

**Aus der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Jörg Barkhausen**

**Synergistische Effekte einer kombinierten Anwendung von
¹³¹I-Photosan und Hyperthermie im Rahmen einer
Radionuklidtherapie**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Christiane Lange
aus Hannover

Lübeck 2009

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Birgit Meller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Gieseler

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.02.2010

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

-Dekan der medizinischen Fakultät-

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Photodynamische Therapie (PDT)	8
1.1.1	Allgemein	8
1.1.2	Vorteile der PDT	9
1.2	Hyperthermie	10
1.2.1	Allgemein	10
1.2.2	Vorteile der Hyperthermiebehandlung	12
1.3	Radiopharmaka und Radionuklidtherapie	12
1.4	Porphyrine	13
1.4.1	Allgemein	13
1.4.2	Vorkommen der Porphyrine im Organismus	14
1.4.3	Hämatoporphyrin	15
1.4.4	Aufnahme von Porphyrinen in die Zellen	15
1.4.5	Effekt der PDT mit Porphyrinen auf zellulärer Ebene	18
1.4.6	Tumorselektivität der Porphyrine	19
1.4.7	Weitere Anwendungsbereiche für Porphyrine	20
1.5	Erhöhung der Therapiewirksamkeit	20
1.5.1	Modulation der Effluxtransporter	20
1.5.2	Kombination der Therapieformen	21
1.5.3	Einsatz von Thermosensibilatoren	21
1.6	Ziel dieser Arbeit	22
2	Materialien und Methoden	23
2.1	Zellkultur	23
2.1.1	Zelllinien	23
2.1.2	Umsetzen der Zellen	23
2.1.3	Einfrieren und Auftauen der Zellen	24
2.2	Substanzen	24
2.2.1	Radioiodid	24
2.2.2	Photosan®	24
2.3	Markierung von Photosan mit ¹³¹ Iodid	25
2.3.1	Prinzip der Markierung	25
2.3.2	Ablauf der Markierung	25
2.3.3	Qualitätskontrolle	26
2.3.4	Stabilitätsprüfung	26
2.4	Durchgeführte Versuche	26
2.4.1	Inkubation mit ¹³¹ I-Photosan	28
2.4.2	Messung der applizierten Aktivitätsmenge	29
2.4.3	Abschätzung der Bestrahlungsdosis durch ¹³¹ I	29
2.4.4	Uptake und Zellzahl	30
2.5	Auswertung und Statistik	32
2.5.1	Standardkurve	32
2.5.2	Rechnungen	32
2.5.3	Statistische Auswertungen	33

3	Ergebnisse	34
3.1	Standardkurve	34
3.2	Stabilitätsprüfung	35
3.3	Uptake durch MB49	36
3.3.1	Uptake von ¹³¹ I-Photosan im Basisexperiment	36
3.3.2	Erhitzen der Zellen	37
3.3.3	Auswirkung von erhöhten Photosankonzentrationen	39
3.3.4	Auswirkung einer thermischen Behandlung bei erhöhter Photosankonzentration	39
3.4	Zellproliferation von MB49	41
3.4.1	Auswirkung von ¹³¹ I-Photosan im Basisexperiment	41
3.4.2	Auswirkung der thermischen Behandlung	41
3.4.3	Auswirkung erhöhter Photosankonzentration	42
3.4.4	Auswirkung einer thermischen Behandlung bei erhöhter Photosankonzentration	43
3.5	Uptake durch JIMT1	45
3.5.1	Uptake von ¹³¹ I-Photosan im Basisexperiment	45
3.5.2	Auswirkung der thermischen Behandlung	46
3.5.3	Auswirkung erhöhter Photosankonzentration	46
3.5.4	Auswirkung von Hitze und erhöhter Photosankonzentration	46
3.6	Zellproliferation von JIMT	47
3.6.1	Auswirkung von ¹³¹ I-Photosan im Basisexperiment	47
3.6.2	Auswirkung des Erhitzens	48
3.6.3	Auswirkung einer erhöhten Photosankonzentration	48
3.6.4	Auswirkung von Hitze und erhöhter Photosankonzentration	48
4	Diskussion	51
4.1	Die Zelllinien	51
4.2	Inkubation mit Photosan	51
4.3	Inkubation mit ¹³¹ I-Photosan	52
4.4	Veränderte Konzentration von ¹³¹ I-Photosan und Photosan	53
4.5	Thermische Behandlung	53
4.6	Mögliche Störfaktoren	56
4.6.1	Freies ¹³¹ I	56
4.6.2	Licht	56
4.7	Radioaktiv markierte Porphyrine	57
4.8	Radionuklid- und multimodale Therapie	58
5	Zusammenfassung	62
6	Literaturverzeichnis	63
7	Danksagung	77
8	Lebenslauf	78

Abkürzungsverzeichnis

A(0)	Aktivität bei Zugabe von ^{131}I
A(t)	Aktivität zum Messzeitpunkt t
Abb.	Abbildung
ABC	ATP binding cassette
ATO	Arsentrioxid
ATP	Adenosin-Triphosphat
C	Kohlenstoff
ca.	circa
cm ²	Quadratcentimeter
Co	Kobalt
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	Zerfälle pro Minute
Cu	Kupfer
DC	Dünnschichtchromatographie
DMEM	Dulbecco's modified Eagles Medium
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
E _{durchschnittl.}	durchschnittliche Energie
EGFR	Epidermal growth factor receptor
E _{max}	maximale Energie
et al.	et altera, dt. und andere
EU	Europäische Union
eV	Elektronenvolt
exp.	Exponentialfunktion
F	Fluor
FBS	Fötales bovines Serum
Fe	Eisen
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gy	Gray
h	Stunde

H	Wasserstoff
HPC1	Häm-Carrier-Protein-1
HpD	Hämatoporphyrin-Derivat
HSP	heat shock protein
I	Iod
J	Joule
kBq	Kilo-Bequerel
kg	Kilogramm
l	Liter
LDL	Low-Density-Lipoprotein
ln	natürlicher Logarithmus
m	Mittelwert
M	Median
MBq	Mega-Bequerel
mg	Milligramm
MIBG	Meta-Iodobenzylguanidin
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N	Stickstoff
n	Anzahl
NH-Lymphom	Non-Hodgkin-Lymphom
nm	Nanometer
O	Sauerstoff
$^1\text{O}_2$	Sauerstoffradikal
p	Signifikanzniveau
PBR	Peripheral-type benzodiazepine Receptor
PBS	phosphate buffered saline, dt: Phosphat-gepufferte Salzlösung
Pd	Palladium
PDT	Photodynamische Therapie
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pg	Picogramm
Photosan	Photosan®

PS	Photosensibilisator
Q25	25. Perzentile
Q75	75. Perzentile
RC	chemische Reinheit
Re	Rhenium
ROS	reactive oxygen species
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDT	sonodynamische Therapie
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
Stw.	Standardabweichung
t	Zeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
$t_{1/2 \text{ eff}}$	effektive Halbwertszeit
$T_{3,4}CPP$	Mesotetrakis[3,4-bis(carboxymethyleneoxy)phenyl]porphyrin
^{99m}Tc	Technetium
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
β	Beta
$^{\circ}C$	Grad Celsius
γ	Gamma
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
π	Pi

1 Einleitung

Bösartige Neubildungen sind in Deutschland die zweithäufigste Todesursache (25,6 % aller Todesfälle im Jahre 2007), die allein von Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit 43,6 % übertroffen werden (Statistisches Bundesamt Deutschland). Die Behandlung von Krebserkrankungen ist daher ein großes Gebiet im medizinischen Alltag sowie Gegenstand der Forschung. Als etabliert gelten die chirurgische Therapie, Chemotherapie und Radiotherapie. Diese klassischen Therapieformen zeichnen sich einerseits durch ihre nachgewiesene Wirksamkeit aus, sind aber andererseits aus verschiedenen Gründen in ihrer Anwendung eingeschränkt. So ist die Tumorselektivität oft nicht ausreichend, so dass es zu schwerwiegenden systemischen Nebenwirkungen kommt. Unter anderem wird die körpereigene Immunabwehr stark geschwächt, was zu erhöhter Infektionsanfälligkeit führt. Durch Chemotherapeutika werden alle schnell wachsenden Zellen angegriffen, somit außer den Tumorzellen auch die der Schleimhäute, Haarwurzeln und blutbildenden Organe. Trotz ständig weiterführender Forschung und Verbesserung der Therapieformen, gelingt es kaum, die Nebenwirkungen weiter zu reduzieren.

So kommt es, dass andere Behandlungsmöglichkeiten für onkologische Erkrankungen erforscht werden. Diese können teilweise als Monotherapie, oft aber auch in Kombination zu anderen Therapieformen eingesetzt werden, um deren Wirksamkeit und Verträglichkeit, z.B. durch erhöhte Tumorselektivität, zu verbessern.

Es gibt Behandlungsformen, bei denen so genannte Sensibilatoren zum Einsatz kommen. Sensibilatoren (auf englisch „Sensitizer“) sind Substanzen, die sich selektiv im Tumorgewebe anreichern, aber per se keine tumorschädigende Wirkung haben. Sie müssen vielmehr durch Energieübertragung aktiviert werden. Als Energiequellen kommen z.B. Licht, Ultraschall, radioaktive Strahlen oder Wärme zur Anwendung. Es soll hier nun vor allem auf die Photodynamische Therapie, die Hyperthermiebehandlung und die Radionuklidtherapie eingegangen werden.

1.1 Photodynamische Therapie (PDT)

1.1.1 Allgemein

Die photodynamische Therapie (PDT) ist ein minimal invasives Behandlungsverfahren, das u.a. in der Onkologie eingesetzt wird und auf dem Zusammenwirken der drei Komponenten Photosensibilisator, Licht und Sauerstoff beruht. Dem Patienten wird zunächst ein Wirkstoff, der Photosensibilisator (PS), intravenös, oral oder lokal appliziert.

Nach einer Zeitspanne von einigen Stunden, in denen der PS bevorzugt in den Zellen des Tumorgewebes angereichert wird, erfolgt die Bestrahlung der betroffenen Region mit Licht einer bestimmten Wellenlänge. Der PS absorbiert die Lichtenergie und bewirkt eine Reaktion von molekularem Sauerstoff in reaktionsfreudigen Singulett-Sauerstoff 1O_2 und weitere freie Radikale (ROS = reactive oxygen species). Die Radikale schädigen die Membranen der Zellen und Zellorganellen und führen so zum Zelluntergang.

Unter den PS unterscheidet man zwei Generationen. Zu der ersten Generation gehören die Porphyrine (vor allem Hämatoporphyrinderivat), auf die weiter unten genauer eingegangen wird. PS der zweiten Generation sind z.B. Chlorine, Benzoporphyrine, Pheophorbide, Phthalocyanine und Porphycene (Stockert et al., 2007; Juarranz et al., 2008). Die neueren PS zeichnen sich durch eine selektivere Anreicherung im Tumorgewebe und geringere Nebenwirkungen aus.

Die PDT wird bei eher oberflächlich gelegenen Karzinomen angewandt. So ist sie u.a. für Blasenkarzinome (Klaunig et al., 1985; Miller et al., 1991; Jichlinski, 2006), Basalzellkarzinome der Haut (Babilas et al., 2006), Lungenkarzinome (Hayata et al., 1982; Vincent et al., 1984; Li et al., 1984) und Kopf-Hals-Karzinome (Biel, 1996) zugelassen. Dies hängt mit der geringen Eindringtiefe des applizierten Lichts in das Gewebe zusammen. Die PS der ersten Generation haben ein Absorptionsmaximum bei 630 nm. Licht dieser Wellenlänge hat eine Eindringtiefe von wenigen Millimetern, wodurch die Anwendung der PDT begrenzt wird. Die PS neuerer Generationen haben ihr Absorptionsmaximum bei höheren Wellenlängen, was die Eindringtiefe des Lichts vergrößert und die Anwendungsmöglichkeiten erweitert.

Die Hauptnebenwirkung der PDT ist eine Photosensibilisierung der Haut. Eine geringe Menge der PS wird ebenfalls von den Dermatozyten aufgenommen und durch das Sonnenlicht aktiviert. Dadurch kommt es zu phototoxischen Effekten auf der Haut, welche sich in Ödemen, Erythemen, Blasenbildung bis hin zu oberflächlichen Hautnekrosen äußern (Pass, 1993; Dougherty et al., 1990).

1.1.2 Vorteile der PDT

Zu den Vorteilen der PDT gegenüber den konventionellen Krebstherapien zählen die geringe systemische Toxizität, die Fähigkeit, selektiv den Tumor zu schädigen und die Möglichkeit der Kombination von PDT mit anderen therapeutischen Behandlungen wie Chemotherapie, Operation, Radiotherapie oder Immuntherapie (Juarranz et al., 2008). Ein ganz besonderer Vorteil der PDT ist die Tatsache, dass der Organismus angeregt wird,

selbst bei der Tumoreradikation mitzuwirken. Obwohl die PDT nur lokal angewendet wird, ist ihre Wirkung nicht allein auf den direkten phototoxischen Effekt beschränkt. Vielmehr kommt es, ausgelöst durch den starken oxidativen Stress auf das Tumorgewebe mit massiver Zerstörung der Zellmembran und anderer zellulärer Strukturen, zu einer sofortigen Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Diese bewirken eine akute Entzündungsreaktion (Korbelik, 1996; Korbelik, 2006). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass durch die PDT eine spezifische T-Zell-vermittelte Anti-Tumor-Immunität entsteht. Durch diese können sogar entfernter lokalisierte Anteile desselben Tumors angegriffen werden (Korbelik und Dougherty, 1999; Castano et al., 2006; Gollnick et al., 2006; Korbelik, 2006). Als weiterer Effekt auf das Immunsystem wurde eine Akute-Phase-Reaktion im Anschluss an die PDT nachgewiesen (Korbelik et al., 2008). Hierzu zählen die Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen, die Aktivierung der adrenergen Hormonachse sowie eine Erhöhung der Konzentration peripherer Leukozyten, besonders der neutrophilen Granulozyten. Diese Auswirkungen als Folge der Tumor-PDT wurden in verschiedenen Studien gezeigt (Cecic und Korbelik, 2002; Cecic et al., 2006).

Es konnte auch gezeigt werden, dass als Folge des zellulären Stresses durch die PDT vermehrt Heat-Shock-Proteine (HSP) auf der Zellmembran exprimiert werden. Diese sollen die Membran stabilisieren, jedoch wurde nachgewiesen, dass sie eine Apoptose nicht verhindern können (Zhou et al., 2008). Vielmehr wurde gezeigt, dass die vermehrte Expression von HSP70 eine Aktivierung von Genen einiger Komplementfaktoren bewirkt (Stott und Korbelik, 2007).

Durch die PDT wird also eine Aktivierung des Immunsystems ausgelöst mit Entwicklung einer Anti-Tumor-Immunität sowie Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen und Aktivierung des Komplementsystems.

1.2 Hyperthermie

1.2.1 Allgemein

Es ist bekannt, dass der Organismus mit einer Erhöhung der Körpertemperatur reagiert, um Krankheiten abzuwehren. Dies wurde schon vor vielen Jahrhunderten als Therapiemöglichkeit erkannt. Inzwischen wird solch eine Hyperthermiebehandlung auch in der Onkologie angewendet. Es wurde nachgewiesen, dass Tumorgewebe auf erhöhte Temperaturen von 40-44 °C sensibler reagiert als gesundes Gewebe. Dies liegt jedoch nicht an den Zellen selbst, sondern an den abnormen physiologischen Bedingungen, die in soliden Tumoren herrschen. Durch eine pathologisch veränderte Blutversorgung kommt es

im Tumor zu Hypoxie und erniedrigten pH-Werten. Diese bewirken eine erhöhte Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber Hyperthermie (Reinhold und Endrich, 1986; Takasu et al., 1998).

Die Hyperthermie kann den Zelltod sowohl durch Nekrose als auch durch Apoptose induzieren. Bei Temperaturen unter 43 °C kommt es eher zum programmierten Zelltod, während durch höhere Temperaturen eher eine Nekrose induziert wird (Harmon et al., 1990). Es kommt zu Schäden im Zytoskelett und der Zellmembran, sowie zu einer Veränderung der Enzyme für die DNA-Synthese und -Reparatur (Hildebrandt et al., 2002).

Das Problem bei der Hyperthermiebehandlung ist, dass es noch keine standardisierten Methoden in der Wärmeapplikation, Dauer der Anwendung und Höhe der Temperatur gibt (Fiorentini und Szasz, 2006). Es können jedoch grundsätzlich drei Methoden unterschieden.

Zum einen wird die Wärme als Ganz-Körper-Hyperthermie-Behandlung angewendet, bei der mithilfe verschiedener Verfahren die Temperatur des gesamten Körpers erhöht wird. Bisher konnte gezeigt werden, dass hierbei ein längeres Erwärmen auf ca. 40 °C bessere Ergebnisse zeigt als ein kürzeres auf bis zu 42 °C (Burd et al., 1998; Kraybill et al., 2002). Zum anderen gibt es Verfahren zur regionalen Hyperthermie. Hierbei werden einzelne Organe, Körperhöhlen oder Extremitäten mit erwärmten Infusionen perfundiert und so die Temperatur in diesen erhöht (Coit, 1992; Ceelen et al., 2000).

