

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen

Abteilung Kinderchirurgie mit Poliklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Fuchs

**Einsatz von Hypericin zur *in-vitro* photodynamischen
Therapie von kindlichen Lebertumoren**

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

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

**vorgelegt von
Renita Bianca Krause
aus Düsseldorf**

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Warmann

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Handgretinger

Meinen Eltern

„Was wir wissen ist ein Tropfen,
Was wir nicht wissen, ein Ozean.“

Isaac Newton

Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Seitz G, Krause R, Fuchs J, Heitmann H, Armeanu S, Ruck P, Warmann SW.
(2008) In vitro photodynamic therapy in pediatric epithelial liver tumors promoted by hypericin. Oncol Rep. 20: 1277-1282.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden präsentiert bei der:

Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung am 01.04.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Das Hepatoblastom.....	3
1.1.1	Epidemiologie	3
1.1.2	Ätiologie	3
1.1.3	Histologie	5
1.1.4	Stadieneinteilung	5
1.1.5	Diagnostik.....	7
1.1.6	Therapie.....	10
1.1.7	Prognose	12
1.2	Das Hepatozelluläre Karzinom.....	14
1.3	Photodynamische Therapie	16
1.3.1	Prinzip der PDT.....	16
1.3.2	Wirkmechanismus.....	16
1.3.3	Apoptose und Nekrose	20
1.3.4	Photosensibilisatoren in der Onkologie.....	21
1.4	Hypericin	22
1.4.1	Herkunft	22
1.4.2	Photochemische und photophysikalische Eigenschaften.....	23
1.4.3	Anwendungsgebiete	24
1.5	Zielsetzung der Arbeit	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Zelllinien.....	26
2.2	Methoden	29
2.2.1	Kulturbedingungen.....	29
2.2.2	Zellzahlbestimmung	30
2.2.3	Hämalaun-Eosin (HE) Färbung.....	31
2.2.4	Fluoreszenzmikroskopie	32
2.2.5	FACS-Analyse	34
2.2.6	Morphologische Beurteilung	35
2.2.7	MTT-Assay.....	36
2.2.8	Ki-67 Immunfluoreszenz	39
2.2.9	TUNEL (TDT-mediated dUTP nick end labeling)	41
2.2.10	Statistische Verfahren.....	43

3	Ergebnisse	44
3.1	Zellvisualisierung.....	44
3.2	Zellmorphologie	47
3.3	Zellvitalität	47
3.4	Zellproliferation	51
3.5	Apoptose.....	53
3.6	Zusammenfassung.....	58
4	Diskussion	59
4.1	Allgemeine Diskussion	59
4.2	Diskussion der eigenen Ergebnisse	60
4.3	PDT-Wirkung beeinflussende Faktoren	62
4.4	Intrazelluläre Lokalisation von Hypericin	64
4.5	Klinische Relevanz.....	66
4.6	Schlussfolgerung.....	67
5	Zusammenfassung	68
6	Anhang	70
6.1	Abkürzungsverzeichnis	70
6.2	Abbildungsverzeichnis	72
6.3	Tabellenverzeichnis	73
6.4	Materialien	74
6.4.1	Geräte und Einmalmaterialien.....	74
6.4.2	Reagenzien.....	75
6.4.3	Antikörper	76
6.4.4	Hypericin-Stammlösung.....	76
6.4.5	Medien	76
6.5	Messdaten	77
6.5.1	Werte MTT-Assay	77
6.5.2	Werte FACS-Analyse.....	83
7	Literaturverzeichnis	84
8	Danksagung	96
9	Lebenslauf	97

1 Einleitung

1.1 Das Hepatoblastom

1.1.1 Epidemiologie

Lebertumoren machen 0,2-5,8% aller malignen Erkrankungen im Kindesalter aus [141]. Über 90% hiervon sind epitheliale Tumoren, von denen das Hepatoblastom (HB) der weitaus häufigste ist [141, 177]. Die jährliche Inzidenz beträgt für westliche Länder 0,7-1,0 pro 1 Millionen Kinder unter 15 Jahren [91, 178]. Der Altersgipfel liegt in den ersten drei Lebensjahren, wobei Jungen 2,5 - 1,5 mal häufiger als Mädchen erkranken [130, 167, 177].

Altersgruppe	Malignom
Kleinkinder	Hepatoblastome
	Rhabdoidsarkome
	Keimzelltumore
Schulkinder/Jugendliche	Hepatozelluläre Karzinome
	Sarkome

Tabelle 1: Maligne kindliche Lebertumoren, Altersverteilung in westlichen Ländern (modifiziert nach von Schweinitz 2006)

1.1.2 Ätiologie

I. Risikofaktoren:

Es besteht eine Assoziation des Hepatoblastoms mit verschiedenen genetischen Erkrankungen, insbesondere dem Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS) [50, 147]. Ein signifikanter Anstieg des Hepatoblastomvorkommens wurde auch bei der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP) beobachtet. Die FAP wird durch eine Inaktivierung des APC (adenomatous polyposis coli) Tumor-Suppressorgens verursacht, welches auf dem Chromosom 5 lokalisiert ist. Bei 67% der Patienten mit Hepatoblastom wurden Abnormitäten des APC-

Gens beschrieben [8, 60, 105]. Auch mit extremer Frühgeburtlichkeit, dem Geburtsgewicht [62, 112] und dem fetalen Alkohol-Syndrom wurde ein Zusammenhang festgestellt [74].

II. Pathogenese:

Es wird angenommen, dass das Hepatoblastom durch Fehldifferenzierung von embryonalen Stammzellen in der vorgeburtlichen Leber entsteht [135, 161]. Diese Stammzellen sind in der Lage, sich sowohl in Hepatozyten als auch in biliäre Epithelzellen zu differenzieren. Desweiteren wird eine extramedulläre sowie im Tumor selbst stattfindende Erythropoese und Thrombopoese beobachtet [166]. Hepatoblastomzellen sezernieren Interleukin-1 β (IL-1 β), dadurch wird in den umgebenden Fibroblasten und Endothelzellen Interleukin-6 (IL-6) produziert [163]. Die Ausschüttung des Hepatocyte-growth-factor (HGF) wird von IL-6 und IL-1 β stimuliert. HGF wird beim kindlichen Hepatoblastom von Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert. Für die Hepatoblastomzellen, die den HGF-Rezeptor c-met an der Oberfläche präsentieren, fungiert HGF als parakriner Wachstumsfaktor [168].

III. Zytogenetische Veränderungen:

Die zytogenetischen Analysen des HB zeigten bisher keine einheitlichen Chromosomenanomalien. Größere Bedeutung hat allerdings der Verlust der Heterozygotie (LOH = loss of heterocycosity), der bei annähernd einem Drittel der Tumoren auf den Chromosomenarmen 1p und 1q nachgewiesen werden konnte. Ein LOH des Chromosomenanteils 11p15.5 zeigte sich bei etwa 25% [5, 82]. Für Patienten mit BWS ist der Verlust der Heterozygotie des maternalen Chromosoms 11p15 nahezu pathognomisch [147]. Ein bedeutendes Gen auf diesem Chromosomenanteil ist das fetale Mitogen IGF2 (Insuline-like growth factor). Die IGF2-Transkription wird von Mutationen des β -Catenin-Gens beeinflusst. Dies scheint ebenfalls eine wichtige Bedeutung bei der Entstehung des Hepatoblastoms zu haben [55]. Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 werden oft in Zusammenhang mit dem Hepatoblastom beschrieben, spielen

nach heutigem Stand der Forschung aber eine untergeordnetere Rolle, da diese Veränderung in vielen Tumorarten vorhanden ist [26].

1.1.3 Histologie

Histologisch unterscheidet man zwischen den rein epithelialen Tumoren, die wiederum embryonale und fetale Komponenten enthalten, sowie der gemischten Form (30%) bei denen zusätzlich zum epithelialen Gewebe noch mesenchymale Tumorkomponenten zu finden sind [64]. Beim embryonalen Typ handelt es sich um kleine spindelförmige Zellen die wenig differenziert sind. Sie weisen viele Mitosen auf und haben einen hohen Zytoplasmaanteil [50, 64, 177]. Die fetalen Zellen sind dagegen höher differenziert, größer und enthalten weniger Zytoplasma. Im Tumorgewebe sind Lebersinusoiden und Gallenkanälchen vorhanden. Zwischen den Tumortrabekeln kann es zur extramedullären Blutbildung kommen. Es ist noch umstritten, ob ein rein fetaler histologischer Phänotyp mit einer günstigen Prognose in Verbindung steht [50, 142, 166, 167]. Eine weitere Gruppe bilden die anaplastischen Hepatoblastome [71], die auch als kleinzellig undifferenziert bezeichnet werden. Dieser Tumor wächst infiltrativ und hat die schlechteste Prognose [50, 71].

1.1.4 Stadieneinteilung

I. Präoperative Stadieneinteilung:

Das Staging ist wichtig für die Abschätzung der Prognose und zur Vergleichbarkeit im Rahmen der Datenerfassung klinischer Studien. Eines von mehreren verschiedenen Systemen zur Stadieneinteilung ist das der Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique (SIOP). Dieses prätherapeutische Staging (pretreatment extent of disease = PRETEXT) wird benutzt, um die Resektabilität und die operative Prognose einzuschätzen. Anhand der diagnostischen Bildgebung, wie Sonographie, CT und MRT wird die Leber in vier Sektoren eingeteilt. Der linke Leberlappen besteht aus einem lateralen und medialen Sektor, während der rechte Leberlappen in einen posterioren und anterioren Sektor unterteilt ist. Die Klassifikation in eine der PRETEXT

Kategorien I-IV erfolgt nun abhängig von der Anzahl der von Tumor betroffenen Sektoren [10, 17, 111, 116, 131].

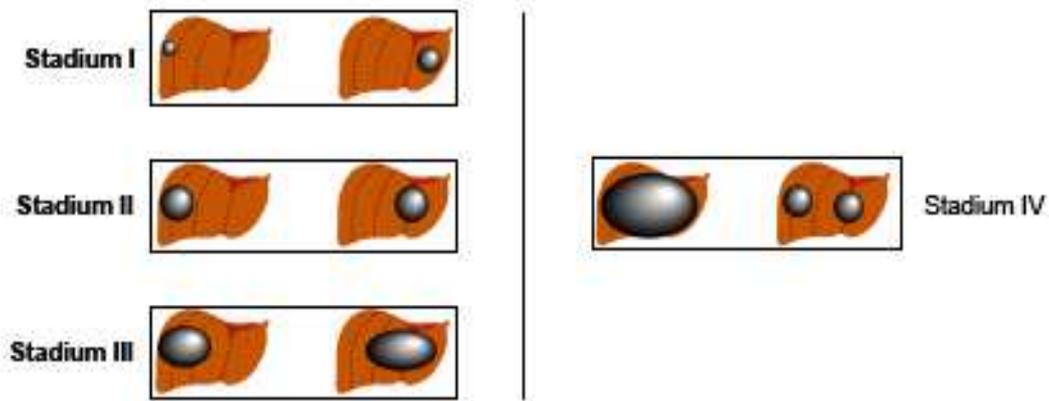


Abbildung 1: PRETEXT Stagingssystem
(aus Aronson et al. (2005) Predictive value of the pretreatment extent of disease system in hepatoblastoma: results from the International Society of Pediatric Oncology Liver Tumor Study Group SIOPEL-1 study. J Clin Oncol. 23:1245-1252.)

Die Ziele des PRETEXT-Systems waren die Analyse der Genauigkeit, der Beobachtungsgleichheit, sowie der Vergleich der aktuell verwendeten Staging-Systeme. Diese Stadieneinteilung bietet die Möglichkeit, die Effekte einer präoperativ durchgeführten Therapie zu überwachen und kann ebenfalls bei Patienten, die noch keine operative Therapie bekommen haben, angewandt werden. Dieses System ist prognostisch relevant und wird gemäß einer internationalen Vereinbarung in den meisten Studien parallel mitbenutzt [10].

II. Postoperative Stadieneinteilung:

Im Gegenteil zur präoperativen Stadieneinteilung nach PRETEXT, benutzen die GPOH (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie) und auch die COG (Children Oncology Group) der USA ein Stagingssystem, das sich zusätzlich zu den Befunden der bildgebenden Diagnostik, nach dem erzielten Resektionsresultat richtet. Je nach Resezierbarkeit des Tumors werden die

postchirurgischen Stadien I bis IV angewendet. Dabei bedeutet Stadium I eine primär vollständige (R0)-Resektion, Stadium II mikroskopischer Resttumor (R1) und das Stadium III makroskopischer Resttumor (R2). Das Stadium IV entspricht einem Tumor mit Fernmetastasen [37, 96, 109].

Stadium I	Primär vollständige Resektion (R0)
Stadium II	mikroskopischer Resttumor (R1)
Stadium III	A: vollständige Resektion, aber Lymphknotenbefall B: makroskopischer Resttumor, unvollständige Resektion (R2)
Stadium IV	Fernmetastasen

Tabelle 2: Postoperatives Stagingsystem der COG und GPOH (modifiziert nach von Schweinitz 2006)

Ein anderes postoperatives Stagingsystem ist das TNM-System (T=Tumor, N=node, M=metastasis), welches im Jahre 1983 in Japan modifiziert wurde [138]. Es wird für adulte Leberkarzinome benutzt, jedoch beim HB äußerst selten angewendet [10, 167].

1.1.5 Diagnostik

I. Klinische Symptomatik:

Häufig wird das Hepatoblastom als Zufallsbefund diagnostiziert oder die Kinder werden vorstellig durch ein stark aufgetriebenes Abdomen, verbunden mit einem bereits äußerlich palpablen Tumor. In den meisten Fällen existieren keine weiteren Symptome. Nur sehr selten ist bei Diagnosestellung ein Ikterus infolge eines Gallenwegsverschlusses sichtbar [41]. Im fortgeschrittenen Erkrankungszustand können auch Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Übelkeit und Erbrechen auftreten [141]. Selten ist eine Pubertas praecox aufgrund erhöhter β -HCG und Testosteronspiegel ein Erstsymptom [155]. Im Falle einer bereits vorliegenden Metastasierung können weitere, hiermit assoziierte Symptome auftreten. Bei annähernd 20% der Patienten werden bereits zum Diagnosezeitpunkt Fernmetastasen gefunden, die sich meistens in der Lunge

befinden. Des Weiteren wurden Metastasierungen in das Zentralnervensystem und den Schädelbereich beschrieben [39, 99]. Hepatoblastome treten häufiger als unifokale, abgekapselte Tumoren auf, wobei das Vorkommen im rechten Leberlappen gegenüber dem linksseitigen überwiegt [54, 164, 171].

II. Bildgebung:

Die bildgebenden Verfahren spielen eine zentrale Rolle bei der Diagnosefindung, der Stadieneinteilung sowie für die Behandlung und Nachkontrolle der Patienten. Primär erfolgt die Sonographie, hierbei präsentiert sich das Hepatoblastom in der Regel als eine echoreiche, solide intrahepatische Masse. Mit der Duplex-Sonographie kann auch die Topographie zu den großen Gefäßen wie auch ein auffälliger Gefäßeinbruch beurteilt werden. Um die segmentale Ausdehnung, die topographische Beziehung zu Gefäßen und damit die Operabilität eines Hepatoblastoms exakt klären zu können, ist entweder eine Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) des Oberbauchs notwendig [79]. Bei Verdacht auf ein Hepatoblastom sollte zusätzlich eine CT der Lunge gemacht werden, um Lungenmetastasen auszuschließen. Des Weiteren kann im Einzelfall eine Skelettszintigraphie zum Ausschluss von Knochenmetastasen sinnvoll sein. Eine weitere Möglichkeit ist die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit F18-Fluoro-Deoxy-Glucose (FDG), die im Rahmen der diagnostischen Bildgebung von Hepatoblastomen beschrieben wurde [120].

III. Labor:

Neben den bildgebenden Verfahren sollte die Diagnostik auch ein Blutbild und die Bestimmung von Leberenzymen, sowie Bilirubin, LDH und Ferritin enthalten. Ein regelmäßiger Befund bei Hepatoblastompatienten ist die Thrombozytose [41]. Die Hepatoblastomzellen besitzen die Fähigkeit IL-1 β zu sezernieren, was zur Induktion der IL-6 Synthese in den umgebenden Fibroblasten und Endothelzellen führt [163]. In einer Studie wurde ein IL6-abhängiger Anstieg von Thrombopoetin (TPO) beobachtet. Gleichfalls erhöhte sich die Thrombozytenanzahl [70, 163]. Dies scheint die erhöhten TPO-Spiegel

und die damit verbundene Thrombozytose bei HB-Patienten erklären zu können [41, 104].

IV. Alpha-Fetoprotein:

Das von den HB-Zellen produzierte Serum-alpha-Fetoprotein (AFP), welches etwa in 90% der Tumoren erhöht ist, dient als Tumormarker und zur Verlaufsbeobachtung nach chirurgischer und medikamentöser Therapie [164]. Dieses fetale Protein wird im Dottersack, in der fetalen Leber und im Verdauungstrakt gebildet. AFP ist sehr sensitiv, allerdings nicht spezifisch für Hepatoblastome. Es ist auch während der Schwangerschaft, bei Säuglingen und bei anderen Leber- und Tumorerkrankungen, (z.B. Keimzelltumoren) erhöht [97].

Bei den epithelialen HB variieren die Serum-AFP-Werte in der Regel je nach histologischer Zusammensetzung. Es ist wichtig, zusätzlich die Normalwerte der jeweiligen Altersstufe zu beachten. Bei Frühgeburtlichkeit ist der Spiegel bei der Geburt höher, als bei normalem Geburtsalter [136]. Im Zusammenhang mit dem Alter des Patienten und der Bildgebung mit Sonographie, CT und/oder MRT lässt sich die Verdachtsdiagnose durch den Tumormarker weiter erhärten. AFP kann im weiteren Verlauf auch als indirekter Anzeiger der Therapiewirksamkeit herangezogen werden. Bei Entfernung eines Hepatoblastoms ist eine Normalisierung der AFP-Werte zu erwarten, auch unter Chemotherapie fallen die AFP-Werte als Zeichen des Rückgangs der Tumorzellvitalität ab. Bei 20% der Kinder mit Hepatoblastomen ist neben dem alpha-Fetoprotein auch der Wert des beta-humanen Choriongonadotropin (β -HCG) erhöht [164].

V. Biopsie:

Die Tumor-Biopsie spielt im Bereich der GPOH nur eine untergeordnete Rolle, da in der Regel durch klinische Präsentation, laborchemische Konstellation und Radiologische Diagnostik die Diagnose zuverlässig gestellt werden kann.

Iyer et al. kamen zwar zum Ergebnis, dass epitheliale Hepatoblastome mittels einer Nadelbiopsie leicht zu diagnostizieren und zu klassifizieren sind [65]. Im HB99-Studien-Protokoll wird jedoch beschrieben, dass Nadelbiopsien sich

häufig als insuffizient erwiesen haben. Deshalb wird bei Patienten, bei denen die Hepatoblastomdiagnostik nicht eindeutig ist, die Entnahme einer offenen Keilbiopsie über eine Laparotomie/Laparoskopie vorgezogen [56].

1.1.6 Therapie

Das Hauptziel in der Therapie des HB ist die komplette Resektion des Tumors. Viele Studien (z.B. HB99 der GPOH, SIOPEL 1 der SIOP) zeigen, dass Hepatoblastome in der Regel initial gut auf Zytostatika ansprechen. Allerdings zeigen sie auch, dass eine Heilung der Hepatoblastome durch die alleinige Gabe von Chemotherapeutika nicht zu erreichen ist [48].

I.Chemotherapie:

In Studien wie HB99 und SIOPEL werden Hepatoblastome durch eine neoadjuvante Chemotherapie vorbehandelt. Es ist wiederholt gezeigt worden, dass hierdurch das Hepatoblastom in seiner Größe reduziert wird, weniger zur Streuung neigt und besser vom gesunden Lebergewebe abzugrenzen ist. Durch diese Strategie ist es möglich, einen initial inoperablen Tumor doch noch operativ zu entfernen und damit die Heilungschancen zu erhöhen. Auch der Erfolg einer vollständigen Resektion wird erheblich verbessert. Gleichzeitig wird auch die Regression von (Mikro-) Metastasen beobachtet [115].

Die Effektivität der Chemotherapie wird durch die Kombination von verschiedenen Zytostatika gesteigert. Die hierbei am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika sind Cisplatin und Doxorubicin, kombiniert mit Ifosfamid, Carboplatin, Etoposid oder 5-Fluorouracil und Vincristin [46, 52, 109, 110, 169]. Allerdings zeigte eine Studie von Perilongo et al, dass die Kombination von Cisplatin von Doxorubicin die selben Ergebnisse erzielt wie eine Monotherapie mit Cisplatin [117].

Des Weiteren haben Hepatoblastome bei prolongierter Anwendung der Chemotherapeutika häufig die Eigenschaft Resistenzmechanismen zu entwickeln. Die „Multi-Drug-Resistance“ ist eines der Hauptprobleme bei der Therapie des fortgeschrittenen Hepatoblastoms. Die HB-Zellen zeigen z.B. unter medikamentöser Therapie eine gesteigerte Expression des Multidrug-

Resistance-1-Gens (MDR-1-Gens). Daraus resultiert, in Abhängigkeit von der applizierten Chemotherapie, ein Anstieg des Genprodukts, dem P-Glykoprotein (P-gp). Das P-gp ist ein ATP-abhängiges Tunnelprotein der Membran, es transportiert Medikamente aus der Zelle. Unter experimentellen Bedingungen zeigt die Inhibition des P-gp eine signifikante Verbesserung der Chemotherapiewirkung beim Hepatoblastom [174].

II. Chirurgische Therapie:

Das Ziel der chirurgischen Therapie ist die komplette Resektion des Hepatoblastoms. Der rechte Leberlappen entspricht 70% der Leberzellmasse. Der linke Leberlappen ist durch das Ligamentum falciforme in einen medialen und lateralen Teil eingeteilt, jedes Segment entspricht 15%. Da die Leber die Fähigkeit besitzt sich zu regenerieren, können bei Kindern bis 85% der Leber reseziert werden. 1 – 3 Monate nach der Operation hat sich die Leber wieder regeneriert [28, 152].

Bei der operativen Therapie von HB erwiesen sich anatomische Resektionsverfahren hinsichtlich des Auftretens von Lokalrezidiven gegenüber atypischen als überlegen. Gegebenenfalls ist eine erweiterte Hepatektomie notwendig [48]. Für die Resektion von großen kindlichen Lebertumoren in kritischer Lokalisation wird die Resektion unter Kreislaufstillstand und tiefer Hypothermie an der Herz-Lungen-Maschine durchgeführt [106].

III. Lebertransplantation:

Im Falle eines unresektablen Tumors, auch nach neoadjuvanter Chemotherapie, kommt zusätzlich die Möglichkeit einer Lebertransplantation in Betracht. Die Indikation erfolgt in der Regel nach den Kriterien der PRETEXT-Stadieneinteilung der SIOPEL-Studien. Sie zeigt, dass vor allem beim Vorliegen von multifokalen, aber auch solitären Hepatoblastomen, welche alle vier Lebersektoren infiltrieren, als auch bei zentral lokalisierten Tumoren nahe der Hauptvenen, die Lebertransplantation Therapie der Wahl ist [149]. Die primäre Lebertransplantation erreicht für HB langfristige rezidivfreie Überlebensraten in der Größenordnung von 80% [111]. Dies zeigt auch den eindeutigen

prognostischen Zusammenhang zwischen vollständiger Resektion und dem Überleben der Patienten [143].

IV. Andere Therapieoptionen:

Aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen von Zytostatika, sowie der Ausbildung von Resistenzmechanismen nach prolongierter Chemotherapie, wird ständig nach alternativen Therapiestrategien gesucht. Die Radiotherapie spielt in der Behandlung des Hepatoblastoms wegen der fehlenden Radiosensibilität eine untergeordnete Rolle. Auch in Kombination mit einer Chemotherapie erzielt die Radiotherapie keine Heilung [41]. Zusätzlich mindert die Radiotherapie die Regenerationsfähigkeit der Leber nach Resektion.

Weitere Therapieansätze wie z.B. die Transarterielle Chemoembolisation (TACE), MDR-Inhibitoren und Tumorangiogenese – Suppressoren werden derzeit untersucht [90, 93, 174]. Auch die Analyse von Expressionen und Pathways werden derzeit präklinisch evaluiert, wie beispielsweise die Hedgehog Pathways [9, 38].

1.1.7 Prognose

In den letzten zwei Jahrzehnten konnten die Behandlungserfolge vor allem durch multizentrische Studien und die Kombination von Chemotherapie und chirurgischer Therapie deutlich verbessert werden. In der Lebertumorstudie HB89 der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie wurden zunächst bei allen Patienten die Tumoren reseziert, ausgenommen Säuglinge und Patienten mit bereits sehr stark erhöhten AFP-Werten. Anschließend erhielten die Patienten eine Chemotherapie, um entweder einem Rezidiv vorzubeugen oder die Zellvitalität zu verringern. In der nachfolgenden Lebertumorstudie HB94 der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie kamen andere Chemotherapeutika zum Einsatz. Hierdurch verbesserte sich die Prognose für die tumorfreie Überlebensrate in den Stadien II, III und IV [48, 165].

Stadium	HB 89	HB 94
I	100%	96%
II	50%	100%
III	71%	76%
IV	29%	36%

Tabelle 3: tumorfreie Überlebensrate in Prozent bei HB 89 und HB94 in Abhängigkeit vom Stadium (modifiziert nach von Schweinitz 1995, Fuchs 2002)

Aktuell werden Kinder in Deutschland mit HB und Hepatozellulärem Karzinom nach dem Protokoll der Lebertumorstudie HB99 der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie behandelt. Diese Studie hat zum Ziel, das Gesamtüberleben von Kindern im Stadium III und IV zu verbessern. Hierbei stellt derzeit die Lebertransplantation als Therapieoption einen der wichtigsten Beiträge zur Verbesserung der Ergebnisse des fortgeschrittenen Hepatoblastoms dar. In der Lebertumorstudie HB94 betrug die tumorfreie Überlebensrate nur 36% im Stadium IV, während sie durch primäre Lebertransplantation auf 80-90% gesteigert werden konnte [46, 47, 48, 165].

Insgesamt sind das Wachstumsmuster des Tumors, die Gefäßinvasion, der Lymphknotenbefall und das Vorhandensein von Fernmetastasen für die Prognose von Bedeutung. Als weiterer Prognosefaktor dient auch das AFP. Der AFP- Serumwert zeigt zwar keine statistische Korrelation zum eigentlichen Outcome, jedoch ist auffällig, dass Patienten mit niedrigem (<100 ng/ml) und sehr hohem AFP-Werten (>1 000 000 ng/ml) eine schlechtere Prognose haben als Patienten mit intermediären Werten [63, 167].

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Prognose hauptsächlich von der Möglichkeit und dem Erfolg der Tumorresektion abhängig ist. Die Chemotherapie dient hierbei dazu den Tumor resektabel zu machen und Rezidive zu verhindern [166]. Es ist notwendig die Therapieschemata zu verbessern und neue Therapieoptionen zu finden um die Prognose für die Patienten in Zukunft zu verbessern.

1.2 Das Hepatozelluläre Karzinom

Die Unterschiede zwischen kindlichen und adulten Hepatozellulären Karzinomen (HCC) sind noch immer ungeklärt. Das HCC tritt im Kindesalter eher selten auf. Bei Kindern aus den westlichen Ländern, beträgt der Anteil des HCC an primären malignen Lebertumoren gerade mal 1/7 [56]. In Asien, Südamerika und Afrika ist das Vorkommen des HCC um einiges häufiger, was darauf zurückzuführen ist, dass dort die Hepatitis B endemisch ist [101]. Das HCC entwickelt sich für gewöhnlich nicht bei Kindern unter 6 Jahren, die meisten Kinder sind bei Diagnosestellung im Schulkind- oder Jugendlichen Alter. Wie auch beim Hepatoblastom sind hier Jungen häufiger als Mädchen betroffen [148].

