungen, welchen Einfluss der pH-Wert auf die PpIX-Synthese hat, stellte sich genau wie bei C33A Zellen auch bei CaSki Zellen heraus, dass ein physiologisches bis alkalisches Milieu zu höheren Syntheseraten führt. Die optimalen pH-Werte, unter denen die PpIX-Fluoreszenz anstieg bzw. am höchsten lag, unterscheiden sich zwischen den beiden Zelllinien kaum. So zeigte sich bei beiden beim Einsatz von b-ALA ein Anstieg ab dem pH-Wert 7,5, bei 5-ALA ab pH 8. Bei h-ALA stieg die PpIX-Synthese in CaSki-Zellen erst bei einem pH von 9, während sie in C33A Zellen bei 8,5 ein Maximum erreichte und bei pH 9 schon wieder abfiel (vgl. Abb. 3.1 und 3.12).

Ferner ließ sich auch bei CaSki Zellen eine Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration der 5-Aminolävulinsäure bzw. ihrer Ester nachweisen, so stieg mit der Konzentration auch die PpIX-Synthese (vgl. 4.2.1). Vergleicht man die Ergebnisse bei beiden Zelllinien, so fällt auf, dass die Syntheserate bzw. die PpIX-Fluoreszenz in C33A Zellen um ca. ein 4faches höher lag als in CaSki Zellen, unabhängig von verwendetem ALA-Derivat oder pH-Wert (vgl. Abb. 3.1 und 3.12). Dies bestätigt die Beobachtungen, dass die durch 5-ALA und ihre

Ester induzierte PpIX-Synthese auch von der verwendeten Zelllinie abhängig ist (Gibson 1999).

Unter dem Einsatz von 20% FCS kam es sowohl in C33A- als auch in CaSki-Zellen zu einem Abfall der PpIX-Syntheserate. Während er bei C33A-Zellen im Durchschnitt 64% betrug, fiel die PpIX-Fluoreszenz in CaSki-Zellen nur um 39% (Abb. 3.4 und 3.13). Bei diesen Versuchen war im Gegensatz zu den pH-Versuchen allerdings kein großer Unterschied mehr hinsichtlich der PpIX-Syntheseleistung der beiden Zelllinien zu erkennen, so dass ein unterschiedliches Ausgangsniveau nicht als Erklärung für diese Zahlen dienen kann. Vielmehr muss angenommen werden, dass das Serum an sich die 5-ALA-/Ester- Aufnahme in die beiden Zelllinien unterschiedlich stark beeinflusst, dass die C33A-Zellen sensibler auf Serum reagieren (vgl. 4.2.2; Steinbach 1995, Weir 1995).

Paradoxerweise erzielen in den Serumversuchen mit CaSki-Zellen jeweils die geringeren Konzentrationen von 5-ALA und ihren Derivaten eine leicht höhere PpIX-Syntheserate als die jeweils höhere Konzentration, unabhängig von der eingesetzten Serummenge. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass zu große Mengen der Aminolävulinsäure toxisch auf die CaSki-Zellen wirken, sie daher teilweise zugrunde gehen und somit nicht mehr soviel PpIX bilden.

EDTA führte bei CaSki-Zellen mit durchschnittlich + 59% zu einer stärkeren Induktion der PpIX-Synthese als bei C33A Zellen (durchschnittlich + 28%, bei h-ALA sogar ein Abfall; vgl. Abb. 3.6 und 3.14). So erzielten bei diesen Versuchen die CaSki-Zellen auch insgesamt höhere PpIX-Syntheseraten als C33A Zellen. Als optimale Konzentrationen, unter denen die höchste PpIX-Fluoreszenz erreicht werden konnte, erwiesen sich fast wie bei den C33A-Zellen auch bei den CaSki-Zellen 2,5 mM für 5-ALA, 1 mM für h-ALA, 5 mM für m-ALA und 2,5 mM für b-ALA (vgl. 4.2.3). Hierbei zeigte sich, ähnlich wie bei den Serum-Versuchen mit CaSki-Zellen, bei beiden Zelllinien, dass die PpIX-Synthese zunächst mit steigender 5-ALA-/Ester-Konzentration ansteigt, bei zu hohen Konzentrationen aber auch wieder abfällt. Hierfür dürften wie oben beschrieben toxische Effekte der Aminolävulinsäure verantwortlich sein.

Der Einsatz des Eisenchelators EDTA zur Steigerung der PpIX-Synthese in Zervixkarzinomzellen stellt also einen vielversprechenden Ansatz dar, um die Wirksamkeit der PDT zu steigern und Nebenwirkungen sowie Kosten zu senken, da für gleiche Effekte niedrigere 5-ALA-/Ester-Konzentrationen benötigt werden.