Als Drittes wird die Wärme lokal appliziert, so dass hauptsächlich die Temperatur im Tumor selbst erhöht wird. Dies erfolgt mittels externer, intraluminaler oder interstitieller Methoden. Als Energiequelle werden elektromagnetische Strahlen oder Ultraschall verwendet. Zu der lokalen Behandlung zählen auch die Verfahren der thermischen Ablation. Hierzu gehören Radiofrequenzablation, fokussierter Ultraschall, Laser, Mikrowelle und Kryotherapie. Die Radiofrequenzablation wird vor allem für Lebertumoren und -metastasen eingesetzt. Eine nadelähnliche Elektrode wird in den Tumor platziert. Durch Emission eines hochfrequenten Wechselstroms wird der Tumor lokal sehr stark auf Temperaturen erhitzt, die optimal zwischen 65 und 100 °C liegen. Ab einer Temperatur von über 60 °C kommt es sofort zu irreversibler Proteindenaturierung, wodurch Zell- und DNA-Strukturen zerstört werden (Pereira et al., 2003).

Die Hauptnebenwirkung der Hyperthermiebehandlung besteht in einer Schädigung des gesunden Gewebes durch die Hitze. Es kann zu Verbrennungen der Haut, des subkutanen Fettgewebes sowie der Muskeln kommen (Lee et al., 1998; van der Zee et al., 1999). Es

wurde gezeigt, dass gesundes Gewebe nicht geschädigt wird, wenn die Hitzeapplikation über eine Stunde 44 °C nicht überschreitet (Fajardo, 1984).

1.2.2 Vorteile der Hyperthermiebehandlung

Im Gegensatz zu Chemo- und Strahlentherapie, die eine geringere Wirksamkeit in hypoxischem Gewebe und bei saurem pH-Wert haben, sind gerade diese Bedingungen für die Wirksamkeit der Hyperthermie notwendig. Ähnlich der PDT ist die systemische Toxizität der Behandlung gering. Auch wird durch Hyperthermie das Immunsystem aktiviert. Es kommt zu einer gesteigerten Anzahl der natürlichen Killerzellen (Shen et al., 1994). Auf der Oberfläche der Tumorzellen werden nach Wärmeapplikation vermehrt Heat-Shock-Proteine exprimiert, wodurch diese zu einem Ziel für das Immunsystem werden (Multhoff, 1995; Ito et al., 2001). Als zusätzlich positive Nebenwirkung kommt es durch die Hyperthermie während der Behandlung zu einer deutlichen Schmerzreduktion (Harari et al., 1991).

1.3 Radiopharmaka und Radionuklidtherapie

Radiopharmaka sind körpereigene oder körperfremde Substanzen, die mit einem Radionuklid radioaktiv markiert sind. In der nuklearmedizinischen Diagnostik werden sie im pg- und mg-Bereich als Tracer eingesetzt. Über den radioaktiven Zerfall können die Stellen im Körper ausgemacht werden, an denen sich die Radiopharmaka anreichern. Um Tumorgewebe darstellen zu können, werden daher Substanzen verwendet, die von diesem verstärkt aufgenommen oder gebunden werden. Durch den stark erhöhten Stoffwechsel des Tumors besteht ein höherer Bedarf an Glukose, Aminosäuren und Nukleinsäuren, welche daher – nach Markierung mit radioaktiven Isotopen – als Tracer verwendet werden. Nach Applikation der Tracer nehmen sie am Stoffwechsel des Organismus teil, ohne ihn zu stören. Bei Szintigraphie und SPECT werden radioaktive Marker verwendet, die γ -Strahlung emittieren. Als Isotop wird hauptsächlich ^{99m}Tc verwendet. Bei der PET dagegen kommen radioaktive Marker zur Anwendung, die Positronen emittieren, wobei hierbei v.a. ^{18}F zur Markierung eingesetzt wird.

Auch zu therapeutischen Zwecken werden Radiopharmaka verwendet. Die Radionuklidtherapie beruht auf dem Einsatz eines Radiopharmakons, das mit einem β^- -Strahlung emittierenden radioaktiven Isotop markiert ist. Es reichert sich – analog zu dem entsprechenden Diagnostikum – gezielt im Tumorgewebe an und führt hier durch Emission von polyenergetischen Elektronen zu Zellschäden. Durch diese Elektronen wird hauptsächlich die DNA der Zellen geschädigt. Es kommt sowohl zu direkter Ionisierung

der DNA als auch zur Bildung freier Radikale, die wiederum die DNA schädigen. So kommt es u.a. zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen und einer Zerstörung der Basen (Kassis und Adelstein, 2005).

Ein häufig verwendetes Radionuklid ist ^{131}I . Es wird in reiner Form zur Behandlung des Schilddrüsenkarzinoms eingesetzt (Bomanji, 2006). Als radioaktiver Marker wird es an tumoraffine Substanzen gebunden, um auch andere Tumorentitäten behandeln zu können. Die markierten Moleküle müssen sich durch Tumorselektivität auszeichnen, damit gesundes Gewebe möglichst wenig geschädigt wird. Zum Einsatz kommen hier u.a. Peptide, Aminosäuren und spezifische Antikörper (Bomanji, 2006). Einige Beispiele sind ^{131}I -Tositumomab, ein markierter Antikörper zur Behandlung des NH-Lymphoms, ^{131}I -Lipiodol zur Therapie des hepatozellulären Karzinoms und ^{131}I -MIBG zur Behandlung des Neuroblastoms (Thierens et al., 2005; Bomanji, 2006).

Um einen Effekt auf das Tumorgewebe zu erreichen, muss die Konzentration des Radiopharmakons und damit die Strahlungs dosis im Tumorgewebe ausreichend hoch sein. In der Literatur finden sich hierzu unterschiedliche Angaben. Vor einigen Jahrzehnten erschien eine Dosis von 1000 Gy als notwendig, um z.B. thyreotoxisches Schilddrüsengewebe zu entfernen (Thierens et al., 2005). Heutzutage gelten Dosen von 70-300 Gy im Zielgewebe für eine Behandlung als ausreichend (Dorn et al., 2003). Trotzdem sind Methoden zur Erhöhung des Tumor-Uptake wünschenswert, um die Strahlenbelastung im gesunden Gewebe möglichst gering zu halten.

Die Hauptnebenwirkung der Radionuklidtherapie ist eine reversible Myelosuppression, welche zu Leukopenie und Anämie führt. Die Patienten sollten daher vor der Behandlung möglichst normale Blutwerte haben und nach der Behandlung besonders in den ersten acht Wochen engmaschig kontrolliert werden (Lewington, 2003).

1.4 Porphyrine

1.4.1 Allgemein

Porphyryne (pophyrá, griech. Purpurfarbstoff) sind organisch-chemische Farbstoffe. Das Porphyrin-Grundgerüst, das auch als Porphyrinsystem bezeichnet wird, besteht aus vier Pyrrolringen, die durch vier Methingruppen kreisförmig miteinander verbunden sind. Es enthält Stickstoff-, Sauerstoff- und Wasserstoffatome und ist hydrophob. Der einfachste Vertreter der Porphyryne ist das Porphin mit der Summenformel $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4$. Die Strukturformel ist in Abb.1 dargestellt. Porphyrinderivate entstehen zum einen durch das Anhängen verschiedener Seitenketten und zum anderen durch Zusammenkoppeln der

monomeren Untereinheiten. Die Polarität der Seitenketten bestimmt hierbei die Wasserlöslichkeit der einzelnen Derivate, welche sehr unterschiedlich ist. Durch das Bilden von Ester- und Ätherbindungen entstehen Dimere und Oligomere. Die konjugierten Doppelbindungen und aromatischen Eigenschaften sind für die Farbigkeit vieler Porphyrine verantwortlich.

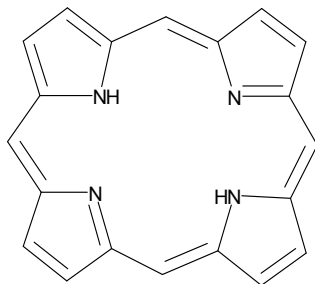


Abbildung 1: Porphyrin-Grundgerüst

Die konjugierten Doppelbindungen sind essenziell für den Einsatz der Porphyrine als Photosensibilatoren. Hierbei spielen delokalisierbare π -Elektronen eine wichtige Rolle. Durch Lichteinstrahlung werden die π -Elektronen beweglich gemacht und die Doppelbindungen in Schwingung versetzt. So wird die zugeführte Energie gespeichert. Am jeweiligen Absorptionsmaximum der Porphyrine entsteht die größtmögliche Eigenschwingung und somit die höchste Energie.

1.4.2 Vorkommen der Porphyrine im Organismus

Porphyryne und ihre Derivate spielen eine bedeutende Rolle im tierischen Organismus, indem sie das Grundgerüst lebenswichtiger Verbindungen bilden. Sie werden in jeder Körperzelle synthetisiert. Für ihre Funktion im Organismus müssen sie eine Komplexbindung mit einem Metall-Ion eingehen. So binden als wichtigste Verbindungen Häm ein Eisen-Ion, Chlorophyll in pflanzlichen Organismen ein Magnesium-Ion und das von Bakterien synthetisierte Vitamin B12 ein Cobalt-Ion.

1.4.2.1 Häm

Von den Porphyrinen spielt Häm die wichtigste Rolle im menschlichen Organismus, da es Bestandteil vieler Proteine und Enzyme ist. Es ist eine Komplexverbindung zwischen Protoporphyrin IX und einem Eisen-Ion (Fe^{2+}). In Hämoglobin und Myoglobin ist es für Sauerstofftransport und -speicherung im Blut und in den Muskelzellen verantwortlich. Das im Häm gebundene Eisen-Ion ist reaktionsfreudig und lässt sich leicht von Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidieren und umgekehrt wieder reduzieren. Daher ist Häm Bestandteil vieler Enzyme, die

vor allem Oxidoreduktasereaktionen katalysieren, z.B. die Katalase, die Cytochrom P450-Oxidase und die Cyclooxygenase. Außerdem ist es Teil der mitochondrialen Cytochrome und hierbei für den Elektronentransport innerhalb der Atmungskette verantwortlich.

1.4.3 Hämatoporphyrin

Hämatoporphyrin ist ein eisenfreies Häm. Es entsteht als künstliches Abbauprodukt von Hämoglobin, Hämin oder Hämatin. Von Protoporphyrin IX unterscheidet es sich dadurch, dass die beiden Vinylgruppen durch Anlagerung von Wasser in Hydroxyethyl-Reste übergegangen sind. Abb.2 zeigt die Strukturformel.

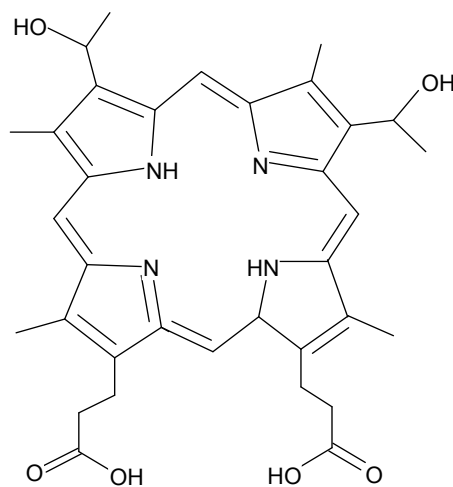


Abbildung 2: Strukturformel von Hämatoporphyrin

Hämatoporphyrin war einer der ersten Photosensibilatoren, der zu therapeutischen Zwecken eingesetzt wurde. Meyer-Betz führte mit Hämatoporphyrin 1912 den ersten Selbstversuch durch (Kick et al., 1996). In den 60er Jahren wurde Hämatoporphyrin-Derivat (HpD) entwickelt. Zu den HpD gehört auch Photosan®, welches aufgereinigt ist und vorwiegend oligomere Verbindungen enthält. Die monomeren und dimeren Anteile wurden größtenteils entfernt, da sie hauptsächlich für eine länger andauernde Lichtsensibilisierung der Haut verantwortlich sind. Photosan ist seit dem Jahre 2002 in der EU als Medizinprodukt für die PDT zugelassen.

1.4.4 Aufnahme von Porphyrinen in die Zellen

Der genaue Ablauf und die Regulierung der Aufnahme von Porphyrinen ist noch nicht vollständig verstanden und erforscht. Früher wurde vermutet, dass Häm und die weiteren Porphyrine allein durch Diffusion in die Zellen aufgenommen und wieder abgegeben werden. Doch gibt es einige Tatsachen, die gegen diese Annahme sprechen. Da die

Porphyrine lipophile Moleküle sind, lagern sie sich in der Doppellipidschicht der Zellmembranen ein. Doch aufgrund von anionischen Seitenketten und der Größe der Moleküle ist eine alleinige Diffusion unwahrscheinlich (Krishnamurthy et al., 2007). Auch muss die intrazelluläre Konzentration von Porphyrinen genau kontrolliert werden, da sie in höherer Konzentration zytotoxisch sind.

Heute gibt es zwei Hypothesen über die Aufnahme der Porphyrine.

1.4.4.1 Endozytose

Zum einen handelt es sich hierbei um rezeptorvermittelte Endozytose. Diese Hypothese wurde von Gräsbeck et al. 1979 aufgestellt, die einen Proteinrezeptor für Häm auf der Microvillusmembran nachweisen konnten. 1985 konnte ein Hämrezeptor auch auf Blutzellen nachgewiesen werden (Galbraith et al., 1985). Es wurde gezeigt, dass Häm in intakter Form aufgenommen wird (Majuri, 1989), wobei der Prozess temperatur- und energieabhängig ist (Worthington et al., 2001; Vaghefi et al., 2001).

1.4.4.2 Transporter

Zum anderen konnten in den letzten Jahren Häm- und Porphyrintransporter nachgewiesen werden. Uc et al. wiesen nach, dass sowohl Aufnahme- als auch Sekretionsmechanismen vorhanden sind (Uc et al., 2004).

1.4.4.2.1 Aufnahme in die Zellen

Für die Aufnahme von Häm und Porphyrinen in die Zellen wurde von Shayeghi et al. 2005 ein Transporter entdeckt, das Häm-Carrier-Protein-1 (HPC1). Dieser konnte in Zellen des Duodenums, der Leber, der Niere und in Makrophagen (Schaer et al., 2008) nachgewiesen werden. In seiner Struktur ähnelt er den bakteriellen Metall-Tetrazyklin-Transportern, die zu einer großen Transporter-Gruppe gehören, die MFS (major facilitator superfamily) genannt wird. Shayeghi et al. wiesen nach, dass der Häm-Uptake sättigbar und temperaturabhängig ist. Außerdem spielt die Porphyrinstruktur eine wichtige Rolle, die Anwesenheit metallischer Ionen dagegen nicht. Die Energiequelle für HPC1 ist noch nicht endgültig erforscht, es wird aber vermutet, dass es sich um einen Co-Transport eines Protons oder Ions handelt (Shayeghi et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass die Regulation der HPC1-Expression in der Zellmembran durch verschiedene Einflüsse erfolgt. Sowohl bei Eisenmangel als auch unter hypoxischen Bedingungen wurde HPC1 vermehrt in die Zellmembran eingebaut (Shayeghi et al., 2005).

2006 wurde von Qiu et al. für das gleiche Transportprotein nachgewiesen, dass es ein protonenabhängiger Folat-Transporter ist, der zu Folat eine höhere Affinität als zu Häm hat. Es wurde von ihm in PCFT/HPC1 umbenannt (Qiu et al., 2006).

1.4.4.2.2 Sekretion aus den Zellen

Bisher wurden drei Transporter entdeckt, die für die Sekretion von Häm und Porphyrinen aus der Zelle verantwortlich sind: FLVCR, ABCG2/BCRP und ABCB6.

FLVCR wurde zunächst als Rezeptor für das feline Leukämievirus der Subgruppe C identifiziert (Tailor et al 1999, Quigley et al 2000). Später konnte gezeigt werden, dass es auch in den Hämtransport involviert und für die Hämsekretion aus der Zelle zuständig ist (Quigley et al 2004). Der Transport ist zeit- und temperaturabhängig. Bisher ist noch nicht geklärt, ob FLVCR auch für den Transport weiterer Porphyrine verantwortlich ist.

ABCG2/BCRP1 wurde als breast cancer resistance protein 1998 von Doyle et al. entdeckt (Doyle et al., 1998). Es ist ein Halbtransporter, der zur ABC-Transporter-Familie gehört und in der Lage ist, Substanzen gegen einen Konzentrationsgradienten zu transportieren (Krishnamurthy und Schuetz, 2006). Er ist in der Plasmamembran lokalisiert (Scheffer et al. 2000; Rocchi et al., 2000; Maliepaard et al., 2001) und wird in allen normalen Geweben exprimiert, wobei die Expression in den Syncytioblasten der Plazenta am höchsten ist (Doyle und Ross, 2003). Es wurde nachgewiesen, dass dieses Protein auch als Effluxtransporter für Häm und Porphyrine fungiert (Krishnamurthy, 2004; Krishnamurthy und Schuetz, 2005; Vlaming et al., 2008), wobei die Tetrapyrrolstruktur der Moleküle eine wichtige Rolle für die Interaktion mit dem Transporter spielt. Die Expression von ABCG2 wird durch Hypoxie induziert. Die ABCG2-Expression ist ein essenzieller Mechanismus, um die Porphyrinkonzentration in den Zellen zu regulieren und auch unter Hypoxie zu überleben (Latunde-Dada et al., 2006; Krishnamurthy et al., 2007).

ABCB6 gehört ebenfalls zu der ABC-Transporter-Familie. Es konnte nachgewiesen werden, dass ABCB6 sowohl in der Plasmamembran (Paterson et al., 2007) als auch in der äußeren Mitochondrienmembran (Krishnamurthy et al., 2006) lokalisiert ist. ABCB6 transportiert Häm und Porphyrine unter ATP-Verbrauch in die Mitochondrien und wird bei erhöhten intrazellulären Konzentrationen dieser Substanzen vermehrt exprimiert (Krishnamurthy et al., 2006). Das in der Plasmamembran lokalisierte ABCB6 transportiert Porphyrine aus der Zelle heraus (Paterson et al., 2007).