Das Hepatozelluläre Karzinom ist häufig mit vorbestehenden Lebererkrankungen assoziiert [76, 80, 162]. Es kann mit sekundärer Leberfibrose oder Leberzirrhose, in Folge von verschiedenen Primärerkrankungen wie virale Hepatitis B und C, extrahepatisch biliäre Atresie oder Chemotherapie induzierter Fibrose auftreten [179]. Bei Kindern jedoch ist das Auftreten des HCC in der Regel isoliert und nicht mit einer Hepatitis oder Zirrhose kombiniert, daher wird hier eine andere Biologie vermutet. Als weitere Risikofaktoren gelten erhöhte Aflatoxin-B1-Exposition, die Hämochromatose sowie ein Alpha-1-Antitrypsinmangel [35].

Klinisch fällt das Hepatozelluläre Karzinom oft erst im fortgeschrittenen Stadium durch eine im rechten oberen Quadranten befindliche abdominelle Schwellung auf. Tumorassoziierte Symptome zeigen sich meist in Form von Gewichtsverlust, Leistungsabfall, Ikterus, Aszites, Oberbauchschmerzen und Splenomegalie. Etwa die Hälfte der Kinder haben ein mäßiggradig erhöhtes AFP [103].

Die histologischen Kriterien für die Diagnosestellung eines HCC basieren auf zytologischen und die Zellarchitektur betreffenden Veränderungen. Gut differenzierte HCC-Zellen ähneln in ihrem strukturellen Aussehen den normalen Hepatozyten. Während des Prozesses der Entdifferenzierung findet in

zunehmendem Maße eine Desorganisation der intrazellulären Organellen statt [35].

Die Überlebensrate bei pädiatrischen HCC-Patienten liegt unter 30% [29]. Eine günstigere Prognose hat das fibrolamelläre Karzinom, ein Subtyp des HCC. Typischerweise tritt es bei älteren Kindern, die keine zirrhotische Leber haben, auf. Das fibrolamelläre Karzinom hat ein charakteristisches histologisches Bild mit reichlich Zytoplasma und fibrösem Stroma [177].

Die vollständige Tumorsektion erweist sich als die einzig mögliche kurative Therapie und stellt damit auch den wichtigsten prognostischen Faktor dar. Da sich das HCC bei Diagnosestellung oft bilobar oder multifokal präsentiert und sich bei mehr als der Hälfte der Patienten bereits eine extrahepatische Ausbreitung und/oder Fernmetastasen zeigen, ist diese notwendige Resektion oft nicht möglich. Das HCC ist auch gegenüber Chemotherapeutika resistenter als das Hepatoblastom [108, 124]. Auch die Radiotherapie zeigt keinen eindeutigen Benefit in der Therapie des kindlichen HCC [51]. Neue Studien bei Kindern mit HCC sind notwendig, um die Prognose zu verbessern und die weitere Erforschung der Unterschiede zwischen adulten und pädiatrischen HCCs zu ermöglichen.

1.3 Photodynamische Therapie

Die photodynamische Therapie (PDT) blickt auf eine lange Geschichte zurück. Die historischen Anfänge dieser Methode werden schon in der Antike erwähnt. PDT ähnliche Verfahren wurden 3000 v. Chr. in Ägypten und Indien angewandt [102].

Der Begriff „photodynamische Therapie“ wurde im Jahre 1900 von Oscar Raab eingeführt. Er stellte fest, dass eine Wechselwirkung von Acridin mit sichtbarem Licht zu cytotoxischen Reaktionen führt, wie z.B. der Abtötung des Pantoffeltierchens *Paramecium caudatum* [127].

Hermann von Tappeiner entdeckte die Sauerstoffabhängigkeit dieser Reaktion und definierte den Begriff der „photodynamischen Reaktion“. Er wendete 1903 als erster die PDT in einer onkologischen Behandlung an, in dem er einen nicht näher beschriebenen Hautkrebs mit Eosin inkubierte und anschließend mit Sonnen- oder Tageslicht bestrahlte [151].

1.3.1 Prinzip der PDT

Die PDT wird zurzeit in unterschiedlichen medizinischen Bereichen zur palliativen und kurativen Tumorthherapie eingesetzt. Bei der Methode wird ein Medikament, ein sog. Photosensibilisator (PS), verabreicht. Dieser wird selektiv in den gewünschten Zielbereich aufgenommen und durch Licht im geeigneten Wellenlängenbereich aktiviert. Die PDT hat den Vorteil, dass die Spezifität höher ist als bei einer üblichen Chemotherapie. Dies beruht auf zwei Eigenschaften: zum einen reichern sich der PS bevorzugt im Tumorgewebe an, zum anderen kann die Bestrahlung gezielt auf die zu behandelnden Regionen gerichtet werden [114].

1.3.2 Wirkmechanismus

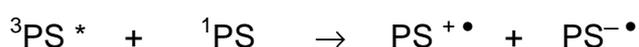
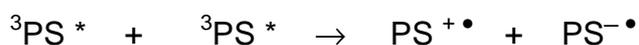
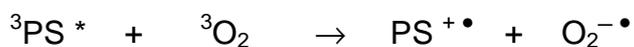
Zu Beginn befindet sich der PS im sogenannten Singulett State (1PS). In diesem niedrigen Energieniveau hat der Photosensibilisator zwei Elektronen mit

entgegengesetzten Spins. Durch die Absorption eines Photons wird eines der Elektronen in ein höheres Energieniveau angehoben, behält dabei aber seine Spinrichtung bei. Der Photosensibilisator im angeregten Singulett State (1PS*) ist sehr kurzlebig (Nanosekunden) und kann seine Energie sowohl durch Fluoreszenz, als auch durch strahlungslose Deaktivierung unter Wärmeentwicklung verlieren. Im angeregten Singulett State kann der Photosensibilisator einen weiteren Prozess, bekannt als Intersystem Crossing durchlaufen. Hierbei wird der Spin des Elektrons umgekehrt, so dass diese Spins parallel verlaufen. Der Photosensibilisator befindet sich nun im langlebigeren Triplet State (3PS*) [23, 150].

Der im Triplet State befindliche Photosensibilisator kann zwei unterschiedliche chemische Reaktionen durchlaufen, die in Typ-1 und Typ-2 Mechanismen eingeteilt werden. Die beiden Reaktionen können auch simultan ablaufen. Der Anteil des jeweiligen Prozesses ist abhängig vom verwendeten Photosensibilisator selbst, seiner Konzentration und der Menge des vorhandenen Sauerstoffs [23].

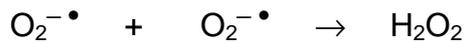
I. Photochemische Reaktionen Typ-1:

Beim Typ-1-Mechanismus reagiert der im Triplet State befindliche PS direkt mit dem Substrat, wie beispielsweise der Zellmembran oder einem Molekül und formt entsprechend durch Protonen oder Elektronentransfer Anionenradikale ($X-\bullet$) und Kationenradikale ($X+\bullet$), die dann durch die Reaktion mit Sauerstoff Sauerstoffradikalanionen bilden ($O_2-\bullet$) [19, 23].



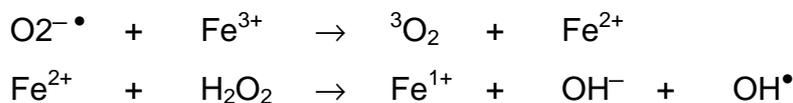
Die Typ-1 Reaktion beinhaltet die initiale Produktion von Superoxidanionen, diese sind nicht besonders reaktiv in biologischen Systemen und lösen kaum einen oxidativen Schaden aus. Aber sie können durch enzymatische Katalyse mit Superoxiddismutase (SOD) Hydrogenperoxid (H_2O_2) bilden [23].

SOD



Eine Möglichkeit ist hierbei die Fenton-Reaktion, bei der Metallionen wie Eisen (Fe^{3+}) als Katalysator fungieren. Das Superoxidanion wirkt in diesem Fall reduzierend auf Eisen. Anschließend wird Hydrogenperoxid in ein Hydroxylradikal (OH^\bullet) und ein Hydroxydion (OH^-) aufgespalten.

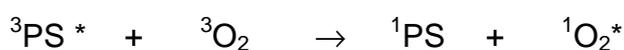
Fenton Reaktion



Genauso wie Hydrogenperoxid passiert das Hydroxylradikal relativ leicht die Zellmembran. Die Folgereaktion durch Hydroxylradikale ist diffusionslimitiert. Das Radikal kann dann mit vielen organischen Substraten reagieren, wie zum Beispiel der Hydroxylierung von Fettsäuren. Das entstehende Substrat kann wieder selbst ein Radikal sein und weiter mit anderen Molekülen reagieren. So entsteht eine Kettenreaktion. Dies demonstriert sehr gut, warum Radikale wie das Hydroxylradikal so viel mehr Schaden anrichten können als man eigentlich erwartet [23].

II. Photochemische Reaktionen Typ-2:

Bei der Reaktion Typ 2 dagegen, kann der Triplet Photosensibilisator seine Energie direkt auf Sauerstoffmoleküle im triplet Grundzustand (${}^3\text{O}_2$) übertragen. Bei diesem Prozess wird Sauerstoff in einen angeregten, energetisch höheren Zustand angehoben und es entsteht der sogenannte Singulett-Sauerstoff (${}^1\text{O}_2^*$) [23]. Beim Übergang des Sauerstoffs zurück in den Triplet Grundzustand wird der größte Teil der freiwerdenden Energie in Form der charakteristischen Rotfluoreszenz abgegeben [44, 126].



Alle photophysikalischen Mechanismen sind graphisch in Abb.3 zusammengestellt.

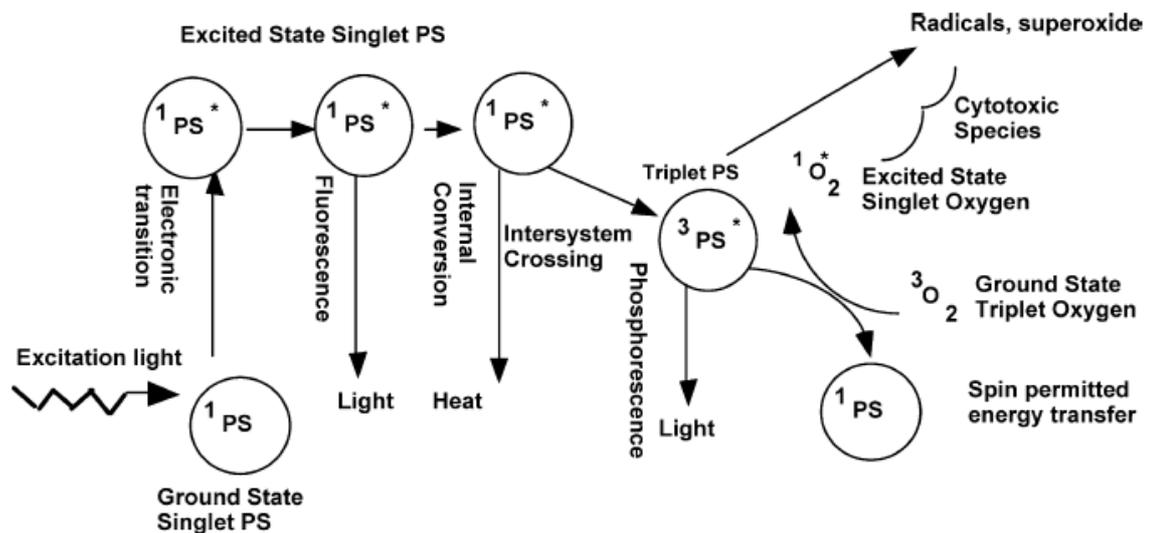


Abbildung 2: Graphische Darstellung der photophysikalischen und photochemischen Prozesse der PDT
 (aus Castano et al. (2004) Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 1:279-293.)

Die bei Typ-1 gebildeten verschiedenartigen ROS (reactive oxygen species) und der in Typ-2 entstandene Singulett-Sauerstoff sind oxidativ wirkende Stoffe, die direkt mit Biomolekülen, wie Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren reagieren. Der Singulett-Sauerstoff und die freien Radikale sind sehr reaktiv, aber auch sehr kurzlebig. Daher sind nur die Areale, in denen der PS lokalisiert ist, direkt von der PDT betroffen. Die Halbwertszeit von Singulett-Sauerstoff in biologischen Systemen ist $< 40\text{ns}$, daraus resultiert, dass der Radius, in dem er wirkt, etwa in der Größenordnung von 20nm liegt [23, 100].

Obwohl die Zellen für diese Art der oxidativen Schädigung über gewisse Reperaturmechanismen verfügen, kann ein Übermaß an Schädigung zum Zelltod führen. In Abhängigkeit von der Lokalisation des PS in der Zelle, dem

Vorhandensein von Sauerstoff und der Bestrahlungszeit werden Apoptose oder Nekrose induziert [23].

1.3.3 Apoptose und Nekrose

Bei der PDT steht die direkte Tumorzellzerstörung via Apoptose oder Nekrose im Vordergrund. Entscheidende Faktoren die die Art des Zelltods determinieren, sind unter anderem die zelltypspezifischen Eigenschaften, die zelluläre Lokalisation des PS, die Menge des vorhandenen Sauerstoffs und vor allem die Lichtdosis. Allgemein kann man sagen, dass eine geringere Lichtdosis zu mehr Apoptose führt, während bei höheren Dosen proportional mehr Nekrosen auftreten [123].

I. Apoptose:

Im zellbiologischen Sinne bedeutet Apoptose programmierter Zelltod. Die Apoptose ist ein aktiver und damit ein energieaufwendiger Prozess. Der Begriff wurde 1972 eingeführt, um die morphologischen Abbauvorgänge in der Zelle zu beschreiben [73]. Hierzu gehören blasige Veränderungen der Plasmamembran (membrane blebbing) und eine starke Abnahme des Zellvolumens. Dann treten die Zellen in die Phase der Zeiose ein, in der die Auflösung der Kernmembran, sowie die Kondensierung und anschließende Fragmentierung des Chromatins stattfindet. Die geschrumpften apoptotischen Zellen werden entweder direkt phagozytiert oder in kleinere apoptotische Körper aufgebrochen (apoptotic bodies). Die Apoptose-Körperchen werden durch Makrophagen oder Nachbarzellen erkannt, phagozytiert und abgebaut, bevor ihre Membran lysiert. Dadurch kommt es zu keiner Entzündungsreaktion [86, 139, 181].

Diese Art des Zelltods ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase [7, 14]. Im Gegensatz dazu kann die Dysregulation der Apoptose zu Erkrankungen führen. Eine verminderte Apoptoseaktivität kann zu unkontrollierter Zellproliferation und damit zu malignen Erkrankungen führen [14]. Zahlreiche Behandlungsstrategien sind bereits entwickelt worden, welche über die Beeinflussung der Apoptose wirken, hierzu zählt auch die Photodynamische Therapie.

II. Nekrose:

Im Gegensatz zur Apoptose ist die Nekrose eine Form des Zelltods die in Folge einer Zellschädigung auftritt, wie zum Beispiel durch Toxine und Strahlung. Die Nekrose ist ein passiver Prozess und damit ATP-unabhängig. Es kommt zu einer starken Schwellung des Zellkörpers, die Organellen werden geschädigt und das Chromatin verklumpt. Im Gegensatz zur Apoptose, bei der die Plasmamembran bis zur Phagozytose erhalten bleibt, resultiert der nekrotische Zelltod in einem Zerfall der Zelle mit Zerreißen der Plasmamembran. Dadurch kommt es zur Entleerung des Zellinhaltes und zur Freisetzung intrazellulärer Proteine. Dies wiederum führt zu einer begleitenden Entzündungsreaktion, die angrenzendes Gewebe gefährdet und den Organismus belastet [81, 182].

1.3.4 Photosensibilisatoren in der Onkologie

Heute werden verschiedene PS mit unterschiedlichen chemischen Strukturen verwendet, wie z.B. Porphyrine, Phthalocyanine und polyzyklische Quinone, zu denen unter anderem das Hypericin zählt.

Der erste Photosensibilisator hieß Porfimer Sodium, auch unter dem Handelsnamen Photofrin[®] bekannt. Basierend auf einer komplexen Mischung von Hämatoporphyrinderivaten gehört er zur Familie der Porphyrine [1, 145]. Er wird bereits bei den unterschiedlichsten Tumorarten, wie dem Endobronchialkarzinom, Magenkarzinom, Barrett-Ösophagus und malignen Tumoren der Blase als Therapieoption eingesetzt [19]. Die Entwicklung von Photofrin[®] war ein Durchbruch in der PDT-Forschung. Dieser Photosensibilisator hat aktuell die meisten Zulassungen für den klinischen Gebrauch. Ein weiterer zur Porphyrinfamilie gehörender Photosensibilisator ist das Vertiporfin, besser bekannt unter dem Handelsnamen Visudyne[®]. Es ist ein Benzoporphyrinderivat und wurde zur Therapie von Maculadegenerationen entwickelt [18, 95]. Temoporfin (Foscan[®]) gehört zur Klasse der Chlorine und wird zur palliativen Behandlung von Kopf und Cervixkarzinomen eingesetzt [34]. Die Photodynamische Therapie mit 5-Aminolevulin-acid (5-ALA, Metvix[®]), wird vor allem zur topischen und systemischen Anwendung bei verschiedenen Hautkrankheiten wie den aktinischen Keratosen und dem Basal-Zell-Karzinom

angewandt [34]. 5-ALA wird allerdings nicht nur in der photodynamischen Therapie eingesetzt, sondern liefert auch vielversprechende Ergebnisse in der Detektion von malignen Neoplasien. Der Einsatz von 5-ALA zeigte bereits Erfolge bei der Erkennung von malignen Tumoren der Blase [87]. Auch in der Brustkrebstdiagnostik wurde in einer Studie nach oraler 5-ALA-Gabe eine selektive Anreicherung im Tumorgewebe nachgewiesen [85]. Ebenso wird ein Nutzen durch 5-ALA nach oraler Applikation zur endoskopischen Detektion ösophagealer Veränderungen dokumentiert [92].

Meta-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC), ein Photosensibilisierer der 2. Generation, hat vielversprechende Ergebnisse bei der Fluoreszenz-gestützten Resektion maligner Hirntumoren gezeigt [185].

Noch in der experimentellen Erforschung ist die Behandlung von Lebertumoren. Der Photosensibilisator Pheophorbid wurde beispielsweise bei der Behandlung des HCC eingesetzt [89]. Aufgrund dieser Erfahrungen ist die Möglichkeit der PDT auch für die Behandlung von kindlichen Lebertumoren von potentiell Interesse. Als geeigneter, effizienter Photosensibilisator hat in diesem Zusammenhang Hypericin an Bedeutung gewonnen [3, 4].

1.4 Hypericin

1.4.1 Herkunft

Hypericin ist ein pflanzlicher Farbstoff, der aus der Blüte von *Hypericum perforatum* (Johanniskraut) gewonnen wird (Abb.4). Das Johanniskraut ist eine vielfältig genutzte Arzneipflanze, die bereits von den Völkern der Antike verwendet wurde [31]. Der botanische Name *Hypericum* leitet sich vom griechischen „hyper“ (auf, über) und „ereikon“ (Heide) ab. Die Blätter erscheinen durch kugelige Sekretbehälter durchscheinend punktiert, worauf der Artnamen „perforatum“ zurückzuführen ist [134]. In der gesamten Pflanze liegt der Anteil von Hypericin zwischen 0,03-0,3 % [42].



Abbildung 3: Blüte des Johanneskrauts
(aus Kamuhabwa et al. (2004) Hypericin as a potential phototherapeutic agent in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Photochem and Photobiol Sci.* 3:772-780.)

1.4.2 Photochemische und photophysikalische Eigenschaften

Hypericin gehört zu den Phenanthroperylenequinonen, auch Naphthodianthrone genannt. Es ist eine wasserunlösliche Verbindung, die nativ wahrscheinlich als Glucosid vorkommt und deren Kaliumsalze löslich sind [42].

Brockmann et al klärten 1942 erstmals die Struktur auf. Die korrekte chemische Bezeichnung lautet 7,14-dione-1, 3, 4, 6, 8, 13-hexahydroxy 10, 11-dimethylphenanthrolperylenen [16, 75].

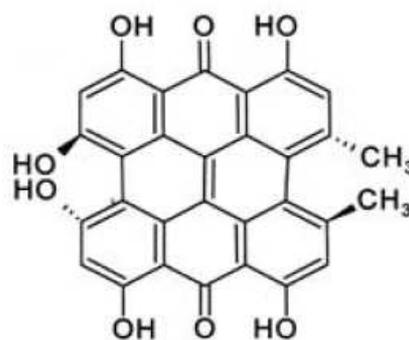


Abbildung 4: Strukturformel des Hypericin
(aus Miskovsky P. (2002) Hypericin - a new antiviral and antitumor photosensitizer: Mechanism of action and interaction with biological macromolecules. *Current drug Targets.* 3:55-84.)

Das Absorptionsspektrum von Hypericin zeigt Banden im UV (330 nm) und im sichtbaren Bereich (550 nm und 588 nm). Hypericin ist recht photostabil und erzeugt nach Bestrahlung Singulett-Sauerstoff mit großer Quantenausbeute (>0.7) [140, 187]. Diese Eigenschaften machen Hypericin zu einer vielversprechenden Substanz für den Einsatz in der photodynamischen Therapie maligner Erkrankungen [61, 67, 68]. Zugrundeliegend für den onkolytischen Effekt des Hypericins sind die photochemischen Reaktionen Typ-1 und 2 der PDT. Zu welchem Umfang jeder der zwei Typen zum zytotoxischen Effekt beiträgt ist noch nicht vollständig geklärt [3]. Bewiesen ist allerdings, dass die photodynamische Aktivität von Hypericin sauerstoffabhängig ist [32].

1.4.3 Anwendungsgebiete

Seit Jahrhunderten wird *Hypericum perforatum* bevorzugt zur Behandlung von leichten Depressionen angewendet. Über einen längeren Zeitraum gegeben, soll es eine Stimmungsaufhellung und Stimmungsstabilisierung, sowie eine Antriebssteigerung bewirken [15, 180].

In der wissenschaftlichen Forschung rücken die viruciden und antineoplastischen Wirkungen von Hypericin und Pseudohypericin in den Vordergrund des Interesses [128]. Durch in vitro und in vivo Versuche zeigte sich, dass die Infektiosität von Retroviren (einschließlich HIV) durch Hypericin gehemmt wird. Unter Zellkulturbedingungen konnten nicht infizierte T-Zellen durch Applikation von Hypericin vor einer Infektion mit dem HI-Virus geschützt werden. Zurzeit wird in klinischen Studien getestet, ob durch die Behandlung mit Hypericin eine Ausbreitung der Infektion in vivo verhindert werden kann. Bis jetzt aber konnte der Mechanismus, der der viruciden Wirkung zu Grunde liegt, nicht eindeutig geklärt werden [21, 94].

Die antineoplastischen Eigenschaften von Hypericin sind auf dessen potente photoaktive Wirkung zurückzuführen, die Apoptose bzw. Nekrose in den Zellen auslöst [27]. Die spezifische Anreicherung von Hypericin in Tumorzellen wurde in vitro bereits an etlichen Tumorzelllinien und auch in vivo bei einer Vielzahl von unterschiedlichen Tumoren gezeigt [13]. Des Weiteren wurde der Vorteil von Hypericin in der Kombination mit andern Therapiemöglichkeiten, wie der

Strahlentherapie, untersucht. So wurde in-vitro gezeigt, dass Hypericin nach Exposition mit ionisierenden Strahlen die Radiosensibilität humaner Glioblastom-Zellen erhöht [184]. Die antineoplastische Wirkung durch photoaktiviertes Hypericin bei kindlichen Lebertumoren ist noch unerforscht.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die epithelialen Lebertumoren, zu denen auch das HB und das HCC gehören, stellen über 90% aller kindlichen hepatischen Malignome dar. Den wichtigsten prognostischen Faktor für das Überleben der Patienten, stellt die vollständige chirurgische Resektion des Tumors dar. Für die Therapie von multifokalen Tumoren und Rezidiven bestehen daher noch ungelöste Probleme. Oftmals sind bei solchen Tumoren Resektionen notwendig mit marginalen oder fraglich tumorfreien Resektionsrändern.

Ein neuer Ansatz könnte hier die Photodynamische Therapie mit dem Photosensibilisator Hypericin darstellen. Es wurde bereits in mehreren Studien bei den verschiedensten Tumorarten erfolgreich als Therapieoption eingesetzt.

Die Möglichkeit der photodynamischen Therapie für die Behandlung von kindlichen Lebertumoren ist jedoch weitestgehend unerforscht.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist daher die Untersuchung der in vitro Effekte von photoaktiviertem Hypericin bei Hepatoblastomzellen, sowie Zellen des Hepatozellulären Karzinoms. Die Studie befasst sich hierbei mit zwei Hauptfragen:

1. In wie weit wird Hypericin von den Zelllinien aufgenommen und ist damit zur Tumorvisualisierung geeignet?
2. Welches Potential besitzt Hypericin zur in-vitro Photodynamischen Therapie bei Hepatoblastomzelllinien und Zellen des Hepatozellulären Karzinoms?

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Für die Experimente wurden die Hepatoblastomzelllinien HepT1 [121] und HUH6 [33], sowie eine Zelllinie des Hepatozellulären Karzinoms, HepG2 [2] verwendet.

1.HepT1:

Bei der Zelllinie HepT1 handelt es sich um ein Hepatoblastom vom embryonalen Typ. Die Linie entstammt dem Lebertumor eines 34 Monate alten Mädchens. Morphologisch findet sich bei dieser Zelllinie ein granulär-eosinophiles Zytoplasma mit pleomorphen Kernen. Die Kerne enthalten zwei bis drei Nukleoli mit irregulär kondensiertem Chromatin. Desweiteren zeigen die Zellen eine Überexpression von Cytokeratin 18 und 19, von Vimentin , α -Fetoprotein, Erythropoetin und dem Stammzellfaktor SCF. Es lassen sich Mitosen und extramedulläre Hämatopoese nachweisen. Der Karyotyp ist poliploid mit 65-125 Chromosomen pro Zelle, verbunden mit einer 1p- sowie 11q-Deletion und einer 6q15-Translokation. Diese Zelllinie HepT1 wurde im Jahre 1996 von Pietsch et al. charakterisiert und publiziert [121].

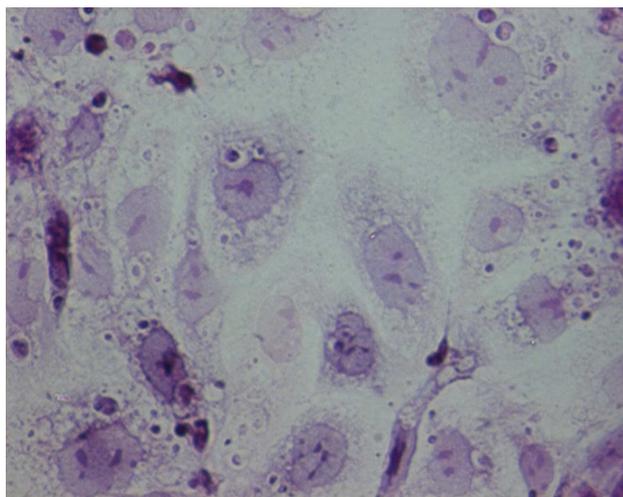


Abbildung 5: HepT1-Zellen (HE, 40x)

II.HUH6:

Die Zelllinie HUH6 wurde 1976 von Doi etabliert. Das Gewebe, aus dem die Zellen entnommen wurden, entstammt dem rechten Leberlappen eines einjährigen Jungen. Bei der Zelllinie handelt es sich um ein gemischtes Hepatoblastom mit Anteilen an Epithelzellen, Fibroblasten, sowie fokal chondroosteogenetischem Gewebe. Auch hier läßt sich eine extramedulläre Hämatopoese nachweisen. Elektronmikroskopisch findet man zahlreiche Desmosomen und Tonofibrillen, sowie glykogenhaltige Granula im Zytoplasma vor. Im Vergleich zum kondensierten Chromatin ist der Nukleolus dieser Zelllinie verhältnismäßig groß, dies weist auf unterschiedlich große Zellkerne hin. Die Zellen zeigen eine Expression von AFP und besitzen eine Kern-Plasma-Relation von etwa 1:2. Der Karyotyp ist normoploid [33].