Auch DEF vermochte in CaSki-Zellen die PpIX-Fluoreszenz zu steigern, erwies sich hier aber weniger wirksam als in C33A-Zellen, wobei das Ausgangsniveau des PpIX, d.h. ohne Zusatz von DEF, diesmal in beiden Zelllinien etwa gleich war. So kam es durch den Einsatz von 1000 μ M DEF in C33A-Zellen zu einer durchschnittlichen Steigerung der PpIX-Synthese um + 54%, in CaSki-Zellen hingegen nur um + 42%, wobei hier nicht bei allen eingesetzten Konzentrationen ein Anstieg zu erkennen war (vgl. Abb. 3.9 und 3.15).

Es stellten sich wie schon bei den EDTA-Versuchen und den Versuchen mit C33A-Zellen in etwa dieselben optimalen Konzentrationen heraus. So wurden mit 2,5 mM 5-ALA, 1 mM h-ALA, 5 mM m-ALA und 2,5 mM b-ALA jeweils eine maximale PpIX-Fluoreszenz unter Zugabe von DEF erreicht (vgl. 4.5.4). Wiederum ließ sich beobachten, dass das PpIX mit zunehmender ALA-

Konzentration zunächst steigt, nach Erreichen eines Maximums aber wieder abfällt. Diese Beobachtung macht es erforderlich je nach verwendetem Ester und den übrigen Bedingungen jeweils die optimale Konzentration herauszufinden. Geht man davon aus, dass wie oben beschrieben zu hohe Konzentrationen deshalb zu einem Abfall der PpIX-Synthese führen, weil die Zellen sterben, so wäre es nicht so schlimm, eine zu hohe Konzentration zu verwenden.

Betrachtet man alle Versuche zur Induktion der PpIX-Synthese in CaSki- und C33A-Zellen, so lässt sich unter Beachtung der verschiedenen hohen eingesetzten Konzentrationen feststellen, dass der ALA-Ester h-ALA die größte Effektivität besitzt. Von h-ALA werden nur geringe Mengen benötigt, um maximal starke PpIX-Fluoreszenz in den Zellen zu induzieren. So reichten oft 1 mM h-ALA aus, um dieselbe oder gar eine bessere Wirksamkeit als 2,5 mM 5-ALA zu erzielen, was an der lipophileren Struktur und damit besseren Aufnahme in die Zelle liegen dürfte. Der Ester m-ALA erwies sich insgesamt als schwächer wirksam, b-ALA als gleichwertig zu 5-ALA.

Durch Verwendung des lipophileren h-ALA könnten im Vergleich zu 5-ALA also auch Nebenwirkungen reduziert und die Wirksamkeit der PDT verbessert werden.

4.4 Klinische Relevanz und Ausblick

Zunächst einmal stellte sich in dieser Arbeit heraus, dass ein pH-Wert im physiologischen bis leicht alkalischen Bereich Voraussetzung dafür ist, dass es zu einer ausreichenden durch 5-ALA induzierten PpIX-Synthese kommen kann. Daher wird es nötig sein, vor einer topischen Applikation der Aminolävulinsäure in dem sonst sauren Milieu der Zervix den pH-Wert zu erhöhen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Eisenchelatoren EDTA und DEF erwiesen sich als mögliche Faktoren, durch die die Wirksamkeit der Photodynamischen Therapie gesteigert werden kann, da es unter ihrem Einfluss zu einer gesteigerten PpIX-Synthese kam. Hierbei müssten aber eventuelle Nebenwirkungen von EDTA und DEF beachtet werden, insbesondere wenn diese in den systemischen Kreislauf gelangen. DEF wird bereits zur Behandlung von Thalassämie eingesetzt und zeigte dort bei oraler Applikation keine wesentlichen Nebenwirkungen (Giardina 2001).

Durch EDTA und DEF lassen sich so auch die benötigten Konzentrationen von 5-ALA verringern, so dass deren Nebenwirkungen reduziert werden können. Dies lässt sich, wie in dieser Arbeit gezeigt, auch dadurch erreichen, dass anstelle von 5-ALA ihre lipophileren Ester eingesetzt werden, die sich außerdem auch noch durch eine bessere Eindringtiefe in das Gewebe auszeichnen.

Bei der klinischen Anwendung können die hier ermittelten Konzentrationen nur als Orientierungswerte dienen und müssen, genau wie die effektiven Mengen EDTA oder DEF, in vivo erneut bestimmt werden.

Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse ergeben sich für die klinische Anwendung folgende Möglichkeiten. Die Photodynamische Diagnostik

wird durch die größere Eindringtiefe, homogenere Verteilung und gesteigerte PpIX-Synthese unter den ALA-Estern effizienter. Durch die verbesserte Fluoreszenz könnten Dysplasien oder kleine Tumoren der Zervix leichter erkannt und zuverlässiger therapiert werden, sei es durch Konisation, chirurgische Intervention oder gar durch PDT. So könnten sowohl bei Konisation als auch chirurgischer Therapie Tumorreste detektiert und anschließend gezielt nachreseziert oder adjuvant bestrahlt werden, wie dies in anderen Fachgebieten der Medizin bereits erfolgreich durchgeführt wird (Ackroyd 2001, Dougherty 2002).