In der äußeren Mitochondrienmembran konnte noch der Peripheral-type benzodiazepine Receptor (PBR), auch translocator protein, als Bindungsstelle für Porphyrine identifiziert

werden (Taketani et al., 1995; Marchetti et al., 1996). Es wurde postuliert, dass es sich bei PBR auch um einen Transporter handelt (Wendler et al 2003), doch wird nun davon ausgegangen, dass es sich lediglich um einen Rezeptor handelt, der Porphyrine bindet (Krishnamurthy et al 2007), da nur eine geringe Affinität zu den Porphyrinen besteht und kein Energieverbrauch stattfindet (Taketani et al., 1995; Snyder et al., 1987).

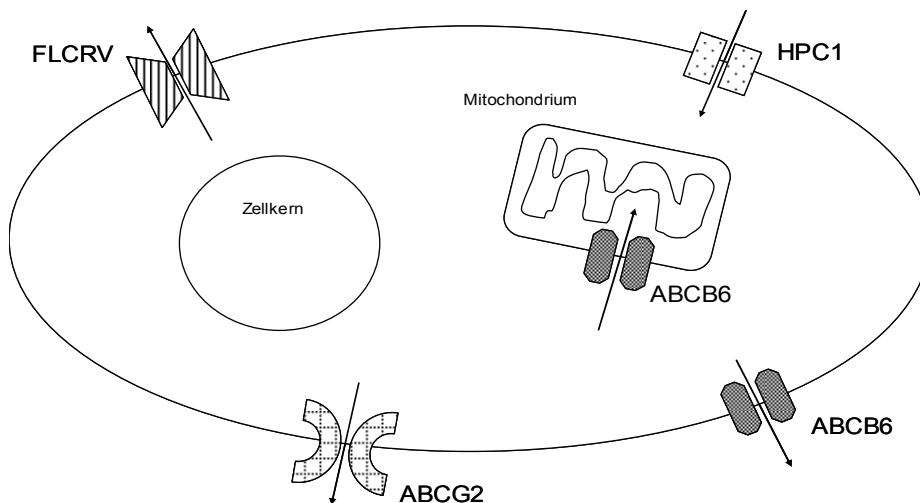


Abbildung 3: Schema einer Zelle mit potentiellen Häm/Porphyrin-Transportern. HPC1 (Häm-Carrier-Protein-1) gilt als Transportprotein für die Aufnahme in die Zellen. ABCG2 und ABCB6 gehören zu der Familie der ABC-Transporter und transportieren Porphyrine aus der Zelle heraus bzw. in die Mitochondrien. FLCRV transportiert Häm aus der Zelle heraus.

1.4.5 Effekt der PDT mit Porphyrinen auf zellulärer Ebene

Bei der Erforschung der Wirkweise der PDT wurden verschiedene Zellkomponenten ausgemacht, in die Porphyrine verstärkt eingelagert werden. Hierzu zählen die Plasmamembran (Kohn und Kessel, 1979), die Kernmembran (Gutter et al., 1977; Gomer, 1980; Moan et al., 1980; Fiel et al., 1981), die Mikrosomen (Dixit et al., 1983; Das et al., 1985) und die Mitochondrien (Hilf et al., 1984; Salet, 1986). Die Einlagerung der Porphyrine in die Plasmamembran bewirkt bei den Zellen nach PDT Nekrosen (Dougherty et al., 1998). Dagegen wird durch die Aufnahme in die Mitochondrien Zellapoptose induziert (Luo et al., 1996; Kessel et al., 1997; Kessel und Luo, 1998). Der schädigende Effekt scheint bei Wirkung auf die Mitochondrien am größten zu sein (Hilf, 2007). Es wurde nachgewiesen, dass Enzyme der inneren Mitochondrienmembran gehemmt werden, die Cytochrom C-Oxidase und die F_0F_1 -ATP-Synthase, und dies zu einer starken Abnahme der ATP-Menge in Tumorzellen führt (Hilf, 2007).

1.4.6 Tumorselektivität der Porphyrine

Besonders bei der systemischen Applikation der Photosensibilatoren ist es wichtig, dass diese hauptsächlich von den gewünschten Zellen aufgenommen werden.

Genauere Ursache und Ablauf der Selektivität für Tumorzellen sind noch unbekannt. Es gibt allerdings verschiedene Aspekte, die eine Rolle dabei spielen, weshalb die Porphyrine von Tumorzellen stärker aufgenommen werden als von gesundem Gewebe.

Die besonderen Eigenschaften des Tumorgewebes sorgen für eine höhere Zufuhr bzw. einen verminderten Abtransport der Porphyrine. Hierzu zählen der vergrößerte Interstitialraum, die starke Vaskularisierung mit jedoch pathologisch veränderten, undichten Gefäßen und unterentwickelte Lymphgefäße (Dougherty et al., 1998). Hinzu kommt eine stark vermehrte Bildung von Kollagen, welches Porphyrine an sich bindet (Musser et al., 1980).

Ein weiterer Grund ist die hohe Lipophilie der Porphyrine, wobei die Tumorselektivität mit steigender Lipophilie noch erhöht wird (Chwilkowska et al., 2003).

Im Blut werden die Porphyrine an Albumin (Muller-Eberhard und Morgan, 1975) und an Lipoproteine (Jori et al., 1984; Byrne et al., 1990; Géze et al., 1993) gebunden zu den Zellen transportiert. Die albumingebundenen Porphyrine sind hauptsächlich für Schäden an den Blutgefäßen verantwortlich, welche schließlich zu Tumorschämie und -hypoxie führen (Dougherty et al., 1998). Unter den Lipoproteinen spielen die Low-Density-Lipoproteine (LDL) eine wichtige Rolle. Zu ihnen haben die Porphyrine eine hohe Affinität (Kessel, 1986; Maziere et al., 1990; Jori und Reddi, 1993). Maligne Tumorzellen besitzen aufgrund ihres hohen Mitoseindex eine große Anzahl an LDL-Rezeptoren (Goldstein et al., 1985), so dass sich wiederum auch vermehrt an LDL gebundene Porphyrine dort anlagern (Biade et al., 1992; Korbelik, 1993). Die Bindungskapazität an LDL stellt einen guten Index dar, um den Uptake einer Substanz widerzuspiegeln, wobei dieser Index jedoch nicht bedeutet, dass die Substanzen auch über den „LDL-pathway“ aufgenommen werden müssen (Kongshaug et al., 1989).

In den Tumorgeweben herrscht durch den vermehrten Stoffwechsel eine höhere Temperatur als im umgebenden Gewebe. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Aufnahme von Porphyrinen mit höherer Temperatur zunimmt (Shayeghi et al., 2005).

Auch der pH-Wert spielt eine Rolle bei der Tumorselektivität. Der extrazelluläre pH im Tumorgewebe ist geringer als im gesunden Gewebe und bewirkt einen höheren Uptake von Porphyrinen (Friberg et al., 2003).

Als Weiteres konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer vermehrten Aufnahme der Porphyrine durch tumor-assoziierte Makrophagen kommt (Bugelski, 1981; Korbelik et al., 1991a und b).

1.4.7 Weitere Anwendungsbereiche für Porphyrine

Da sich die Porphyrine aufgrund der oben beschriebenen Tumorselektivität und der geringen Nebenwirkungen als Photosensibilatoren etabliert haben, werden sie inzwischen auch als Sensibilatoren für weitere Therapieformen verwendet.

Bei der sonodynamischen Therapie (SDT) handelt es sich um eine relativ neue Therapieform. Es wird ähnlich der PDT ein Sonosensibilisator appliziert und dieser im Anschluss durch Ultraschall aktiviert. Es hat sich gezeigt, dass verschiedene Porphyrine auch hierbei signifikante Antitumor-Wirksamkeit entwickeln (Quan-hong et al., 2004; Shang et al., 2006; Kuroki et al., 2007). Der Vorteil gegenüber der PDT ist eine größere Eindringtiefe der Ultraschallwellen in das Gewebe im Vergleich zum Licht.

Porphyryne können auch in der Strahlentherapie eingesetzt werden, um als Radiosensibilisatoren den Effekt der Therapie zu erhöhen. Photofrin II hat sich in ersten Studien als vielversprechender Wirkstoff erwiesen (Schaffer et al., 2002). Ein synergistischer Effekt von Bestrahlung nach Gabe von Photofrin II als Radiosensibilisator konnte für Blasenkarzinomzelllinien und Glioblastome nachgewiesen werden (Schaffer et al., 2005).

Um die Selektivität der Porphyrine für das Zielgewebe zu erhöhen, gibt es Versuche, diese an monoklonale Antikörper zu binden, die wiederum spezifisch an das Tumorgewebe binden. (van Dongen et al., 2004). Dieses Verfahren wird Photoimmuntherapie genannt.

1.5 Erhöhung der Therapiewirksamkeit

1.5.1 Modulation der Effluxtransporter

Ein Problem der Behandlungsformen, bei denen Sensibilatoren eingesetzt werden, ist das Erreichen einer ausreichenden Konzentration dieser Substanzen im Tumorgewebe. Für die Porphyrine sind, wie oben genannt, drei potentielle Transporter nachgewiesen, die diese aus der Zelle heraustransportieren. So zeigten Usuda et al., dass die Wirksamkeit einer PDT mit Porphyrinen davon abhängt, ob auf den Tumorzellen der Efflux-Transporter ABCG2 exprimiert ist oder nicht (Usuda et al., 2009).

Daher gibt es Versuche, diesen Transporter gleichzeitig zu blockieren oder seine Expression zu vermindern, um dadurch die intrazelluläre Porphyrin-Konzentration zu

erhöhen (Hardwick et al., 2007). Für verschiedene Substanzen konnte bisher eine blockierende Wirkung an ABCG2 nachgewiesen werden. Hierzu gehören beispielsweise Mycotoxin, Fumitremorgin C (Rabindran et al., 2000) und der Kinaseinhibitor Gefitinib (Yanase et al., 2004; Nakamura et al., 2005). Es konnte für andere Substanzen nachgewiesen werden, dass sie die Expression von ABCG2 einschränken. Hierzu gehört RzB1, ein hochaktives Ribozym, das direkt gegen die mRNA von ABCG2 gerichtet ist (Kowalski et al., 2002). Außerdem konnten siRNA (small interfering RNA) Moleküle synthetisiert werden, die nach Einschleusen in die Zellen eine deutlich verminderte Expression von ABCG2 bewirkten (Ee et al., 2004).

1.5.2 Kombination der Therapieformen

Um die Wirkung der PDT zu erhöhen, wurde diese in verschiedenen Studien mit einer Hyperthermiebehandlung kombiniert. Es zeigte sich, dass es hierbei zu einer synergistischen Wirkung kommt, wenn die Hyperthermie direkt auf die PDT folgt (Henderson et al., 1985; Waldow et al., 1987; Prinsze et al., 1991; Chen et al., 1996).

Die Hyperthermie selbst wird nur selten alleine angewendet. Meistens wird sie entweder mit einer Strahlentherapie (Stewart und Denekamp, 1978; Kampinga und Dikomey, 2001) oder einer Chemotherapie (Gerad et al., 1984; Bates und Mackillop, 1990) kombiniert, um die Wirksamkeit dieser Behandlungen zu erhöhen. So werden die Zellen sensibler gegenüber den radioaktiven Strahlen bzw. den Chemotherapeutika, wenn sie vorher erhitzt wurden.

1.5.3 Einsatz von Thermosensibilatoren

Auch bei Hyperthermiebehandlungen können Sensibilatoren eingesetzt werden, die die Wirksamkeit dieser Therapieform erhöhen sollen. In der Literatur gibt es hierzu zwei Ansätze, wobei einerseits der pH-Wert im Tumor und andererseits die Tumordurchblutung beeinflusst werden.

So konnte für das diuretisch wirkende Amilorid und seine Analoga ein thermosensibilisierender Effekt nachgewiesen werden. Amilorid hemmt den Na^+/H^+ -Antiporter und bewirkt so eine Senkung des pH-Werts. Da Zellen in saurem Milieu für eine thermische Behandlung sensibler sind, konnte so die Thermosensibilität erhöht werden (Song et al., 1994 und 1994a; Lyons und Song, 1995).

Ein weiterer Versuchsansatz ist der Einsatz von Arsentrioxid (ATO). Dieses ist als Chemotherapeutikum für die refraktäre akute Promyelozyten Leukämie bekannt. Der genaue Wirkmechanismus ist nicht erforscht. ATO bewirkt durch vaskuläre Schäden eine

Verminderung der Tumorperfusion. Es konnte gezeigt werden, dass diese Wirkung zu einem erhöhten Ansprechen auf eine Hyperthermiebehandlung führt (Griffin et al., 2000).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Thema dieser Arbeit war die Untersuchung von Porphyrinen (hier Photosan) als mögliche Sensitizer jenseits der PDT. Für eine Verwendung als Thermosensibilatoren gibt es bisher keine Beschreibung in der Literatur.

Wie in den vorangegangenen Abschnitten erwähnt, zeichnen sich Porphyrine als Photosensibilatoren bei der PDT durch mehrere Aspekte aus. Aufgrund verschiedener Mechanismen reichern sie sich im Tumorgewebe an, schädigen dieses nach Energiezufuhr selektiv und zeigen eine geringe systemische Toxizität. Der Nachteil der PDT bzw. eine Einschränkung in der Anwendbarkeit beruht auf der geringen Eindringtiefe der Lichtstrahlen in das Gewebe. Daher können nur Tumoren behandelt werden, die oberflächlich lokalisiert sind.

Die Überlegung war nun, sich die Eigenschaften der Porphyrine auch bei einer Hyperthermiebehandlung zunutze zu machen, um die Wirksamkeit dieser Therapieform zu erhöhen. Da Wärme überall im Körper appliziert werden kann, wären so auch tiefer im Gewebe lokalisierte Tumoren erreichbar.

In dieser Arbeit sollten folgende Aspekte untersucht werden. Zum einen ging es um die Frage, welchen Einfluss eine thermische Behandlung auf die Aufnahme eines radioaktiv markierten Porphyrins durch Tumorzellen hat. Hierbei konnte über Messung des radioaktiven Zerfalls der Uptake berechnet werden.

Zum anderen wurde untersucht, ob es beim Einsatz radioaktiv markierter Porphyrine im Vergleich zu nicht markierten Porphyrinen einen Unterschied im Zellwachstum gibt und ob eine zusätzliche Hyperthermiebehandlung einen Einfluss hat.

2 Materialien und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Die Durchführung der Zellkulturexperimente erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II, wobei mit sterilen Einwegmaterialien und Reagenzien gearbeitet wurde.

Als Zelllinien wurden MB49-Zellen (Medizinische Universität zu Lübeck, Klinik für Urologie, Lübeck, Deutschland) und JIMT1-Zellen (DSMZ-Nr. ACC 589, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) verwendet.

Die MB49-Zellen sind karzinogen-induzierte Urothelkarzinomzellen, die aus männlichen Mäusen gewonnen wurden (Summerhayes und Franks, 1979).

Die JIMT1-Zellen wurden zum ersten Mal im Jahr 2003 in einer Pleurametastase einer 62-jährigen Patientin mit duktalem Mammakarzinom nachgewiesen (Tanner et al., 2004).

Beide Zelllinien wurden als anheftende Monolayerkulturen in sterilen Zellkulturflaschen (Zellkulturflaschen 50 ml, Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland) gezogen. Die Flaschen hatten eine Anheftungsfläche von 25 cm². Als Kulturmedium wurde Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM, high Glucose (4,5 g/l), with Sodium Pyruvate, with L-Glutamine, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) verwendet. Diesem wurden 10 % Fetal Bovine Serum (PAA, Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) und 1 % Penicillin/Streptomycin (10000 Units/10 mg/ml; PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) zugefügt. Pro Zellkulturflasche wurden 6,6 ml Kulturmedium verwendet.

Die Zellkulturen wurden im Brutschrank (Heraeus 6000, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) bei einer Temperatur von 37 °C und einer CO₂-Begasung von 5 % inkubiert. Das Aufteilen der Zellen erfolgte zweimal pro Woche, bei MB49 im Verhältnis 1:40, bei JIMT1 im Verhältnis 1:10.

2.1.2 Umsetzen der Zellen

Zum Umsetzen der Zellen wurde das Kulturmedium abgegossen und der Zellrasen zweimal mit jeweils 5 ml PBS-Puffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gespült. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche erfolgte mit 1 ml Trypsin/EDTA (Trypsin/EDTA (1:250), PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), welches auf den

Zellrasen pipettiert wurde. Nach einer Inkubationszeit im Brutschrank von 10 Minuten wurde das Trypsin mit 5 ml Kulturmedium neutralisiert und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen (Polystyrol-Röhrchen, 15 ml, Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland) abgegossen. Mit der gleichen Menge PBS-Puffer wurde noch einmal nachgespült und dieser in das gleiche Röhrchen abgegossen. Die Zellen wurden daraufhin mit 1100 rpm bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert (Heraeus Sepatech Varifuge 3.2 RS, Heraeus, Osterode, Deutschland). Anschließend wurde der Überstand abgegossen, das Zellpellet mit Kulturmedium in der gewünschten Menge suspendiert und dann auf neue Kulturflaschen aufgeteilt. Diese wurden auf 6,6 ml Medium aufgefüllt und zum Inkubieren in den Brutschrank gestellt.

2.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Das Einfrieren der Zellen erfolgte analog dem Umsetzen. Nach dem Zentrifugieren wurde das Zellpellet allerdings in 1 ml Einfriermedium (Cyromaxx, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) suspendiert und die Suspension in ein Einfriereröhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden sofort in eine Kühlbox gestellt und diese für 24 Stunden in einen Gefrierschrank bei -20 °C. Danach kam die Box wiederum für 24 Stunden in einen Gefrierschrank bei -80 °C. Daraufhin wurden die Zellen schließlich in Flüssigstickstoff eingefroren.