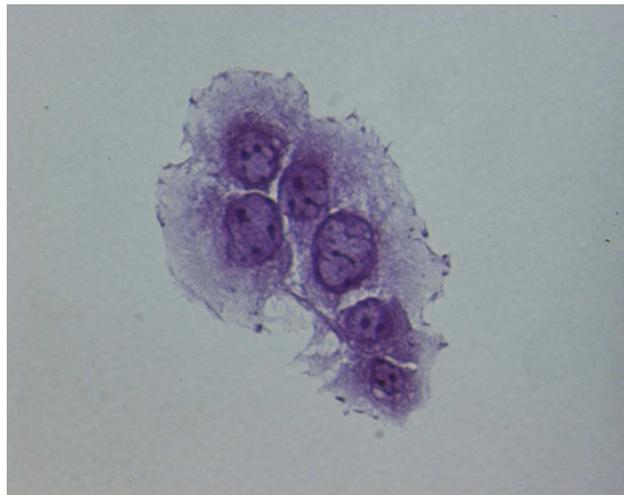


Abbildung 6: HUH6-Zellen (HE, 40x)

III. HepG2:

Die Zelllinie HepG2 leitet sich von dem Hepatozellulären Karzinom eines männlichen, 15-jährigen Patienten ab. Sie wurde 1975 von Aden et al. etabliert. Histologisch handelt es sich hierbei um ein gut differenziertes hepatozelluläres Karzinom vom trabekulären Typ. Morphologisch ähneln sie den Leber-Parenchymzellen. Die HepG2-Zellen exprimieren α -Fetoprotein und Albumin.

Desweiteren exprimieren sie das Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen HBsAg. Bei der Zelllinie HepG2 finden sich 15 weitere humane Plasmaproteine, wie beispielsweise Transferrin, Plasminogen oder Fibrinogen. Die Zellen haben einen polyploiden Karyotyp von 50-56 Chromosomen, wobei es mehrere Isoformen des Chromosoms 1 gibt [2].

Hinsichtlich der Dignität der HepG2-Zelllinie gibt es bereits länger bestehende Kontroversen. Besonders in japanischen Forscherkreisen wurde HepG2 immer wieder als HB-Zelllinie verwendet. Eine in allerjüngster Zeit erschienen Publikation schließt sich dieser Tendenz an [88]. Wiederholte Untersuchungen mehrerer voneinander unabhängiger Arbeitsgruppen - einschließlich der eigenen – wiesen aber entscheidende Eigenschaften von HCC für HepG2 nach [118, 175]. Da somit eine endgültige Klärung derzeit nicht zur Verfügung steht, wird HepG2 in der vorliegenden Arbeit als HCC klassifiziert.

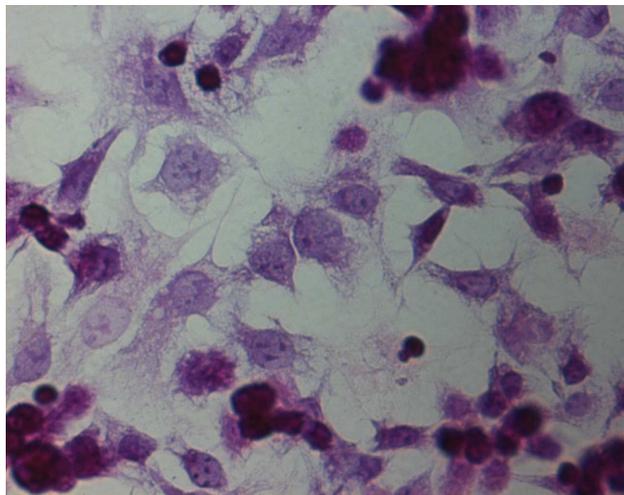


Abbildung 7: HepG2-Zellen (HE, 40x)

2.2 Methoden

2.2.1 Kulturbedingungen

2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die verschiedenen Zelllinien wurden in Standardmedien bei 37°C in einem permanent mit Wasserdampf gesättigten Brutschrank kultiviert, der zusätzlich mit 10% CO₂ angereichert wurde. Als Nährlösung diente DMEM, in das zuvor 10% inaktiviertes fetales Kälberserum (FBS), 1% L-Glutamin und 2,5% HEPES-Puffer supplementiert wurde. Alle Zelllinien wuchsen unter konstanten Bedingungen und wurden regelmäßig negativ auf Mycoplasmen untersucht. Sämtliche untersuchten Zellen waren stets Mycoplasmen negativ.

2.2.1.2 Zellpassage

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die in Kultur gehaltenen Zelllinien 1 - 2mal pro Woche passagiert. Die Passage erfolgte sobald die Zellen nahezu konfluent gewachsen waren, nach folgendem Protokoll:

Nach Entfernung des alten Mediums wurden die Zellen im ersten Schritt mit 1 ml PBS gewaschen, um Mediumreste zu beseitigen. Anschließend wurden durch Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA die Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellablösung wurde unter dem Lichtmikroskop beobachtet und dann durch die Zugabe von FCS gestoppt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges pipettieren mit Hilfe einer 10 ml Pipette vereinzelt und gleichzeitig resuspendiert.

Nach dem Verteilen der Zellsuspension auf neue Kulturschalen (sog. Passagewechsel) wurden die Schalen erneut mit 8 ml frischem Medium aufgefüllt. Durch vorsichtiges Schwenken wurden die Zellen gleichmäßig verteilt. Das Ergebnis wurde nochmals unter dem Lichtmikroskop evaluiert und dann erfolgte die Inkubation im Brutschrank. Für eine Routinepassage wird üblicherweise ein Aliquot der Zellsuspension mit frischem Medium 1:10 bis 1:50 verdünnt.

2.2.1.3 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Zellsuspension wurde dann in eine Kulturflasche mit 10 ml FBS-haltigem DMEM überführt. Nach 3 min Zentrifugieren bei 1300 Umdrehungen/min wurde der Kulturmediumüberstand verworfen und das Zellsediment in 2ml frisches Medium resuspendiert. Danach wurden die Zellen in 8 ml vorbereitetes Medium in eine Petrischale überführt. Die Schale wurde vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Vor der Aufbewahrung im Brutschrank wurde lichtmikroskopisch die Zelldichte und Lebensfähigkeit der Zellen überprüft.

2.2.1.4 Einfrieren von Zellen

Für das Einfrieren besaßen die Zellen eine Konfluenz von etwa 80 %, um genügend und gut lebensfähige Zellen zu erhalten. Zuerst wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und dann mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Die Zellsuspension wurde dann in sterilen Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Medium 3 Minuten lang abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 0,8 ml Einfriermedium (DMSO) resuspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in ein vorgekühltes Kryoröhrchen gegeben. Um ein langsames und schonendes Abkühlen der Zellen zu gewährleisten, wurden die Zellen für mehrere Stunden bei -30°C und dann bei -80°C eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Zunächst wurde das Deckglas leicht befeuchtet, so dass die Newton-Ringe sichtbar waren. 100 µl der Zellsuspension wurden mit 100 µl Trypanblau (0,4%) versehen, anschließend wurden die Kammern mittels Kapillarkräften befüllt. Nun wurden die Zellen im Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung mäanderförmig ausgezählt. Die vitalen Zellen erschienen ungefärbt, die toten

Zellen färben sich blau. Ein Eckquadrat einer Kammer entspricht 10^{-4} cm^3 ($0,1 \mu\text{l}$). Durch die Verdünnung der Zellsuspension mit Trypitanblau ergibt sich die Zellzahl nach folgender Formel: Zellzahl / ml = Durchschnittliche Zellzahl pro Eckquadrat x Verdünnungsfaktor x 10^4 .

2.2.3 Hämalaun-Eosin (HE) Färbung

I. Prinzip:

Die HE-Färbung wird wegen ihrer einfachen und raschen Durchführbarkeit als Übersichtsfärbung eingesetzt. Sie zeigt Zellkerne blau und alles übrige in verschiedenen Rottonabstufungen. Hämalaun ist ein positiv geladener Farbstoff und zeigt die Basophilie einer Struktur an. Die erwünschte selektive Kernfärbung wird durch die Azidität der Lösung und einen Überschuss an Alaun erreicht. Hier konkurrieren Aluminiumionen und andere Kationen mit dem Farbstoff um die Bindung an negativ geladene Valenzen; das saure Milieu vermindert die Dissoziation von Carboxylgruppen im Gewebe.

Eosin ist der gebräuchlichste Farbstoff für eine Cytoplasmafärbung. Bei dem Eosin Y bzw. Eosin G (Y für yellow oder G für gelblich) genannten Farbstoff handelt es sich um Tetrabrom-Fluorescein.

II. Durchführung:

Nach mikroskopischer Evaluation der Zellvitalität wurden die unterschiedlichen Zelllinien nach dem Waschen mit PBS und der Dispersion mit Trypsin/EDTA Lösung auf Culture Slides (8-Well-Platten) ausgesäht. Nach etwa 24-48 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Chambers abgelöst. Anschließend wurde der Objektträger zwei mal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten in 4,5% Formaldehydlösung fixiert. Nach einer erneuten Waschung mit PBS erfolgte die Färbung mit Hämalaun für 5 min, mit anschließendem Spülen unter Leitungswasser zum Bläuen und Fixieren. Nach erfolgtem Farbumschlag wurden die Objektträger noch für 1 min in Eosin inkubiert. Nach erneutem Spülen mit Aqua dest wurde der Objektträger zum Entwässern in Ethanol mit aufsteigenden Konzentrationen von 50%-100% gegeben und hinterher noch 2

mal in Xylol getaucht. Nach dem Einbetten mit DePex wurden die Objektträger im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

III. Mikroskopie:

Die Darstellung der HE-Färbung erfolgte am Mikroskop mit Hilfe der Axio Cam von Zeiss und die Bearbeitung der digital gemachten Fotos erfolgte mit Axiovision-Software Version 3.1. Für alle Bilder wurde die gleiche Belichtung von 151ms und eine 40fache Vergrößerung gewählt. Bei allen Zelllinien wurden die Fotos unter den gleichen Bedingungen hergestellt.

2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

I. Vorbereitung:

Auf den dicht bewachsenen Petrischalen wurden die Zellen der verschiedenen Zelllinien mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA Lösung abgelöst und dann mit Standardmedium auf Chamber Slides ausgesäht. Die Platten wurden anschließend für 24h im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde mit einer sterilen Pasteurpipette das Medium abgesaugt. Die Hypericinlösung wurde in unterschiedlichen Konzentrationen vorbereitet:

<u>Hypericinlösung</u>	<u>+</u>	<u>Kulturmedium</u>	<u>=</u>	<u>Konzentration</u>
10 µl	+	800 µl	=	12,5 µM
8 µl	+	800 µl	=	10,0 µM
6 µl	+	800 µl	=	7,5 µM
4 µl	+	800 µl	=	5,0 µM
2 µl	+	800 µl	=	2,5 µM

Pro Zelllinie wurden jeweils 3 Wells der Culture Slides mit 200 µl des Hypericin-Medium-Gemischs in aufsteigender Konzentration aufgefüllt. Für die Negativ-Kontrolle wurde jeweils ein Well pro Zelllinie nur mit dem Kulturmedium gefüllt. Unter möglichst abgedunkelten Bedingungen wurden nach etwa 24-48 Stunden Inkubation im Brutschrank die Chambers vom Objektträger gelöst, der dann mit PBS gewaschen und anschließend mit 4,5% Formaldehydlösung fixiert wurde.

Zur besseren Kerndarstellung wurden die Zellen mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) gegengefärbt und dann mit Mounting Medium eingedeckt.

II. Fluoreszenzmikroskopie:

Die Mikroskopie erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop von Zeiss. Die Bilder wurden mit Axiovision-Software Version 3.1 hergestellt. Alle Bilder wurden mit der Standard Auflösung von 1300 x 1030 Pixel gemacht. Für die Darstellung der Dapi-Kernfärbung wurde eine Belichtungszeit von 69ms gewählt und der Blau-Filter eingestellt. Es wurden alle Zelllinien mit 20facher und 40facher Vergrößerung dargestellt. Für die Darstellung der Hypericinaufnahme wurde der Rot-Filter verwendet und die Belichtungszeit der jeweiligen Hypericinkonzentration angepasst. Es wurden folgende Belichtungszeiten gewählt:

Hypericinkonzentration	Belichtungszeit
neg. Kontrolle	134 ms
2,5 μM	793 ms
5,0 μM	326 ms
7,5 μM	209 ms
10,0 μM	107 ms
12,5 μM	77 ms

Tabelle 4: Belichtungszeiten für die Fluoreszenzmikroskopie

Zum Schluss wurde noch die Kerndarstellung (DAPI) mit der Hypericinaufnahme überlagert, um ein Gesamtbild zu erhalten. Dann wurden noch Fotos mit 40facher Vergrößerung gemacht und mit dem entsprechenden Nativbild überlagert, um den Ort der Hypericinanreicherung zu veranschaulichen.

2.2.5 FACS-Analyse

I. Prinzip:

Die Hypericinaufnahme in die unterschiedlichen Zellen wurde quantitativ mit Hilfe des FACS (Fluorescence-Activated-Cell-Sorting) analysiert, welches auf dem Prinzip der Einzelzell-Durchflusszytometrie beruht. Hierbei wird jede einzelne Zelle analysiert, wobei die Messrate bei einigen tausend Zellen pro Sekunde liegt. So können mit dieser Methode verschiedene Zelltypen aus einem Gemisch von Zellen quantifiziert und isoliert werden. Die Zellen werden einzeln an einem Lichtstrahl vorbeigeführt und das von den Zellen reflektierte Licht wird zu Detektoren geleitet, die das auftreffende Licht in elektrische Impulse umwandeln. Dabei werden die Zellen anhand ihres Streulichtverhaltens und anhand ihrer Fluoreszenzintensität beurteilt. Das in 180° Richtung gemessene Streulichtverhalten ist ein relatives Maß für die Größe der Zelle. Diese Fraktion wird als 'Forward-scattered-light' (FSC) bezeichnet. Zum anderen wird das in 90° auftreffende Streulicht vom sogenannten 'Side-scattered-light'-(SSC) Detektor wahrgenommen und ist ein Maß für intrazelluläre Bestandteile wie Kerngrößen und Granularität der Zelle.

Im Rahmen dieses Versuches wurde für die Messung ein FACS Canton II von Becton-Dickinson verwendet. Der FACS Canton besitzt neben FSC- und SSC-Detektoren auch verschiedene Detektoren für Fluoreszenzmessungen (FL 1-3). Die Detektion von zellulärerer Fluoreszenz beruht auf der Anregung von Fluorochromen durch einen Laser, die dann beim Übergang in ihren Ausgangszustand Photonen bestimmter Wellenlängenbereiche, die den entsprechenden Fluorochromen zugeordnet werden können, aussenden. Die Fluoreszenzintensität von Hypericin wird durch das Fluorochrom Phycoerythrin (PE) bei 488 nm angeregt. Die maximale Intensität des abgestrahlten Lichtes liegt bei 585 nm und wird dementsprechend bei dieser Wellenlänge gemessen. Der Anteil an markierten Zellen und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der markierten Zellen wird gegen die als Hintergrund definierten unmarkierten Zellen kalkuliert. Die Hypericinaufnahme wurde mittels des Mean fluoreszenz index (MFI) bestimmt. Dieser berechnet sich aus dem Quotienten aus

durchschnittlicher Fluoreszenz der positiven Zellpopulationen und der Negativkontrolle.

II. Durchführung:

Zunächst wurden die Zellen aller Zelllinien auf Petrischalen mit einer Zellzahl von jeweils 10×10^4 /ml ausgesät. Pro Zelllinie benötigte man 6 Petrischalen (Negativkontrolle, 2,5 μ M, 5,0 μ M, 7,5 μ M, 10,0 μ M und 12,5 μ M Hypericin). Als nächstes wurden nun die Zellen für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend mit jeweils 8ml der entsprechenden Hypericinkonzentration versetzt. Als Negativkontrolle wurde Medium ohne Hypericin verwendet. Nach 2 Stunden Inkubation wurden die Ansätze mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA Lösung abgelöst. Dann wurde die Zellsuspension mit 4 ml PBS + 10%FCS aufgenommen. Nach dem Umfüllen in die FACS-Röhrchen wurde die Zellsuspension noch auf dem Vortex geschüttelt und dann sofort am FACS Canton II gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels der BD FACSDiva-Software. Die FACS-Analyse wurde drei mal nach dem gleichen Protokoll wiederholt.

2.2.6 Morphologische Beurteilung

I. Vorbereitung:

Nach dem Aussähen der Zellsuspensionen auf die Culture Slides (8-Well-Platten) wurden die Platten für 24h im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde mit einer sterilen Pasteurpipette das Medium abgesaugt und die unterschiedlichen Hypericinkonzentrationen angemischt :

Hypericinlösung + Kulturmedium = Konzentration

10 μ l	+	800 μ l	=	12,5 μ M
8 μ l	+	800 μ l	=	10,0 μ M
6 μ l	+	800 μ l	=	7,5 μ M
4 μ l	+	800 μ l	=	5,0 μ M
2 μ l	+	800 μ l	=	2,5 μ M

Dann wurden pro Zelllinie jeweils 5 Wells der Culture Slides mit 200 µl des Hypericin-Medium-Gemischs in unterschiedlicher Konzentration (2,5µM, 5,0µM, 7,5 µM, 10,0 µM, 12,5 µM) aufgefüllt. Für die Negativkontrolle wurde jeweils ein Well pro Zelllinie nur mit 200 µl Medium ohne Hypericin befüllt. Die Versuche wurden für unterschiedliche Lichteinwirkungen durchgeführt, einmal als Kontrolle ohne Licht, dann mit 10 min und 50 min Lichteinwirkung.

Negativ Kontrolle	2,5 µM Hypericin	5,0 µM Hypericin	7,5 µM Hypericin
10,0 µM Hypericin	12,5 µM Hypericin		

Abbildung 8: Befüllungsschema der Chamber Slides (8 Well-Platte)

Nach Abschluß dieser Arbeitsschritte wurden die Chamber Slides für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde unter abgedunkelten Bedingungen das Hypericingemisch entfernt und die Chambers mit frischem Medium aufgefüllt. Dann erfolgte erneut eine Inkubation für 24h im Brutschrank. Am nächsten Tag wurden die Zellen wie in 1.2.3 beschrieben mit Hämalaun und Eosin gefärbt. Die morphologische Beurteilung aller Zelllinien erfolgte anschließend mittels Lichtmikroskopie durch den Pathologen Herrn Prof. Dr. Ruck (Pathologisches Institut Leonberg).

2.2.7 MTT-Assay

I.Allgemein:

Zur Messung der Vitalität der Zellen wurde der EZ4U Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest von Biomedica benutzt. Als Indikator für die Zellvitalität wird hierbei nicht-toxisches Tetrazoliumsalz verwendet. Die Methode beruht darauf, dass von lebenden Zellen schwach gefärbte Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazanderivate umgewandelt werden können. Diese Reduktion

erfordert intakte Mitochondrien, die kurz nach Absterben einer Zelle inaktiv werden. Daraus ergibt sich die Möglichkeit zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden.

II. Durchführung:

Zunächst wurden die Zellen aller Zelllinien ausgesät. Dafür wurde das Medium aus der Petrischale mit sterilen Pasteurpipetten abgesaugt, dann mit PBS abgespült und anschließend die Zellen mit Trypsin/EDTA Lösung abgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe von Medium gewaschen und in ein 15 ml Probegefäß (Falcon) überführt. Hieraus nahm man nun mit einer Mikroliterpipette 100µl Zellsuspension und gab diese mit dem Farbstoff Trypanblau, (100µl) in ein Eppendorfhütchen. Im Anschluß wurde dieses Gemisch in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Nun zählte man die Zellen mäanderförmig im Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung aus. Die Zellzahl in 4 Eckquadranten dividiert durch 4 und multipliziert mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor 2 ergab die Zellzahl pro Milliliter. Die Zellzahl betrug 3×10^4 pro ml bei der Zelllinie HepG2 wegen des schnelleren Wachstums. Bei HepT1 und HUH6 lag die gewünschte Zellzahl bei 5×10^4 pro ml. Nun wurde für den MTT-Assay die bereits vorbereitete Zellsuspension aus dem Falcon je nach ausgezählter Zellzahl verdünnt, und dann jeweils 100µl pro Well in eine 96-Well-Platte pipetiert. Es wurden jeweils 3fach-Bestimmungen durchgeführt, das heißt 3 Wells pro unterschiedliche Konzentration (2,5 µM, 5,0 µM, 7,5 µM, 10,0 µM, 12,5 µM) und unterschiedlicher Zelllinie. Dann wurde noch eine Kontrolle ohne Zugabe von Hypericin untersucht. Die Ansätze wurden für je 6 unterschiedliche Lichteinwirkungen durchgeführt, einmal für die Kontrolle ohne Licht, dann für 10 min, 20 min, 30 min, 40 min und 50 min Lichteinwirkung. Nach Abschluß dieser Vorbereitungen wurden die Zellen zum Inkubieren in den Brutschrank gestellt. Nach 24 Stunden Inkubation wurde dann in jedes Well Hypericinlösung in den unterschiedlichen Konzentrationen und in das zur Kontrolle bestimmten Well 100 µl Kulturmedium hinzu gegeben. Zusätzlich wurde noch ein Blank = Leerwert angelegt, in dem sich keine Zellen und kein Hypericin befanden. Nun erfolgte eine erneute Inkubation für 2 Stunden.

Danach wurde das mit Hypericin gemischte Medium abgesaugt und durch 200 µl neues Medium ersetzt und dem weißen, ungefilterten Lichteinwirkungen (0 - 50 min) ausgesetzt. Zuletzt wurden die 96-Well-Platten für weitere 72 Stunden im Brutschrank aufbewahrt.

HepT1			HUH6			HepG2					
n.K.											
2,5 µM											
5,0 µM											
7,5 µM											
10,0 µM											
12,5 µM											
LW	LW	LW									

- Legende:
- n.K. = Negativ Kontrolle (Zellsuspension ohne Hypericin)
 - unterschiedliche Hypericinkonzentrationen
 - LW = Leerwert

Abbildung 9: Befüllungsschema der 96-Well-Platte

III. Auswertung – Vitalitätsanalyse:

Die Auswertung erfolgte mit EZ4U, einem nichtradioaktivem Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest.

Inhalt des EZ4Y-Kits: Substrat (SUB), lyophilisiert: 10 Fläschchen

Aktivatorlösung (ACT): 1 Fläschchen mit 30ml

Ein Fläschchen chromogenes Substrat (SUB) beinhaltet die entsprechende Menge Substrat für 125 Wells einer Mikrotiterplatte mit 200µl Zellkulturmedium pro Well. Das zuvor auf 37°C erwärmte Substrat, wurde in 2,5 ml Aktivator gelöst. Nach Auflösung des Substrats war die Lösung strohgelb gefärbt. Von

dieser Farbstofflösung wurden dann pro Well 20 μ l zu jeweils 200 μ l Zellkultur gegeben. Die Inkubationszeit ist von der Umsetzungskapazität der Zellen abhängig, jede Zelllinie hat eine unterschiedliche Fähigkeit zur Umsetzung der gelb gefärbten Tetrazoliumverbindung in das ziegelrote Formazanderivat. Bei unseren Zelllinien waren 2 Stunden für einen intensiven Farbanstieg ausreichend. Anschließend wurde die Absorption im Mikrotiterplatten-Photometer bei 450nm (620 nm als Referenzwellenlänge) gemessen. Die Messung der Absorption bei 620 nm diente zum Abzug des Leerwertes, der von Zellbruchstücken oder anderen Störfaktoren herrühren kann. Insgesamt wurden mindestens drei komplette Messungen durchgeführt, bei denen wiederum alle Messwerte der Versuchsgruppen dreifachbestimmt wurden. Zur Auswertung wurde die optische Dichte des Leerwertes (Substrat ohne Zellen), von den dreifachbestimmten Messwerten der jeweiligen Versuchsgruppe abgezogen und im Anschluss daran das arithmetische Mittel ermittelt. Das Ergebnis der Negativkontrolle wurde dann als 100% Vitalität definiert und die Ergebnisse der Versuchsgruppen in Relation dazu gesetzt und als Prozentwerte wiedergegeben.

2.2.8 Ki-67 Immunfluoreszenz

I. Prinzip:

Bei der Immunfluoreszenz macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass ein sogenannter Primär-Antikörper an ein spezifisches Antigen eines Produktes der Zelle bindet. Um die erfolgte Antikörper-Antigen-Bindung sichtbar zu machen, wird im zweiten Schritt ein mit Fluoreszenzfarbstoff markierter Sekundär-Antikörper eingesetzt, der an den Primärantikörper bindet. Der Sekundärantikörper muss dabei gegen die Tierspezies gerichtet sein, aus der der Primärantikörper isoliert wurde. In diesem Fall erfolgt der Nachweis mit der indirekten Methode. Als Primär-Antikörper verwendeten wir den Proliferationsmarker Ki-67 der aus der Maus isoliert wurde, Ki 67-Antigen, Antihumanclone MIB-1. Während des Zellzyklus wird dieser Antikörper in der G1-, in der S-, in der G2- und in der M-Phase exprimiert. Ruhende Zellen, also Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, exprimieren das Ki67-Antigen nicht.

Die Ki67-Färbung gibt also unmittelbar Aufschluss über die Wachstumsphase eines Tumors und ist deshalb in der Routinediagnostik sehr wichtig. Als Sekundär-Antikörper wurde ein mit Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrome) markierter Anti-Maus-Antikörper verwendet. Als Markersubstanz dient Fluoreszeinisothiocyanat (FITC). Bei Anregung im UV-Licht oder bei Anregung mit entsprechenden Anregungs- und Sperrfiltern kommt es zu einer gelbgrünen Fluoreszenz. Als unerwünschte Reaktion kann eine Kreuzreaktion des Sekundär-AK mit endogenen Immunglobulinen auftreten, dies wird durch Vorinkubation mit vorabsorbierenden Antisera ausgeschaltet.

II. Durchführung:

Bei allen Immunfluoreszenz-Färbungen wurden parallel positive und negative Kontrollen mitgeführt, um die Qualität des Nachweises von Ki-67 zu überprüfen. Als Positivkontrolle diente die bekannt positive Rhabdomyosarkom-Zelllinie, Rh30. Als negative Kontrollen dienten Zellen, welche ohne Primärantikörper, unter ansonsten gleichen Bedingungen, inkubiert wurden.

Zunächst wurden 5×10^4 Zellen der Zelllinien HepT1 und HUH6, 3×10^4 Zellen der Zelllinie HepG2 auf 8-Well-Platten (Greiner) übersiedelt und diese wiederum über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 10% CO_2 inkubiert. Die Zellen konnten so adhären wachsen und einen homogenen Zellrasen ausbilden, was zu einem natürlicheren Zellbild und damit qualitativ hochwertigeren Färbeergebnissen führte. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 2h mit Hypericin in der Konzentration von $5 \mu\text{M}$ inkubiert. Dann wurde das Hypericingemisch unter abgedunkelten Bedingungen abgesaugt und die Zellen mit frischem Medium eingedeckt. Bevor die Zellen erneut für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert wurden, wurden sie noch unterschiedlicher Lichteinwirkung (10 min und 50 min) ausgesetzt. Nach den 3 Tagen Inkubation wurde der Objektträger nach Entfernen der Chambers mit PBS gewaschen, um Stoffwechsel- und Abfallprodukte der Zellen zu entfernen. Danach konnte man die Zellen dann mit 4,5% - Formaldehydlösung fixieren. Die Einwirkzeit betrug 10 min. Hinterher wurde der Objektträger erneut mit PBS gewaschen. Um unerwünschte Kreuzreaktionen zu vermeiden, wurde 1,5 %iges Goat-Serum für

30min auf die Zellen gegeben. Das alles erfolgte unter abgedunkelten Bedingungen.