5 Zusammenfassung

Einleitung:

Die Photodynamische Therapie ist eine neuere Methode zur Therapie maligner Erkrankungen. Durch eine Wechselwirkung zwischen Licht einer bestimmten Wellenlänge und einem *Photosensitizer* entsteht reaktiver Singulett-Sauerstoff, welcher die Tumorzellen zerstört. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss 5-Aminolävulinsäure und ihre lipophileren Ester auf die Synthese des Photosensitizer Protoporphyrin IX in den Zervixkarzinomzelllinien C33A und CaSki hat. Außerdem sollte untersucht werden, wie der pH-Wert, die Eisenchelatoren EDTA und Desferrioxamin sowie Serum die durch Aminolävulinsäure induzierte Protoporphyrin IX- Synthese beeinflussen.

Material und Methoden:

Die Zelllinien C33A und CaSki wurden über 4 Stunden jeweils mit 5-Aminolävulinsäure bzw. ihren Estern inkubiert, zusätzlich wurde jeweils EDTA, Desferrioxamin oder Serum hinzugefügt bzw. der pH-Wert verändert. Anschließend wurde die Protoporphyrin IX Fluoreszenz mittels *Fluoreszenzreaders* gemessen. Es folgte die Bestrahlung mit Laserlicht der Wellenlänge 635 nm. Sowohl vor als auch 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde die Vitalität der behandelten Zellen anhand eines WST-1 Test bestimmt.

Ergebnisse und Bewertung:

In dieser Arbeit konnte erstmals an Zervixkarzinomzelllinien gezeigt werden, dass Hexyl-Aminolävulinsäure die Protoporphyrin IX- Synthese stärker zu induzieren vermochte als 5-Aminolävulinsäure. Methyl- und Butyl-Aminolävulinsäure hingegen erwiesen sich nicht als der 5-Aminolävulinsäure eindeutig überlegen.

Ferner ließ sich erkennen, dass zu hohe Konzentrationen der 5-Aminolävulinsäure bzw. ihrer Ester auch ohne Bestrahlung toxisch auf die Zellen wirkten.

Die Protoporphyrin IX-Synthese war abhängig vom pH-Wert. Unter sauren pH-Werten konnte nur wenig Protoporphyrin IX-Fluoreszenz nachgewiesen werden, während sie mit zunehmenden pH-Wert im physiologischen bis leicht alkalischen Bereich zunahm.

Die gesteigerte Protoporphyrin IX-Synthese spiegelte sich auch in einer erniedrigten Überlebensrate der Zellen nach Bestrahlung im physiologischen bis alkalischen Bereich wieder.

Die Zugabe von Serum führte zu einer erniedrigten Protoporphyrin IX-Fluoreszenz und einer sich daraus abzuleitenden und beobachteten höheren Überlebensrate der Zellen.

Der Eisenchelator EDTA steigerte die durch Aminolävulinsäure induzierte Protoporphyrin IX-Synthese um durchschnittlich 28% in C33A- bzw. 59% in

CaSki-Zellen. EDTA per se erwies sich nicht als toxisch. Analog zum Anstieg der Protoporphyrin IX-Fluoreszenz sank die Überlebensrate nach Bestrahlung.

Desferrioxamin vermochte die durch 5-Aminolävulinsäure bzw. ihre Ester induzierte Protoporphyrin IX-Fluoreszenz noch stärker als EDTA zu erhöhen, nämlich um durchschnittlich 54% in C33A- bzw. 42% in CaSki-Zellen. Desferrioxamin selbst erwies sich ebenfalls als nicht toxisch. Unter Bestrahlung konnte die Überlebensrate der Zellen durch Zugabe von Desferrioxamin in C33A-Zellen um 80% nach Inkubation mit Hexyl-Aminolävulinsäure bzw. um 47% nach Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure verringert werden.

Zusammenfassend stellt die Photodynamische Therapie mittels 5-Aminolävulinsäure eine vielversprechende Methode zur Behandlung von Neoplasien der Zervix dar. Dabei lassen sich durch Verwendung von Hexyl-Aminolävulinsäure, eventuell in Kombination mit Desferrioxamin, die Wirksamkeit deutlich steigern und Nebenwirkungen sowie Kosten reduzieren.

6 Literaturverzeichnis

Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N. & Reed, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* **74**, 656-69. (2001).

Anderson, P.M. & Desnick, R.J. Purification and properties of uroporphyrinogen I synthase from human erythrocytes. Identification of stable enzyme-substrate intermediates. *J Biol Chem* **255**, 1993-9. (1980).

Bech, O., Berg, K. & Moan, J. The pH dependency of protoporphyrin IX formation in cells incubated with 5-aminolevulinic acid. *Cancer Lett* **113**, 25-9. (1997).

Berg, K., Anholt, H., Bech, O. & Moan, J. The influence of iron chelators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolaevulinic acid-treated cells. *Br J Cancer* **74**, 688-97. (1996).

Berg, K. & Moan, J. Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer. *Photochem Photobiol* **65**, 403-9. (1997).

Boegheim, J.P. et al. Photodynamic effects of hematoporphyrin-derivative on enzyme activities of murine L929 fibroblasts. *J Photochem Photobiol B* **1**, 61-73. (1987).