2.2 Substanzen

2.2.1 Radioiodid

¹³¹Iod ist ein Radionuklid mit einer Halbwertszeit von 8 Tagen. Bei seinem Zerfall entsteht β^- -Strahlung mit einer maximalen Reichweite von 2,4 mm in Wasser. ¹³¹I (MDS Nordion S.A., Fleurus, Belgien) wird im Kernreaktor erzeugt. Die Lieferung erfolgte als Natriumiodid, welches in Phosphatpuffer gelöst war. Die Ausgangskonzentration betrug 7400 MBq/ml. Mit 0,9 %iger isotonischer Natriumchloridlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurden die gewünschten Verdünnungen hergestellt.

2.2.2 Photosan®

Das verwendete Photosan® (Seehof Laboratorium Forschungs- und Entwicklungsgesellschaft mbH) ist ein aufgereinigtes Poly-Hämatoporphyrinderivat. Laut Herstellerangaben enthält es vorwiegend oligomere Verbindungen, während monomere

und dimere Verbindungen durch einen patentierten Aufarbeitungsprozess weitgehend entfernt wurden, da sie für eine langanhaltende Lichtsensibilisation verantwortlich sind.

2.3 Markierung von Photosan mit ^{131}I Iodid

2.3.1 Prinzip der Markierung

Die Markierung erfolgte nach dem Prinzip der direkten oxidativen Iodierung in IODO-GEN® Pre-Coated Iodination Tubes (PIERCE Biotechnology, Inc., Rockford, USA). Diese Glasröhrchen sind von innen mit IODO-GEN (1,3,4,6-tetrachloro-\alpha,6alpha-diphenylglycouril) als Iodierungsreagenz beschichtet, welches als Katalysator wirkt. Die Iodid-Ionen (I^-) werden zu Iod-Kationen (I^+) oxidiert, welche mit Tyrosinresten im Photosan-Molekül reagieren und jeweils ein Proton des aromatischen Rings ersetzen (Abb.4). Für den Ablauf der Reaktion ist ein neutraler pH-Wert erforderlich.

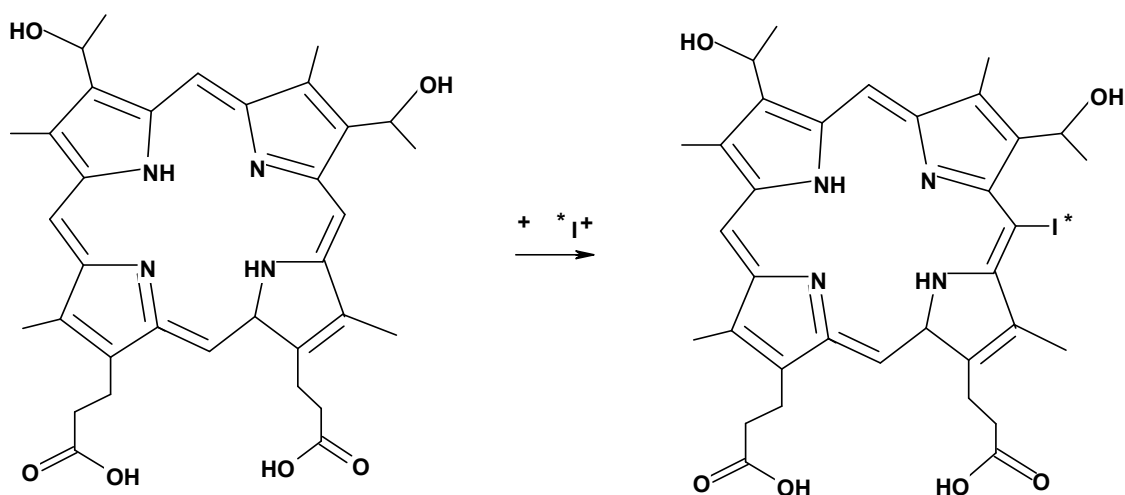


Abbildung 4: Die Iodierungsreaktion. Es ist Hämatoporphyrin dargestellt, an dessen konjugiertem Porphyrinsystem ein Proton durch ein Iod-Kation (I^+) ersetzt wird. Der Stern * kennzeichnet die Radioaktivität des ^{131}I -Isotops.

2.3.2 Ablauf der Markierung

Für die Markierung wurde Photosan in einer Konzentration von 2 g/l in PBS-Puffer gelöst. Hiervon wurden 50 μl (entsprechen 100 μg Photosan) in ein IODO-GEN®-Röhrchen pipettiert. Dieses wurde zuvor mit 1 ml PBS-Puffer gespült und davon 100 μl am Röhrchenboden belassen, um einen neutralen pH-Wert zu erreichen. Dazu wurde $^{131}\text{I}^-$ mit einer Aktivität von 50 MBq gegeben. Die Reaktion erfolgte unter ständigem Rühren durch einen Magnetrührer (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Nach 45

Minuten wurde die Reaktion gestoppt, indem die Reaktionslösung in eine Spritze aufgezogen wurde.

2.3.3 Qualitätskontrolle

Der Anteil an freiem, nicht an Photosan gebundenem ^{131}I sollte möglichst gering gehalten werden und 10 % nicht überschreiten. Zum Nachweis der Reinheit des markierten Photosans wurde daher eine Qualitätskontrolle mittels Papier-Dünnschichtchromatographie (DC) durchgeführt. Dazu wurde ein Tropfen der Lösung an das untere Ende eines Instant-Thin-Layer-Chromatographie-Streifens (Pall Corporation GmbH, Dreieich, Deutschland) gegeben. Nach vollständigem Trocknen des Tropfens wurde der Streifen in eine 0,5 cm hoch mit Aceton gefüllte Laufkammer gestellt, in der die Luft mit Aceton abgesättigt war. Sobald das Laufmittel 1 cm vom oberen Rand des Streifens entfernt war, wurde dieser herausgenommen und in der Mitte durchgeschnitten. Im Aktivimeter (Dosiskalibrator CRC-15R, Capintec, INC., New York, USA) wurde die Aktivität des unteren Teils (A) und beider Teile zusammen (A_{gesamt}) gemessen.

Nach der Formel

$$RC = (A/A_{\text{gesamt}}) * 100$$

wurde dann die chemische Reinheit RC von ^{131}I -Photosan am gesamten ^{131}I berechnet, welche größer als 90 % sein musste.

2.3.4 Stabilitätsprüfung

Es wurde die Stabilität der Verbindung ^{131}I -Photosan über den Versuchszeitraum von 72 Stunden ermittelt. Hierzu wurde ^{131}I -Photosan in Kulturmedium bzw. in PBS-Puffer jeweils bei Raumtemperatur, bei 37 °C und bei 4 °C inkubiert. Nach 2, 4, 24, 48 und 72 Stunden wurde mittels Dünnschichtchromatographie – analog der Qualitätsprüfung – der Anteil RC von ^{131}I -Photosan im Verhältnis zu freiem ^{131}I in jeder dieser Proben nach $A/A_{\text{gesamt}} = RC$ berechnet.

2.4 Durchgeführte Versuche

Mit den MB49-Zellen wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Versuche durchgeführt. Die Bestimmung von Uptake und/oder Zellzahl erfolgte jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach Versuchsstart. Die römischen Zahlen für die Versuchsbezeichnung werden im Ergebnisteil wieder aufgefasst und beziehen sich auf diese Tabelle.

	Versuche	Ziel/Untersuchung
I	Zellkultur bei 37°C	Zellwachstum ohne Einfluss von PhOTOSAN oder Hitze
II	Inkubation mit 0,21 µg/l kaltem PhOTOSAN	Zellwachstum unter Einfluss von kaltem PhOTOSAN
III	Basisexperiment: Inkubation mit 0,21 µg/l ¹³¹ I-PhOTOSAN	Zellwachstum und Uptake unter Einfluss von ¹³¹ I-PhOTOSAN
IV	Thermische Behandlung	Zellwachstum unter Einfluss von Hitze
V	Hitze und Inkubation mit 0,21 µg/l kaltem PhOTOSAN	Zellwachstum unter Einfluss von Hitze und kaltem PhOTOSAN
VIa	Hitze direkt vor Zugabe von 0,21 µg/l ¹³¹ I-PhOTOSAN	Uptake und Zellwachstum unter Einfluss von ¹³¹ I-PhOTOSAN mit zusätzlichem Erhitzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten
VIb	Hitze direkt nach Zugabe von 0,21 µg/l ¹³¹ I-PhOTOSAN	
VIc	Hitze 24h nach Zugabe von 0,21 µg/l ¹³¹ I-PhOTOSAN	
VII	Inkubation mit 2,33 µg/l kaltem PhOTOSAN	Zellwachstum bei erhöhter Konzentration an kaltem PhOTOSAN
VIII	Inkubation mit 0,21 µg/l ¹³¹ I-PhOTOSAN und 2,12 µg/l kaltem PhOTOSAN	Zellwachstum und Uptake bei verminderter spezifischer Aktivität
IX	Inkubation mit 2,33 µg/l ¹³¹ I-PhOTOSAN	Zellwachstum und Uptake unter Einfluss erhöhter ¹³¹ I-PhOTOSAN-Konzentration
X	Hitze und Inkubation mit 2,33 µg/l kaltem PhOTOSAN	Zellwachstum unter Einfluss von Hitze und erhöhter Konzentration an kaltem PhOTOSAN
XI	Hitze und Inkubation mit 0,21 µg/l ¹³¹ I-PhOTOSAN und 2,12 µg/l kaltem PhOTOSAN	Zellwachstum und Uptake unter Einfluss von Hitze und verminderter spezifischer Aktivität
XII	Hitze und Inkubation mit 2,33 µg/l ¹³¹ I-PhOTOSAN	Zellwachstum und Uptake unter Einfluss von Hitze und erhöhter ¹³¹ I-PhOTOSAN-Konzentration

Tabelle 1: Übersicht über die mit MB49 durchgeführten Versuche

Mit JIMT1-Zellkulturen wurden einige der mit MB49 durchgeführten Versuchsvarianten wiederholt. Diese sind in Tabelle 2 aufgelistet. Es wurde jeweils dieselbe römische Ziffer verwendet wie bei den entsprechenden Versuchen mit MB49.

	Versuche	Ziel/Untersuchung
I	Zellkultur bei 37°C	Zellwachstum ohne Einfluss von Photosan oder Hitze
II	Inkubation mit 0,21 µg/l kaltem Photosan	Zellwachstum unter Einfluss von kaltem Photosan
III	Basisexperiment: Inkubation mit 0,21 µg/l ¹³¹ I-Photosan	Zellwachstum und Uptake unter Einfluss von ¹³¹ I-Photosan
IV	Thermische Behandlung	Zellwachstum unter Einfluss von Hitze
V	Hitze und Inkubation mit 0,21 µg/l kaltem Photosan	Zellwachstum unter Einfluss von Hitze und kaltem Photosan
VIb	Hitze nach Zugabe von 0,21 µg/l ¹³¹ I-Photosan	Uptake und Zellwachstum unter Einfluss Hitze und ¹³¹ I-Photosan
VII	Inkubation mit 2,33 µg/l kaltem Photosan	Zellwachstum bei erhöhter Konzentration an kaltem Photosan
VIII	Inkubation mit 0,21 µg/l ¹³¹ I-Photosan und 2,12 µg/l kaltem Photosan	Zellwachstum und Uptake bei verminderter spezifischer Aktivität
X	Hitze und Inkubation mit 2,33 µg/l kaltem Photosan	Zellwachstum unter Einfluss von Hitze und erhöhter Konzentration an kaltem Photosan
XI	Hitze und Inkubation mit 0,21 µg/l ¹³¹ I-Photosan und 2,12 µg/l kaltem Photosan	Zellwachstum und Uptake unter Einfluss von Hitze und verminderter spezifischer Aktivität

Tabelle 2: Übersicht über die mit JIMT1-Zellen durchgeführten Versuche

2.4.1 Inkubation mit ¹³¹I-Photosan

Die – wie in 2.3.2 beschrieben – hergestellte ¹³¹I-Photosan-Lösung wurde so verdünnt, dass jeweils 100 µl eine Aktivitätsmenge von 0,7 MBq enthielten. Bei einer chemischen Reinheit von annähernd 100 % entsprach dies einer Photosanmenge von 0,0014 µg. Nach einem Mediumwechsel wurden zu den Zellkulturen pro Flasche jeweils 100 µl des ¹³¹I-Photosans in das Kulturmedium pipettiert, um eine Konzentration von 0,21 µg/l

¹³¹I-Photosan in der Kulturflasche zu erhalten. Die zugegebene Aktivitätsmenge und der Zeitpunkt wurden genau bestimmt und festgehalten, um die späteren Messergebnisse mittels des Zerfallsgesetzes korrigieren zu können. Die Inkubationszeit betrug 24, 48 und 72 Stunden, was den jeweiligen Messzeitpunkten entsprach.

2.4.2 Messung der applizierten Aktivitätsmenge

Im Aktivimeter wurde der Wert der applizierten Aktivität gemessen. Hierbei beruht das Messprinzip darauf, dass die Radioaktivität in einer gasgefüllten Kammer Ionisationen erzeugt, die als Strom gemessen werden können. Dieser Strom ist proportional zur Aktivität eines bestimmten Radionuklids. In dem Gerät sind Programme für unterschiedliche Isotope eingespeichert.

2.4.3 Abschätzung der Bestrahlungsdosis durch ¹³¹I

Die maximale Bestrahlungsdosis auf die Zellen wurde berechnet nach:

$$\text{Bestrahlungsdosis [Gy]} = \text{Energie [J]} / \text{Masse [kg]}$$

mit: Energie [eV] = $E_{\text{durchschnittl.}}$ x durchschnittl. Aktivität ¹³¹I x Bestrahlungszeit

für β^- gilt: $E_{\text{durchschnittl.}} = 1/3 E_{\text{max}}$; durchschnittl. Aktivität ¹³¹I während 24 h ~ 95 % der Anfangsaktivität und 1 eV = $1,602 \times 10^{-19}$ J

Dabei wurde die Menge des Kulturmediums als Masse eingesetzt und der maximale Uptake als 100 % angenommen. Diese Annahmen ergeben die maximale Dosis in dem geschlossenen Kultursystem. Somit ist das Ergebnis eine Abschätzung der Dosis, die maximal auf die Zellen gewirkt hat.

Für das Basisexperiment ergeben sich hiermit folgende Bestrahlungsdosen:

Zeit [h]	24	48	72
Bestrahlungsdosis [Gy]	0,25	0,48	0,69

Für die Versuche mit höherer ¹³¹I-Photosan-Aktivität entsprechend:

Zeit [h]	24	48	72
Bestrahlungsdosis [Gy]	2,75	5,28	7,59

2.4.4 Uptake und Zellzahl

2.4.4.1 Gewinnung der Zellen

Zum Ernten der Zellen wurde zuerst das Medium abgegossen und der Zellrasen zweimal mit 5 ml PBS-Puffer gespült. Das Ablösen des Zellrasens vom Boden der Zellkulturflasche erfolgte durch 1 ml Trypsin/EDTA. Nach zehnmütiger Reaktion bei 37 °C im Brutschrank wurde das Trypsin mit 5 ml Medium neutralisiert. Die abgelösten Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen abgegossen und die Flaschen mit PBS-Puffer nachgespült. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten bei 1100 rpm und 4 °C zentrifugiert, danach der Überstand abgegossen und das Zellpellet in 1,5 ml Medium suspendiert.

2.4.4.2 Messen des Uptake

Die so erhaltenen 1,5 ml Zellsuspension wurden zur Messung der Zerfälle pro Minute in einem Bohrlochdetektor (Multi-Logger 5310, Bertold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland) verwendet. Das Prinzip besteht darin, dass die Messeinheit Szintillations-Lichtblitze registriert, die durch die Energie der absorbierten Strahlung im NaI-Szintillationskristall entstehen. Der Ausgabewert von Zerfällen pro Minute (cpm, counts per minute) ist proportional zur Anzahl der Lichtblitze. Diese wiederum ist abhängig von der Stoffmenge, der Aktivität und dem Radioisotop.

Die Messzeit betrug je Probe zweimal 1 Minute. Von den beiden Werten wurde der Mittelwert gebildet. Pro Messzeitpunkt wurde zusätzlich der Wert einer Kontrollprobe bestimmt, die keine Zellen enthielt, sondern nur Medium und ¹³¹I-Photosan. Dieser Leerwert wurde von jedem Probenwert subtrahiert. Für die spätere Zerfallskorrektur wurde der genaue Zeitpunkt der jeweiligen Messung festgehalten.

2.4.4.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension in Eppendorfgläsern (1,5 ml SafeSeal Micro Tubes, SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) noch stärker verdünnt. Zu jeder Probe wurden 20-100 µl Trypanblau (Trypanblue solution 0,4 %, SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) pipettiert. Dieses färbt nicht mehr intakte Zellen und ermöglicht daher eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen. Die Auszählung erfolgte unter einem Auflichtmikroskop (BX40F, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer (Assistent, Sondheim, Deutschland) und Haemocytometer-Deckgläsern (Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland).

Dabei wurde aus den vier Werten einer Seite der Mittelwert gebildet und die Zellzahl unter Berücksichtigung aller vorgenommenen Verdünnungen berechnet.

2.4.4.4 Einfluss von kaltem Photosan

Um den Einfluss von kaltem Photosan auf die Zellproliferation zu untersuchen, wurden Kulturen mit 0,21 µg/l kaltem Photosan inkubiert (II), was der Konzentration des ¹³¹I-Photosan im Basisexperiment (III) entsprach.