Primär-Antikörper: Ki 67-Antigen, Antihumanclone MIB-1, Maus AK.

Schließlich konnten 50µl pro Well des 1. Antikörpers in einer Verdünnung mit PBS von 1:100 aufgetragen werden. Dieser Antikörper wurde für eine Einwirkzeit von 2h im Dunkeln auf dem Objektträger belassen. Es folgte ein dreimaliges Waschen, indem die Zellen 3 mal 5 min in ein PBS-Bad getaucht wurden.

Sekundär-Antikörper: Goat Anti-Maus-Antikörper, FITC konjugiert.

Nach diesem Waschgang wurde der 2. Antikörper auf die Zellen gegeben, ebenfalls in der Antikörper spezifischen Verdünnung von 1:100 mit PBS.

Dieser Antikörper bindet Tier-spezifisch jeweils nur an denjenigen ersten Antikörper, der dem entsprechenden Tier entstammt, gegen das der zweite Antikörper gerichtet ist, in unserem Fall der Maus. Auch hier genügten 50µl pro Well, die Platte musste dann für weitere 30 min im Dunkeln inkubieren.

Im Folgenden wurden die Zellen erneut einer dreimaligen Waschprozedur mit PBS unterzogen. Auch hier wurde das Ziel verfolgt alle freien Antikörper zu entfernen. Danach wurden die Zellen nur noch mit DAPI, zur besseren Kerndarstellung gefärbt. Zum Schluss wurde der Objektträger mit Mounting Medium eingedeckt und dunkel gelagert bis zur Untersuchung und fotografischen Dokumentation mit dem Fluoreszenzmikroskop. Die Auswertung erfolgte dann anhand der Auszählung von jeweils 300 Zellen durch drei unabhängige Untersucher.

2.2.9 TUNEL (TDT-mediated dUTP nick end labeling)

I. Prinzip:

Der TUNEL-Test dient dem Nachweis des apoptotischen Zelltods. TUNEL steht als Abkürzung für „**T**erminale **D**esoxyribosyl-**T**ransferase mediated **dUTP N**ick **E**nd **L**abeling. Während der Apoptose kommt es in den Zellen zur DNA-

Spaltung. Dadurch entstehen doppelsträngige, niedermolekulare DNA-Fragmente und Einzelstrangbrüche (nicks). Nachgewiesen werden diese DNA-Fragmente mit Hilfe des Enzyms Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT), welches modifizierte Nukleotide matrizenunabhängig an freie 3'-OH-Enden anheftet. Die Nukleotide sind außerdem mit Fluoreszein markiert, so dass die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop erfolgen kann.

Für die Gegenfärbung wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI verwendet. Er bindet direkt an doppelsträngige DNA, insbesondere an die Basen Adenin und Thymin.

II. Durchführung:

Für die TUNEL-Färbung wurden alle Zelllinien in eine 8-Well-Platten ausgesät und mit verschiedenen Hypericin-Konzentrationen und Belichtungszeiten behandelt.

Zunächst wurden die Zellen in 4%igem Paraformaldehyd (pH 7,4 in PBS) für 10 min fixiert. Dann folgte eine zweiminütige Inkubation auf Eis in 0,1% Triton X-100 in 0,1% Natriumcitrat. Anschließend wurden die Zellen für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank in der Reaktionslösung (*Enzyme Solution* und *Label Solution* im Verhältnis 1:10) inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten in PBS wurden die Präparate für 1 h bei 37°C mit dem Reagenz aus TUNEL-Enzymen (Terminale Transferase) und TUNEL-Labellösung inkubiert (je 50 µl, In situ Death Detection Kit, Fluorescein, Fa. Roche, Mannheim, BRD). Die Negativ-Kontrolle wurde stattdessen mit nur 50 µl TUNEL-Labellösung ohne Terminale Transferase aufpipettiert. Es folgten drei weitere Waschschrritte mit PBS für je 5 min. Für die Gegenfärbung wurde DAPI in einer mit Aqua dest. 1:10.000 verdünnten Lösung für 15 sec auf die Objektträger aufgetragen. Nochmals folgten drei 5-minütige Waschschrritte in PBS. Schließlich wurden die Präparate mittels Mounting Medium für die Fluoreszenz-Mikroskopie eingedeckt und durch Auszählung von jeweils 300 Zellen pro Well, verblindet durch drei unabhängige Personen, ausgewertet.

In den Versuchsabläufen wurden bei jeder Farbe-Serie eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. Die Positiv-Kontrolle wurde mit DNase I (Fa.

Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, BRD) inkubiert. DNase I ist eine aus Rinderpankreas gewonnene Doppelstrang-spezifische Endonuclease. Mit Hilfe dieses Enzyms wurden DNA-Strangbrüche „künstlich“ induziert, die dann im TUNEL-Test positiv nachgewiesen werden.

2.2.10 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung der Zellvitalität beim MTT-Assay, sowie des Ergebnisses der Ki-67 Immunfluoreszenz und des TUNEL-Tests erfolgte stets im Vergleich zur Kontrollgruppe (0 μ M Hypericin, 0 min Belichtung). Aufgrund der Normalverteilung der Daten und der nicht zu großen Anzahl der vergleichenden Faktoren wurde der Dunn`s Test eingesetzt. Hierbei handelt es sich um einen Test der einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA (analysis of variance).

Als Signifikanzniveau wurde stets $p < 0,05$ vorausgesetzt. Die Werte wurden immer als MW (Mittelwert) \pm SEM (Standardfehler) angegeben.

Die Daten der FACS-Analyse wurden in linearer Regression mit dem Konfidenzintervall des Mittleren Fluoreszenzindex (MFI) und den verschiedenen Hypericinkonzentrationen mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Ver. 4.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA) ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Zellvisualisierung

Als erstes untersuchten wir, inwieweit Hypericin von den unterschiedlichen Tumorzelllinien aufgenommen wird und damit zur Tumorvisualisierung geeignet ist. Um dies zu analysieren wurden nach erfolgter Hypericinapplikation fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Im Anschluss daran fand zur quantitativen Bewertung der Hypericinaufnahme noch eine FACS-Analyse statt.

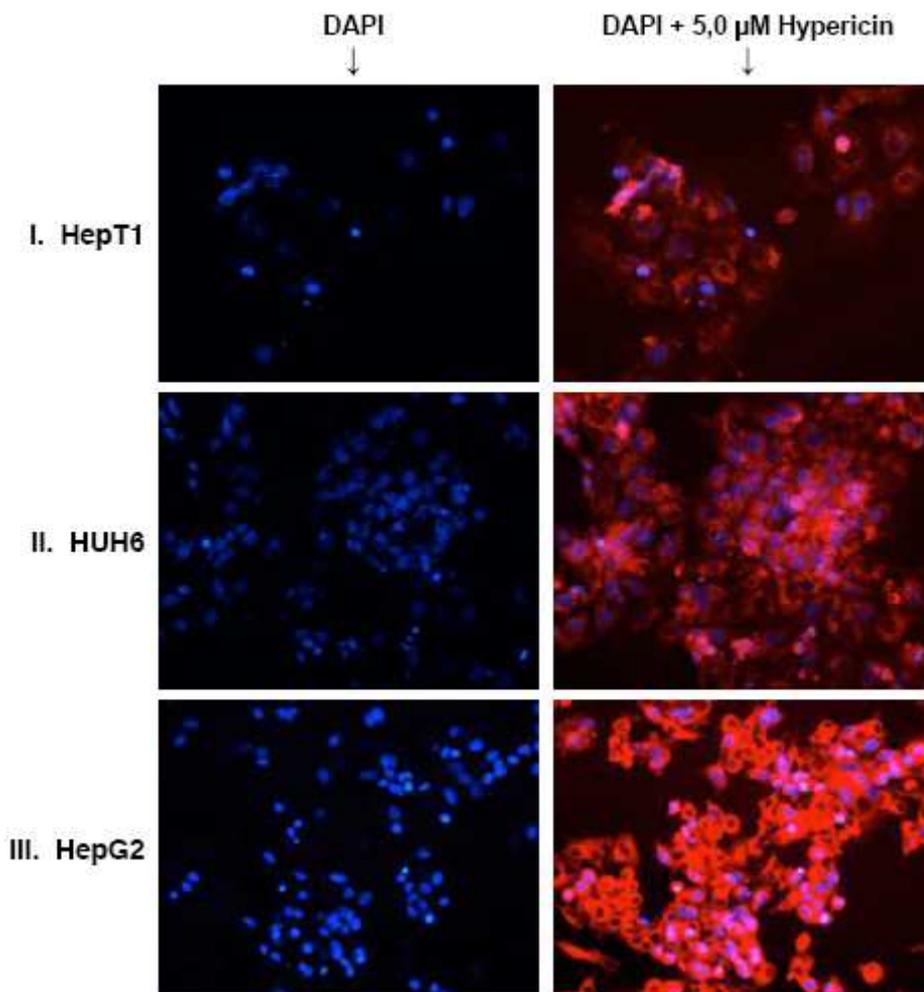


Abbildung 10: Aufnahme von Hypericin in die Tumorzellen (Immunfluoreszenz, 20x)

Bei allen Tumorzelllinien (HepT1, HUH6, HepG2) kommt es bereits bei einer Konzentration von 5,0 μM Hypericin zu einer vollständigen Aufnahme des Photosensibilisators in die Zellen kommt.

Durch das Überlagern der fluoreszenzmikroskopischen Bilder mit dem entsprechenden Nativbild wird die Lokalisation des Hypericins nochmals verdeutlicht. Bei allen Tumorzelllinien zeigt sich eine zytosolische Anreicherung von Hypericin.

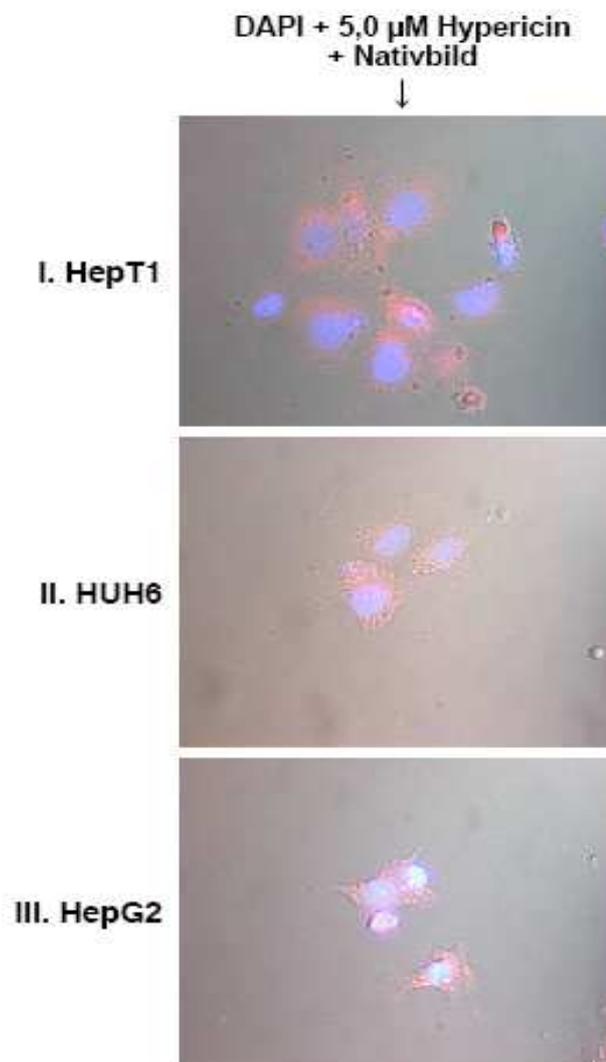


Abbildung 11: Zytosolische Anreicherung von Hypericin in die Tumorzellen
(Immunfluoreszenz, 40x)

Die FACS-Analyse verdeutlicht, dass bei allen Zelllinien eine steigende Hypericinkonzentration auch zu einer steigenden Hypericinaufnahme und damit stärkerem Fluoreszenzsignal führt. Das stärkste Fluoreszenzsignal mit einem MFI von 697.83 wurde bei HUH6 gefunden. Im Vergleich dazu wurde das niedrigste Fluoreszenzsignal mit einem MFI von 437.14 bei HepT1 gefunden. Im Folgenden ist dies in einer Graphik dargestellt. Die Tabelle mit den einzelnen Werten ist im Anhang unter 6.4.2 aufgeführt.

Auf der x-Achse ist die applizierte Hypericinkonzentration abgebildet und auf der y-Achse der jeweilige MFI (mean fluorescence index). Die dabei verwendeten unterschiedlichen Symbole entsprechen den jeweiligen Zelllinien.

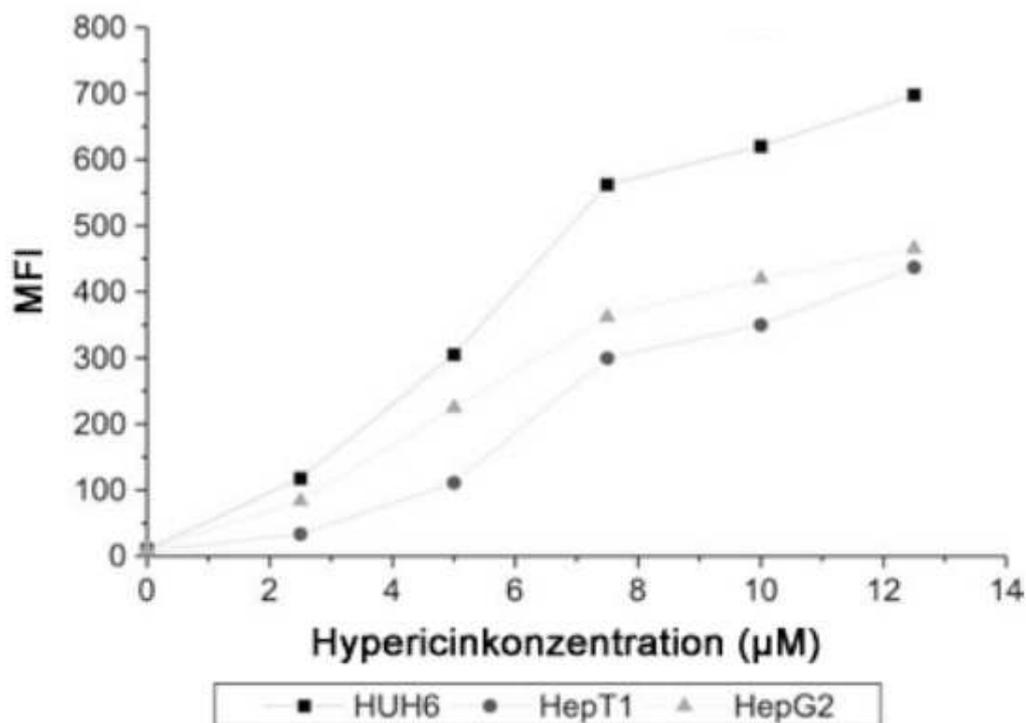


Abbildung 12: Quantitative Hypericinaufnahme in die Tumorzellen (FACS-Analyse, MFI : Mittlere Fluoreszenzindex)

3.2 Zellmorphologie

Im Lichtmikroskop zeigten die Negativkontrollen aller Zelllinien ohne Hypericin und ohne Belichtung große dichte Haufen an Tumorzellen. Des Weiteren wiesen sie eine hohe Kern-Zytoplasma Ratio, mit einem großen Nukleus und einem prominenten Nukleolus auf. Genau das gleiche Ergebnis erhält man bei bereits erfolgter Hypericinapplikation, aber noch fehlender Lichtexposition. Somit hat Hypericin allein keinen Einfluss auf die Morphologie der Zelle. Erst bei zusätzlicher Bestrahlung mit Licht kommt es zur Photoaktivierung des Hypericins, und dadurch zur Reduktion der Dichtigkeit der Zellhaufen und der Zelladhäsion. Bei einer Belichtungszeit von 50 min und einer Konzentration von 12,5 μM Hypericin waren nur noch wenige Zellcluster zu finden und die meisten Zellen wiesen einen pyknotischen Zellkern auf. Pyknose bedeutet die Schrumpfung des Zellkerns und ist ein morphologisches Korrelat der Apoptose.

3.3 Zellvitalität

Im Folgenden sind die Ergebnisse der einzelnen Zelllinien graphisch dargestellt. Auf der x-Achse ist jeweils die verwendete Hypericinkonzentration in μM und auf der y-Achse die Zellvitalität in Prozent aufgetragen. Die Belichtungszeiten von 0 - 50 min, werden durch die unterschiedlich schattierten Säulen dargestellt.

Die Anwesenheit von Hypericin ohne nachfolgende Bestrahlung hat keinerlei inhibierende Auswirkung auf die Zellvitalität. Stattdessen kommt es sogar zu einem vermehrten Wachstum der Zellen. Bei der Zelllinie des Hepatozellulären Karzinoms wurde die höchste Zellvitalität bei einer Konzentration von 5 μM Hypericin nachgewiesen. Hier zeigte sich ein Anstieg auf $145\% \pm 5\%$. Die höchste Zellvitalität bei beiden Hepatoblastom-Zelllinien, wurde bei einer Hypericinkonzentration von 12,5 μM gefunden. Bei HepT1 zeigte sich ein Anstieg auf $121\% \pm 9,5\%$ und bei HUH6 auf $131\% \pm 15\%$ (Abb. 14 – 16).

Des weitern zeigt sich, dass durch die zusätzliche Kombination mit Licht ein effizienter photodynamischen Effekt entsteht und es zu einer verminderten Zellvitalität bei allen Tumorzelllinien kommt. Im Einzelnen benötigt man bei der Zelllinie des Hepatozellulären Karzinoms (HepG2) beispielsweise nur eine Hypericinkonzentration von 10 μM und eine Belichtungszeit von 20 min um 98,4% ($\pm 1,6\%$, $p \leq 0,05$) der Tumorzellen abzutöten. Bei der Hepatoblastomzelllinie HepT1 dagegen, waren eine Hypericinkonzentration von 12,5 μM und eine Lichtexposition von 30 min notwendig um 99% der Zellen zu zerstören ($\pm 2\%$, $p \leq 0,05$). Für 99,8% ($\pm 2,4\%$, $p \leq 0,05$) abgetötete Tumorzellen der Zelllinie HUH6 waren ebenfalls eine Hypericinkonzentration von 12,5 μM erforderlich, aber zusätzlich musste hier noch die Belichtungszeit auf 40 min erhöht werden.

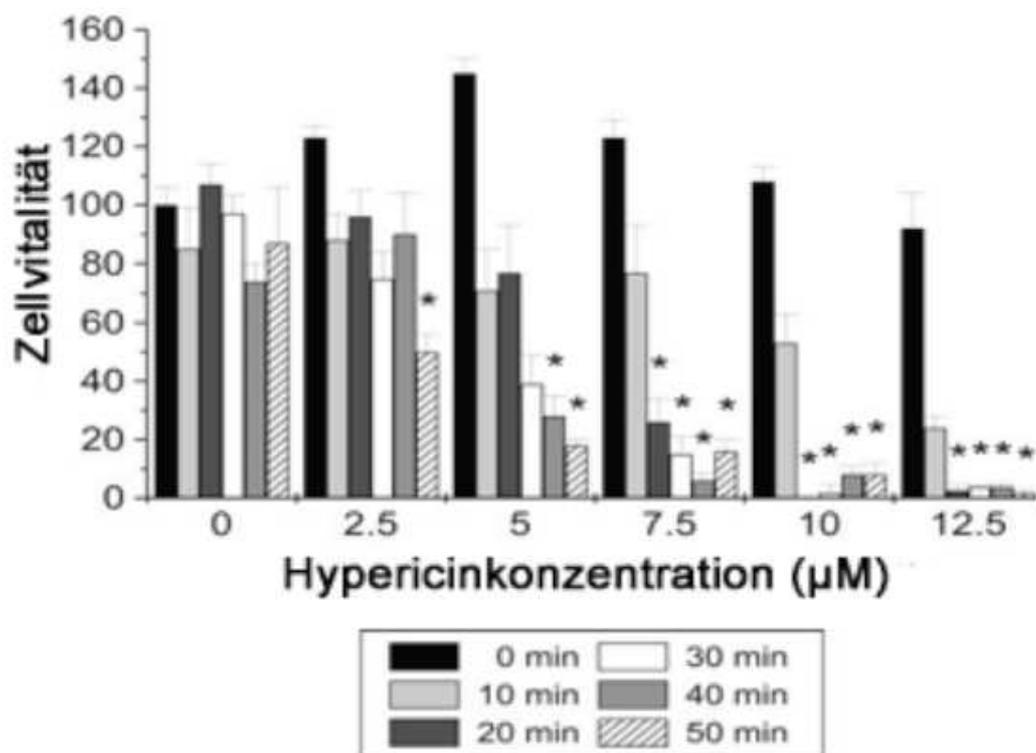


Abbildung 13: Einfluss der Photodynamischen Therapie mit Hypericin auf die Zelllinie HepG2 (* = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe)

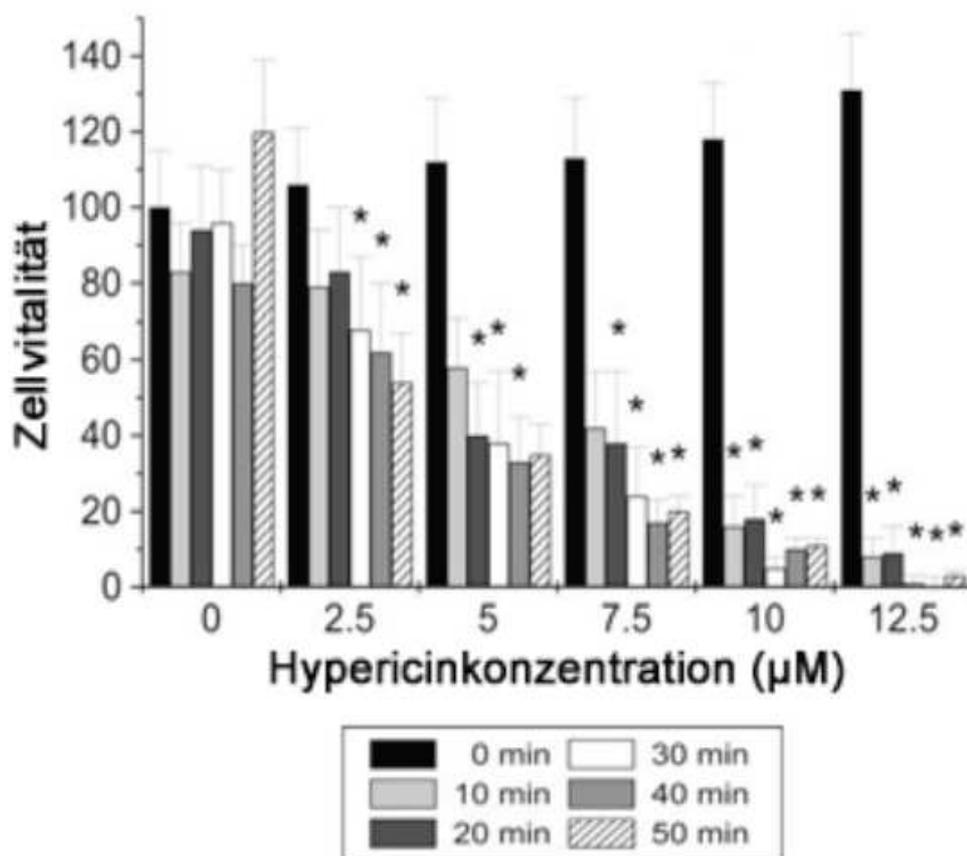


Abbildung 14: Einfluss der Photodynamischen Therapie mit Hypericin auf die Zelllinie HepT1 (* = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe)

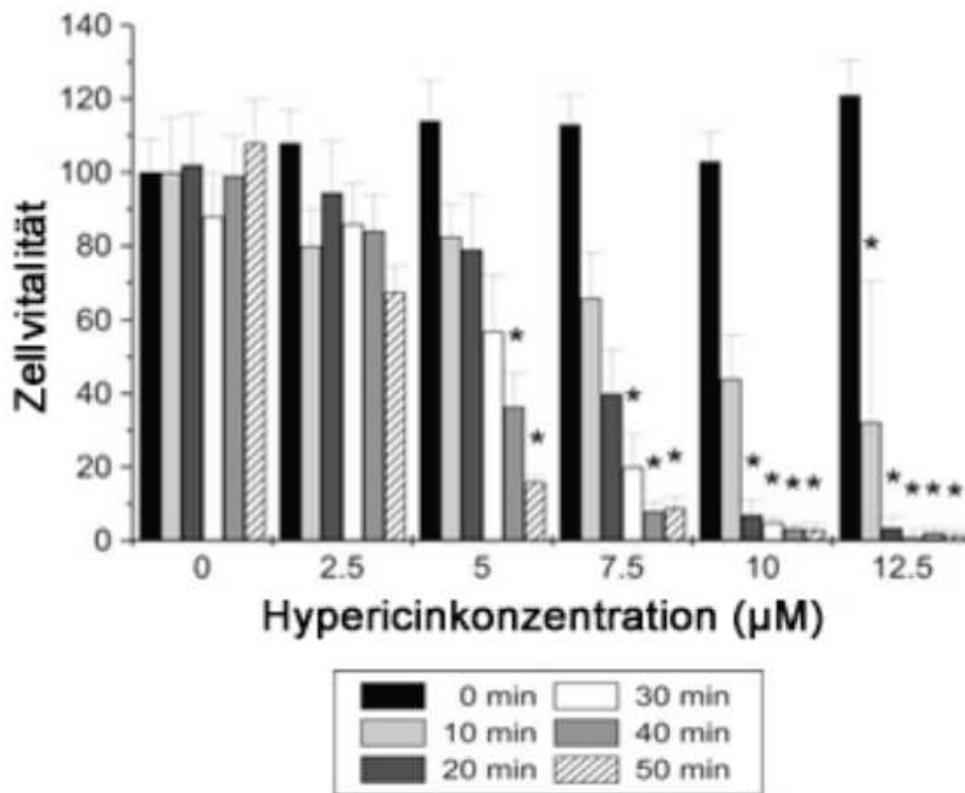


Abbildung 15: Einfluss der Photodynamischen Therapie mit Hypericin auf die Zelllinie HUH6
(* = p < 0,05 vs. Kontrollgruppe)

3.4 Zellproliferation

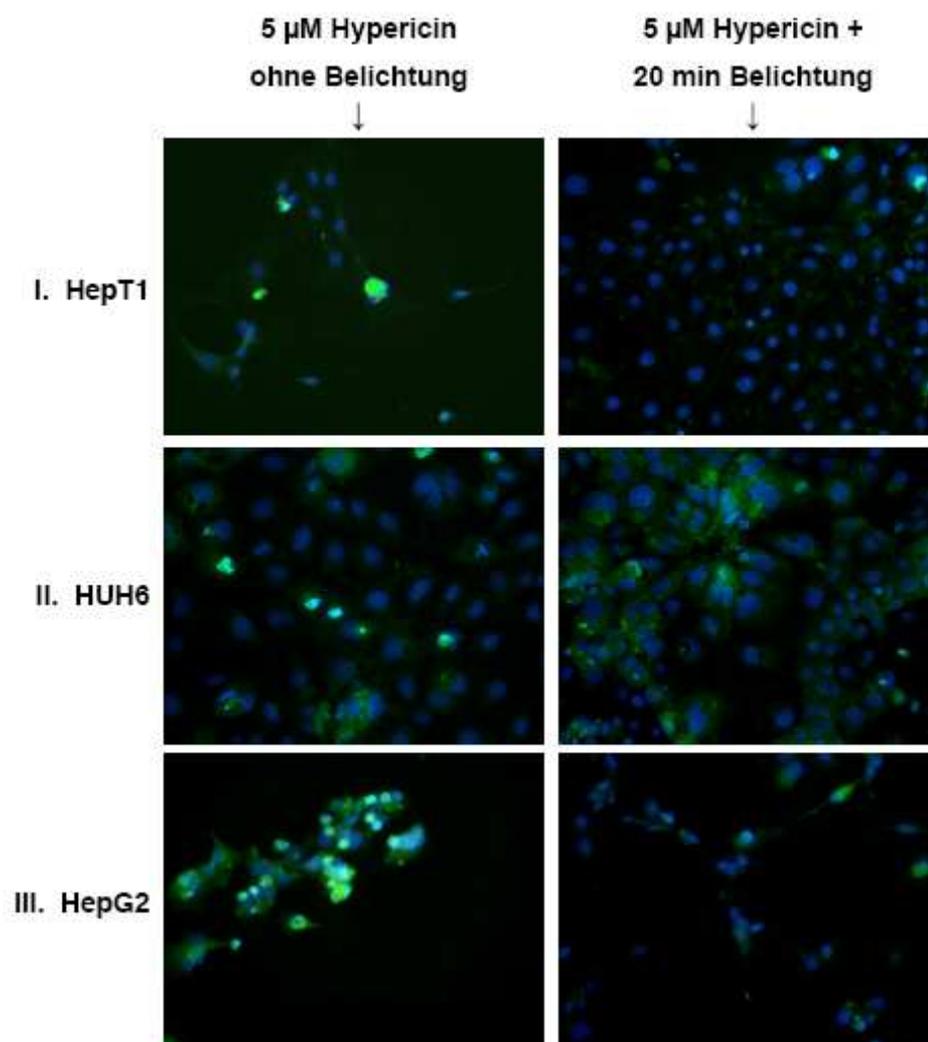


Abbildung 16: (Ki-67 Immunfluoreszenz, 20x) Zellen, die sich in der Proliferationsphase befinden, weisen eine ausgeprägte Grünfärbung auf

Die folgenden Tabellen beinhalten die Werte der Dreifachauszählung der in Proliferation befindlichen Zellen durch drei unabhängige Untersucher.