Bohmer, R.M. & Morstyn, G. Uptake of hematoporphyrin derivative by normal and malignant cells: effect of serum, pH, temperature, and cell size. *Cancer Res* **45**, 5328-34. (1985).

Bonferroni, C.E., *Theoria statistica classi e calcolo delle probabilità. Pubbl R Int Super Sci Econ Comm Firenze* **8**, 1-62 (1936).

Bottomley, S.S. & Muller-Eberhard, U. Pathophysiology of heme synthesis. *Semin Hematol* **25**, 282-302. (1988).

Candide, C. et al. Photosensitization of Wi26-VA4 transformed human fibroblasts by low density lipoprotein loaded with the anticancer porphyrin mixture photofrin II: evidence for endoplasmic reticulum alteration. *Cancer Lett* **44**, 157-61. (1989).

Casas, A., Fukuda, H., Di Venosa, G. & Batlle, A. Photosensitization and mechanism of cytotoxicity induced by the use of ALA derivatives in photodynamic therapy. *Br J Cancer* **85**, 279-84. (2001).

De Rosa, F.S., Marchetti, J.M., Thomazini, J.A., Tedesco, A.C. & Bentley, M.V. A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy. *J Control Release* **65**, 359-66. (2000).

de Vree, W.J., Essers, M.C., Koster, J.F. & Sluiter, W. Role of interleukin 1 and granulocyte colony-stimulating factor in photofrin-based photodynamic therapy of rat rhabdomyosarcoma tumors. *Cancer Res* **57**, 2555-8. (1997).

Dellinger, M. Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem Photobiol* **64**, 182-7. (1996).

Diddens, H., Hümpel, B., Hüttmann, G., Novo, M. Chemische Instabilität von 5-Aminolävulinsäure: pH und Konzentrationsabhängigkeit. *Laser Medizin* **10**, 106. (1994).

Doring, F. et al. Delta-aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications. *J Clin Invest* **101**, 2761-7. (1998).

Dougherty, T.J., Grindey, G.B., Fiel, R., Weishaupt, K.R. & Boyle, D.G. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J Natl Cancer Inst* **55**, 115-21. (1975).

Dougherty, T.J. et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* **38**, 2628-35. (1978).

Dougherty, T.J., Potter, W.R. & Weishaupt, K.R. The structure of the active component of hematoporphyrin derivative. *Prog Clin Biol Res* **170**, 301-14. (1984).

Dougherty, T.J. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg* **20**, 3-7. (2002).

Dubbelman, T.M. & Van Steveninck, J. Photodynamic effects of hematoporphyrin-derivative on transmembrane transport systems of murine L929 fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* **771**, 201-7. (1984).

Dvorak, H.F., Dvorak, A.M., Manseau, E.J., Wiberg, L. & Churchill, W.H. Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs. Role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression. *J Natl Cancer Inst* **62**, 1459-72. (1979).

Dvorak, H.F. et al. Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products. *J Immunol* **122**, 166-74. (1979).

Elliott, R.L., Elliott, M.C., Wang, F. & Head, J.F. Breast carcinoma and the role of iron metabolism. A cytochemical, tissue culture, and ultrastructural study. *Ann N Y Acad Sci* **698**, 159-66. (1993).

Epstein, J.H. Phototherapy and photochemotherapy. *N Engl J Med* **322**, 1149-51. (1990).

Evans, S. et al. Effect of photodynamic therapy on tumor necrosis factor production by murine macrophages. *J Natl Cancer Inst* **82**, 34-9. (1990).

Figge, F.H.J. & Weiland, G.S. The affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissue for porphyrins and metalloporphyrins. *Anat. Rec.***100**, 659. (1948a).

Figge, F.H.J., Weiland, G.S., Manganiello, L.O.J. Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissue for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.***68**, 640-41. (1948b).

Fijan, S., Honigsmann, H. & Ortel, B. Photodynamic therapy of epithelial skin tumours using delta-aminolaevulinic acid and desferrioxamine. *Br J Dermatol* **133**, 282-8. (1995).

Fingar, V.H. Vascular effects of photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg* **14**, 323-8. (1996).

Fisher, A.M., Ferrario, A. & Gomer, C.J. Adriamycin resistance in Chinese hamster fibroblasts following oxidative stress induced by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* **58**, 581-8. (1993).

Fuchs, C., Riesenber, R., Siegert, J. & Baumgartner, R. H-dependent formation of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX in fibrosarcoma cells. *J Photochem Photobiol B* **40**, 49-54. (1997).

Fukuda, H., Battle, A.M. & Riley, P.A. Kinetics of porphyrin accumulation in cultured epithelial cells exposed to ALA. *Int J Biochem* **25**, 1407-10. (1993).

Gaullier, J.M. et al. Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture. *Cancer Res* **57**, 1481-6. (1997).

Georgakoudi, I., Keng, P.C. & Foster, T.H. Hypoxia significantly reduces aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX synthesis in EMT6 cells. *Br J Cancer* **79**, 1372-7. (1999).