2.4.4.5 Erhitzen der Zellen

Um den Einfluss höherer Temperaturen auf den Photosan-Uptake sowie die Zellzahlen zu untersuchen, wurden die Zellkulturen für einen bestimmten Zeitraum in einem Hitzeschrank (Hybaid Hybridisation oven, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland) inkubiert. Dies erfolgte über 10 bzw. 20 Minuten bei Temperaturen von 45 °C, 50 °C oder 60 °C. Für das Erhitzen gab es drei verschiedene Zeitpunkte. Zum einen direkt vor Mediumwechsel und ¹³¹I-Photosan-Gabe (VIa), des weiteren direkt nach Medienwechsel und anschließender ¹³¹I-Photosan-Gabe (VIb) und als drittes 24 Stunden nach der Gabe von ¹³¹I-Photosan (VIc). Ebenso wurden Kulturen erhitzt, die mit kaltem Photosan (V) bzw. ohne Photosan inkubiert wurden (IV).

2.4.4.6 Erhöhte Photosankonzentration

Um die Auswirkung einer erhöhten Photosankonzentration auf Zellzahl und Uptake untersuchen zu können, wurde die Konzentration des kalten Photosans bzw. des ¹³¹I-Photosan erhöht. Hierzu wurde die – analog 2.3.2 – hergestellte ¹³¹I-Photosan-Lösung so verdünnt, dass 100 µl eine Aktivitätsmenge von 7,7 MBq enthielten, was einer Menge von 0,0154 µg ¹³¹I-Photosan entsprach. In einer Variante wurden zu Zellkulturen wiederum 100 µl dieser Lösung pipettiert, wodurch eine Konzentration von 2,33 µg/l ¹³¹I-Photosan pro Zellkulturflasche erreicht wurde (IX). Entsprechend wurden Zellkulturen in einer weiteren Versuchsvariante mit 2,33 µg/l kaltem Photosan inkubiert (VII). In einem dritten Versuchsansatz wurde zu den Kulturen 0,0014 µg ¹³¹I-Photosan und 0,014 µg kaltes Photosan gegeben (VIII). Dies entsprach einer Konzentration von 0,21 µg/l ¹³¹I-Photosan und 2,12 µg/l kaltem Photosan pro Kulturflasche. Auf diese Weise wurde die spezifische Aktivität des ¹³¹I-Photosan erniedrigt.

2.4.4.7 Hitze und erhöhte Photosankonzentration

Um eine Aussage treffen zu können, wie sich Erhitzen und erhöhte Photosankonzentrationen gleichzeitig auswirken, wurden Zellkulturen thermisch behandelt, die mit einer erhöhten Konzentration Photosan inkubiert wurden.

Dies erfolgte mit Zellkulturen, die 2,33 µg/l ¹³¹I-Photosan (XII) oder 2,33 µg/l kaltes Photosan (X) erhalten hatten, sowie Kulturen, die mit 0,21 µg/l ¹³¹I-Photosan und 2,12 µg/l kaltem Photosan inkubiert wurden (XI).

2.4.4.8 Kontrolle

Als Kontrolle wurden Zellen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, die kein Photosan erhielten und nicht erhitzt wurden (I).

2.5 Auswertung und Statistik

2.5.1 Standardkurve

Zunächst wurde eine Standardkurve erstellt. Dazu wurden 10 µl, 25 µl, 50 µl, 100 µl und 400 µl einer ¹³¹I-Lösung (154 kBq/ml) mit Wasser jeweils auf 1,5 ml aufgefüllt. Die Proben wurden im Bohrloch gemessen. Aus den Werten wurde in Excel mittels linearer Regression eine Geradengleichung ermittelt. Mit Hilfe dieser Gleichung wurden die Zerfälle pro Minute (cpm) in MBq umgerechnet.

2.5.2 Rechnungen

Bei der Interpretation der Messergebnisse wurde der radioaktive Zerfall berücksichtigt. Da dieser einer Kinetik nullter Ordnung unterliegt, ist die Aktivität zum Zeitpunkt (t) nur vom Messzeitpunkt und der Halbwertszeit des Isotops abhängig. Die Stoffmenge spielt für den Zerfall keine Rolle.

$$A(t) = A(0) * \exp(-\ln 2 * t / t_{1/2})$$

Nach linearer Umformung ergibt sich daraus:

$$A(0) = A(t) / (\exp(-\ln 2 * t / t_{1/2}))$$

mit $A(0)$ = Aktivität bei Zugabe von ¹³¹I, $A(t)$ = Aktivität zum Messzeitpunkt,
 t = Messzeitpunkt, $t_{1/2}$ = Halbwertszeit

Der Messwert des Uptake wurde durch Einsetzen in die obige Gleichung korrigiert. Anschließend erfolgte mit Hilfe der zuvor ermittelten Geradengleichung die Berechnung des Werts in MBq. Das Ergebnis wurde auf die pro ml applizierte Aktivität bezogen. Da ein vom Zellwachstum unabhängiger Vergleichswert erzielt werden sollte, wurde der prozentuale Uptake daraufhin auf 10^6 Zellen bezogen.

2.5.3 Statistische Auswertungen

Für die statistischen Auswertungen wurde das Programm SPSS 15.0 (SPSS inc., Chicago, USA) verwendet. Es wurden aus den Einzelwerten der Zellzahlen und des Uptake die Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen, 25. und 75. Perzentilen berechnet. Durchgeführt wurden der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben sowie nichtparametrische Tests. So wurde die Signifikanz zwischen den Ergebnissen der einzelnen Versuchsreihen bestimmt. Als Signifikanzniveau wurde 5 % gewählt, was einem $p < 0,05$ entspricht.

3 Ergebnisse

Für die Auswertung der Uptakewerte wurden die Mediane, bei der Zellzahl die Mittelwerte der einzelnen Versuchsvarianten verwendet. Beim Vergleich Ergebnisse einzelner Versuchsvarianten miteinander wurden immer nur die Einzelwerte der zeitgleich durchgeführten Versuche berücksichtigt, da sich auch die Berechnung der Signifikanz nur auf diese Werte bezieht. Somit ergeben sich teilweise unterschiedliche Mediane/Mittelwerte für dieselbe Variante, wenn diese mit unterschiedlichen Varianten verglichen wird.

3.1 Standardkurve

In der Standardkurve ist zu erkennen, dass ein linearer Zusammenhang zwischen den in den Proben vorgegebenen Werten in der Einheit Becquerel und den gemessenen Zerfällen pro Minute (cpm) besteht. Mittels linearer Regression wurde eine Geradengleichung ermittelt. Aus der Multiplikation der Geradensteigung mit den Zerfällen pro Minute ergeben sich die in Tabelle 3 angegebenen Werte in Bequerel.

Bequerel	0	1540	3850	7700	15400	61600
Cpm	0	20363	51831	100544	201333	812833

Tabelle 3: Gemessene Zerfälle pro Minute (Cpm) bei vorgegebenen Bequerelwerten

Für ^{131}I ergibt sich daraus folgende Geradengleichung:

$$y = 0,0758x + 21,635$$

In Abb.5 sind die ermittelten Werte und die Gerade graphisch dargestellt.

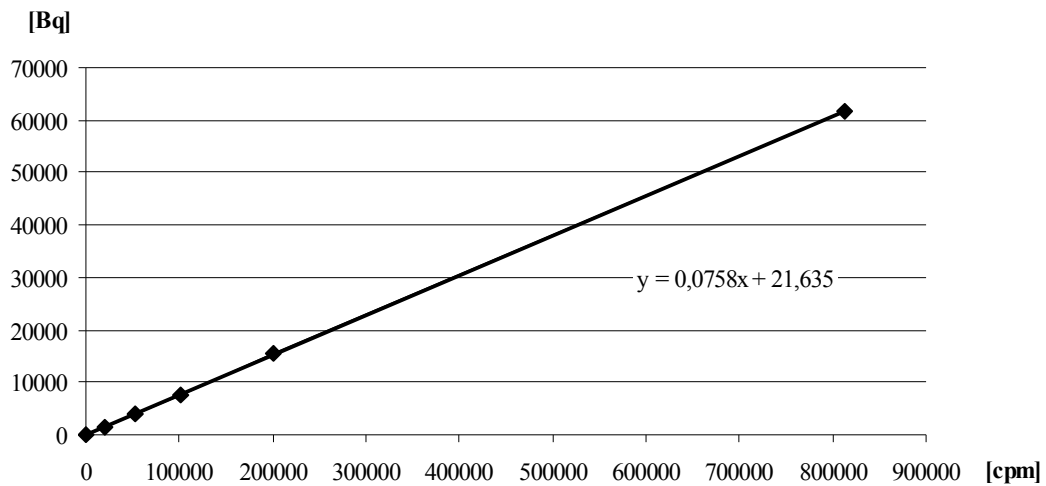


Abbildung 5: Standardkurve für ^{131}I mit eingezeichneter Trendlinie. Es wurden die gemessenen Cpm gegen die vorgegebenen Becquerelwerte aufgetragen. Die ermittelte Geradengleichung ist angegeben.

3.2 Stabilitätsprüfung

Für die Stabilität der Verbindung ^{131}I -Photosan ergaben sich folgende in Tabelle 2 und Abb.6 dargestellten Werte. Es ist der prozentuale Anteil M von ^{131}I -Photosan an dem gesamten ^{131}I angegeben.

Messzeitpunkt [h]	0	2	4	24	48	72
Medium bei Raumtemperatur [%]	95	90	85	86	61	62
PBS bei Raumtemperatur [%]	95	90	67	35	25	31
Medium bei 37 °C [%]	95	89	90	64	62	48
PBS bei 37 °C [%]	95	55	53	32	24	15
Medium bei 4 °C [%]	95	90	91	88	83	87
PBS bei 4 °C [%]	95	87	84	80	73	60

Tabelle 4: Prozentualer Anteil des ^{131}I -Photosan am gesamten ^{131}I

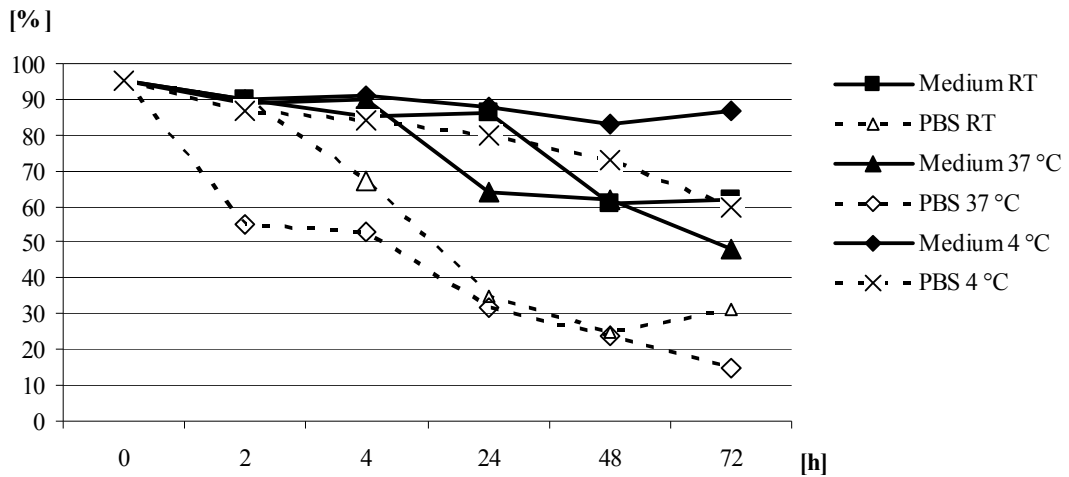


Abbildung 6: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils von ^{131}I -Photosan am gesamten ^{131}I bei Inkubation in Kulturmedium bzw. PBS-Puffer bei Raumtemperatur (RT), 37 °C oder 4 °C

3.3 Uptake durch MB49

3.3.1 Uptake von ^{131}I -Photosan im Basisexperiment

Bei der Messung des Uptake pro 10^6 Zellen nach Inkubation mit $0,21 \mu\text{g/l}$ ^{131}I -Photosan (III) wurden Werte zwischen 1,3 % und 1,1 % ermittelt. Der Uptake nahm im zeitlichen Verlauf signifikant ab ($p < 0,05$). Die Mediane der Uptakewerte sind in Abb.7 dargestellt. Dieses Experiment diente bei allen weiteren Versuchen als Kontrolle.

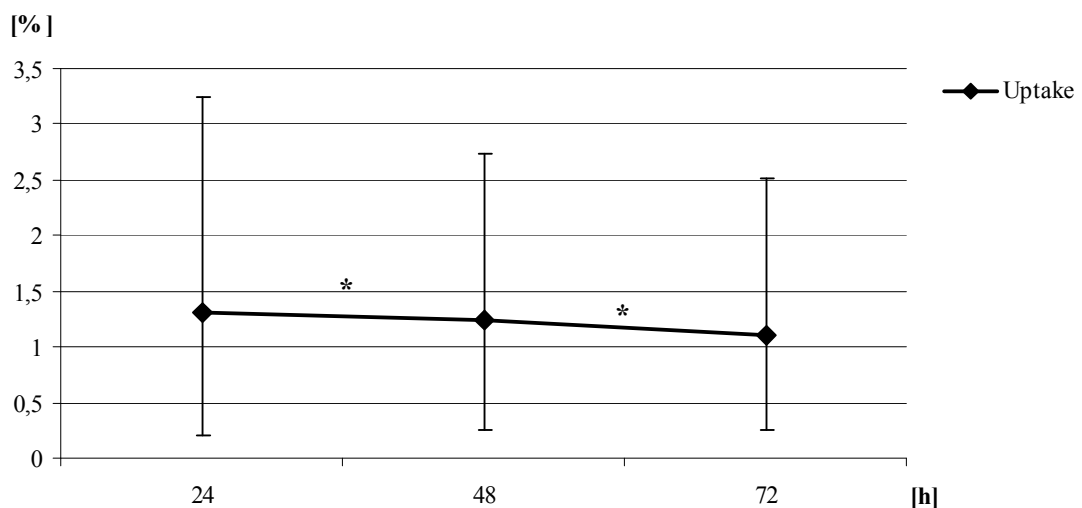


Abbildung 7: Darstellung von M mit Q25 und Q75 des Uptake nach Inkubation mit $0,12 \mu\text{g/l}$ ^{131}I -Photosan. Die Ergebnisse stammen von $n=60$ Experimenten. Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede ($*p < 0,05$).

3.3.2 Erhitzen der Zellen

3.3.2.1 Ermitteln der Temperatur

Um die optimale Temperatur für die Versuchsdurchführung zu ermitteln, wurden Zellkulturen 20 Minuten auf 45 °C, Parallelkulturen 10 bzw. 20 Minuten auf 60 °C erhitzt. Bei 45 °C ergab sich kein Unterschied bei Uptake und im Zellwachstum im Vergleich zu den thermisch unbehandelten Zellen. Die auf 60 °C erhitzten Zellen starben alle ab.

Für die Experimente wurde schließlich ein Erhitzen der Kulturen auf 50 °C über 20 Minuten gewählt.

Beim kontinuierlichen Messen des Temperaturverlaufs einer Probe Wasser ergaben sich die in Tabelle 5 und Abb.8 dargestellten Werte. Es sind jeweils die Mittelwerte von 3 Proben angegeben.

Zeit [min]	0	5	10	20
Temperatur [°C]	33	40	43	46

Tabelle 5: Temperaturverlauf einer Probe Wasser im Wärmeschrank bei 50 °C

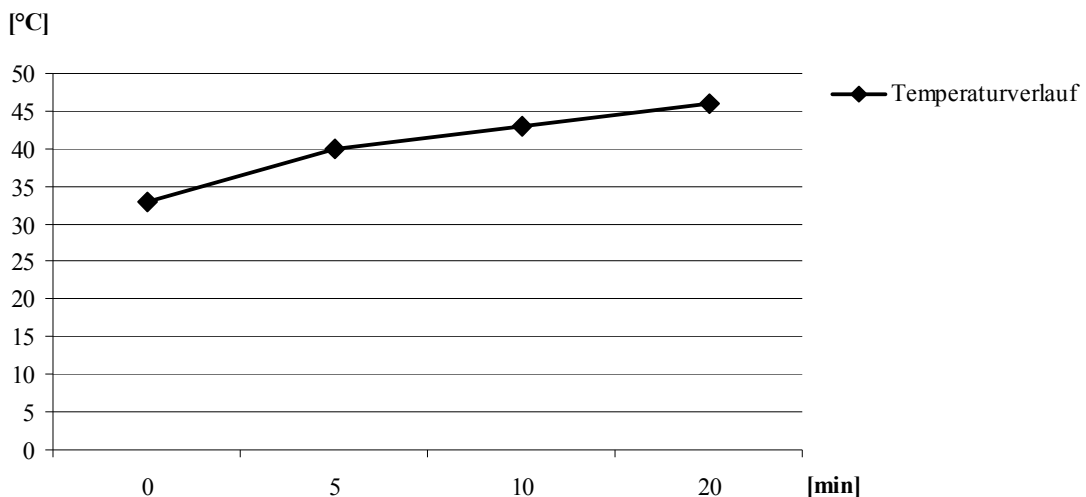


Abbildung 8: Temperaturverlauf einer Probe Wasser im Wärmeschrank bei 50 °C über 20 Minuten

3.3.2.2 Auswirkung des Erhitzens auf den Uptake

Bei den thermisch behandelten Zellkulturen, die – analog zum Basisexperiment – mit 0,21 µg/l ¹³¹I-Photosan inkubiert wurden, wurden im Rahmen von Parallelexperimenten drei Varianten untersucht.

Zwischen der Variante, bei der die Kulturen direkt vor Gabe von ^{131}I -Photosan erhitzt wurden (VIa) und der Variante, bei der das Erhitzen direkt im Anschluss an die ^{131}I -Photosan-Gabe folgte (VIb) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Uptake. Er lag zwischen 1,3 % und 1,9 % pro 10^6 Zellen. Bei beiden Varianten konnte keine signifikante Zeitabhängigkeit des Uptake nachgewiesen werden (Abb.9).