	HepT1			HUH6			HepG2		
t in [min]	0	20	50	0	20	50	0	20	50
1. Auszählung	9	5	2	9	6	4	7	5	2
2. Auszählung	11	2	1	13	7	5	8	3	2
3. Auszählung	10	2	2	15	7	2	11	6	1

Tabelle 5: Anzahl der in Proliferationsphase befindlichen Zellen

Die statistische Auswertung der Auszählung erfolgte ebenfalls im Vergleich zur Kontrollgruppe mittels des Dunn`s Test. Bei einer Inkubation mit 5 μ M Hypericin und steigender Bestrahlungszeit sieht man eine deutliche Reduktion der proliferativen Zellen (Abb. 18). Bereits bei einer Bestrahlungszeit von 20 min zeigt sich ein signifikanter Rückgang der in Proliferation befindenden Tumorzellen. Bei der Zelllinie HepT1 zeigt sich ein Rückgang auf 70%, bei HUH6 und HepG2 auf 46% ($p < 0,05$). Bei einer Belichtungszeit von 50 min waren bei HUH6 nur noch 3,7 \pm 0,89 Ki-67 positive Zellen zu finden ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe). Noch weniger proliferativ aktive Zellen fanden sich bei HepT1 mit 1,7 \pm 0,3 und bei HepG2 ebenfalls mit 1,7 \pm 0,3 Zellen ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe).

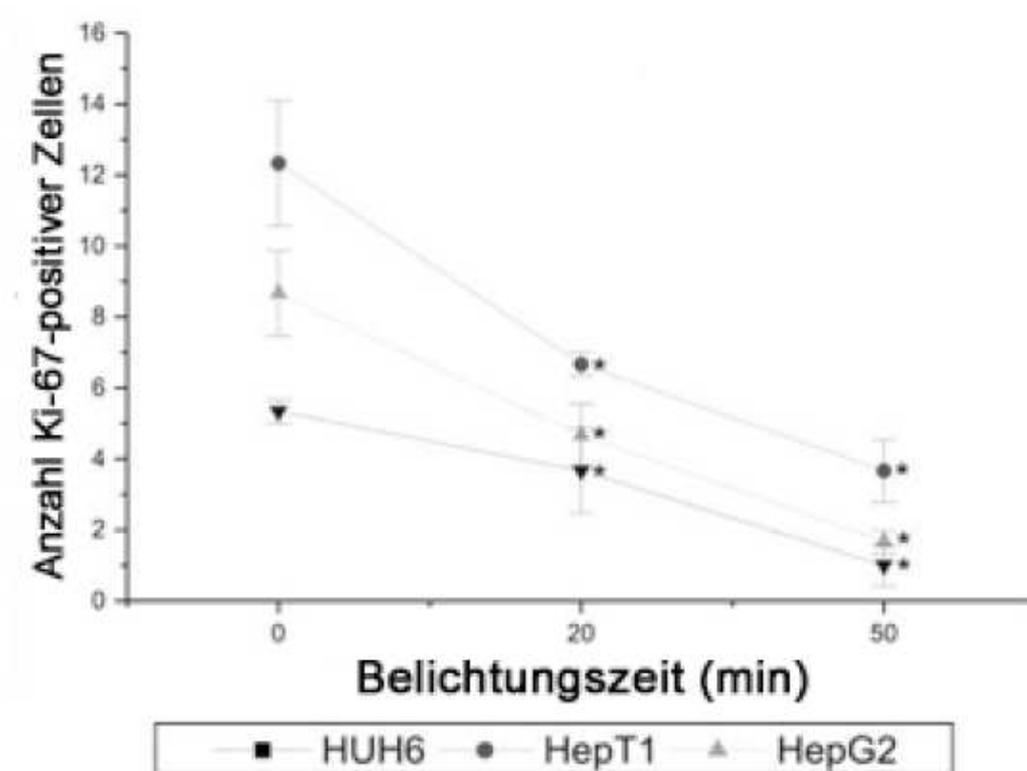


Abbildung 17: Proliferierende Zellen nach Inkubation mit 5 μ M Hypericin und Lichtexposition von 0, 20, 50 min (Ki-67-Assay, * = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe)

3.5 Apoptose

Auf den folgenden fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen erscheinen avitale Zellen durch eine deutliche Grünfärbung. Die Aufnahmen zeigen alle Zelllinie bei 40-facher Vergrößerung.

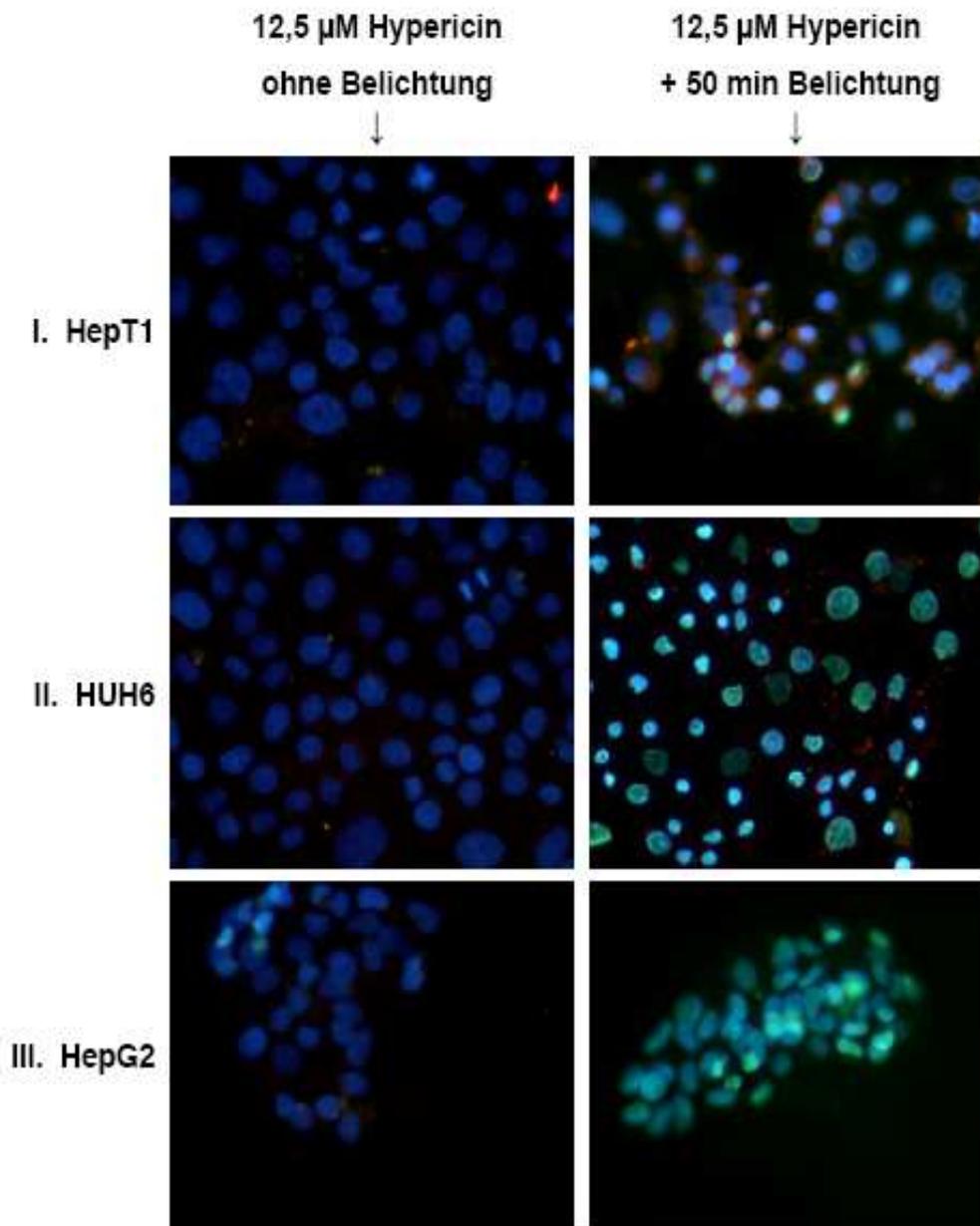


Abbildung 18: Apoptose in Tumorzellen nach PDT mit Hypericin, apoptotische Zellen erscheinen grün (TUNEL, 40x)

Die weitere Auswertung erfolgte anhand der fuoreszenzmikroskopischen Daten durch Dreifachauszählung von jeweils 300 Zellen pro Well, durch drei unabhängige Personen. Die Werte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

HepT1											
Negativkontrolle			2,5µM			7,5µM			12,5µM		
0	10	50	0	10	50	0	10	50	0	10	50 min
4	13	6	7	12	15	2	35	275	9	51	300
2	5	6	8	12	30	2	29	266	3	54	300
8	10	5	12	14	28	5	36	281	11	60	300
HUH6											
Negativkontrolle			2,5µM			7,5µM			12,5µM		
0	10	50	0	10	50	0	10	50	0	10	50 min
2	17	11	1	12	102	34	20	300	23	113	300
2	17	9	1	18	134	26	20	300	18	84	300
5	22	18	4	22	131	21	35	300	19	127	300
HepG2											
Negativkontrolle			2,5µM			7,5µM			12,5µM		
0	10	50	0	10	50	0	10	50	0	10	50 min
31	23	23	53	53	167	108	68	300	69	264	300
28	14	19	56	59	231	84	45	246	81	272	300
22	33	19	42	64	198	69	97	280	67	281	300

Tabelle 6: Anzahl der apoptotischen Zellen nach PDT mit Hypericin (50 min, TUNEL)

Bei allen Tumorzelllinien nimmt mit steigender Hypericinkonzentration und zunehmender Belichtungszeit auch die Anzahl der apoptotischen Zellen zu. Bei der HCC-Zelllinie HepG2 führte bereits eine Konzentration von 2,5 µM Hypericin mit 50 min Belichtung zu einer signifikanten Erhöhung der

apoptotischen Zellen ($p < 0,05$). Bei steigender Hypericinkonzentration von 10 μM Hypericin und der Selben Belichtungszeit wurden nur noch apoptotische Zellen gefunden.

Im Vergleich hierzu wurden bei der Zelllinie HepT1 bei einer niedrigen Hypericinkonzentration von 2,5 μM und identischer Lichtexposition sehr wenig apoptotische Zellen gezählt. Für einen vergleichbaren photodynamischen Effekt wie bei den Zellen des Hepatozellulären Karzinoms benötigt man bei HepT1 bei einer Belichtungszeit von 50 min mindestens 7,5 μM Hypericin.

Bei der Hepatoblastomzellen HUH6 sind die Ergebnisse ähnlich wie bei HepG2. Schon bei niedrigeren Hypericinkonzentrationen und einer 50 minütigen Lichtexposition ist ein deutlicher Effekt erkennbar. Insgesamt wurden bei allen Tumorzelllinien durch eine Photoaktivierung mit 12,5 μM Hypericin und einer Bestrahlung von 50 min fast nur noch apoptotische Zellen gefunden.

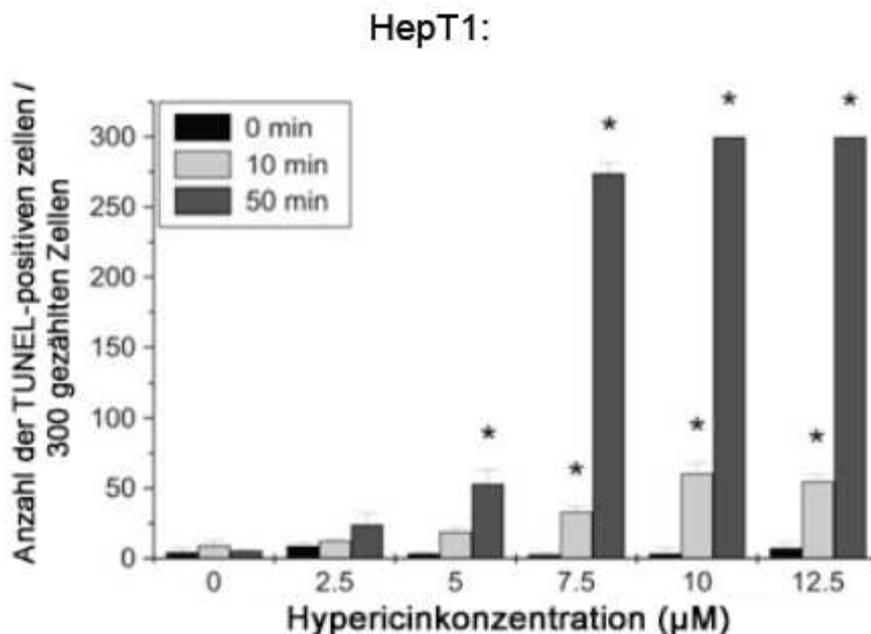


Abbildung 19: Anzahl der apoptotischen Zellen nach PDT mit Hypericin in steigender Konzentration bei HepT1 (TUNEL), (* = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe)

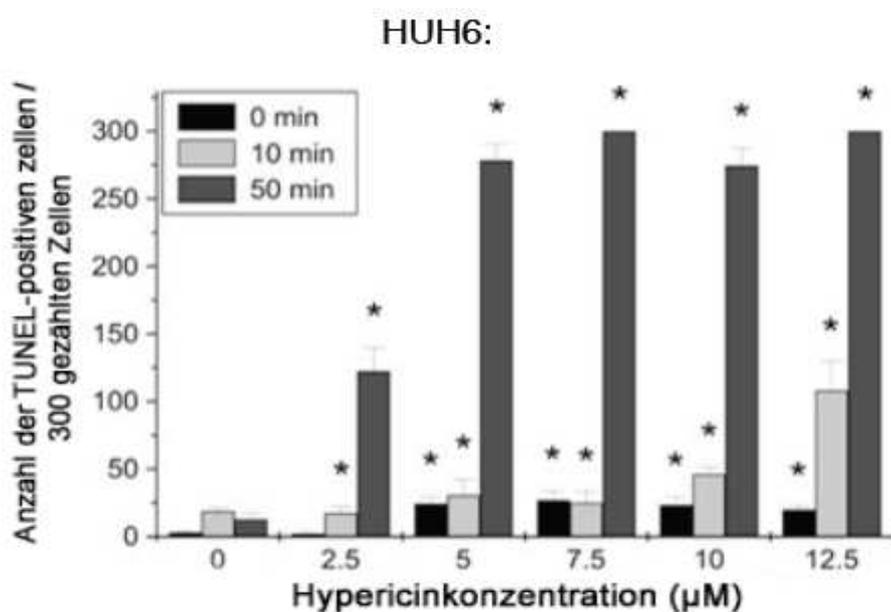


Abbildung 20: Anzahl der apoptotischen Zellen nach PDT mit Hypericin in steigender Konzentration bei HUH6 (TUNEL), (* = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe)

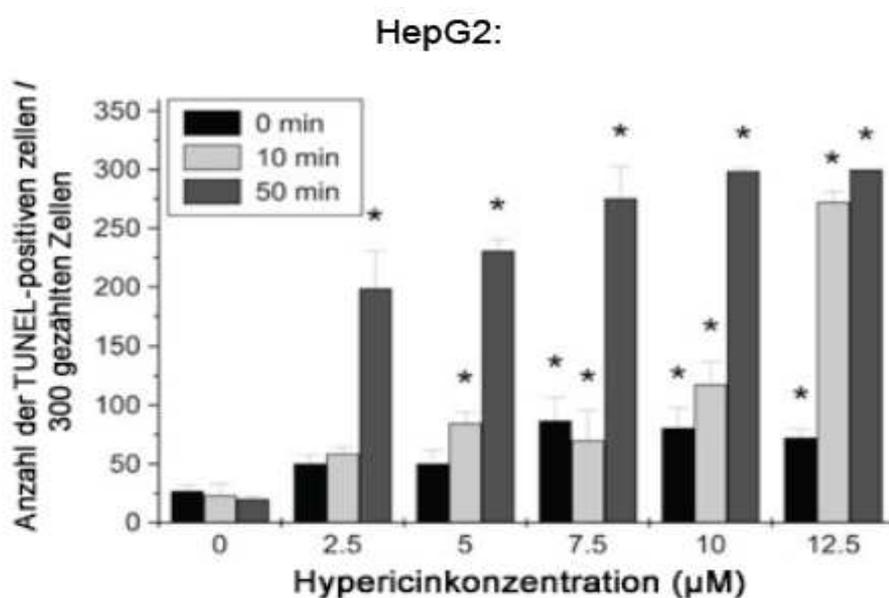


Abbildung 21: Anzahl der apoptotischen Zellen nach PDT mit Hypericin in steigender Konzentration bei HepG2 (TUNEL), (* = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe)

3.6 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann man sagen, dass alle Tumorzelllinien den Photosensibilisator aufnehmen. Die quantitative Bewertung durch die FACS-Analyse veranschaulichte zudem, dass auch die Fluoreszenzintensität mit ansteigender Hypericinkonzentration zunimmt.

Die Hypericinapplikation ohne Lichtexposition erzeugt keinerlei Effekt bei den Tumorzellen, während die Kombination von Hypericin und Belichtung das vollständige Verschwinden von vitalen Zellen bewirkt. Durch den entstandenen photodynamischen Effekt nehmen die Anzahl der Zellproliferationen ab, sowie die Anzahl der apoptotischen Zellen zu. Demnach besitzt Hypericin ein ausreichendes Potential zur in-vitro Photodynamischen Therapie bei Zellen des Hepatoblastoms und kindlichen Hepatozellulären Karzinoms.

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Diskussion

Lebertumoren machen 0,2-5,8% aller malignen Erkrankungen im Kindesalter aus [141]. Hiervon ist das Hepatoblastom der häufigste maligne kindliche Lebertumor. Die Prognose bei Patienten mit bereits fortgeschrittenen Tumorstadien ist noch immer ernüchternd. Die Therapiemöglichkeiten sind limitiert auf die vollständige chirurgische Resektion und begleitende Chemotherapie [47]. Verschiedene Studien zeigen allerdings auch, dass eine Heilung der Hepatoblastome durch die alleinige Gabe von Chemotherapeutika nicht zu erreichen ist [48].

Die Radiotherapie erzielt auch in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika bei der Behandlung des Hepatoblastoms keinen kurativen Ansatz. Zusätzlich mindert die Radiotherapie die Regenerationsfähigkeit der Leber nach chirurgischer Resektion [41].

Das Hepatozelluläre Karzinom bei Kindern ist extrem selten und mit einer sehr schlechten Prognose verbunden. Der Tumor ist kaum chemosensitiv und auch die Radiotherapie hat keinerlei Einfluss auf das Überleben der Patienten. Die vollständige chirurgische Tumorsektion ist Voraussetzung für das Überleben der Patienten und damit der prognostisch wichtigste Faktor [119].

Eine Verbesserung der chirurgischen Therapie für fortgeschrittene Hepatoblastome und Hepatozelluläre Karzinome ist kaum mehr möglich, da bereits heute Extrem-Resektionen, teilweise unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine, sowie Lebertransplantationen vorgenommen werden. Die Tumoren sind oft auch nach mehreren Chemotherapiezyklen nicht vollständig resektabel und zeigen eine hohe Rezidivquote. Die Lebertransplantation bringt rezidivfreie Überlebensraten in der Größenordnung von bis zu 80% [111]. Dennoch ist die Lebertransplantation noch immer ein risikoreicher Eingriff, der ebenfalls mit erheblicher Morbidität assoziiert sein kann [106].

Derzeit sind verschiedene neue therapeutische und diagnostische Ansätze in der Untersuchung, um eine Verbesserung der Prognose zu erzielen. In diesem Sinne kommt der Erforschung alternativer Behandlungsmethoden, wie der Photodynamische Therapie mit Hypericin besondere Bedeutung zu.

Die Photodynamische Therapie wird heutzutage bereits zur Behandlung zahlreicher Tumorarten verwendet. Ein viel versprechender Photosensibilisator ist das Hypericin, ein Extrakt aus dem Johanneskraut, welches hauptsächlich in Europa und Asien vorkommt [66].

Der photodynamische Effekt von Hypericin wurde erstmals 1939 von *Brockmann et al.* beschrieben. Dort beschrieb er eine „Lichtkrankheit“, die vorwiegend bei Schafen und Pferden auftrat, nachdem diese Johanniskraut gefressen hatten und gleichzeitig dem Sonnenlicht ausgesetzt waren. Die dort beobachtete Wirkung wurde als „Hypericismus“ bezeichnet [16].

Das Interesse an der Pflanze *Hypericum perforatum* lag aber lange Zeit vorwiegend in seiner antidepressiven und antiviralen Wirkweise begründet [171]. Daher rückten die Erkenntnisse über den photodynamischen Effekt etwas in den Hintergrund. Heute werden Hypericin-Präparate zur PDT bei verschiedensten Tumorarten eingesetzt, wie beispielsweise bei Blasentumoren [69], Kolontumoren [154], Glioblastomen [137], Nasopharynx-Karzinomen [183] und Rhabdomyosarkomen [144]. Neben dem photodynamischen Effekt von Hypericin, kann der Photosensibilisator auch genutzt werden für die in-vivo Visualisierung von Tumorzellen. Viel versprechende Ergebnisse wurden beschrieben in der zystoskopischen Diagnostik von Blasenkarzinomen [66]. Des Weiteren dient Hypericin auch zur ex vivo Detektion durch eine Urin-Zytology, welche somit eine nicht invasive Diagnostik des Blasenkarzinoms ermöglicht [45].

4.2 Diskussion der eigenen Ergebnisse

In unserer Studie untersuchten wir die Hypericin induzierte PDT an Zelllinien des Hepatoblastoms (HepT1, HUH6), sowie kindlichen Hepatozellulären Karzinoms (HepG2). Es konnte veranschaulicht werden, dass Hypericin

abhängig von der applizierten Dosis vollständig von den Tumorzellen aufgenommen wird. Bei der durchgeführten Fluoreszenzmikroskopie erscheint eine deutliche Rotfärbung des Zytoplasmas bei allen Zelllinien. Die quantitative Bewertung durch die FACS-Analyse zeigte zudem, dass auch die Fluoreszenzintensität mit ansteigender Hypericinkonzentration zunimmt. Des Weiteren variiert die Fluoreszenzintensität zwischen den verwendeten Zelllinien, ein Grund hierfür könnte die unterschiedliche Zellgröße sein. Da sich bei größeren Zellen das applizierte Hypericin auf ein größeres Areal verteilt, erscheint die Fluoreszenzintensität schwächer als bei kleineren Tumorzellen. Eine vollständige Hypericinaufnahme ist essentiell für eine effektive PDT, genauso wie für eine mögliche Visualisierung der Tumorzellen.

Außer der Fähigkeit von Hypericin zur Zellvisualisierung untersuchten wir auch seine zytotoxische Wirkung. Photoaktiviertes Hypericin verursacht große Veränderungen in der Zellmorphologie, was bis hin zur vollständigen Zerstörung der Tumorzellen führt. Diese Tumorzellzerstörung wurde in unserer Studie zum einen durch Lichtmikroskopie, anhand morphologischer Veränderungen, als auch durch den TUNEL-Test nachgewiesen. Die Sensitivität dieser Methode gilt als sehr hoch. Er basiert auf dem Einbau spezifischer markierter Nucleotidderivate an freie 3'-OH-Enden von DNA-Strangbrüchen. Diese können unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Ein Hauptvorteil liegt darin, dass bereits in einem sehr frühen Apoptose-Stadium DNA-Strangbrüche dargestellt werden können [46]. Der TUNEL-Test ist die einzige Methode, mit der Apoptose in jeder Phase nachgewiesen werden kann. Noch bevor sich lichtmikroskopisch morphologische Veränderungen zeigen, sind bereits die Strangbrüche darstellbar [133].

Trotz seiner hohen Sensitivität wird der TUNEL-Test auch kontrovers diskutiert, da apoptotische Zellen nicht spezifisch markiert werden. DNA-Strangbrüche sind nicht nur in apoptotischen Zellen vorhanden, sondern kommen auch in nekrotischen Zellen vor. Was in unserer Studie keinen Einfluss auf das

Ergebnis hat, da jede Tumorzellerstörung entscheidend ist, egal ob durch Nekrose oder Apoptose verursacht.

Bei allen Tumorzelllinien nahm mit steigender Hypericinkonzentration und zunehmender Belichtungszeit die Anzahl der zerstörten Zellen zu, bis nur noch zerstörte Tumorzellen gefunden wurden. Im Gegensatz zu den Beobachtungen beim TUNEL-Test, zeigte sich bei der Ki-67 Immunzytochemie nur eine reduzierte Proliferationsaktivität, aber kein vollständiges Verschwinden der proliferativen Tumorzellen. Dies könnte an der applizierten Dosis liegen. Für die in-vivo Verwendung von photoaktiviertem Hypericin wären dann, um die vollständige Proliferationsaktivität zu hemmen, höhere Dosen erforderlich.

Interessanterweise verursacht die Applikation des Photosensibilisators Hypericin ohne Lichtexposition sogar ein Ansteigen der Tumorzellviabilität. Ein Grund hierfür könnte die Fähigkeit des Hypericin sein, den Proteasom-Komplex zu inhibieren [113]. Chen and Regan zeigten das Proteasominhibitoren einen protektiven Effekt auf Zellen haben können, was in einer wachsenden Zellviabilität resultiert [27]. Nach stattgehabter Lichtexposition wird dieser Effekt nicht mehr gefunden und es kommt durch die PDT zur signifikanten Reduktion der Tumorzellvitalität. Bei höheren Hypericinkonzentrationen (12,5 μM) und längerer Belichtungszeit (50 min) zeigt sich bei den Hepatoblastomzelllinien ein vollständiges Verschwinden der Tumorzellen. Beim Hepatozellulären Karzinom benötigten wir insgesamt geringere Dosen und kürzere Belichtungszeiten, was am biologischen Verhalten dieser Tumorzelllinie liegen könnte.