Gerscher, S. et al. Comparison of the pharmacokinetics and phototoxicity of protoporphyrin IX metabolized from 5-aminolevulinic acid and two derivatives in human skin in vivo. *Photochem Photobiol* **72**, 569-74. (2000).

Giardina, P.J. & Grady, R.W. Chelation therapy in beta-thalassemia: an optimistic update. *Semin Hematol* **38**, 360-6. (2001).

Gibson, S.L., Murant, R.S., Chazen, M.D., Kelly, M.E. & Hilf, R. In vitro photosensitization of tumour cell enzymes by photofrin II administered in vivo. *Br J Cancer* **59**, 47-53. (1989).

Gibson, S.L., Havens, J.J., Foster, T.H. & Hilf, R. Time-dependent intracellular accumulation of delta-aminolevulinic acid, induction of porphyrin synthesis and subsequent phototoxicity. *Photochem Photobiol* **65**, 416-21. (1997).

Gibson, S.L., Nguyen, M.L., Havens, J.J., Barbarin, A. & Hilf, R. Relationship of delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels to mitochondrial content in neoplastic cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **265**, 315-21. (1999).

Gollnick, S.O., Liu, X., Owczarczak, B., Musser, D.A. & Henderson, B.W. Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy in vivo. *Cancer Res* **57**, 3904-9. (1997).

Gomer, C.J., Ferrario, A., Rucker, N., Wong, S. & Lee, A.S. Glucose regulated protein induction and cellular resistance to oxidative stress mediated by porphyrin photosensitization. *Cancer Res* **51**, 6574-9. (1991).

Granick, S., Sinclair, P., Sassa, S. & Grieninger, G. Effects by heme, insulin, and serum albumin on heme and protein synthesis in chick embryo liver cells cultured in a chemically defined medium, and a spectrofluorometric assay for porphyrin composition. *J Biol Chem* **250**, 9215-25. (1975).

Hanania, J. & Malik, Z. The effect of EDTA and serum on endogenous porphyrin accumulation and photodynamic sensitization of human K562 leukemic cells. *Cancer Lett* **65**, 127-31. (1992).

Harth, Y., Hirshowitz, B. & Kaplan, B. Modified topical photodynamic therapy of superficial skin tumors, utilizing aminolevulinic acid, penetration enhancers, red light, and hyperthermia. *Dermatol Surg* **24**, 723-6. (1998).

Hausmann, W. Die sensibilisierende Wirkung tierischer Farbstoffe und ihre physiologische Bedeutung. *Wien Klin Wchnschr* **xxi**, 1527-1529. (1908).

Hausmann, W. Die sensibilisierende Wirkung des Hematoporphyrins. *Biochem. Z.* **30**, 276-316. (1911).

He, X.Y., Sikes, R.A., Thomsen, S., Chung, L.W. & Jacques, S.L. Photodynamic therapy with photofrin II induces programmed cell death in carcinoma cell lines. *Photochem Photobiol* **59**, 468-73. (1994).

Henderson, B.W. & Dougherty, T.J. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol* **55**, 145-57. (1992).

Hilf, R., Smail, D.B., Murant, R.S., Leakey, P.B. & Gibson, S.L. Hematoporphyrin derivative-induced photosensitivity of mitochondrial succinate dehydrogenase and selected cytosolic enzymes of R3230AC mammary adenocarcinomas of rats. *Cancer Res* **44**, 1483-8. (1984).

Hillemanns, P., Korell, M., Schmitt-Sody, M., Baumgartner, R., Beyer, W., Kimmig, R., Untch M., Hepp, H. Photodynamic Therapy in women with cervical intraepithelial neoplasia using topically applied 5-Aminolevulinic Acid. *Int J Cancer* **81**,34-8. (1999).

Holm, S., Sequentially rejective multiple test procedures. University of Umea, Sweden, *Statistical research report* 1977-1 (1977).

Holm, S., A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Statist* **6**, 65-70 (1979).

Iinuma, S., Farshi, S.S., Ortel, B. & Hasan, T. A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. *Br J Cancer* **70**, 21-8. (1994).

Jacobs, R., Ackerman, N.B., Bloom, N.D. & Kim, D.D. The acute effects of hematoporphyrin derivative photoradiation on tumor and liver capillary blood flow. *Microcirc Endothelium Lymphatics* **6**, 343-54. (1990).

Jori, G. & Reddi, E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers. *Int J Biochem* **25**, 1369-75. (1993).

Joshi, P.G., Joshi, K., Mishra, S. & Joshi, N.B. Ca²⁺ influx induced by photodynamic action in human cerebral glioma (U-87 MG) cells: possible involvement of a calcium channel. *Photochem Photobiol* **60**, 244-8. (1994).

Keberle, H. The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism. *Anns. N. Y. Acad. Sci.* **19**, 758-68. (1964).

Kennedy, J.C. & Pottier, R.H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* **14**, 275-92. (1992).

Kennedy, J.C. & Pottier, R.H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* **14**, 275-92. (1992).