Im Rahmen eines dritten Versuchsansatzes wurden die Kulturen erst 24 Stunden nach Gabe des ^{131}I -Photosans erhitzt (VIc). Diese zeigten Uptakewerte zwischen 1,2 % und 1,5 %, welche im Verlauf signifikant abnahmen ($p < 0,05$). Der Uptake bei dieser Versuchsvariante war signifikant geringer als bei den Kulturen, welche direkt im Anschluss an die Photosan-Gabe erhitzt wurden (VIb; $p < 0,05$).

Im Vergleich zu Kontrollkulturen, die analog zum Basisexperiment behandelt wurden (III), zeigte sich bei allen thermisch behandelten Kulturen zeitunabhängig ein signifikant höherer Uptake ($p < 0,05$). Dies ist in Abb.9 dargestellt. Dabei war der Unterschied bei VIb am stärksten ausgeprägt, weshalb diese Variante für Folgeexperimente gewählt wurde.

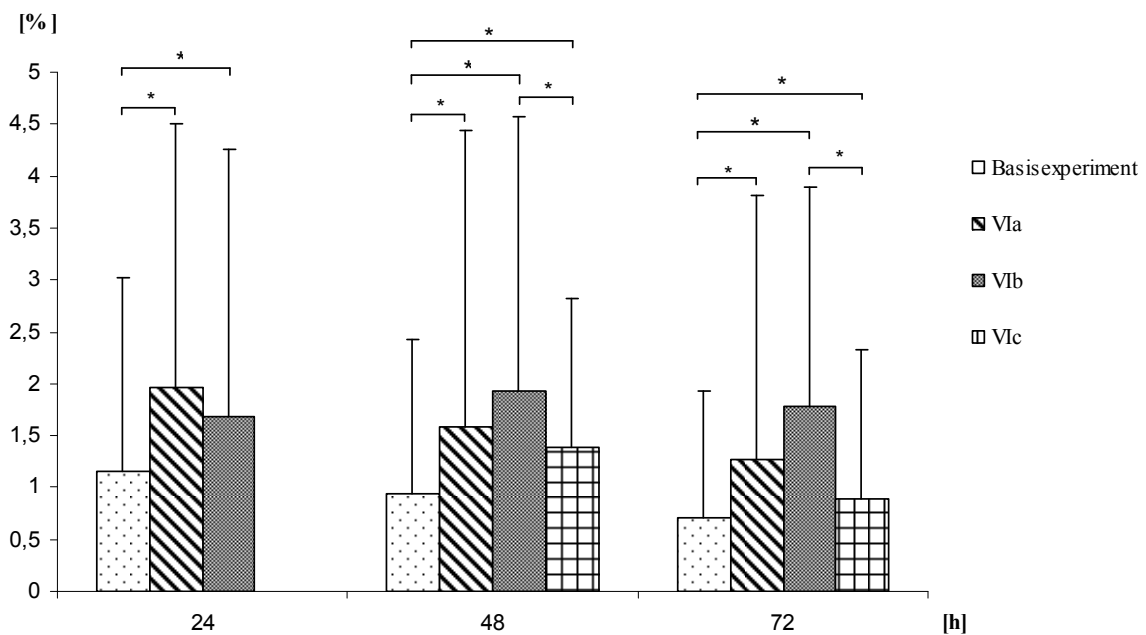


Abbildung 9: Darstellung von M und Q75 des Uptake von Kontrollkulturen, die analog zum Basisexperiment (III) sowie von Kulturen, die thermisch behandelt wurden. (VIa: Hitze vor ^{131}I -Photosan-Zugabe, VIb: Hitze direkt nach ^{131}I -Photosan-Zugabe, VIc: Hitze 24 Stunden nach ^{131}I -Photosan-Zugabe). Die Klammern kennzeichnen Werte, bei denen ein signifikanter Unterschied besteht ($*p < 0,05$ von $n=8$ Untersuchungen).

3.3.3 Auswirkung von erhöhten Photosankonzentrationen

3.3.3.1 Erhöhung der Konzentration an kaltem Photosan

In einem weiteren Versuch wurden die MB49-Zellkulturen zusätzlich zu 0,21 µg/l ¹³¹I-Photosan mit 2,12 µg/l kaltem Photosan (VIII) inkubiert, auf diese Weise die spezifische Aktivität des Porphyrins vermindert, und wiederum Kontrollkulturen (III) mitgeführt. Es kam im zeitlichen Verlauf zu einer signifikanten Abnahme des Uptake pro 10⁶ Zellen (p<0,05). Im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich lediglich nach 24 Stunden ein leicht erhöhter (Zunahme um 0,27 %) Uptake (p<0,05). Zu anderen Zeitpunkten konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Somit war bei MB49 die Aufnahme von Photosan weitgehend unabhängig von der spezifischen Aktivität.

3.3.3.2 Erhöhte Konzentration von ¹³¹I-Photosan

Bei dieser Versuchsvariante erhielten die Zellen eine im Vergleich zum Basisexperiment 11fach höhere ¹³¹I-Photosan-Aktivität (7,7 MBq) bei gleicher spezifischer Aktivität (IX). Der prozentuale Uptake zeigte sich im Vergleich zu dem des Basisexperiments (III) bei 37 °C unverändert. Da er auf die applizierte Anfangsaktivität normiert wurde, war der Uptake proportional zur erhöhten ¹³¹I-Photosan-Konzentration ebenfalls 11fach erhöht.

3.3.4 Auswirkung einer thermischen Behandlung bei erhöhter Photosankonzentration

3.3.4.1 Hitze und erhöhtes kaltes Photosan

In diesem Experiment wurden Zellkulturen, die eine – analog zu 3.3.3.1 – niedrigere spezifische Aktivität erhalten hatten, zusätzlich einer thermischen Behandlung unterzogen (XI). Im zeitlichen Verlauf kam es zu einer signifikanten Abnahme im Uptake pro 10⁶ Zellen (p<0,05). Auch in diesen Kulturen zeigte sich zu allen Messzeitpunkten ein signifikant höherer Uptake als bei nicht erhitzten Kontrollkulturen (III; p<0,05). Dies ist in Abb.10 dargestellt.

Der Uptake durch thermisch behandelte Zellkulturen war in dem von uns untersuchten Bereich unabhängig von der spezifischen Aktivität des ¹³¹I-Photosan (Versuche XI und VIb). Bei Zellkulturen, die mit niedrigerer spezifischer Aktivität inkubiert wurden, zeigten sich nach einer thermischen Behandlung keine signifikanten Unterschiede im Uptake (Versuche XI und VIII).

Es kam also erst zu signifikanten Auswirkungen auf den Uptake, wenn sowohl Hitze als auch eine niedrigere spezifische Aktivität appliziert wurden.

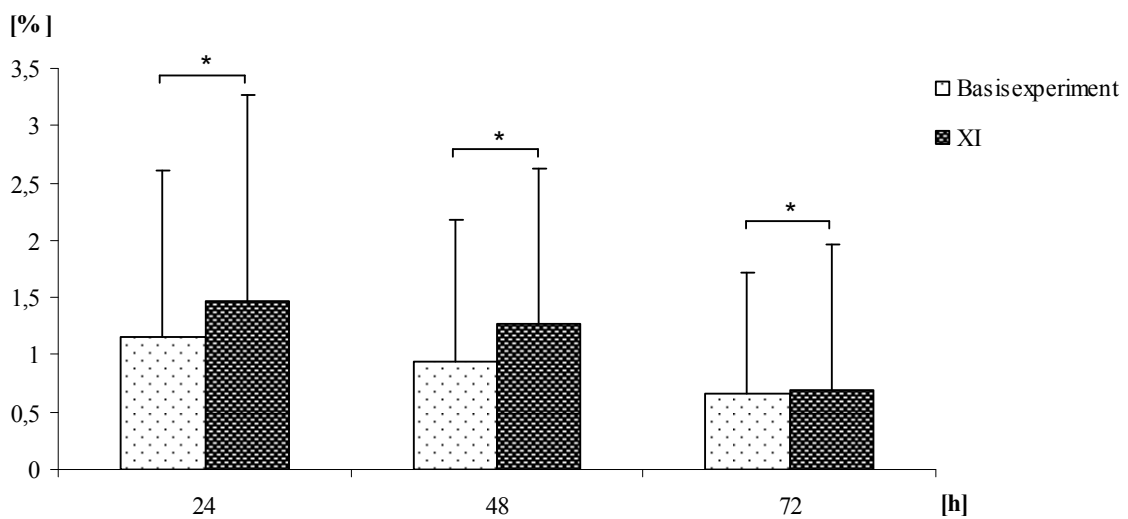


Abbildung 10: Darstellung von M und Q75 des Uptake von erhitzten Kulturen mit niedrigerer spezifischer Aktivität (XI) und Kulturen des Basisexperiment. Die Klammern kennzeichnen signifikant unterschiedliche Ergebnisse (* $p < 0,05$ von $n = 14$ Untersuchungen).

3.3.4.2 Hitze und erhöhte ^{131}I -Photosan-Konzentration

Nach thermischer Behandlung von Kulturen, die mit $2,33 \mu\text{g/l}$ ^{131}I -Photosan inkubiert wurden (XII), ergaben sich Uptakewerte zwischen 2 % und 3,3 % pro 10^6 Zellen. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich eine signifikante Abnahme des Uptake ($p < 0,05$).

Der Uptake durch thermisch behandelte Zellkulturen war unabhängig von der eingesetzten ^{131}I -Photosan-Aktivität (VIb und XII), was bedeutet, dass er auch hier – analog zu 3.3.3.2 – mit Aktivitätserhöhung proportional zunahm.

Die thermisch behandelten Zellkulturen mit erhöhter ^{131}I -Photosan-Aktivität (XII) zeigten jedoch einen signifikant höheren Uptake als thermisch unbehandelte Zellkulturen, unabhängig von der eingesetzten ^{131}I -Photosan-Konzentration ($p < 0,05$; Versuche III und IX). Dies ist in Abb.11 dargestellt.

Somit war der Uptake von der thermischen Behandlung abhängig und proportional zu der applizierten Aktivitätsmenge.

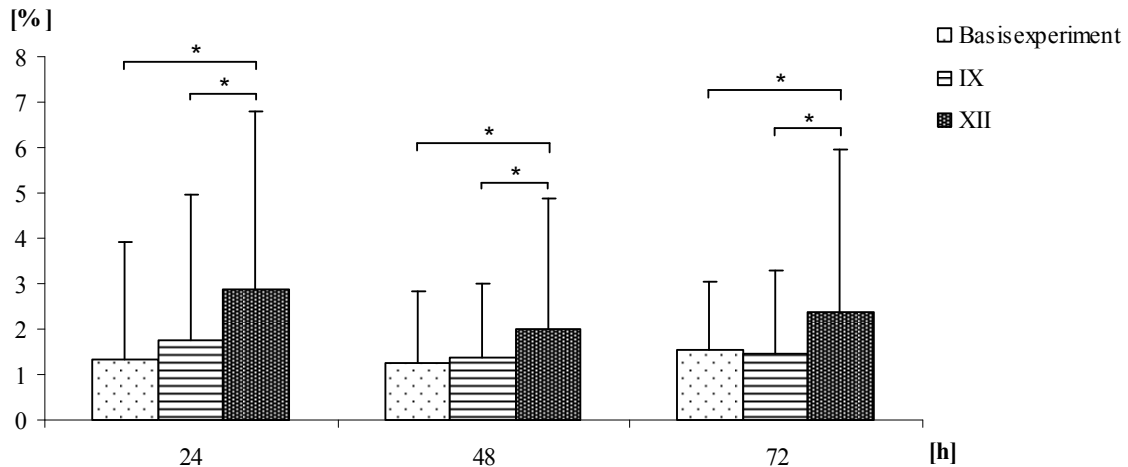


Abbildung 11: Darstellung von M und Q75 des Uptake von Kulturen des Basisexperiments sowie thermisch behandelten (XII) und thermisch unbehandelten (IX) Kulturen mit $2,33 \mu\text{g/l}$ ^{131}I -Photosan. Die Klammern kennzeichnen signifikant unterschiedliche Werte ($*p < 0,05$ von $n=10$ Untersuchungen).

3.4 Zellproliferation von MB49

Bei allen Versuchsvarianten zeigte sich eine signifikante Zunahme der Zellzahl im zeitlichen Verlauf ($p < 0,05$).

3.4.1 Auswirkung von ^{131}I -Photosan im Basisexperiment

Mit $0,21 \mu\text{g/l}$ ^{131}I -Photosan inkubierte Zellkulturen (III) zeigten im Zellwachstum keine signifikanten Unterschiede zu Zellen, die entweder kaltes Photosan (II) oder gar kein Photosan (I) erhalten hatten. ^{131}I -Photosan allein wirkte sich also nicht auf die Zellproliferation aus.

3.4.2 Auswirkung der thermischen Behandlung

Die Zellkulturen der drei Versuchsvarianten, bei denen die Zellen mit $0,21 \mu\text{g/l}$ ^{131}I -Photosan inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhitzt wurden (Versuche VIa, VIb, VIc), zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede in der Zellzahl. Die Zellzahlen waren am geringsten, wenn die Zellen direkt im Anschluss an die ^{131}I -Photosan-Gabe erhitzt wurden (VIb).

Im Vergleich zum Basisexperiment (III) lagen die Zellzahlen der thermisch behandelten Zellen bei 50-75 % und waren somit zu allen Zeitpunkten jeweils signifikant geringer ($p < 0,05$). Die Ergebnisse der Zellzahlen nach thermischer Behandlung wurden für die graphische Darstellung auf die des Basisexperiments standardisiert (Abb.12).

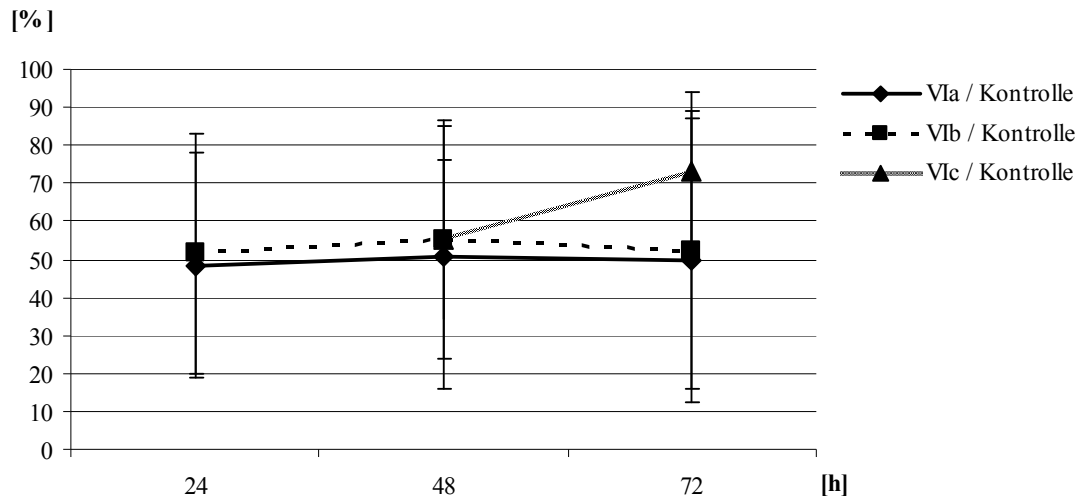


Abbildung 12: Mittelwert \pm Stw. der Quotienten aus Zellzahlen thermisch behandelter Kulturen nach Inkubation mit ^{131}I -Photosan (VIa, VIb, VIc) und denen des Basisexperiments (Kontrolle). Die Werte beziehen sich auf $n=16$ (VIa), $n=32$ (VIb) und $n=10$ (VIc) Untersuchungen.

Auch im Vergleich zu allein thermisch behandelten Kulturen bzw. Hitze in Kombination mit kaltem Photosan inhibierte eine thermische Behandlung, kombiniert mit einer ^{131}I -Photosan-Inkubation, das Zellwachstum signifikant ($p < 0,05$; Versuche IV, V, VIb).

Eine thermische Behandlung der Zellkulturen ohne Photosanzugabe bzw. bei Inkubation mit kaltem Photosan zeigte keine Auswirkungen auf das Zellwachstum (I, II, IV, V).

Die thermische Behandlung allein hatte daher keine Auswirkung auf die Zellproliferation. Auch eine Inkubation mit kaltem Photosan zeigte bei paralleler thermischer Behandlung keine Inhibition des Zellwachstums. Somit hatte nur eine Inkubation mit ^{131}I -Photosan in Kombination mit Hitze eine Auswirkung auf die Zellproliferation.

3.4.3 Auswirkung erhöhter Photosankonzentration

3.4.3.1 Erhöhung der Konzentration an kaltem Photosan

Bei Zellkulturen, die – analog zu 3.3.3.1 – mit niedrigerer spezifischer Aktivität inkubiert wurden (VIII), zeigte sich lediglich nach 48 Stunden eine signifikant geringere Zellzahl als bei Kulturen des Basisexperiments ($p < 0,05$). Im Vergleich zu Zellkulturen, die entsprechend mit $2,33 \mu\text{g/l}$ kaltem Photosan inkubiert wurden (VII), ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.4.3.2 Erhöhte ¹³¹I-Photosan-Konzentration

Eine Inkubation mit höherer ¹³¹I-Photosan-Konzentration (IX) inhibierte das Zellwachstum ab 48 Stunden signifikant um 20-40 % ($p < 0,05$). Dies zeigte sich sowohl im Vergleich zu Kulturen des Basisexperiments als auch zu Kulturen, die mit entsprechend 2,33 µg/l kaltem Photosan (Versuche III und VII) inkubiert wurden. Die Ergebnisse sind in Abb.13 dargestellt. Die erhöhten Konzentrationen an kaltem Photosan hatten keine inhibitorische Wirkung auf das Zellwachstum (Versuche VII und I).