4.3 PDT-Wirkung beeinflussende Faktoren

Das Ziel jeder PDT bei der Krebsbehandlung ist die völlige Abtötung der Tumorzellen. Zusätzlich zur direkten Tumorzellerstörung durch Induktion von Apoptose und Nekrose haben noch andere Prozesse Einfluss auf die Effektivität des Verfahrens. Als erstes wäre hier der verursachte Schaden an den Versorgungsgefäßen des Tumors zu nennen. In-vivo Studien zeigen eine

biphasische Gefäßreaktion, bei der die erste Reaktion die Vasokonstriktion ist. Nach etwa drei Stunden folgt dann die Thrombusbildung. Dieser Effekt hemmt das weitere Tumorwachstum und führt zu einer Art Tumorinfarkt durch den entstehenden Sauerstoffmangel [25, 34].

Im Gegensatz dazu wird allerdings bei unvollständiger Tumornekrose durch freiwerdende Cytokine vermehrt VEGF (vascular endothelial growth factor) und COX-2 (Cyclooxygenase) produziert. Beide Faktoren wirken steigernd auf die Angiogenese und versorgen somit den Tumor mit neuen Gefäßen [25, 34].

Andere Untersuchungen zeigen eine Anregung der körpereigenen Immunreaktion auf die durch Zellnekrose und Apoptose frei werdenden Tumorantigene. Es kommt zur Infiltration von Lymphozyten, Leukozyten und Makrophagen in das behandelte Gewebe. Dies weist auf die Aktivierung einer spezifischen Immunantwort hin [58]. Als erstes werden die Tumorzellen zerstört, dann werden die zellulären Fragmente durch Makrophagen und dendritischen Zellen phagozytiert. Diese fungieren als antigen-präsentierende Zellen und werden von den T-Lymphozyten erkannt. Dies führt zur Aktivierung einer tumorspezifischen Immunantwort. Die unterschiedliche Intensität der Entzündungsreaktion in normalem und tumorösem Gewebe kann auch ursächlich für den selektiven, PDT induzierten Gewebeschaden sein [25, 34, 43, 53]. Durch die PDT ausgelöste Akkumulation von Neutrophilen verlangsamt sich auch das Tumorwachstum. Korbelik et. al. berichteten bereits 1999, dass sich durch die PDT tumorspezifische Immunzellen produzieren lassen, die aus dem Lymphsystem im tumorfernen Gebiet mehrfach gewonnen werden konnten [74]. Im Gegensatz hierzu zeigte Von Vree, dass es durch die Verringerung der Neutrophilen bei tumortragenden Mäusen zu einem verminderten Effekt bei der PDT kommt [160].

Diese drei Hauptmechanismen (direkte Tumorzellzerstörung, Gefäßschädigung und Immunantwort) beeinflussen sich gegenseitig. Die Bedeutung jedes einzelnen ist determiniert durch den Photosensibilisator selbst, die Eigenschaften des Tumors und den immunologischen Status des Patienten. Für

eine optimale Tumorbehandlung ist die Kombination aller drei Antitumor-Mechanismen erforderlich [25].

Verschieden Gründe können diesen Effekt limitieren, wie z.B. eine nicht homogene Anreicherung des Photosensibilisators im Tumorgewebe [77] oder die eingeschränkte Verfügbarkeit von Sauerstoff [32].

Interessanterweise reichern sich die photosensibilisierenden Stoffe, wie Hypericin stärker im tumorösen Gewebe an, als im umgebenden Normalgewebe [3, 57, 59, 144]. Auch der durch die PDT assoziierte cytotoxische Effekt ist in Tumorzellen stärker ausgeprägt als in normalen Zellen. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass es sich bei der Hypericin-induzierten PDT um einen stark tumoraffinen Prozess handelt [144]. Der exakte Mechanismus für diesen Effekt ist nicht vollständig geklärt, aber man geht davon aus, dass die modulierte Biologie und Physiologie der Tumorzelle eine Rolle spielt. Dazu zählen zum Beispiel die schwache Lymphdrainage, niedrigerer pH und höhere Anzahl an Rezeptoren für das Low-Density Lipoprotein [11, 36]. Durch die gesteigerte Anreicherung des Photosensibilisators wird eine gezielte Apoptoseinduktion im Tumorgewebe erst möglich [107].

Ein weiterer wichtiger Faktor ist das Vorhandensein von Sauerstoff, welcher unerlässlich ist für die zytotoxische Wirkung der PDT [32, 153]. Allein die Reduktion des Sauerstoffs führt zur Verminderung des photodynamischen Effekts. Ein Sauerstoffmangel tritt sowohl durch seinen Verbrauch bei der Produktion von freien Sauerstoffradikalen, als auch durch die Schädigung der tumorversorgenden Gefäße auf. Um die Sauerstoffausschöpfung zu reduzieren muß in diesem Fall die Lichtexposition vermindert werden oder eine Reoxygenierung erfolgen [125].

4.4 Intrazelluläre Lokalisation von Hypericin

Die intrazelluläre Aufnahme und Verteilung von Hypericin ist von äußerster Wichtigkeit für die zytotoxischen Mechanismen. Vor allem im Hinblick darauf,

dass der Wirkradius der PDT nur 20 nm beträgt [100]. Der Ort des oxidativen Schadens ist demnach durch die Lokalisation des PS, zur Zeit der Belichtung definiert.

Die zelluläre Aufnahme von Hypericin erfolgt hauptsächlich über Diffusion, aber auch membranassoziierte Translokationsprozesse tragen zur Aufnahme bei [153, 176]. Durch das Lösen von Hypericin in einem serumhaltigen Medium bildet sich ein Hypericin-Serum-Komplex aus, der sich an die Plasmamembran anheftet bzw. diese überwinden kann [98]. Die Aufnahme ins Zytoplasma erfolgt entweder über Pinozytose oder durch Lösen der Plasmamembranlipidschicht. Die spätere intrazelluläre Aufnahme von Hypericin in die Zellorganellen erfolgt sowohl über aktive, als auch über passive Transportwege [158]. Durch den Transport über die Pinozytose erfolgt die Aufnahme von Hypericin in Endozytosevesikel, die das Hypericin beispielsweise zum endoplasmatischen Retikulum oder zu den Mitochondrien transportieren [146]. Die intrazelluläre Lokalisation von Hypericin ist von vielen Parametern abhängig und führt daher zu einer kontroversen Diskussion in der Literatur [83].

Eine Co-Lokalisation mit α -Tubulin in HeLa-Zellen konnte durch *Piette et al.* festgestellt werden, wohingegen *Ali et al.* nach 15 minütiger Inkubation eine Akkumulation von Hypericin im Zytoplasma von Nasopharyngeal-Carcinom-Zellen nachwies [6, 122].

Eine überwiegende Einlagerung von Hypericin in die membranösen Organellen, wie Golgiapparat, endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien und Lysosomen, wurde von *Agostinis et al.* beobachtet [3]. *Uzdensky et al.* wies bei drei unterschiedlichen Tumorzelllinien ebenfalls eine Lokalisation im ER, Golgi und der Zellkernhülle nach [157]. Bei *Miskovsky* hingegen wird nach vierstündiger Inkubationszeit eine Akkumulation im Zellkern beschrieben [98].

Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen wurde ebenfalls festgestellt, dass durch die phototoxische Wirkung Ca^{2+} in diesen Organellen freigesetzt wird. Diese Erkenntnis deutet auf eine Inaktivierung der Ca^{2+} -ATPase2 des endoplasmatischen Retikulums hin, verbunden mit einer Störung der Ca^{2+} -Homöostase und nachfolgendem Zelltod [20].

4.5 Klinische Relevanz

Eine mögliche klinische Relevanz hätte die Hypericin induzierte PDT vor allem durch die Möglichkeit der intraoperativen Visualisierung von Tumorzellen, sowie die lokale PDT im Resektionsbereich. Durch die bei der PDT entstehende Fluoreszenz wäre das Untersuchungsfeld genau abgrenzbar. Wagniers et al. bezeichneten die Photodynamische Diagnostik als eine Art optische Biopsie, um das maligne Gewebe zu identifizieren [173]. Dies wäre zum einen von Nutzen, um intraoperativ Tumorränder oder Tumorreste darzustellen. Andererseits könnte bei schwierigen anatomischen Regionen wie der Pfortader eine zusätzliche Resektionsrandbestrahlung erfolgen.

Das Ziel der PDT bei direkter Applikation des Hypericins auf die Resektionsränder und nachfolgender Bestrahlung durch Licht wäre hierbei mikroskopische Tumorreste zu zerstören und so das Risiko für Rezidive zu verringern.

Durch den technischen Fortschritt der Laser und Lichtleitertechnik sind innere Organe für Licht leichter erreichbar. Durch den Einsatz von modernen Fiberoptiken und verschiedenen Typen von Endoskopen, die das Licht präzise auf den gewünschten Zielbereich richten, kann die PDT auch als minimal invasive Therapie angewandt werden [19, 159]. Einschränkend hierbei wäre jedoch der fehlende Sauerstoff, der für die Wirksamkeit dieser Methode notwendig ist.

Die Hypericin induzierte PDT zeichnet sich nicht nur durch ihre einfache, nicht-invasive, zielsichere Anwendung aus, sondern auch durch eine geringe körperliche Belastung des Patienten [132]. Photoaktiviertes Hypericin wird klinisch bereits bei verschiedenen Tumorarten wie beispielsweise dem Blasenkarzinom angewandt, ohne dass hier größere Nebenwirkungen beschrieben wurden [68]. Die einzige zu nennende Nebenwirkung ist die nach Lichtexposition auftretende Photodermatitis. Sie kann einige Wochen bis zu 3 Monaten anhalten [53] und wird nur bei höheren Konzentrationen erwartet [156]. Die erforderliche Hypericindosis für eine effektive PDT ist um ein

vielfaches geringer, als beispielsweise bei der antidepressiven Therapie [84]. Daneben existiert für Hypericin keine Dosislimitierung, was die mehrmalige Applikation des Photosensibilisators im selben Tumor ermöglicht [23]. Da die Anreicherung lokal begrenzt ist, treten keine Schädigungen im umgebenden gesunden Gewebe auf [22]. Der Radius in dem der aktivierte Photosensibilisator wirken kann, liegt etwa in der Größenordnung von 20nm [23, 100]. Zusätzlich vermindert auch die kurze Halbwertszeit der zytotoxischen Verbindung den schädlichen Effekt [19].

Allerdings weist die Therapie mit photoaktiviertem Hypericin noch Grenzen auf, wie bei der Behandlung von fortgeschrittenen, bereits ausgebreiteten Krankheiten, da die Bestrahlung des ganzen Körpers mit unterschiedlichen Dosen nicht möglich ist. In diesem Fall könnte die PDT nur die Lebensqualität verbessern und das Überleben verlängern [19].

4.6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann man sagen, dass Hypericin ein geeigneter Photosensibilisator ist zur Diagnostik und photodynamischen Therapie bei Zellen des Hepatoblastoms sowie Hepatozellulären Karzinoms. Bei beiden Tumorarten konnte ein deutlicher photodynamischer Effekt erzielt werden und die entstandene Fluoreszenz war ausreichend für eine Visualisierung der Tumorzellen. Nun sind weitere in vivo Studien erforderlich, um die in vivo Fähigkeiten von photoaktiviertem Hypericin bei kindlichen Lebertumoren näher zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren hat die Photodynamische Therapie in unterschiedlichen Bereichen der Medizin an Bedeutung gewonnen. Diese Entwicklung wird u. a. durch die Herstellung und Anwendung von neuen, auf Naturstoffgrundlage basierenden Photosensibilisatoren ermöglicht. Hypericin, gewonnen aus dem Johanneskraut (*Hypericum perforatum*), zählt zu dieser Gruppe.

Beim Hepatoblastom und Hepatozellulären Karzinom handelt es sich um epitheliale Lebertumore, die über 90% aller kindlichen hepatischen Malignome darstellen. Den wichtigsten prognostischen Faktor für das Überleben der Patienten stellt die vollständige chirurgische Resektion des Tumors dar. Für die Therapie von multifokalen Tumoren bestehen daher noch ungelöste Probleme, so dass der Erforschung alternativer Therapiestrategien besondere Bedeutung zukommt.

Einen neuen Ansatz könnte die Photodynamische Therapie mit photoaktiviertem Hypericin darstellen. Es wurde bereits in mehreren Studien bei den verschiedensten Tumorarten erfolgreich als kurative Therapieoption eingesetzt.

Aufgrund dieser Erfahrungen ist die Möglichkeit der PDT auch für die Behandlung von kindlichen Lebertumoren von potentiell Interesse.

Der Grundgedanke dieser Studie war die Entwicklung der wissenschaftlichen Grundlagen für eine photodynamische Behandlung mit Hypericin bei kindlichen Lebertumoren, mit dem Ziel die Prognose zu verbessern, den chirurgischen Eingriff zu vereinfachen und eine R0 – Resektionen zu ermöglichen.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist daher zum einen die Untersuchung in wie weit Hypericin von den Hepatoblastomzelllinien (HepT1, HUH6), sowie Zellen des kindlichen Hepatozellulären Karzinoms (HepG2) aufgenommen wird und damit zur Tumorvisualisierung geeignet ist, sowie die Untersuchung der in vitro Effekte von photoaktiviertem Hypericin bei den Zelllinien.

Anhand verschiedener Versuche, konnte gezeigt werden, dass die Hypericinapplikation ohne weitere Lichtexposition keinerlei Zellreduktion

erzeugt, während die Kombination von Hypericin und Belichtung das vollständige Verschwinden von vitalen Zellen bewirkt. Es wurde durch die Ki-67 Immunzytochemie und dem TUNEL-Test veranschaulicht, dass durch den entstandenen photodynamischen Effekt die Anzahl der Zellproliferationen abnimmt, während die Anzahl der apoptotischen Zellen zunimmt. Demnach besitzt Hypericin ein ausreichendes Potential zur in vitro Photodynamischen Therapie bei Zellen des Hepatoblastoms und kindlichen Hepatozellulären Karzinoms. Des Weiteren ist Hypericin auch zur Tumorvisualisierung geeignet, da alle Tumorzelllinien den Photosensibilisator vollständig aufnehmen. Die quantitative Bewertung durch die FACS-Analyse veranschaulichte zudem, dass auch die Fluoreszenzintensität mit ansteigender Hypericinkonzentration zunimmt.

Die von uns durchgeführten Versuche ergeben die Grundlagen für neue therapeutische, sowie diagnostische Möglichkeiten in der Behandlung von kindlichen Lebertumoren. Möglicher klinischer Einsatz wäre die Übertragung auf die intraoperative Situation im Operationssaal, in welchem durch weißes Licht eine suffiziente Tumorzellvisualisierung sowie photodynamische Therapie erzielt werden könnte.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Abb.	Abbildung
AFP	Alpha-Fetoprotein
AK	Antikörper
ALA	Aminolevulinacid
ANOVA	Analysis of Variance
APC	Tumorsuppressorgen (adenomatous polyposis coli)
β -HCG	beta-humanes Choriongonadotropin
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
Ca^{2+}	Kalzium
Dapi	4.6 Diamidino-1-phenylindol-Dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
et al.	et alii (und andere)
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting (Durchflußzytometrie)
FCS	Fetales Kälberserum
FDG	F18-Fluoro-Deoxy-Glucose
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HB	Hepatoblastom
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HEPES	Hydroxy-Ethyl-Piperazin-Ethan-Sulfansäure
HLM	Herz-Lungen-Maschine

IL-6	Interleukin -6
IU	international Unit
kDa	Kilodalton
LOH	Loss of Heterozygosity
MDR	Multi-Drug-Resistance
MEM	Minimal Essential Medium
MFI	Mean fluorescence index
ml	Milliliter
mg	Milligramm
MTT	3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NPC-Zellen	Nasopharyngeal Carcinoma-Zellen
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDD	Photodynamische Diagnostik
PDT	Photodynamische Therapie
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
P-gp	P-Glykoprotein
PRETEXT	pretreatment extent of disease
PS	Photosensibilisator
SIOP	Société Internationale d`Oncologie Pédiatrique
TNM	Tumor-Node-Metastasis (Tumorstaging)
TPO	Thrombopoietin
VP16	Zytostatikum, Synonym:Etoposid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	PRETEXT Stagingsystem (aus Aronson 2005).....	6
Abbildung 2:	Graphische Darstellung der photophysikalischen und photochemischen Prozesse der PDT (aus Castano 2004).....	19
Abbildung 3:	Blüte des Johanneskrauts (aus Kamuhabwa 2004).....	23
Abbildung 4:	Strukturformel des Hypericin (aus Miskovsky 2002)	23
Abbildung 5:	HepT1-Zellen (HE, 40x).....	26
Abbildung 6:	HUH6-Zellen (HE, 40x).....	27
Abbildung 7:	HepG2-Zellen (HE, 40x).....	28
Abbildung 8:	Befüllungsschema der Chamber Slides (8 Well-Platte)	36
Abbildung 9:	Befüllungsschema der 96-Well-Platte	38
Abbildung 10:	Aufnahme von Hypericin in die Tumorzellen (Immunfluoreszenz, 20x)	44
Abbildung 11:	Zytosolische Anreicherung von Hypericin in die Tumorzellen.....	45
Abbildung 12:	Quantitative Hypericinaufnahme in die Tumorzellen (FACS-Analyse,.....	46
Abbildung 13:	Einfluss der Photodynamischen Therapie mit Hypericin auf die Zelllinie HepG2 (* = p < 0,05 vs. Kontrollgruppe).....	48
Abbildung 14:	Einfluss der Photodynamischen Therapie mit Hypericin auf die Zelllinie HepT1 (* = p < 0,05 vs. Kontrollgruppe).....	49
Abbildung 15:	Einfluss der Photodynamischen Therapie mit Hypericin auf die Zelllinie HUH6 (* = p < 0,05 vs. Kontrollgruppe).....	50
Abbildung 16:	(Ki-67 Immunfluoreszenz, 20x) Zellen, die sich in der Proliferationsphase befinden, weisen eine ausgeprägte Grünfärbung auf	51
Abbildung 17:	Proliferierende Zellen nach Inkubation mit 5 µM Hypericin und Lichtexposition von 0, 20, 50 min (Ki-67-Assay, * = p < 0,05 vs. Kontrollgruppe)	53
Abbildung 18:	Apoptose in Tumorzellen nach PDT mit Hypericin, apoptotische Zellen erscheinen grün (TUNEL, 40x).....	54
Abbildung 19:	Anzahl der apoptotischen Zellen nach PDT mit Hypericin in steigender Konzentration bei HepT1 (TUNEL), (* = p < 0,05 vs. Kontrollgruppe)	56
Abbildung 20:	Anzahl der apoptotischen Zellen nach PDT mit Hypericin in steigender Konzentration bei HUH6 (TUNEL), (* = p < 0,05 vs. Kontrollgruppe)	57
Abbildung 21:	Anzahl der apoptotischen Zellen nach PDT mit Hypericin in steigender Konzentration bei HepG2 (TUNEL), (* = p < 0,05 vs. Kontrollgruppe).....	57

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Maligne kindliche Lebertumoren, Altersverteilung in westlichen Ländern (modifiziert nach von Schweinitz 2006)	3
Tabelle 2:	Postoperatives Stagingssystem der COG und GPOH (modifiziert nach von Schweinitz 2006)	7
Tabelle 3:	tumorfremie Überlebensrate in Prozent bei HB 89 und HB94 in Abhängigkeit vom Stadium (modifiziert nach von Schweinitz 1995, Fuchs 2002)	13
Tabelle 4:	Belichtungszeiten für die Fluoreszenzmikroskopie	33
Tabelle 5:	Anzahl der in Proliferationsphase befindlichen Zellen.....	52
Tabelle 6:	Anzahl der apoptotischen Zellen nach PDT mit Hypericin (50 min, TUNEL)	55

6.4 Materialien

6.4.1 Geräte und Einmalmaterialien

Folgende Geräte wurden für die Versuche verwendet:

<u>Material</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Combitips plus (0,5ml)	Eppendorf Biopur
Dakopen	Dako Cytomation
Deckgläser	Menzel
FACS Canto™ II	Becton Dickinson Labware
FACS-Röhrchen (Falcon® 5ml)	Becton Dickinson Labware
FACSDiva Software	Becton Dickinson Labware
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Handschuhe	Kimberly-Clark
Inkubator	Heraeus
Kühlschrank	Bosch
Lampe, 1000 Lux	Osram
Lichtmikroskop	Leitz
Mikroliterpipetten	Eppendorf
Neubauer-Zählkammer	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Objektträger	Fa. R. Langenbrinck
Pasteurpipetten (steril)	WU Mainz
Petrischalen 100x20mm	Sarstedt
Petrischalen 35x10mm (Cellstar)	Greiner
Petrischalen 35x10mm	Sarstedt
Pipettierhilfe	IBS Integra Biosciences
Pipettenspitzen	Sarstedt
Photometer Spectra Mini	Tecan
Probengefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner
Stabpipette (5 ml, 10ml, 25ml)	Falcon
Sterile Werkbank	Heraeus, Lamin Air
Tischzentrifuge	Hettich Rotixa
Vortexer	Fa. Neo Lab

6-Well-Platten (Culture Slides)	Becton Dickinson Labware
8-Well-Platten (Culture Slides)	Becton Dickinson Labware
96-Well-Platten	Becton Dickinson Labware

6.4.2 Reagenzien

Folgende Reagenzien wurden für die Versuche verwendet:

<u>Substanzen</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Ampuwa	Fresenius
DePeX	Serva
Destilliertes Wasser	Glaxo Smith Kline GmbH & Co.KG
DNase I	Roche Diagnostics GmbH
Dulbecco`s MEM	Biochrom AG
DMSO	AppliChem
Eosin G	Fa. Merck
EZ4U	Biomedica
Foetal Calves Serum (FCS)	Biochrom AG
Formaldehydlösung 4,5%	Carl Roth GmbH & Co.
Goat Serum	Fa. Dako Cytomation
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hepes-Puffer	Gibco™
Hypericin	Phytochem GbRmbH
In situ Cell Death Detection Kit (Enthält: - Enzyme solution (TdT) - Label solution (fluorescein-dUTP) - TdT buffer II)	Medical & Biological Lab.
L-Glutamin	Biochrom AG
Mounting Medium	Fa. Dako Cytomation
PBS-Dulbecco	Biochrom AG
Trypsin/ EDTA-Solution	PAA Laboratories GmbH
Tryptanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Xylol	Fa. Merck

6.4.3 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für die Versuche verwendet:

<u>Antikörper</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Monoklonaler Antihumanclon MIB1, Ki67 Antigen der Spezies Maus	Fa. Dako Cytomation
Anti Mouse Antikörper, FITC konjugiert der Spezies Ziege	Immuno Research Jackson Lab.

6.4.4 Hypericin-Stammlösung

Herstellung der Hypericin-Stammlösung: → 1 mM Hypericin-Pulver gelöst in 1ml DMSO.

6.4.5 Medien

Dulbecco`s MEM: → w 3,7 g/l NaHCO₃
w 1,0 g/l D-Glucose
w/o L-Glutamin

Kulturmedium: → DMEM wird supplementiert mit:
10% FCS
1% L-Glutamin
2,5% Hapes-Puffer

Einfriermedium: → 70% DMEM wird supplementiert mit:
20% FCS
10% DMSO

6.5 Messdaten

6.5.1 Werte MTT-Assay

I. Zelllinie HepT1:

Belichtungs- zeit	Nummer Messung	Kontrolle			2,5µM			5,0µM		
		Messwert I	II	III	I	II	III	I	II	III
0 min	I	0,693	0,738	0,715	0,621	0,618	0,649	0,591	0,605	0,685
	II	1,720	1,526	1,161	1,622	1,845	1,544	1,135	1,187	1,161
	III	1,748	2,043	1,918	1,576	1,836	1,668	2,105	2,558	2,332
	IV	1,500	1,637	1,762	2,244	1,820	2,002	2,184	2,112	2,184
	V	0,979	0,923	1,036	1,033	1,143	1,217	0,993	1,139	1,119
	VI	1,288	1,362	1,210	1,454	1,272	1,523	1,342	1,595	1,559
	VII	1,615	1,630	1,657	1,437	1,451	1,388	1,434	1,532	1,430
10 min	I	0,635	0,577	0,580	0,582	0,629	0,679	0,634	0,588	0,656
	II	1,998	1,993	2,006	1,797	1,789	1,793	1,516	1,488	1,479
	III	0,773	0,687	0,856	0,542	0,566	0,591	0,641	0,780	0,930
	IV	2,336	2,185	2,486	1,556	1,859	1,922	1,596	1,557	1,781
	V	0,946	0,987	1,019	0,892	0,955	1,029	1,011	1,014	1,012
	VI	1,181	1,297	1,238	1,016	0,972	1,059	1,006	0,916	1,096
	VII	1,200	1,183	1,217	1,143	1,220	1,109	1,278	1,338	1,418
20 min	I	0,650	0,632	0,705	0,659	0,598	0,527	0,576	0,570	0,565
	II	1,919	1,813	2,026	1,714	2,022	1,777	1,731	1,926	1,868
	III	0,961	1,012	0,909	0,943	0,998	0,928	0,723	0,795	0,878
	IV	2,197	2,224	2,170	2,214	2,041	2,387	1,942	2,280	2,037
	V	0,791	0,813	0,810	0,776	0,735	0,791	0,732	0,638	0,685
	VI	1,419	1,422	1,533	1,204	1,260	1,148	0,841	0,854	0,828
	VII	1,423	1,375	1,459	1,265	1,485	1,362	1,224	1,350	1,288
30 min	I	0,637	0,628	0,650	0,595	0,590	0,605	0,512	0,665	0,621
	II	1,998	2,040	1,956	2,118	2,009	1,866	1,705	1,929	1,830
	III	1,691	1,781	1,600	1,068	1,045	1,057	0,810	0,803	0,817
	IV	1,936	1,717	1,725	1,769	1,604	1,682	1,432	1,329	1,457
	V	0,720	0,799	0,897	0,884	0,890	0,852	0,645	0,598	0,681
	VI	1,030	0,993	1,152	1,036	0,970	1,102	0,377	0,348	0,405
	VII	1,815	1,635	1,750	1,694	1,683	1,701	1,550	1,651	1,761
40 min	I	2,326	2,147	2,245	2,108	1,935	2,107	1,752	1,927	1,837
	II	1,238	1,289	1,180	1,086	1,071	1,105	0,511	0,595	0,588
	III	1,687	1,664	1,710	1,418	1,531	1,598	0,796	0,705	0,750
	IV	0,739	0,705	0,773	0,660	0,791	0,806	0,503	0,575	0,563
	V	1,561	1,717	1,761	1,158	1,094	1,223	0,457	0,454	0,471
	VI	1,494	1,489	1,509	1,423	1,718	1,495	1,074	1,413	1,243
50 min	I	1,686	1,705	1,700	1,407	1,544	1,479	0,511	0,542	0,526
	II	1,794	1,677	1,993	1,391	1,498	1,663	0,684	0,651	0,668
	III	0,953	0,931	0,975	0,873	0,951	0,912	0,604	0,675	0,640
	IV	1,915	1,914	1,916	0,837	0,802	0,917	0,355	0,376	0,333
	V	1,319	1,392	1,245	0,989	0,986	0,993	0,458	0,456	0,454