Kessel, D. Photosensitization with derivatives of haematoporphyrin. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **49**, 901-7. (1986).

Kessel, D. Sites of photosensitization by derivatives of hematoporphyrin. *Photochem Photobiol* **44**, 489-93. (1986).

Kessel, D. Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization. *Cancer Lett* **33**, 183-8. (1986).

Klamert, A. & Hölzel, D. Epidemiologie, Tumorzentrum München. (1998).

Kloek, J., Akkermans, W. & Beijersbergen van Henegouwen, G.M. Derivatives of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy: enzymatic conversion into protoporphyrin. *Photochem Photobiol* **67**, 150-4. (1998).

Kondo, M., Hirota, N., Takaoka, T. & Kajiwara, M. Heme-biosynthetic enzyme activities and porphyrin accumulation in normal liver and hepatoma cell lines of rat. *Cell Biol Toxicol* **9**, 95-105. (1993).

Krammer, B. & Uberriegler, K. In-vitro investigation of ALA-induced protoporphyrin IX. *J Photochem Photobiol B* **36**, 121-6. (1996).

Lange, N. et al. Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolaevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX: a pilot study. *Br J Cancer* **80**, 185-93. (1999).

Leibovici, L. et al. Activity of porphobilinogen deaminase in peripheral blood mononuclear cells of patients with metastatic cancer. *Cancer* **62**, 2297-300. (1988).

Loh, C.S. et al. Oral versus intravenous administration of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy. *Br J Cancer* **68**, 41-51. (1993).

Malik, Z., Kostenich, G., Roitman, L., Ehrenberg, B. & Orenstein, A. Topical application of 5-aminolevulinic acid, DMSO and EDTA: protoporphyrin IX accumulation in skin and tumours of mice. *J Photochem Photobiol B* **28**, 213-8. (1995).

Marti, A. et al. Optimisation of the formation and distribution of protoporphyrin IX in the urothelium: an in vitro approach. *J Urol* **162**, 546-52. (1999).

Meyer-Betz, F. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs. *Dtsch. Arch. Klin. Med.* **112**, 476-503. (1913).

Miyamoto, Y., Umebayashi, Y. & Nishisaka, T. Comparison of phototoxicity mechanism between pulsed and continuous wave irradiation in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* **53**, 53-9. (1999).

Moan, J., Rimington, C. & Western, A. The binding of dihematoporphyrin ether (photofrin II) to human serum albumin. *Clin Chim Acta* **145**, 227-36. (1985).

Moan, J. et al. Intracellular localization of photosensitizers. *Ciba Found Symp* **146**, 95-107; discussion 107-11. (1989).

Moan, J. & Berg, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* **53**, 549-53. (1991).

Moan, J. & Berg, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* **53**, 549-53. (1991).

Moan, J., Streckyte, G., Bagdonas, S., Bech, O. & Berg, K. Photobleaching of protoporphyrin IX in cells incubated with 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* **70**, 90-7. (1997).

Moan, J. et al. Protoporphyrin IX accumulation in cells treated with 5-aminolevulinic acid: dependence on cell density, cell size and cell cycle. *Int J Cancer* **75**, 134-9. (1998).

Moor, A.C. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* **57**, 1-13. (2000).

Musser, D.A., Wagner, J.M., Weber, F.J. & Datta-Gupta, N. The binding of tumor localizing porphyrins to a fibrin matrix and their effects following photoirradiation. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **28**, 505-25. (1980).

Navone, N.M., Polo, C.F., Frisardi, A.L., Andrade, N.E. & Battle, A.M. Heme biosynthesis in human breast cancer--mimetic "in vitro" studies and some heme enzymic activity levels. *Int J Biochem* **22**, 1407-11. (1990).

Noodt, B.B., Berg, K., Stokke, T., Peng, Q. & Nesland, J.M. Apoptosis and necrosis induced with light and 5-aminolaevulinic acid-derived protoporphyrin IX. *Br J Cancer* **74**, 22-9. (1996).

Nseyo, U.O., Whalen, R.K., Duncan, M.R., Berman, B. & Lundahl, S.L. Urinary cytokines following photodynamic therapy for bladder cancer. A preliminary report. *Urology* **36**, 167-71. (1990).

Ochsner, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B* **39**, 1-18. (1997).

Ortel, B., Tanew, A. & Honigsmann, H. Lethal photosensitization by endogenous porphyrins of PAM cells--modification by desferrioxamine. *J Photochem Photobiol B* **17**, 273-8. (1993).

Peng, Q., Moan, J., Warloe, T., Nesland, J.M. & Rimington, C. Distribution and photosensitizing efficiency of porphyrins induced by application of exogenous 5-aminolevulinic acid in mice bearing mammary carcinoma. *Int J Cancer* **52**, 433-43. (1992).

Peng, Q., Moan, J. & Nesland, J.M. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. *Ultrastruct Pathol* **20**, 109-129. (1996).

Peng, Q. et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer* **79**, 2282-308. (1997).

Policard, A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees à la lumière de Wood. *C. R. Soc. Biol.* **91**, 1423-28. (1924).