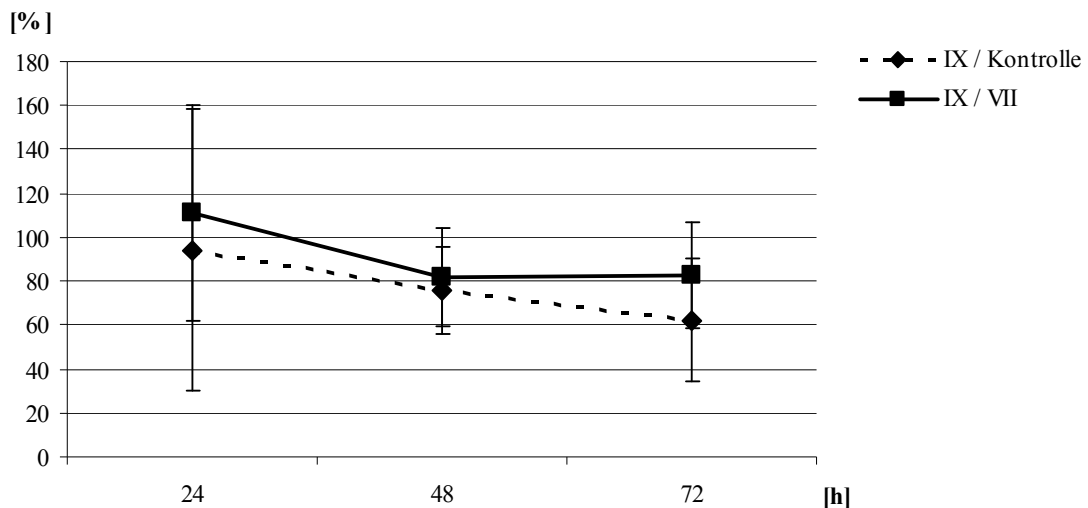


Abbildung 13: Mittelwerte \pm Stw. der Quotienten aus Zellzahlen der Kulturen nach Inkubation mit erhöhter ¹³¹I-Photosan-Aktivität (IX) und denen des Basisexperiments (Kontrolle) bzw. denen der Kulturen mit erhöhtem kaltem Photosan (VII). Die Werte beziehen sich auf $n=10$ (IX / Kontrolle) und $n=7$ (IX / VII) Untersuchungen.

3.4.4 Auswirkung einer thermischen Behandlung bei erhöhter Photosankonzentration

3.4.4.1 Hitze und erhöhtes kaltes Photosan

Zellkulturen, die – analog zu 3.3.4.1 – thermisch behandelt und mit einer niedrigeren spezifischen Aktivität inkubiert wurden, zeigten zu allen Zeitpunkten um 22-40 % signifikant geringere Zellzahlen als die des Basisexperiments ($p < 0,05$; III, XI). In Abb.14 ist der Quotient der Ergebnisse dieser beiden Versuchsvarianten dargestellt.

Im Vergleich zu thermisch behandelten Zellkulturen bei Inkubation mit höherer spezifischer Aktivität zeigten sich im Zellwachstum keine signifikanten Unterschiede (Versuche VIb und XI). Eine Inhibition des Zellwachstums zeigte sich also nur durch thermische Behandlung bei gleichzeitiger Verminderung der spezifischen Aktivität.

Eine Inkubation der Zellkulturen mit 2,33 $\mu\text{g/l}$ kaltem Photosan und paralleles Erhitzen zeigte keinen Einfluss auf die Zellproliferation.

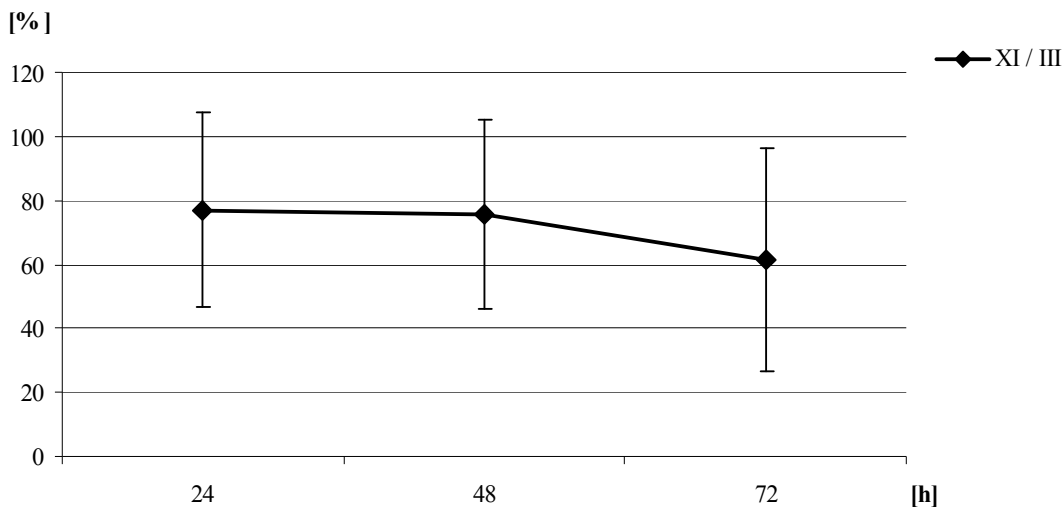


Abbildung 14: Mittelwert \pm Stw. der Quotienten aus Zellzahlen thermisch behandelter Zellen nach Inkubation mit erniedrigter spezifischer Aktivität (XI) und denen des Basisexperiments (III). Die Werte beziehen sich auf n=14 Untersuchungen.

3.4.4.2 Hitze und erhöhte ^{131}I -Photosan-Konzentration

Zellkulturen, die – analog zu 3.3.4.2. – mit 2,33 $\mu\text{g/l}$ ^{131}I -Photosan inkubiert wurden, zeigten signifikant geringere Zellzahlen, wenn sie thermisch behandelt wurden (Versuche XII und IX). Dabei kam es zu einer Abnahme um 43-60 % (Abb.15).

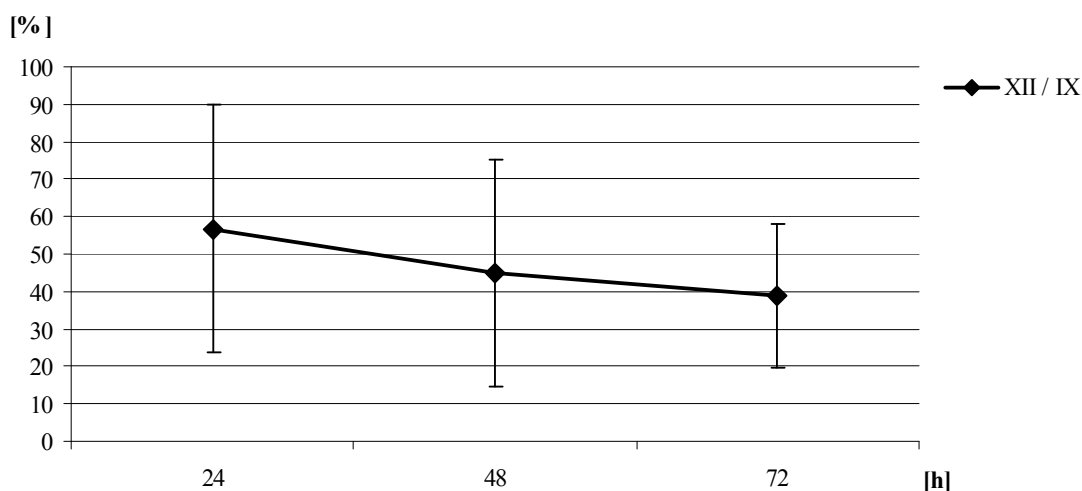


Abbildung 15: Mittelwert \pm Stw. des Quotienten aus Zellzahlen thermisch behandelter (XII) und unbehandelter Kulturen (IX) nach Inkubation mit 2,33 $\mu\text{g/l}$ ^{131}I -Photosan. Die Werte beziehen sich auf je n=10 Untersuchungen.

Im Vergleich zu den Zellkulturen des Basisexperiments war die Proliferation um 52-75 % signifikant verringert ($p < 0,05$; Versuche III und XII). In Abb.16 ist der Quotient der Zellzahlen beider Versuchsvarianten dargestellt.

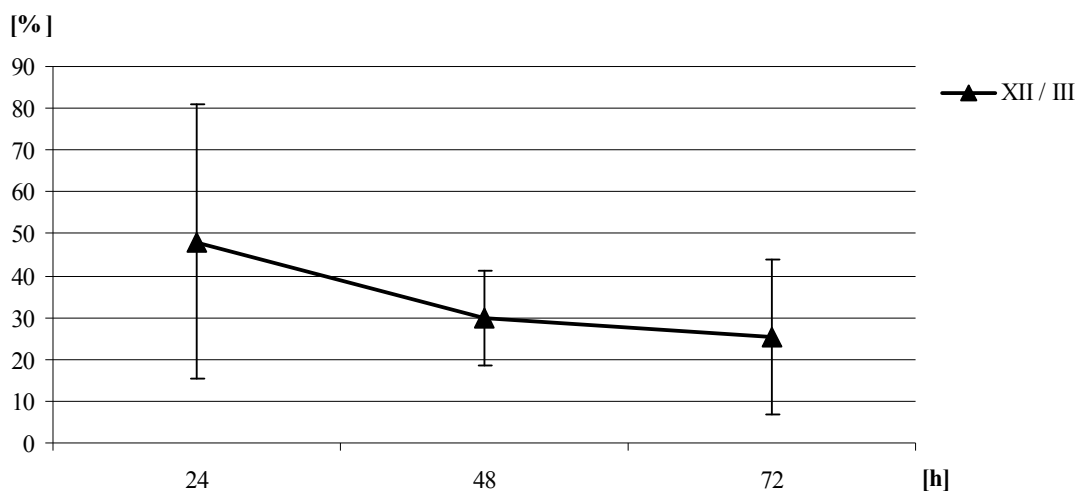


Abbildung 16: Mittelwert \pm Stw. der Quotienten aus Zellzahlen thermisch behandelter Kulturen nach Inkubation mit erhöhter ^{131}I -Photosan-Aktivität (XII) und denen des Basisexperiments (III). Die Werte beziehen sich auf je $n=10$ Untersuchungen.

Die thermisch behandelten Zellkulturen zeigten nach Inkubation mit $2,33 \mu\text{g/l}$ ^{131}I -Photosan um 20 % geringere Zellzahlen als nach Inkubation mit $0,21 \mu\text{g/l}$ ^{131}I -Photosan; diese Unterschiede waren nicht signifikant (Versuche VIb und XII).

Somit war das Zellwachstum hauptsächlich abhängig von der thermischen Behandlung, es zeigte sich jedoch auch eine Tendenz, dass eine Erhöhung der Aktivität ebenfalls einen inhibitorischen Einfluss hat.

3.5 Uptake durch JIMT1

3.5.1 Uptake von ^{131}I -Photosan im Basisexperiment

Die Uptake-Werte nach Inkubation der Zellkulturen mit $0,21 \mu\text{g/l}$ ^{131}I -Photosan lagen zu den drei Messzeitpunkten zwischen 1,3 % und 1,6 %. Dieser Basis-Uptake ist also vergleichbar mit dem der MB49-Zellen. Der Uptake pro 10^6 Zellen war über die Versuchszeit stabil und ist in Abb.17 dargestellt.

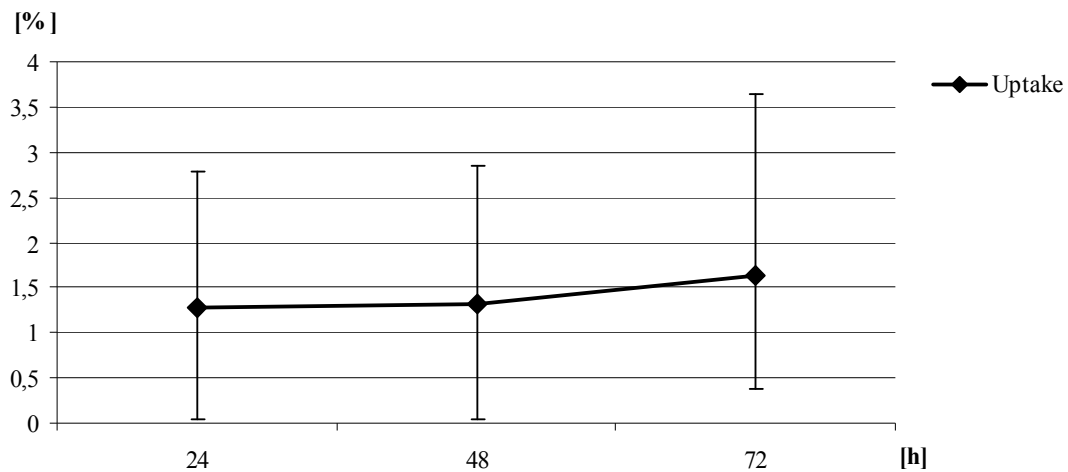


Abbildung 17: Darstellung von M sowie Q25 und Q75 des Uptake durch JIMT1 nach Inkubation mit 0,21 $\mu\text{g/l}$ ^{131}I -Photosan. Die Werte stammen von n=15 Untersuchungen.

3.5.2 Auswirkung der thermischen Behandlung

Analog zu den Versuchen mit MB49 wurden JIMT1-Zellen mit 0,21 $\mu\text{g/l}$ ^{131}I -Photosan inkubiert und thermisch behandelt (VIb). Hierbei ergaben sich für den Uptake Werte zwischen 1,4 % und 1,7 %. Im zeitlichen Verlauf war der Uptake pro 10^6 Zellen stabil.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit MB49 hatte die thermische Behandlung im Vergleich zu den Kulturen des Basisexperiments (III) keine signifikanten Auswirkungen (Abb.18).

3.5.3 Auswirkung erhöhter Photosankonzentrationen

Ebenfalls analog zu den mit MB49 durchgeführten Versuchen – 3.3.3.1 – wurde die spezifische Aktivität des ^{131}I -Photosans durch zusätzliche Gabe von kaltem Photosan erniedrigt (VIII). Für diese Zellkulturen ergaben sich Uptake-Werte zwischen 2,8 % und 3,5 % pro 10^6 Zellen (Abb.18). Im zeitlichen Verlauf kam es zu einer signifikanten Abnahme des Uptake ($p < 0,05$).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit MB49 war der Uptake im Vergleich zu den Zellkulturen des Basisexperiments (III) zu allen Messzeitpunkten signifikant höher ($p < 0,05$). Die Werte sind in Abb.18 dargestellt.

3.5.4 Auswirkung von Hitze und erhöhter Photosankonzentration

In einem weiteren Versuch wurden Kulturen thermisch behandelt und mit niedrigerer spezifischer Aktivität inkubiert (XI). Bei diesen zeigten sich Uptakewerte zwischen 2,5 % und 3,2 % pro 10^6 Zellen. Diese waren im zeitlichen Verlauf stabil.

Im Vergleich zu Kulturen mit höherer spezifischer Aktivität zeigten sich signifikant höhere Uptake-Werte, wobei dies unabhängig war von einer thermischen Behandlung der Zellkulturen ($p < 0,05$; Versuche III und VIb). Die Ergebnisse sind in Abb.18 dargestellt. Eine thermische Behandlung hatte bei Inkubation mit niedrigerer spezifischer Aktivität keine Auswirkung auf den Uptake (Versuche VIII und XI).

Somit war der Uptake durch JIMT1 – im Gegensatz zu MB49 – abhängig von der spezifischen Aktivität des ^{131}I -Photosans, jedoch unabhängig von einer thermischen Behandlung.

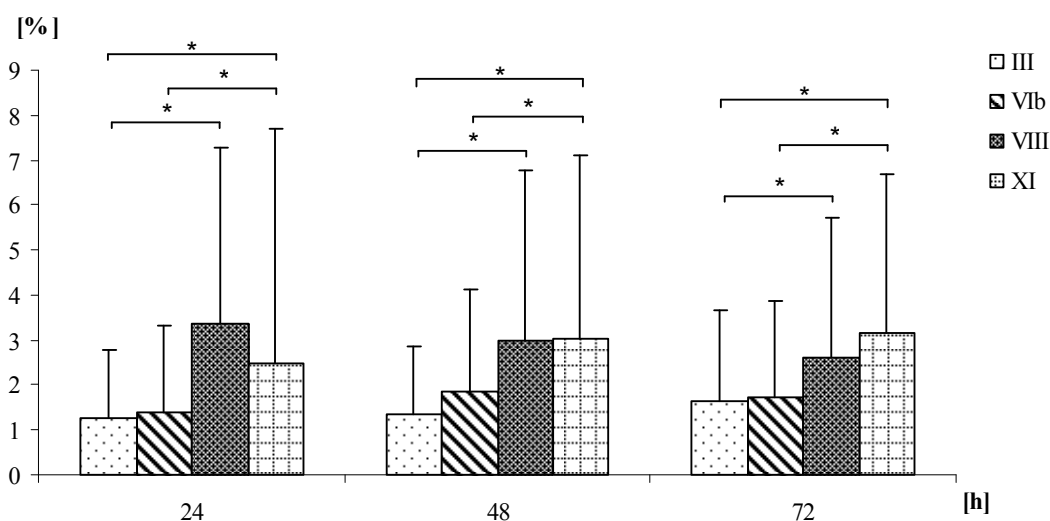


Abbildung 18: Darstellung von M und Q75 des Uptake von Kulturen des Basisexperiments (III), sowie thermisch behandelte Kulturen mit höherer (VIb) und niedrigerer (XI) spezifischer Aktivität und thermisch unbehandelter Zellen mit niedrigerer spezifischer Aktivität (VIII). Die Klammern kennzeichnen signifikant unterschiedliche Werte ($*p < 0,05$ von $n=15$ Untersuchungen).