Belichtungs- zeit	Nummer Messung	7,5µM			10,0µM			12,5µM			Leerwert
		Messwert I	II	III	I	II	III	I	II	III	
0 min	I				0,566	0,626	0,643				0,539
	II				1,592	1,596	1,599				0,439
	III	1,849	2,016	2,016	2,186	1,998	2,373				0,405
	IV	2,046	1,914	1,898	1,626	1,879	1,762	1,941	2,054	2,126	0,486
	V	1,074	1,202	1,256	1,007	1,084	1,160	1,073	1,133	1,208	0,421
	VI	1,378	1,379	1,607	1,318	1,400	1,486	1,797	1,793	1,797	0,360
	VII	1,563	1,520	1,605	1,500	1,404	1,609	1,612	1,464	1,585	0,181
10 min	I				0,553	0,564	0,575				0,584
	II				0,996	0,853	1,139				0,428
	III	0,850	0,896	0,808	0,386	0,334	0,282				0,222
	IV	1,532	1,553	1,653	1,371	1,456	1,187	0,990	1,050	1,095	0,447
	V	0,784	0,803	0,728	0,543	0,558	0,602	0,480	0,522	0,518	0,537
	VI	0,678	0,771	0,730	0,386	0,434	0,411	0,333	0,313	0,320	0,358
	VII	1,380	1,261	1,139	1,136	1,054	1,130	0,941	1,139	1,041	0,228
20 min	I				0,556	0,548	0,583				0,544
	II				0,815	0,867	0,842				0,411
	III	0,495	0,568	0,532	0,214	0,280	0,256				0,191
	IV	1,549	1,636	1,593	0,759	0,777	0,757	0,589	0,686	0,730	0,475
	V	0,461	0,486	0,409	0,366	0,380	0,378	0,382	0,342	0,367	0,432
	VI	0,591	0,563	0,619	0,384	0,411	0,415	0,421	0,404	0,416	0,374
	VII	0,604	0,698	0,650	0,372	0,340	0,404	0,291	0,311	0,353	0,338
30 min	I				0,555	0,528	0,537				0,549
	II				0,748	0,639	0,857				0,422
	III	0,641	0,584	0,696	0,387	0,341	0,433				0,263
	IV	0,761	0,732	0,728	0,530	0,540	0,643	0,550	0,563	0,468	0,476
	V	0,428	0,472	0,470	0,406	0,449	0,434	0,441	0,426	0,426	0,439
	VI	0,237	0,285	0,333	0,451	0,440	0,462	0,314	0,327	0,302	0,400
	VII	1,071	1,070	1,071	0,452	0,449	0,456	0,459	0,508	0,464	0,393
40 min	I				0,716	0,637	0,794				0,437
	II	0,493	0,449	0,462	0,299	0,295	0,270				0,220
	III	0,531	0,476	0,584	0,412	0,411	0,415	0,353	0,348	0,367	0,324
	IV	0,384	0,391	0,404	0,384	0,363	0,376	0,392	0,364	0,354	0,350
	V	0,381	0,418	0,440	0,381	0,391	0,387	0,357	0,359	0,358	0,417
	VI	0,435	0,472	0,527	0,454	0,434	0,446	0,287	0,305	0,313	0,388
50 min	I	0,281	0,262	0,299	0,441	0,453	0,456				0,257
	II	0,441	0,442	0,521	0,418	0,467	0,521	0,452	0,442	0,440	0,487
	III	0,475	0,483	0,490	0,476	0,486	0,509	0,467	0,482	0,485	0,468
	IV	0,376	0,427	0,363	0,377	0,401	0,428	0,406	0,343	0,368	0,268
	V	0,496	0,473	0,469	0,205	0,235	0,234	0,211	0,235	0,223	0,234

II.Zelllinie HUH6:

Belichtungs- zeit	Nummer Meesung	Kontrolle			2,5µM			5,0µM		
		Messwert I	II	III	I	II	III	I	II	III
0 min	I	1,191	1,214	1,168	1,339	1,098	1,073	1,231	1,188	1,235
	II	0,498	0,541	0,481	0,424	0,507	0,493	0,465	0,498	0,501
	III	1,438	1,512	1,244	1,256	1,469	1,485	1,043	1,101	1,072
	IV	1,803	1,922	1,984	1,990	1,871	2,027	2,060	2,019	2,231
	V	0,991	0,994	0,988	0,991	1,041	0,989	1,031	0,935	0,910
	VI	0,823	0,792	0,853	1,107	1,083	1,059	1,146	1,141	1,185
	VII	0,878	0,844	0,832	0,708	0,648	0,738	0,701	0,736	0,757
10 min	I	1,330	1,270	1,106	1,523	1,243	1,368	1,267	1,182	1,225
	II	0,462	0,467	0,491	0,437	0,479	0,518	0,451	0,507	0,449
	III	0,887	1,055	0,918	0,571	0,508	0,633	0,554	0,561	0,554
	IV	1,571	1,594	1,719	1,618	1,773	1,738	1,396	1,439	1,481
	V	0,965	0,977	0,969	0,924	0,808	0,801	0,715	0,737	0,825
	VI	0,982	1,005	0,994	0,931	0,940	0,871	0,790	0,693	0,802
	VII	0,526	0,639	0,569	0,584	0,500	0,604	0,438	0,393	0,383
20 min	I	1,050	0,981	0,998	0,896	1,046	0,746	0,675	0,666	0,657
	II	0,493	0,441	0,476	0,466	0,450	0,505	0,475	0,450	0,438
	III	0,853	0,767	0,785	0,474	0,527	0,521	0,298	0,302	0,300
	IV	1,651	2,060	1,960	1,872	1,910	1,834	1,455	1,464	1,324
	V	0,828	0,865	0,810	0,769	0,860	0,679	0,434	0,410	0,457
	VI	1,302	1,066	1,186	0,884	0,911	0,857	0,592	0,535	0,526
	VII	0,609	0,675	0,642	0,656	0,732	0,673	0,511	0,447	0,456
30 min	I	1,383	1,382	1,379	0,714	0,711	0,745	0,604	0,647	0,572
	II	0,513	0,491	0,547	0,445	0,437	0,487	0,459	0,444	0,453
	III	1,025	0,902	1,110	0,821	0,817	0,986	0,583	0,521	0,459
	IV	1,733	1,940	1,823	1,830	1,876	1,853	1,650	1,661	1,585
	V	0,974	0,985	0,896	0,703	0,733	0,672	0,452	0,452	0,457
	VI	1,097	1,191	1,003	0,546	0,591	0,569	0,309	0,341	0,332
	VII	0,831	0,826	0,791	0,769	0,635	0,689	0,461	0,477	0,496
40 min	I	0,484	0,496	0,476	0,455	0,452	0,412	0,442	0,441	0,449
	II	1,117	0,966	0,951	0,695	0,604	0,730	0,340	0,363	0,352
	III	1,207	1,322	1,120	1,594	1,776	1,412	1,039	1,118	1,197
	IV	0,864	0,910	0,750	0,666	0,679	0,652	0,457	0,440	0,532
	V	1,232	1,166	1,297	0,691	0,624	0,758	0,545	0,595	0,513
	VI	0,674	0,615	0,686	0,506	0,421	0,467	0,353	0,388	0,352
50 min	I	1,310	1,931	2,088	0,888	0,862	0,835	0,513	0,525	0,501
	II	1,836	1,728	1,995	1,459	1,418	1,526	1,087	1,106	1,106
	III	1,278	1,278	1,272	0,634	0,624	0,644	0,567	0,473	0,513
	IV	1,741	1,575	1,639	0,574	0,604	0,633	0,512	0,488	0,464
	V	0,396	0,414	0,475	0,414	0,410	0,474	0,465	0,432	0,448

Belichtungs-zeit	Nummer Messung	7,5µM			10,0µM			12,5µM			Leerwert
		Messwert I	II	III	I	II	III	I	II	III	
0 min	I				1,162	1,219	1,135				0,539
	II				0,596	0,568	0,582				0,439
	III	1,184	1,203	1,194	0,902	0,811	0,857				0,405
	IV	1,868	2,273	2,110	1,949	2,018	1,939	1,669	2,065	1,949	0,486
	V	1,005	1,032	1,030	1,071	1,332	1,593	1,771	1,657	1,884	0,421
	VI	1,128	1,054	1,036	1,192	1,259	1,083	1,239	1,307	1,082	0,360
	VII	0,812	0,838	0,822	0,629	0,615	0,721	0,680	0,744	0,625	0,181
10 min	I				0,775	0,657	0,822				0,548
	II				0,410	0,451	0,445				0,428
	III	0,391	0,383	0,398	0,138	0,183	0,161				0,222
	IV	1,408	1,377	1,536	0,975	0,815	0,895	0,663	0,767	0,715	0,447
	V	0,573	0,546	0,592	0,526	0,470	0,481	0,484	0,467	0,477	0,537
	VI	0,534	0,550	0,518	0,349	0,361	0,355	0,310	0,290	0,329	0,358
	VII	0,358	0,359	0,351	0,354	0,326	0,310	0,326	0,305	0,362	0,228
20 min	I				0,579	0,561	0,570				0,544
	II				0,416	0,456	0,436				0,411
	III	0,269	0,245	0,221	0,175	0,177	0,193				0,191
	IV	1,766	1,428	1,655	1,046	0,933	1,044	0,799	0,853	0,868	0,475
	V	0,374	0,374	0,364	0,361	0,356	0,355	0,364	0,370	0,375	0,432
	VI	0,451	0,468	0,471	0,408	0,405	0,419	0,386	0,430	0,426	0,374
	VII	0,376	0,329	0,353	0,392	0,377	0,407	0,298	0,313	0,258	0,338
30 min	I				0,563	0,538	0,545				0,549
	II				0,460	0,454	0,434				0,422
	III	0,400	0,393	0,407	0,351	0,398	0,302				0,263
	IV	1,169	1,256	1,293	0,659	0,600	0,617	0,582	0,539	0,561	0,476
	V	0,455	0,452	0,457	0,455	0,425	0,429	0,442	0,441	0,443	0,439
	VI	0,315	0,327	0,339	0,384	0,417	0,351	0,356	0,368	0,343	0,400
	VII	0,434	0,418	0,440	0,423	0,416	0,419	0,405	0,407	0,340	0,393
40 min	I				0,445	0,474	0,455				0,437
	II	0,374	0,362	0,386	0,250	0,242	0,246				0,220
	III	0,704	0,719	0,688	0,523	0,527	0,547	0,391	0,325	0,457	0,324
	IV	0,411	0,408	0,442	0,372	0,421	0,424	0,372	0,364	0,377	0,350
	V	0,415	0,431	0,447	0,406	0,415	0,396	0,419	0,424	0,421	0,417
	VI	0,414	0,426	0,476	0,432	0,419	0,449	0,294	0,312	0,300	0,388
50 min	I	0,496	0,335	0,416	0,287	0,301	0,294				0,157
	II	0,701	0,696	0,809	0,526	0,558	0,543	0,490	0,516	0,453	0,487
	III	0,463	0,492	0,468	0,503	0,481	0,492	0,491	0,533	0,522	0,468
	IV	0,442	0,440	0,444	0,422	0,417	0,426	0,366	0,339	0,295	0,268
	V	0,450	0,422	0,399	0,365	0,348	0,340	0,223	0,226	0,215	0,234

III. Zelllinie HepG2:

Belichtungs- zeit	Nummer Messung	Kontrolle			2,5µM			5,0µM		
		Messwert I	II	III	I	II	III	I	II	III
0 min	I	0,893	0,922	1,052	0,830	0,929	0,953	0,903	0,897	0,843
	II	0,822	0,724	0,869	0,605	0,526	0,684	0,758	0,816	0,826
	III	0,666	0,596	0,631	0,732	0,696	0,631	0,611	0,708	0,609
	IV	1,261	1,320	1,195	1,447	1,445	1,273	1,411	1,506	1,474
	V	1,198	1,155	1,112	1,139	1,107	1,153	1,562	1,420	1,491
	VI	0,717	0,724	0,710	1,060	1,062	1,061	1,047	1,193	1,120
10 min	I	0,807	0,662	0,655	0,753	0,810	0,820	0,736	0,813	0,725
	II	0,830	0,892	0,912	0,715	0,746	0,776	0,839	0,989	0,914
	III	0,673	0,619	0,563	0,376	0,372	0,380	0,579	0,616	0,598
	IV	1,515	1,443	1,298	1,295	1,246	1,345	1,362	1,400	1,187
	V	Pilz								
	VI	0,678	0,656	0,732	0,858	0,961	0,910	0,647	0,652	0,642
	VII	0,688	0,711	0,719	0,668	0,682	0,654	0,600	0,579	0,510
20 min	I	0,764	0,699	0,741	0,790	0,765	0,678	0,748	0,797	0,727
	II	0,772	0,760	0,745	0,732	0,735	0,670	0,796	0,771	0,793
	III	0,294	0,343	0,244	0,278	0,312	0,346	0,303	0,330	0,347
	IV	1,356	1,392	1,370	1,444	1,325	1,278	1,294	1,439	1,367
	V	1,066	0,982	0,892	0,862	0,823	0,843	0,532	0,453	0,611
	VI	1,013	1,086	1,179	1,049	1,020	0,958	0,905	0,919	0,912
30 min	I	0,790	0,745	0,792	0,834	0,769	0,777	0,785	0,920	0,711
	II	0,930	0,830	0,842	0,827	0,726	0,792	0,846	0,757	0,668
	III	0,550	0,541	0,546	0,418	0,490	0,345	0,352	0,383	0,321
	IV	1,326	1,289	1,329	1,163	1,214	1,189	0,822	1,017	0,919
	V	0,990	0,931	0,884	0,700	0,678	0,689	0,408	0,434	0,406
	VI	1,056	1,031	1,101	0,961	1,003	0,930	0,721	0,692	0,813
40 min	I	0,793	0,808	0,778	0,828	0,854	0,867	0,629	0,722	0,698
	II	0,579	0,553	0,560	0,436	0,502	0,507	0,461	0,394	0,428
	III	0,807	0,813	0,833	1,008	1,076	1,064	0,692	0,602	0,647
	IV	1,117	1,061	1,111	0,802	0,708	0,704	0,439	0,429	0,459
	V	0,765	0,835	0,714	0,911	1,581	1,246	0,655	0,622	0,639
50min	I	0,596	0,438	0,517	0,500	0,429	0,465	0,413	0,348	0,432
	II	1,297	1,219	1,473	0,926	0,999	0,963	0,589	0,556	0,532
	III	1,102	1,255	1,145	0,459	0,510	0,485	0,427	0,429	0,428
	IV	0,310	0,317	0,324	0,596	0,679	0,513	0,381	0,374	0,378

Belichtungs-zeit	Nummer Messung	7,5µM			10,0µM			12,5µM			Leerwert
		Messwert I	II	III	I	II	III	I	II	III	
0 min	I				0,877	1,007	0,907				0,539
	II				0,713	0,779	0,746				0,439
	III	0,603	0,781	0,687	0,637	0,592	0,615				0,405
	IV	1,227	1,160	1,216	1,405	1,333	1,369	1,504	1,400	1,452	0,486
	V	1,273	1,305	1,336	1,071	1,029	0,987	0,902	0,971	0,833	0,360
	VI	1,198	1,006	1,102	0,914	0,897	0,930	0,668	0,559	0,614	0,181
10 min	I				0,715	0,702	0,727				0,548
	II				0,858	0,855	0,861				0,428
	III	0,464	0,419	0,373	0,218	0,286	0,293				0,222
	IV	1,592	1,386	1,281	1,034	1,187	1,021	0,712	0,731	0,693	0,447
	V										
	VI	0,594	0,576	0,611	0,542	0,510	0,459	0,420	0,438	0,401	0,358
	VII	0,617	0,637	0,657	0,606	0,569	0,540	0,407	0,434	0,459	0,228
20 min	I				0,711	0,669	0,603				0,544
	II				0,475	0,488	0,462				0,411
	III	0,352	0,354	0,356	0,237	0,236	0,238				0,191
	IV	0,860	0,873	0,846	0,509	0,432	0,456	0,490	0,457	0,442	0,475
	V	0,367	0,383	0,351	0,376	0,383	0,390	0,435	0,443	0,450	0,374
	VI	0,516	0,515	0,516	0,340	0,347	0,333	0,331	0,342	0,337	0,338
30 min	I				0,508	0,508	0,575				0,549
	II				0,442	0,480	0,488				0,422
	III	0,305	0,296	0,282	0,262	0,229	0,208				0,263
	IV	0,737	0,641	0,689	0,466	0,498	0,448	0,447	0,469	0,463	0,476
	V	0,357	0,369	0,344	0,324	0,323	0,297	0,359	0,378	0,369	0,400
	VI	0,565	0,532	0,549	0,455	0,466	0,429	0,367	0,360	0,352	0,393
40 min	I				0,454	0,513	0,467				0,437
	II	0,308	0,330	0,352	0,247	0,294	0,313				0,220
	III	0,430	0,441	0,385	0,481	0,464	0,447	0,290	0,291	0,288	0,324
	IV	0,438	0,388	0,382	0,428	0,422	0,384	0,412	0,400	0,361	0,417
	V	0,440	0,434	0,437	0,407	0,440	0,424	0,334	0,411	0,356	0,388
50min	I	0,371	0,340	0,339	0,277	0,292	0,243				0,157
	II	0,536	0,524	0,455	0,499	0,502	0,412	0,473	0,424	0,479	0,487
	III	0,398	0,397	0,419	0,294	0,303	0,311	0,287	0,278	0,295	0,268
	IV	0,433	0,398	0,416	0,395	0,389	0,392	0,280	0,277	0,274	0,234

6.5.2 Werte FACS-Analyse

HypericinKonz.	Messung	HUH6	HepT1	HepG2
0 μM	1	10,00	8,06	8,82
	2	9,89	7,99	8,50
	3	10,23	9,14	7,97
	Mittelwert	10,04	8,40	8,43
	Standardfehler	0,17	0,64	0,43
2,5 μM	1	117,57	33,38	83,54
	2	113,36	23,98	79,65
	3	120,43	31,37	81,25
	Mittelwert	117,12	29,58	81,48
	Standardfehler	3,56	4,95	1,96
5,0 μM	1	305,05	110,90	224,68
	2	312,29	103,83	208,29
	3	301,30	112,45	226,71
	Mittelwert	306,21	109,06	219,89
	Standardfehler	5,59	4,60	10,10
7,5 μM	1	361,90	242,16	351,56
	2	370,22	233,80	352,78
	3	372,43	240,65	332,04
	Mittelwert	368,18	238,87	345,46
	Standardfehler	5,55	4,46	11,64
10,0 μM	1	395,96	299,61	465,55
	2	402,38	302,50	489,92
	3	393,01	287,34	460,31
	Mittelwert	397,12	296,48	471,93
	Standardfehler	4,79	8,05	15,80
12,5 μM	1	697,83	437,14	562,34
	2	696,92	421,89	581,49
	3	684,09	440,8	560,37
	Mittelwert	692,95	433,28	568,07
	Standardfehler	7,68	10,03	11,67

7 Literaturverzeichnis

- [1] Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. (2001) The History of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 74:656-669.
- [2] Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Kamjanov I, Knowles BB. (1979) Controlled synthesis of HbsAg in a different human liver carcinoma-derived cell line. *Nature.* 282:615-616.
- [3] Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, Witte de PAM. (2002) Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J of Biochem & Cell Biol.* 34:221–241.
- [4] Agostinis P, Buytaert E, Breysens H, Hendrickx N. (2004) Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol.* 3:721-729.
- [5] Albrecht S, von Schweinitz D, Waha A, Kraus JA, von Deimling A, Pietsch T. (1994) Loss of maternal alleles on chromosome arm 11p in hepatoblastoma. *Cancer Res.* 54:5041-5044.
- [6] Ali SM, Olivo M. (2003) Mechanisms of action of phenanthroperylenequinones in photodynamic therapy (review) *Int J of Oncology.* 22:1181-1191.
- [7] Alles A, Alley K, Barrett JC, Buttyan R, Columbano A, Cope FO, Copelan EA, Duke RC, Farel PB, Gershenson LE et al. (1991) Apoptosis: a general comment. *FASEB J.* 5:2127-2128.
- [8] Aretz S, Koch A and Uhlhaas S et al. (2006) *Pediatric Blood Cancer.* 47:811–818.
- [9] Armengol C, Cairo S, Fabre M, Buendia MA. (2009) Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: The hepatoblastoma model. *Int J Biochem Cell Biol.* [Epub ahead of print]
- [10] Aronson DC, Schnater MJ, Staalman CR, Weverling GJ et al. (2005) Predictive value of the pretreatment extent of disease system in hepatoblastoma: results from the International Society of Pediatric Oncology Liver Tumor Study Group SIOPEL-1 study. *J Clin Oncol.* 23:1245-1252.
- [11] Barrett AJ, Kennedy JC, Jones RA et al. (1990) The effect of tissue and cellular pH on the selective biodistribution of porphyrin-type photochemotherapeutic agents: a volumetric titration study. *J Photochem Photobiol B.* 6:309-323.
- [12] Bhattacharya S, Lobo FD, Pai PK, Pai GK. (1998). Hepatic neoplasms in childhood - a clinicopathologic study. *Pediatr Surg Int.* 14:51-54.
- [13] Blank M, Mandel M, Hazan S, Keisari Y, and Lavie G. (2001) Anticancer activities of hypericin in the dark. *Photochem Photobiol.* 74:120-125.
- [14] Borgerson KL, Bretz JD, Baker JR. (1999) The Role of Fas-mediated Apoptosis in Thyroid Autoimmune Disease. *Autoimmunity.* 30:251-264.
- [15] Brenner R, Azbel V, Madhusoodanan S und Pawlowska M. (2000) Comparison of an extract of Hypericum (LI 160) and sertraline in the treatment of depression: a double blind randomized pilot study. *Clin Ther.* 22:411-419.
- [16] Brockmann H, Haschad NM, Maier K, Pohl F. (1939) Über das Hypericin, den photodynamisch wirksamen Farbstoff aus *Hypericum perforatum*. *Naturwissenschaften.* 27:550-555.

- [17] Brown J, Perilongo G, Shafford E, Keeling J, Pritchard J, Brock P, Dicks-Mireaux C, Phillips A, Vos A, Plaschkes J. (2000) Pretreatment prognostic factors for children with Hepatoblastoma- results from the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) Study SIOPEL 1. *Eu J Cancer*. 36:1418-1425.
- [18] Brown SB, Mellish KJ. (2001) Verteporfin: a milestone in ophthalmology and photodynamic therapy. *Expert Opin Pharmacother*. 2:351-361.
- [19] Brown SB, Brown EA, Walker I. (2004) The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The Lancet Oncology*. 5:497-508.
- [20] Buytaert E, Callewaert G, Hendrickx N, Scorrano L, Hartmann D, Missiaen L, Vandenhede JR, Heirman I, Grooten I, Agostinis P. (2006) Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB J*. 20:576-578.
- [21] Carpenter Fehr MJ, Kraus GA, Petrich JW. (1994) Chemiluminescent activation of the antiviral activity of hypericin: A molecular flashlight. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:12273-12277.
- [22] Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. (2004) Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 1:279-293.
- [23] Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. (2005) Mechanisms in photodynamic therapy: part two - cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2:1-23.
- [24] Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. (2005) Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2:91-106.
- [25] Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. (2006) Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 7:535-545.
- [26] Chen TC, Hsieh LL, Kuo TT. (1995) Absence of p53 gene mutation and infrequent overexpression of p53 protein in hepatoblastoma. *J Pathol*. 176:243-247.
- [27] Chen J and Regan RF. (2005) Increasing expression of heme oxygenase-1 by proteasome inhibition protects astrocytes from hememediated oxidative injury. *Curr Neurovasc Res* 2:189- 196.
- [28] Clatworthy HW, Schiller M, Grosfeld JL. (1974) Primary liver tumors in infancy and childhood. 41 cases variously treated. *Arch Surg*. 109:143-147.
- [29] Czauderna P. (2000) Adult type vs Childhood hepatocellular carcinoma-are they same or different lesions? Biology, natural, history, prognosis and treatment. *Med Pediatr Oncol*. 39:519-523.
- [30] Czauderna P, Mackinlay G, Perilongo G, Brown J, Shafford E, Aronson D, Pritchard J, Chapchap P, Keeling J, Plaschkes J and Otte JB. (2002) Liver Tumors Study Group of the International Society of Pediatric Oncology. *J Clin Oncol*. 20:2798-2804.
- [31] Czygan FC. (1993) „Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrautes“. *Phyther*. 14:272- 278.

- [32] Delaey EM, Vandenbergaeerde AI, Merlevede WJ, de Witte PA. (2000) Photocytotoxicity of Hypericin oxyc and hypoxic conditions. *J Photochem. Photobiol B.* 56:19-24.
- [33] Doi I. (1976) Establishment of a cell line and its clonal sublines from a patient with hepatoblastoma. *Jap J of Cancer Res.* 67:1-7.
- [34] Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. (2003) Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer.* 3:380-387.
- [35] Dominguez-Malgon H, Gaytan-Graham S. (2001) Hepatocellular carcinoma: an update. *Ultrastruct Pathol.* 25:497-516.
- [36] Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW et al. (1998) Photodynamic therapy. *J Nat Cancer Inst.* 90:889-905.
- [37] Douglass EC, Reynolds M, Finegold M et al. (1993) Cisplatin, Vincristin and Fluoracil therapy for hepatoblastoma. A pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 11:96-99.
- [38] Eichenmüller M, Gruner I, Hagl B, Häberle B, Müller-Höcker J, von Schweinitz D, Kappler R. (2009) Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth. *Hepatology.* 49:482-490.
- [39] Endo EG, Walton DS, Albert DM. (1996) Neonatal hepatoblastoma metastatic to the choroid and iris. *Arch Ophthalmol.* 114:757-761.
- [40] Evans AE, Land VJ, Newton WA, Randolph JG, Sather HN, Tefft M. (1982) Combination chemotherapy (vincristine, adriamycin, cyclophosphamide, and 5-fluorouracil) in the treatment of children with malignant hepatoma. *Cancer.* 50:821-826.
- [41] Exelby PR, Filler RM, Grosfeld JL. (1974) Liver tumors in children in the particular reference to hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: American Academy of Pediatrics Surgical Section Survey. *J Pediatr Surg.* 10:329-337.
- [42] Falk H, Schmitzberger W. (1992) On the Nature of „soluble“ Hypericin in Hypericin Species. *Monatsh Chem.* 123:731-739.
- [43] Fox FE, Niu Z, Tobia A, and Rook AH. (1998) Photoactivated hypericin is an anti-proliferative agent that induces a high rate of apoptotic death of normal, transformed, and malignant T lymphocytes: implications for the treatment of cutaneous lymphoproliferative and inflammatory disorders. *J Invest Dermatol.* 111:327-32.
- [44] Fritsch C, Lang K, Neuse W, Ruzicka T, Lehmann P. (1998) Photodynamic diagnosis and therapy in dermatology. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 11:358-373.
- [45] Fu CY, Ng BK, Razul SG, Chin WW, Tan PH, Lau WK and Olivo M. (2007) Fluorescence detection of bladder cancer using urine cytology. *Int J Oncol.* 31:525-530.
- [46] Fuchs J, Bode U, von Schweinitz D et al. (1999) Analysis of treatment efficiency of carboplatin and etoposide in combination with radical surgery in advanced and recurrent childhood hepatoblastoma: a report of the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB89 and HB94. *Klin Pädiatr.* 211:305-309.
- [47] Fuchs J, Rydzynski J, Hecker H, Mildemberger H, Bürger D, Harms D and von Schweinitz D. (2002) German cooperative liver tumour studies HB89 and HB94. *Eur J Pediatr Surg.* 12:255-261.