Raab, O. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Z. Biol.* **39**, 524-546. (1900).

Reed, M.W., Wieman, T.J., Schuschke, D.A., Tseng, M.T. & Miller, F.N. A comparison of the effects of photodynamic therapy on normal and tumor blood vessels in the rat microcirculation. *Radiat Res* **119**, 542-52. (1989).

Roeder, B. et al. Photophysical properties and photodynamic activity in vivo of some tetrapyrroles. *Biophys Chem* **35**, 303-12. (1990).

- Rossi, F.M., Campbell, D.L., Pottier, R.H., Kennedy, J.C. & Dickson, E.F. In vitro studies on the potential use of 5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy for gynaecological tumours. *Br J Cancer* **74**, 881-7. (1996).
- Rud, E., Gederaas, O., Hogset, A. & Berg, K. 5-aminolevulinic acid, but not 5-aminolevulinic acid esters, is transported into adenocarcinoma cells by system BETA transporters. *Photochem Photobiol* **71**, 640-7. (2000).
- Salet, C. & Moreno, G. Photosensitization of mitochondria. Molecular and cellular aspects. *J Photochem Photobiol B* **5**, 133-50. (1990).
- Sassa, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* **28**, 133-45. (1982).
- Schneider, A., Dürst, M., Klug, S.J., Kaufmann, A., Jochmus, I., Gissmann, L. Epidemiologie, Ätiologie und Prävention des Zervixkarzinoms. *Der Onkologe* **8**, 814. (2001).
- Schwartz, S.K., Absolon, K., Vermund, H. Some relationships of porphyrins x-rays and tumours. *Univ. Minn. Med. Bull.* **27**, 7-8. (1955).
- Sellner, W. Gewebe und Zellkultur. In: Romeis- Mikroskopische Technik. Böck, P. (ed) Urban und Schwarzenberger, München, Wien, Baltimore, 37-67. (1989).
- Shen, H.R., Spikes, J.D., Kopecekova, P. & Kopecek, J. Photodynamic crosslinking of proteins. I. Model studies using histidine- and lysine-containing N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers. *J Photochem Photobiol B* **34**, 203-10. (1996).
- Specht, K.G. & Rodgers, M.A. Depolarization of mouse myeloma cell membranes during photodynamic action. *Photochem Photobiol* **51**, 319-24. (1990).
- Spikes, J.D. The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in health sciences. In *Primary Photoprocesses in Biology and Medicine* (Edited by R.V. Bergasson, G. Jori, E.J. Land and T.G. Truscott), pp. 209-227. Plenum Press, New York (1985).
- Steinbach, P. et al. Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *Photochem Photobiol* **62**, 887-95. (1995).
- Szeimies, R.M., Sassy, T. & Landthaler, M. Penetration potency of topical applied delta-aminolevulinic acid for photodynamic therapy of basal cell carcinoma. *Photochem Photobiol* **59**, 73-6. (1994).
- Thomas, J.P. & Girotti, A.W. Role of lipid peroxidation in hematoporphyrin derivative-sensitized photokilling of tumor cells: protective effects of glutathione peroxidase. *Cancer Res* **49**, 1682-6. (1989).

- Torti, S.V. & Torti, F.M. Iron and ferritin in inflammation and cancer. *Adv Inorg Biochem* **10**, 119-37. (1994).
- Tromberg, B.J. et al. In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* **52**, 375-85. (1990).
- Uehlinger, P. et al. 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J Photochem Photobiol B* **54**, 72-80. (2000).
- van den Akker, J.T., Iani, V., Star, W.M., Sterenberg, H.J. & Moan, J. Topical application of 5-aminolevulinic acid hexyl ester and 5-aminolevulinic acid to normal nude mouse skin: differences in protoporphyrin IX fluorescence kinetics and the role of the stratum corneum. *Photochem Photobiol* **72**, 681-9. (2000).
- Vaupel, P., Kallinowski, F. & Okunieff, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* **49**, 6449-65. (1989).
- von Tappeiner, H. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. *Münch. Med. Wochenschr.* **47**, 5. (1900).
- von Tappeiner, H. & Jesionek, A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Münch. Med. Wochenschr.* **47**, 2042-44. (1903).
- von Tappeiner, H. & Jodlbauer, A. Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. *Gesamte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung*. F.C.W. Vogel, Leipzig. (1907).
- Weir, M.M., Vernon, D.I., Brown, S.B. Influence of serum proteins on the accumulation of aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX cells in culture. *International Photodynamic Association SPIE***2371**, 40-44. (1994).
- Weishaupt, K.R., Gomer, C.J. & Dougherty, T.J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res* **36**, 2326-9. (1976).
- Wieman, T.J. & Fingar, V.H. Photodynamic therapy. *Surg Clin North Am* **72**, 609-22. (1992).
- Wyld, L., Reed, M.W. & Brown, N.J. The influence of hypoxia and pH on aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy in bladder cancer cells in vitro. *Br J Cancer* **77**, 1621-7. (1998).
- Xiang, W. et al. Photodynamic effects induced by aminolevulinic acid esters on human cervical carcinoma cells in culture. *Photochem Photobiol* **74**, 617-23. (2001).

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
Acyl-CoA	<i>Acyl coenzyme A</i>
a.u.	<i>arbitrary fluorescence units</i>
b-ALA	Buthyl-Aminolävulinsäure
DEF	Desferrioxamin
DHE	Dihematoporphyrin Ether
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>
FCS	Fetales Kälberserum
GRP	<i>Glucose regulated protein</i>
h-ALA	Hexyl-Aminolävulinsäure
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HpD	Hematoporphyrinderivat
HSP	<i>Heat shock protein</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
m-ALA	Methyl-Aminolävulinsäure
O.D.	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDD	Photodynamische Diagnostik
PDT	Photodynamische Therapie
PpIX	Protoporphyrin IX
SEM	Standardfehler der Mittelwerte

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Peter Hillemanns für die Überlassung des Themas, sowie für seine fachliche und persönliche Unterstützung. Insbesondere auch für die Möglichkeit, in dem von ihm geleiteten onkologischen Forschungslabor zu forschen und die gewonnenen Ergebnisse auf Kongressen und in wissenschaftlichen Zeitschriften zu präsentieren.

Ich danke meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Wei Xiang für die kontinuierliche und stets zuverlässige Betreuung, sowie für ihren wissenschaftlichen Rat und die methodische Anleitung bei den experimentellen Arbeiten.

Für die gute Kooperation, die Bereitstellung des Lasers und des Fluoreszenzmessgeräts möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. Alfons G. Hofstetter, Herrn Dr. rer. nat. Reinhold Baumgartner, Herrn Dr. rer. biol. hum. Herbert Stepp und allen Mitarbeitern des Laser-Forschungslabors des Klinikums Großhadern bedanken. Insbesondere Herrn Dipl. Ing. Thomas Pongratz möchte ich für seine Hilfe und Unterstützung während der Bestrahlungsversuche danken.

Ich danke allen Mitdoktoranden im Labor für die gute und nette Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich mich auch bei den Medizinisch Technischen Assistentinnen Frau Egner, Frau Felber, Frau Fileki, und Frau Lude für die bereitwillige und tatkräftige Unterstützung bedanken.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten bedanke ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Michels vom Universitätsklinikum Jena.

Ich danke von ganzem Herzen meiner Mutter, Frau Dr. med. Jana Klein, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt und mir mein Medizinstudium ermöglicht hat.

Nicht zuletzt möchte ich auch meinem Bruder Jan-Philipp Klein, sowie allen anderen danken, die ich hier namentlich nicht erwähnt habe, die mich aber auf diesem Weg begleitet und in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Veröffentlichungen

- Okt 2001 Xiang W., Weingandt H., Liessmann F., Klein S., Stepp H., Baumgartner R., Hillemanns P., Photodynamic effects induced by aminolevulinic acid esters on human cervical carcinoma cells in culture, Photochemistry and Photobiology 2001 Oct; 74 (4): 617-23.
- Okt 2001 Hillemanns P., Weingandt H., Klein S., Xiang W., Apoptoseinduktion und Pharmakokinetik von ALA-Estern in der Photodynamischen Therapie des Zervixkarzinoms, Posterbeitrag, XVII. Akademischen Tagung deutschsprechender Hochschullehrer in der Gynäkologie und Geburtshilfe, Salzburg, Österreich.
- Mai 2003 Klein S., Kronschnabl M., Xiang W., Hillemanns P., Verbesserte Effektivität der Photodynamischen Therapie durch Esterderivate der 5-Aminolävulinsäure bei Zervixkarzinomzelllinien, Posterbeitrag, 77.Tagung der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde e.V., Würzburg.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Susanne Klein
Geburtsdatum: 26.11.1974
Geburtsort: Ulm/ Donau

Schulbildung

1981 – 1985 Friedrichsau Grundschule in Ulm
1985 – 1988 Humboldt Gymnasium, Ulm
1988 – 1992 Heimschule Kloster Wald, Wald
1992 – 1995 Kepler Gymnasium, Ulm
1995 Allgemeine Hochschulreife

Freiwilliges Soziales Jahr

1995 – 1996 Freiwilliges Soziales Jahr im ambulanten
Krankenpflegedienst bei der Arbeiter Wohlfahrt , Ulm

Hochschulbildung

1996 – 2003 Studium der Humanmedizin an der LMU München
Sept. 1998 Ärztliche Vorprüfung
Aug. 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Nov. 1999 Beginn der Promotion bei Herrn PD Dr. med. P.
Hillemanns
Aug. 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2002 – März 2003 Praktisches Jahr an der LMU München, Kantonsspital
Winterthur, Schweiz und an der University of
Melbourne, Australien
Mai 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juni 2003 Abschluss der Promotion

Berufliche Tätigkeit

August 2003 Ärztin im Praktikum, Krankenhaus Neuperlach,
Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, München
seit Februar 2004 ÄiP, Frauenklinik Universität Würzburg