- [48] Fuchs J, Rydzynski J, von Schweinitz D et al. (2002) Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with hepatoblastoma – a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB 94. *American Cancer Society*. 95:172-182.
- [49] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. (1992) Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *J. Cell Biol.* 119:493-501.
- [50] Haas JE, Muczynski KA, Krailo M et al. (1989) Histopathology and prognosis in childhood hepatoblastoma and hepatocarcinoma. *Cancer*. 64:1082-1095.
- [51] Habrand JL, Nehme D, Kalifa C et al. (1992) Is there a place for radiation therapy in the management of hepatoblastoma and hepatocellular carcinomas in children? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 23:525-531.
- [52] Häberle B, Bode U, von Schweinitz D. (2003) Differenzierte Therapieansätze für Hoch- und Standardrisiko-Hepatoblastome. *Klin Padiatr*. 215:159-65.
- [53] Harrod-Kim P. (2006) Tumor Ablation with Photodynamic Therapy: Introduction to Mechanism and Clinical Applications. *J Vasc Interv Radiol*. 17:1441-1448.
- [54] Hartley AL, Birch JM, Kelsey AM, Jones PH, Harris M, Blair V. (1990) Epidemiological and familial aspects of hepatoblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 18:103-109.
- [55] Hartmann W, Waha A, Koch A et al. (2000) p57 (KIP2) is not mutated in hepatoblastoma but shows increased transcriptional activity in a comparative analysis of the three imprinted genes p57(KIP2), IGF2, and H19. *Am J Pathol*. 157:1393-1403.
- [56] HB99 – Protokoll zur kooperativen Therapieoptimierungsprüfung der Behandlung von malignen Lebertumoren des Kindesalters. Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie / GPOH. Protokollfassung Dezember 1999.
- [57] Head CS, Luu Q, Sercarz J and Saxton R. (2006) Photodynamic therapy and tumor imaging of hypericin-treated squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol*. 4:87.
- [58] Henderson BW and Dougherty DJ. (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*. 55:145-157.
- [59] Hendrickx N, Volanti C, Moens U, Morten Sertenes O, de Witte P, Vandenheede JR, Piette J and Agostinis P. (2003) Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells. *J Biol Chem*. 278:52231-52239.
- [60] Hirschman BA, Pollock BH and Tomlinson GE. (2005) The spectrum of APC mutations in children with hepatoblastoma from familial adenomatous polyposis kindreds. *Journal of Pediatrics*. 147:263–266.
- [61] Huygens A, Huyghe D, Bormans G, Verbruggen A, Kamuhabwa AR, Roskans T, de Witte PA. (2003) Accumulation and phototoxicity of Hypericin and analogs in two- and threedimensional cultures of transitional cell carcinoma cells. *Photochem Photobiol*. 78: 607-614.
- [62] Ikeda H, Matsuyama S, Tanimura M. (1997) Association between hepatoblastoma and very low birth weight: a trend or a chance. *J Pediatr*. 130:557-560.
- [63] Ioris MD, Brugieres L, Zimmermann A, Keeling J, Brock P, Maibach R, Pritchard J, Shafford L, Zsiros J, Czauzerna P, Perilongo G. (2007) Hepatoblastoma with a low

- serum alpha-fetoprotein level at diagnosis: The SIOPEL group experience. *Eur J Cancer*. article in press.
- [64] Ishak KG, Glunz PR. (1967) Hepatoblastoma and hepatocarcinoma in infancy and childhood: report of 47 cases. *Cancer*. 20:396-422.
- [65] Iyer VK, Kapila K, Argawala S, Verma K. (2005) Fine needle aspiration cytology of hepatoblastoma. Recognition of subtypes on cytomorphology. *Acta Cytol*. 49:355-364.
- [66] Jichlinski P and Leisinger HJ. (2005) Fluorescence cystoscopy in the management of bladder cancer: a help for the urologist. *Urol Int*. 74:97-101.
- [67] Kamuhabwa AA, Roskams T, D'Hallewin MA, Baert L, Van Poppel H, de Witte PA. (2003) Whole bladder wall photodynamic therapy of transitional cell carcinoma rat bladder tumors using intravesically administered hypericin. *Int J Cancer*. 10:460-467.
- [68] Kamuhabwa A, Agostinis P, Ahmed B, Landuyt W et al. (2004) Hypericin as a potential phototherapeutic agent in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Photochem and Photobiol Sci*. 3:772-780.
- [69] Kamuhabwa AA, Di Mayungu JD, Baert L, D'Hallewin MA, Hoogmartens J and de Witte PA. (2005) Determination of hypericin in human plasma by high-performance liquid chromatography after intravesical administration in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur J Pharm Biopharm*. 59:469-474.
- [70] Kaser A, Brandacher G, Steurer W et al. (2001) Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood*. 98:2720-2725.
- [71] Kaw YT, Hansen K. (1993) Fine needle aspiration cytology of undifferentiated small cell (anaplastic) hepatoblastoma. *Acta Cytol*. 37:216-220.
- [72] Kelbauskas L, Dietel W. (2002) Internalisation of aggregated photosensitizers by tumor cells: subcellular timeresolved fluorescence spectroscopy on derivatives of pyropheophorbide-a esters and chlorine e6 under femtosecond one- and two-photons excitations. *Photochem Photobiol*. 76:686-694.
- [73] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26:239-257.
- [74] Khan A, Bader JL, Hoy GR, Sinks LF. (1979) Hepatoblastoma in child with fetal alcohol syndrome. *Lancet*. 1:1403-1404.
- [75] Kiesslich T, Krammer B, Plaetzer K. (2006) Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy. *Curr-Med-Chem*. 13:2189-2204.
- [76] Kohno M, Kitatani H, Wada H et al. (1995) Hepatocellular carcinoma complicating biliary cirrhosis caused by biliary atresia: Report of a case. *J Pediatr Surg*. 30:1713 - 1716.
- [77] Korbelik M, Krosi G. (1994) Cellular levels of photosensitizers in tumours: the role of proximity to the blood supply. *Br J Cancer*. 70:604-610.
- [78] Korbelik M, Dougherty DJ. (1999) Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors. *Cancer Res*. 59:1941-1946.
- [79] Korobkin M, Kirks DR, Sullivan DC, Mills SR, Bowie JD. (1981) Computed tomography of primary liver tumors in children. *Radiology*. 139:431-435.

- [80] Kovalic JJ, Thomas PRM, Thomas MB et al. (1991) Hepatocellular carcinoma as second malignant neoplasm in successfully treated Wilms` tumor patients. *Cancer*. 67:342-344.
- [81] Krammer PH. (2000) Apoptose. *Dt. Ärzteblatt*. 97:1752-1759.
- [82] Kraus JA, Albrecht S, Wiestler OD, von Schweinitz D, Pietsch T. (1996) Loss of heterozygosity on chromosome 1 in human hepatoblastoma. *Int J Cancer*. 67:467-471.
- [83] Kubin A, Wierrani F, Burner U, Alth G, Grunberger W. (2005) Hypericin-facts about a controversial agent. *Curr Pharm Des*. 11:233-253.
- [84] Laakmann G, Jahn G and Schüle C. (2002) Hypericum perforatum extract in treatment of mild to moderate depression. Clinical and pharmacological aspects. *Nervenarzt*. 73:600-612.
- [85] Ladner DP, Steiner RA, Allemann J, Haller U, Walt H. (2001) Photodynamic diagnosis of breast tumours after oral application of aminolevulinic acid. *Br J Cancer*. 84:33-37.
- [86] Levin S, Bucci TJ, Cohen SM, Fix AS, Hardisty JF, Le Grand EK, Maronpot RR, Trump BF. (2002) The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol Pathol*. 27:484-490.
- [87] Lipinski M, Jeromin L. (2002) Comparison of the bladder tumour antigen test with photodynamic diagnosis in patients with pathologically confirmed recurrent superficial urinary bladder tumours. *BJU Int*. 89:757-759
- [88] López-Terrada D, Cheung SW, Finegold MJ, Knowles BB. (2009) HepG2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum Pathol*. 40:1512-1515.
- [89] Ma J, Chen M, Dai Y, Qiao L. (2006) Enhancing the Efficacy of Photodynamic Therapy by a Chinese Herbal Medicine for Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Biology and Therapy*. 5:1117-1119.
- [90] Malogolowkin MH, Katzenstein HM and Krailo M et al. (2006) Intensified platinum therapy is an ineffective strategy for improving outcome in pediatric patients with advanced hepatoblastoma. *Journal of Clinical Oncology*. 24:2879–2884.
- [91] Mann JR, Kasthuri N, Raafat F et al. (1990) Malignant hepatic tumours in children: incidence, clinical features and aetiology. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 4:276-289.
- [92] Mayinger B, Neidhardt S, Reh H, Martus P, Hahn EG. (2001) Fluorescence induced with 5-aminolevulinic acid for the endoscopic detection and follow-up of esophageal lesions. *Gastrointest Endosc*. 54:572-578.
- [93] McCrudden KW, Hopkins B, Frischer J et al. (2003) Anti-VEGF antibody in experimental hepatoblastoma: suppression of tumor growth and altered angiogenesis. *J Pediatr Surg*. 38:308-314.
- [94] Meruelo D, Lavie G, Lavie D. (1988) Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: Aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:5230-5234.
- [95] Messmer KJ, Abel SR. (2001) Verteporfin for age-related macular degeneration. *Ann Pharmacother*. 35:1593-1598.
- [96] Meyers RL. (2007) Tumors of the Liver in Children. *Surg Oncol*. 16:195-203.

- [97] Meyers RL, Katzenstein HM and Rowland JH et al. (2008) PRETEXT and other prognostic factors in hepatoblastoma. *Pediatric Blood Cancer* in press.
- [98] Miskovsky P. (2002) Hypericin - a new antiviral and antitumor photosensitizer: Mechanism of action and interaction with biological macromolecules. *Current drug Targets*. 3:55-84.
- [99] Miyagi J, Kobayashi S, Kojo N, Watanabe M, Kuramoto S, Hirose F. (1984) Brain metastasis of hepatoblastoma - a case report and review of literature. *No Shinkei Geka (Neurol Surg)*. 12:753-758.
- [100] Moan J, Berg K. (1991) The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol*. 53:549-553.
- [101] Moore SW, Hesseling PB, Wessels G et al. (1997) Hepatocellular carcinoma in children. *Pediatr Surg Int*. 12:266-270.
- [102] Musajo L, Rodighiero G. (1962) The Skin-Photosensitizing Furocoumarins *Experientia* Vol 18:153-200.
- [103] Newmann KD. (1997) Hepatic tumors in children. *Semin Pediatr Surg*. 6:38-41.
- [104] Nickerson HJ, Silberman TL, McDonald TP. (1980) Hepatoblastoma, thrombocytosis and increased thrombopoietin. *Cancer*. 45:315-317.
- [105] Oda H, Imai Y, Nakatsuru Y, Hata J, Ishikawa T. (1996) Somatic mutations of the APC gene in sporadic hepatoblastomas. *Cancer Res*. 56:3320-3323.
- [106] Oldhafer KJ, Fuchs J, Steinhoff G, Millenberger H. (2000) Ausgedehnte Leberresektion bei Kleinkindern im Kreislaufstillstand unter Low-flow-Kreislaufbedingungen in der Herz-Lungen-Maschine. *Chirurg*. 71:692-695.
- [107] Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. (2002) The Role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. *Photochem Photobiol Sci*. 1:1-21.
- [108] Ortega JA, Krailo MD, Haas JE et al. (1991) Effective treatment of unresectable or metastatic hepatoblastoma with cisplatin and continuous infusion doxorubicin chemotherapy: A report from the Childrens Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 9:2167-2176.
- [109] Ortega JA, Douglass EC, Feusner JH, Reynolds M et al. (1994) Treatment of hepatoblastoma: results of the pediatric intergroup liver tumor study. *Med Pediatr Oncol*. 23:170.
- [110] Ortega JA, Douglass EC, Feusner JH et al. (2000) Randomized comparison of cisplatin/vincristine/fluorouracil and cisplatin/continuous infusion doxorubicin for treatment of pediatric hepatoblastoma: A report from the Children's Cancer Group and the Pediatric Oncology Group. *J Clin Oncol*. 18:2665-2675.
- [111] Otte JB et al. (2005) Liver transplantation for hepatoblastoma: indications and contraindications in the modern era. *Pediatr Transplant*. 9:557-565.
- [112] Owe T, Kubota A, Okuyama H, Kawahara H, Nara K, Kawa K, Kitajima H. (2003) Hepatoblastoma in children of extremely low birth weight: a report from a single perinatal center. *J Pediatr Surg*. 38:134-137.
- [113] Pajonk F, Scholber J and Fiebich B. (2005) Hypericin - an inhibitor of proteasome function. *Cancer Chemother Pharmacol*. 55:439-446.

- [114] Peng Q, Moan J, Warloe T, Nesland JM, Rimington C. (1992) Distribution and photosensitizing efficiency of porphyrins induced by application of exogenous 5-aminolevulinic acid in mice bearing mammary carcinoma. *Int J Cancer*. 52:433-443.
- [115] Perilongo G, Shafford EA. (1999) Liver tumours. *Eur J Cancer*. 35:953-958; discussion 958-959.
- [116] Perilongo G, Shafford E, Maibach R, Aronson D, Brugieres L, Brock P, Childs M, Czauderna P, MacKinlay G, Otte JB, Pritchard J, Rondelli R, Scopinaro M, Staalman C, Plaschkes J. (2004) Risk-adapted treatment for childhood hepatoblastoma. final report of the second study of the International Society of Paediatric Oncology-SIOPEL 2. *Eur J Cancer*. 40:411-21.
- [117] Perilongo G, Maibach R, Shafford E, Brugieres L, Brock P, Morland B, de Camargo B, Zsiros J, Roebuck D, Zimmermann A, Aronson D, Childs M, Widing E, Laithier V, Plaschkes J, Pritchard J, Scopinaro M, MacKinlay G, Czauderna P. (2009) Cisplatin versus cisplatin plus doxorubicin for standard-risk hepatoblastoma. *N Engl J Med*. 22:1662-1670.
- [118] Perugorria MJ, Castillo J, Latasa MU, Goñi S, Segura V, Sangro B, Prieto J, Avila MA, Berasain C. (2009) Wilms' tumor 1 gene expression in hepatocellular carcinoma promotes cell dedifferentiation and resistance to chemotherapy. *Cancer Res*. 15:1358-1367.
- [119] Pham TH, Iqbal CW, Grams JM, Zarroug AE, Wall JC, Ishitani MD, Nagorney DM and Moir C. (2007) Outcomes of primary liver cancer in children: an appraisal of experience. *J Pediatr Surg*. 42:834-839.
- [120] Philip I, Shun A, McCowage G, Howman-Giles R. (2005) Positron emission tomography in recurrent hepatoblastoma. *Pediatr Surg Int*. 21:341-345.
- [121] Pietsch T, Fonatsch C, Albrecht S, Maschek H, Wolf HK, von Schweinitz D. (1996) Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma. *Lab invest*. 74:809-818.
- [122] Piette J, Voltani C, Vantieghem A, Matroule J-Y, Habraken Y, Agostinis P. (2003) Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membranebound photosensitizers. *Biochemical Pharmacology*. 66:1651-1659.
- [123] Plaetzer K, Kiesslich T, Krammer B, Hammerl P. (2002) Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to ALPcS4-PDT. *Photochem Photobiol Sci*. 1:172-177.
- [124] Plaschkes J, Perilongo G, Shafford E et al. (1996) Preoperative chemotherapy Cisplatin (PLA) and Doxorubicin (DO) PLADO for the treatment of hepatoblastoma (HB) and hepatocellular carcinoma (HCC) - Results after 2 years follow-up. *Med Pediatr Oncol*. 27:256.
- [125] Pogue BW, Hasan T. (1997) A theoretical study of light fractionation and dose-rate effects in photodynamic therapy. *Radiat Res*. 147:551-559.
- [126] Pottier RH, Chow YFA, LaPlante JP, Truscott TG, Kennedy JC, Beiner LA. (1986) Non-invasive technique for obtaining fluorescence excitation and emission spectra in vivo. *Photochem Photobiol*. 44:679-687.
- [127] Raab O. (1900) Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Zeitschrift für Biologie*. 39:524-546.

- [128] Reichling J, Weseler A, Saller R. (2001) A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum*. *L Pharmacopsychiat*. 34:116-118.
- [129] Reynolds M. (1995) Conversion of unresectable to resectable hepatoblastoma and long-term follow-up-study. *World J Surg*. 19:814-816.
- [130] Reynolds M. (1999) Pediatric Liver Tumors. *Semin Surg Oncol*. 16:159-172.
- [131] Roebuck DJ, Aronson D and Clapuyt P et al. (2005) PRETEXT: a revised staging system for primary malignant liver tumours of childhood developed by the SIOPEL group. *Pediatric Radiology*. 37:123-132.
- [132] Roeder B. (1993) Photosensibilisatoren in der Photodynamischen Therapie, Kapitel in: Berlien HP, Müller H, ed. *Angewandte Lasermedizin*; München-Landsberg: ecomed Verlag, 6. Aufl.
- [133] Rojo MC, Gonzalez ME. (1998) In situ detection of apoptotic cells by TUNEL in the gill epithelium of the developing brown trout (*Salmo trutta*). *J Anat*. 193:391-398.
- [134] Roth L. (1990) *Hypericum-Hypericin*. Botanik, Inhaltsstoffe, Wirkung., In: Editor. *Ecomed Arzneipflanzen-Monographie*, ed. Series. Landsberg/Lech: Ecomed.
- [135] Ruck P, MD and Xiao JC. (2002) Stem-like Cells in Hepatoblastoma. *Med Pediatr Oncology*. 39:504-507.
- [136] Ruoslahti E, Seppälä M. (1979) Alpha-Fetoprotein in cancer and fetal development. *Adv Cancer Res*. 29:275-346.
- [137] Sarissky M, Lavicka J, Kocanova S, Sulla I, Mirrossay A, Miskovsky P, Gajdos M, Mojzis J and Mirossay L. (2005) Diazepam enhances hypericin-induced phototoxicity and apoptosis in human glioblastoma cells. *Neoplasma*. 52:352-359.
- [138] Sasaki F, Matsunaga T, Iwafuchi M. (2002) Outcome of hepatoblastoma treated with JPLT-1(Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor) Protocol-1: a report from the Japanese Study Group for Pediatric Liver tumor. *J Pediatr Surg*. 37: 851-856.
- [139] Savill J, Fadok V. (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 407:784-788.
- [140] Schempp CH, Simon-Haarhans B, Termeer CC, Simon JC. (2001) Hypericin photo-induced apoptosis involves the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and activation of caspase-8. *FEBS Letters*. 493:26-30.
- [141] Schmidt A, Schmidt P, Haas R, Hecker W. (1988) Primäre Lebertumoren im Kindesalter: Eine Analyse von 19 Fällen. *Langenbecks Arch Chir*. 373:159-165.
- [142] Schmidt D, Harms D, Lang W. (1985) Primary malignant hepatic tumours in childhood. *Vichows Arch (Pathol Anat)*. 407:387-405.
- [143] Schnater JM, Aronson DC, Plaschkes J et al. (2002) Surgical view of the treatment of patients with hepatoblastoma. Results from the first prospective trial of the International Society of Pediatric Oncology Liver Tumor Study Group (SIOPEL-1). *Cancer*. 94:1111-1120.
- [144] Seitz G, Warmann SW, Armeanu S, Heitmann H, Ruck P, Hoffman RM, Fuchs J and Wessels JT. (2007) In vitro photodynamic therapy of childhood rhabdomyosarcoma. *Int J Oncol* 30:615-620.

- [145] Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. (1999) Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today*. 4:507-517.
- [146] Siboni G, Weitman H, Freeman D, Mazur Y, Malik Z and Ehrenberg B. (2002). The correlation between hydrophilicity of hypericins and helianthone: internalization mechanisms, subcellular distribution and photodynamic action in colon carcinoma cells. *Photochem Photobiol Sci*. 1:483-491.
- [147] Steenman M, Westerveld A, Mannens M. (2000) Genetics of Beckwith-Wiedemann syndrome-associated tumors: common genetic pathways. *Genes Chromosomes Cancer*. 28:1-13.
- [148] Stringer MD. (2000) Liver Tumors. *Semin Pediatr Surg*. 9:196-208.
- [149] Stringer MD. (2007) The role of liver transplantation in the management of paediatric liver tumours. *Ann R Coll Surg Engl*. 89:12-21.
- [150] Takemura T, Ohta N, Nakajima S, Sakata I. (1989) Critical importance of photosensitizer in photodynamic therapy of tumor. *Photochem Photobiol*. 50:339-344.
- [151] Tappeiner von H, Jesionek A. (1903) Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Münchener Medizinische Wochenschrift*. 47:2042-2044.
- [152] Taylor PH, Filler RM, Nebesar RA, Tefft M. (1969) Experience with hepatic resection in childhood. *Am J Surg*. 7:435-441.
- [153] Thomas C and Pardini RS. (1992) Oxygen dependence of hypericin-induced phototoxicity to EMT6 mouse mammary carcinoma cells. *Photochem Photobiol*. 55: 831-837.
- [154] Tian R, Koyabu N, Morimoto S, Shoyama Y, Ohtani H and Sawada Y. (2005) Functional induction and de-induction of P-glycoprotein by St. John's Wort and its ingredients in a human colon cancer adenocarcinoma cell line. *Drug Metab Dispos*. 33:547-554.
- [155] Tomlinson GE, Finegold MJ. (2002) Tumors of the Liver. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 29:847-64.
- [156] Traynor NJ, Beattie PE, Ibbotson SH, Moseley H, Ferguson J and Woods JA. (2005) Photogenotoxicity of hypericin in HaCaT keratinocytes: implications for St. John's Wort supplements and high dose UVA1-therapy. *Toxicol Lett*. 158:220-224.
- [157] Uzdensky AB, Ma L-W, Iani V, Hjortland GO, Steen HB, Moan J. (2001) Intracellular Localisation of Hypericin in Human Glioblastoma and Carcinoma Cell Lines. *Lasers Med Sci*. 16:276-283.
- [158] Uzdensky AB, Iani V, Ma LW, Moan J. (2002) Photobleaching of Hypericin Bound to Human Serum Albumin, Cultured Adenocarcinoma Cells and Nude Mice Skin. *Photochem Photobiol*. 76:320-328.
- [159] VanderWerf QM, Saxton RE, Chang A, Horton D, Paiva MB, Anderson J, Foote C, Soudant J, Mathey A and Castro DJ. (1996) Hypericin: a new laser targeting agent for human cancer cells. *Laryngoscope*. 106:479-483.
- [160] Van Vree WJ et al. (1996) Evidence for an important role of neutrophils in the efficacy of photodynamic therapy in vivo. *Cancer Res*. 56:2908-2911.
- [161] Vasseij CJ, De La Hall PM. (2001) Hepatic stem cells: a review. *Pathology*. 33:130-141.

- [162] Vieleisis RA, Sorenson K, Gonzales-Crussi F, et al. (1982) Liver malignancy after parenteral nutrition. *J Pediatr.* 100:88-90.
- [163] Von Schweinitz D, Hadam MR, Welte K, Mildenerger H, Pietsch T. (1993) Production of interleukin-1 beta and interleukin-6 in hepatoblastoma. *Int J Cancer.* 53:728-734.
- [164] Von Schweinitz D, Burger D, Mildenerger H. (1994) Is laparotomy the first step in treatment of childhood liver tumors? The experience from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB-89. *Eur J Pediatr Surg.* 4:82-86.
- [165] Von Schweinitz D, Hecker H, Bürger D, Mildenberg H. (1995) Chirurgische Therapie von Hepatoblastomen im Kindesalter. *Langenbecks Arch Chir.* 380:315-320.
- [166] Von Schweinitz D, Hecker H, Harms D et al. (1995) Complete resection before development of drug resistance is essential for survival from advanced hepatoblastoma – a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB89. *J Pediatr Surg.* 30:845-852.
- [167] Von Schweinitz D, Hecker H, Schmidt-von-Arndt G, Harms D. (1997) Prognostic factors and staging systems in childhood hepatoblastoma. *Int J Cancer.* 74:593-599.
- [168] Von Schweinitz D, Faundez A, Teichmann B et al. (2000) Hepatocyte growth-factor-scatter factor can stimulate post-operative tumor-cell proliferation in childhood hepatoblastoma. *Int J Cancer.* 85:151-159.
- [169] Von Schweinitz D. (2003) Das kindliche Hepatoblastom. *Kinder- und Jugendmedizin.* 6:221-226.
- [170] Von Schweinitz D. (2006). Management of liver tumors in childhood. *Semin Pediatr Surg.* 15:17-24.
- [171] Vos A. (1995) Primary liver tumours in children. *Eur J Surg Oncol.* 21:101-105.
- [172] Wada A, Sakaeda T, Takara K, Hirai M, Kimura T, Ohmoto N, Zhou J, Nakamura T, Kobayashi H, Okamura N, Yagami T and Okumura K. (2002) Effects of St John's Wort and hypericin on cytotoxicity of anticancer drugs. *Drug Metab Pharmacokinet.* 17:467-474.
- [173] Wagniers GA, Star WM, Wilson BC. (1998) In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for Oncological Application. *Photochem Photobiol.* 68:603-632.
- [174] Warmann S, Hunger M, Teichmann B, Flemming P, Gratz KF, Fuchs J. (2002) The role of the MDR1 gene in the development of multidrug resistance in human hepatoblastoma: clinical course and in vivo model. *Cancer.* 95:1795-1801.
- [175] Warmann SW, Frank H, Heitmann H, Ruck P, Herberts T, Seitz G, Fuchs J. (2008) Bcl-2 Gene Silencing in Pediatric Epithelial Liver Tumors. *J Surg Res.*144:43-48.
- [176] Weber ND, Murray BK, North JA, Wood SG. (1994) The antiviral agent hypericin has in vitro activity against HSV-1 through non-specific association with viral and cellular membranes. *Antivir Chem Chemother.* 5:83-90.
- [177] Weinberg A, Feingold M. (1983) Primary hepatic tumors in childhood. *Human Pathol.* 14:512-537.

- [178] Weinel P, Freddara R, Bürger D. (1986) Hepatoblastoma and Hepatocellular carcinoma. *Monogr Paediat.* 18:359-367.
- [179] Williams RA, Ferrell LD. (1993) Pediatric liver tumors. *Pathology.* 2:23-42.
- [180] Woelk H. (2000) Comparison of St. John's wort and imipramine for treating depression: randomized controlled trial. *Br Med J.* 321:536-539.
- [181] Wyllie AH. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 284:555-556.
- [182] Wyllie AH. (1997) Apoptosis and carcinogenesis. *Europ J Cell Biol.* 73:189-197.
- [183] Yee KK, Soo KC and Olivo M. (2005) Anti-angiogenic effects of Hypericin-photodynamic therapy in combination with Celebrex® in the treatment of human nasopharyngeal carcinoma. *Int J Mol Med* 16:993-1002.
- [184] Zhang W, Anker L, Law RE, Hinton DR, Gopalakrishna R, Pu Q, Gundimeda U, Weiss MH, and Couldwell WT. (1996) Enhancement of radiosensitivity in human malignant glioma cells by hypericin in vitro. *Clin Cancer Res.* 2:843-846.
- [185] Zimmermann A, Ritsch-Marte M, Kostron H. (2001) MTHPC-mediated photodynamic diagnosis of malignant brain tumors. *Photochem Photobio.* 74:611-616.
- [186] [<http://probes.invitrogen.com/handbook/sections/1802.html>]

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Steven Warmann danke ich für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, sowie für die wissenschaftliche und freundschaftliche Betreuung.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich herzlich bei Herrn PD Dr. Guido Seitz, der diese Arbeit hervorragend betreut und mit seinem Engagement unterstützt hat.

Ich danke den Mitarbeitern des Labors der Abteilung Kinderchirurgie, insbesondere Frau Heike Heitmann und Dr. rer. nat. Sorin Armeanu die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die Geduld und emotionale Unterstützung.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Renita Bianca Krause
Geburtsdatum: 12.02.1980
Geburtsort: Düsseldorf

Schulbildung

1886 – 1990 Grundschole Wöschbach
1990 – 1999 Ludwig-Marum-Gymnasium Pfinzta
06/1999 Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung

07/2000 Ausbildung zum Rettungssanitäter
beim ASB Mannheim

Studium

04/2001-11/2007 Medizinstudium an der Eberhard-Karls-
Universität Tübingen
03/2003 Ärztliche Vorprüfung
20/11/2007 Ärztliche Prüfung

Praktisches Jahr

Innere Medizin: Erste River Hospital, University of Cape Town
Chirurgie: Unfallchirurgie, BG Tübingen
Kinderchirurgie Universitätsklinik Tübingen
Anästhesie: Universitätsklinik Tübingen

Ärztliche Tätigkeit

seit 03/2008 Unfallchirurgie, Städtisches Klinikum Karlsruhe