3.6 Zellproliferation von JIMT

Bei allen Versuchsreihen zeigte sich eine signifikante Zunahme ($p < 0,05$) der Zellzahl im zeitlichen Verlauf.

3.6.1 Auswirkung von ^{131}I -Photosan im Basisexperiment

Im Vergleich zu Kulturen, die entweder kaltes oder gar kein Photosan erhielten, hatte die Inkubation mit ^{131}I -Photosan entsprechend dem Basisexperiment keine signifikanten Auswirkungen auf die Zellproliferation (Versuche I, II, III). Dies entspricht den Ergebnissen mit MB49.

3.6.2 Auswirkung des Erhitzens

Eine Kombination aus thermischer Behandlung der Kulturen und Inkubation mit ^{131}I -Photosan (VIb) reduzierte die Zellzahlen signifikant ($p < 0,05$). Dies galt sowohl im Vergleich zu Kulturen des Basisexperiments als auch zu thermisch behandelten Kulturen ohne Photosan-Gabe oder nach Gabe von kaltem Photosan (Versuche III, IV, V). Die Ergebnisse sind in Abb.19 dargestellt. Entsprechend der Ergebnisse mit MB49 hatte nur eine Inkubation der Kulturen mit ^{131}I -Photosan bei gleichzeitigem Erhitzen eine proliferationshemmende Wirkung.

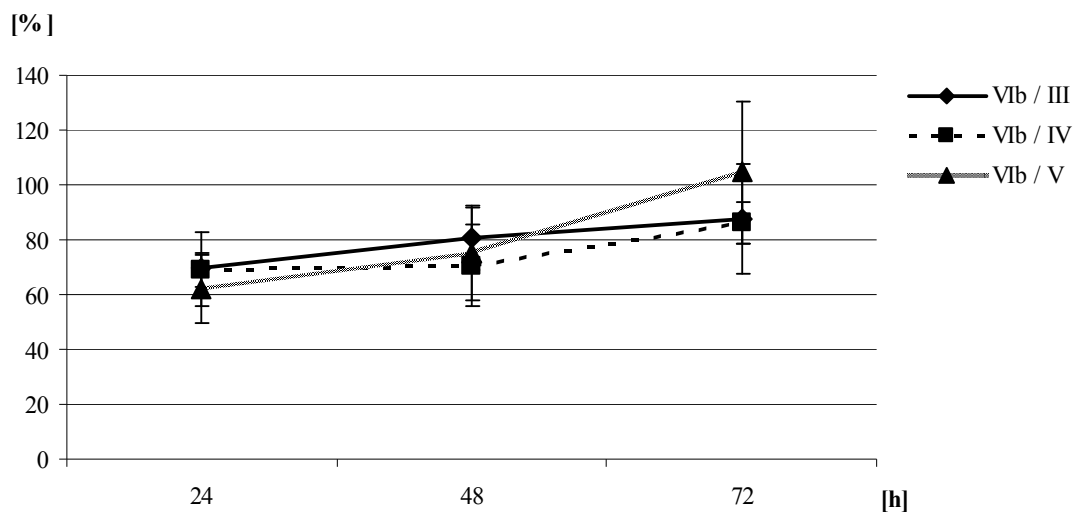


Abbildung 19: Mittelwerte \pm Stw. der Quotienten aus Zellzahlen thermisch behandelter Kulturen nach Inkubation mit ^{131}I -Photosan (VIb) und denen des Basisexperiments (III) bzw. thermisch behandelten Kulturen ohne Photosan (IV) und mit kaltem Photosan (V). Die Werte stammen von $n=11$ (VIb / III), $n=4$ (VIb / IV) und $n=5$ (VIb / V) Untersuchungen.

3.6.3 Auswirkung einer erhöhten Photosankonzentration

Zellkulturen, die – analog 3.3.3.1 – mit niedrigerer spezifischer Aktivität inkubiert wurden (VIII), zeigten nach 24 Stunden signifikant geringere Zellzahlen als Kulturen des Basisexperiments (III; $p < 0,05$). Auch im Vergleich zu Kulturen, die lediglich kaltes Photosan in erhöhter Konzentration erhielten (VII), zeigten sich signifikant geringere Zellzahlen ($p < 0,05$).

3.6.4 Auswirkung von Hitze und erhöhter Photosankonzentration

Zellkulturen, die thermisch behandelt und mit niedrigerer spezifischer Aktivität inkubiert wurden (XI), zeigten um 20-30 % signifikant geringere Zellzahlen als thermisch

unbehandelte Kulturen, unabhängig von der eingesetzten spezifischen Aktivität ($p < 0,05$; Versuche VIII und III). Die Werte sind in Abb.20 dargestellt.

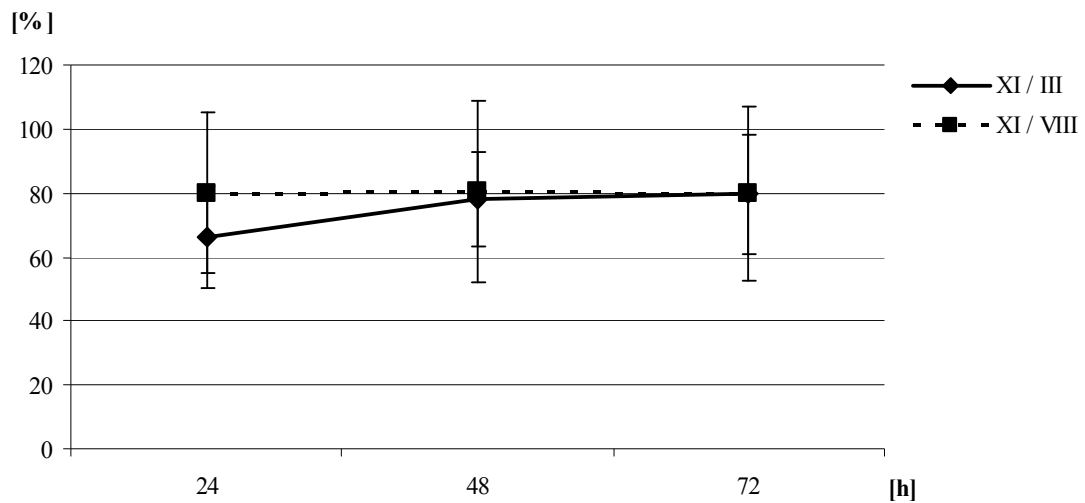


Abbildung 20: Mittelwerte \pm Stw. der Quotienten aus Zellzahlen thermisch behandelter (XI) und thermisch un behandelter Kulturen (VIII) nach Inkubation mit niedrigerer spezifischer Aktivität sowie Kulturen des Basisexperiments (III). Die Werte stammen von $n=15$ Untersuchungen.

Auch im Vergleich zu Kulturen, die mit $2,33 \mu\text{g/l}$ kaltem Photosan inkubiert wurden, zeigte sich ein um 18-42 % signifikant geringeres Zellwachstum, das unabhängig von einer thermischen Behandlung war ($p < 0,05$; Versuche X und VII). Dies ist in Abb.21 dargestellt. Die Proliferation war also von einer thermischen Behandlung in Anwesenheit von ^{131}I -Photosan abhängig.

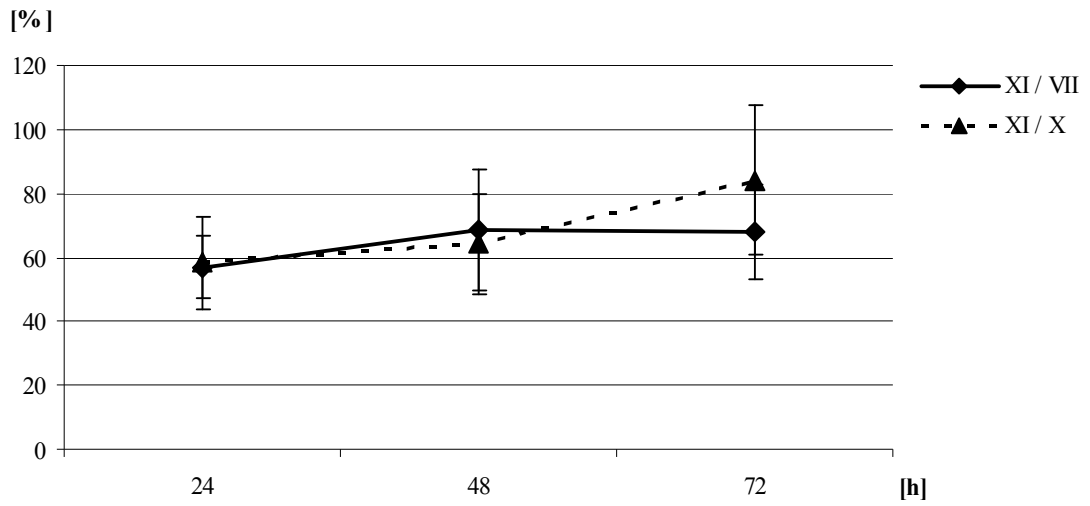


Abbildung 21: Mittelwerte \pm Stw. der Quotienten aus Zellzahlen thermisch behandelter Kulturen nach Inkubation mit niedrigerer spezifischer Aktivität (XI) und thermisch behandelter (X) bzw. unbehandelter (VII) Kulturen nach Inkubation mit 2,33 $\mu\text{g/l}$ kaltem Photosan (n=5 Untersuchungen).

4 Diskussion

Diese Arbeit wurde durchgeführt, um eine Aussage treffen zu können, ob sich Porphyrine als Thermosensibilatoren eignen könnten. Es wurde untersucht, ob eine thermische Behandlung von Tumorzellen eine stärkere Wirkung zeigt, wenn sie mit einer Porphyrin-Applikation kombiniert wird, wobei sowohl kaltes als auch radioaktiv markiertes Porphyrin eingesetzt wurde. Ebenso wurde untersucht, welche Auswirkungen eine thermische Behandlung auf die Aufnahme des radioaktiv markierten Porphyrins in die Tumorzellen hat. Die Markierung mit ^{131}I war notwendig, um durch das Messen des radioaktiven Zerfalls einen Rückschluss auf die Höhe des Uptake ziehen zu können.

4.1 Die Zelllinien

Der genaue Ablauf der Porphyrinaufnahme in die Zellen ist Gegenstand aktuellster Forschung. Es gibt einerseits Hinweise auf eine rezeptorvermittelte Endozytose (Gräsbeck et al., 1979; Galbraith et al., 1985; Majuri, 1989) und andererseits auf einen energieabhängigen Transportmechanismus (Uc et al., 2004; Shayeghi et al., 2005). Erst wenige Zelllinien sind auf die in jüngster Zeit nachgewiesenen Porphyrintransporter (Krishnamurthy, 2004; Shayeghi et al., 2005; Krishnamurthy und Schuetz, 2005; Krishnamurthy et al., 2006; Paterson et al., 2007; Vlaming et al., 2008) untersucht worden. Es ist bisher unbekannt, ob MB49- oder JIMT1-Zellen Porphyrintransporter exprimieren oder nicht. Es können hier also nur Vermutungen angestellt werden, wie die Aufnahme des Photosans in die Zellen abgelaufen ist. Diese beiden Zelllinien wurden ausgewählt, da sowohl beim Blasenkarzinom als auch beim Mammakarzinom eine lokale Applikation der Porphyrine und der Hyperthermie möglich wäre. Dies hätte eine Vermeidung systemischer Nebenwirkungen zum Vorteil.

4.2 Inkubation mit Photosan

Die Ergebnisse der Versuche zeigen, dass Photosan keine Wirkung als Thermosensibilisator hat. So wurde die Zellproliferation beider Zelllinien durch eine Inkubation mit kaltem Photosan kombiniert mit einer thermischen Behandlung nicht inhibiert. Dies war unabhängig von der verwendeten Konzentration des Photosans, da es auch bei höheren Konzentrationen zu keiner messbaren Veränderung des Zellwachstums kam.

In anderen Bereichen gibt es vielversprechende Forschungsergebnisse mit Porphyrinen als Sensibilatoren. Dazu gehört ihre Erprobung als Sonosensibilatoren mit der Aktivierung durch Ultraschall (Quan-hong et al., 2004; Shang et al., 2006; Kuroki et al., 2007) sowie

als Radiosensibilatoren mit Anregung durch radioaktive Strahlung (Schaffer et al., 2002 und 2005).

Doch unsere Hypothese, dass das Porphyrin Photosan auch durch eine alleinige Wärmebehandlung aktiviert werden und zu zytotoxischen Effekten führen könnte, wurde unter den von uns angewandten Versuchsbedingungen nicht bestätigt.

4.3 Inkubation mit ^{131}I -Photosan

Interessanterweise führte eine Inkubation mit ^{131}I -Photosan in einer Konzentration von 2,33 $\mu\text{g/l}$ ohne eine thermische Behandlung zu einer deutlichen Inhibition der Zellproliferation um ca. 30 %. Dies zeigte sich sowohl im Vergleich zu Kulturen, die ohne Photosan, als auch zu solchen, die mit kaltem Photosan inkubiert wurden. Wir können also vermuten, dass ^{131}I -Photosan auf die Zellen wachstumshemmend wirkt. Dies könnte sowohl chemische als auch physikalische Ursachen haben. Als wahrscheinlich ist hier die durch ^{131}I emittierte β^- -Strahlung anzunehmen, die nach Aufnahme von ^{131}I -Photosan in die Zellen intrazellulär wirkte. Die hochenergetischen Elektronen bewirken direkte und indirekte Schäden an der DNA der Zellen, welche auf Ionisierung und Radikalbildung beruhen. Die Einzel- und Doppelstrangbrüche, Veränderungen der Basen und Ausbildung von Quervernetzungen sind so vielfältig, dass sie durch die Zellen nicht in vollem Umfang repariert werden können und letztendlich zu einer Einschränkung der Zellproliferation führen (Kassis und Adelstein, 2005).

Bei der genannten ^{131}I -Photosan-Konzentration kam es über die Versuchszeit in der Zellkultur zu einer Strahlendosis von 2,7 bis 7,6 Gy. In der Literatur sind für die Tumoreradikation erforderliche Strahlendosen von mindestens 70 bis zu 300 Gy im Tumor beschrieben (Thierens et al., 2005). Die Strahlendosen in der Zellkultur und im Organismus sind nicht direkt vergleichbar, aber der zu erkennende große Unterschied lässt vermuten, dass die Inhibition des Zellwachstums noch weitere Ursachen haben könnte. Die proliferationshemmende Wirkung könnte auch mit dem Photosan zusammenhängen. Durch die radioaktive Strahlung könnte es zu einer Aktivierung des Porphyrins gekommen sein. Für das strukturell ähnliche Porphyrin Photofrin II wurde gezeigt, dass es durch Strahlendosen von 5-15 Gy aktiviert werden kann und deshalb ein potentieller Radiosensibilisator ist (Schaffer et al., 2002). Diese Wirkung könnte daher auch in unseren Versuchen eine Rolle gespielt haben.

4.4 Veränderte Konzentration von ¹³¹I-Photosan und Photosan

Bei MB49 waren die auf die Ausgangsaktivität normierten Uptakewerte gleich, unabhängig davon, ob eine niedrigere oder höhere ¹³¹I-Photosan-Konzentration eingesetzt oder die spezifische Aktivität durch kaltes Photosan erniedrigt wurde. Dies zeigt, dass es durch ein erhöhtes Angebot sowohl an ¹³¹I-Photosan als auch an kaltem Photosan zu einem proportionalen Anstieg des Uptake kam. Diese Interpretation gilt allerdings nur, wenn davon ausgegangen wird, dass ¹³¹I-Photosan und Photosan in gleichem Maße in die Zellen aufgenommen wurden. Dies würde dafür sprechen, dass die Aufnahme der Porphyrine durch MB49-Zellen durch Endozytose erfolgt. Denn für den HCP1-Transporter wurde nachgewiesen, dass die Porphyrin-Aufnahme in die Zellen sättigbar ist (Shayeghi et al., 2005).

Bei JIMT1 dagegen wurde der Uptake von ¹³¹I-Photosan durch ein erhöhtes Angebot an kaltem Photosan signifikant auf mehr als das Doppelte gesteigert. Unabhängig davon, ob ¹³¹I-Photosan und Photosan in gleichem Maße in die Zellen aufgenommen werden, hatte das höhere Angebot an kaltem Photosan zur Folge, dass es zu einem überproportional starken Anstieg des ¹³¹I-Photosan-Uptake kam. Auch dies passt nicht zu der nachgewiesenen Sättigbarkeit des HCP1-Transporters (Shayeghi et al., 2005). Es könnte aber auch sein, dass HPC1 durch eine höhere Porphyrinkonzentrationen verstärkt exprimiert wird. Dieser Aspekt ist noch nicht erforscht. Bisher konnte nur nachgewiesen werden, dass Hypoxie und Eisenmangel einen Einfluss auf die HPC1-Expression haben (Shayeghi et al., 2005).

Zusätzlich könnte vermutet werden, dass es noch einen weiteren bisher unbekanntem Porphyrin-Transporter geben könnte. Eine Tatsache, die dafür sprechen könnte, wäre der Nachweis der eher geringen Affinität von HCP1 zu Häm und Porphyrinen im Vergleich zu der Affinität von HCP1 zu Folat (Qiu et al., 2006).

Bei Inkubation der Zellen mit niedrigen Konzentrationen an ¹³¹I-Photosan bzw. bei niedrigerer spezifischer Aktivität kam es zu keiner Auswirkung auf das Zellwachstum. Hierbei war der Uptake von ¹³¹I-Photosan durch die Zellen nicht hoch genug, um eine intrazelluläre Strahlendosis zu erreichen, die proliferationshemmend wirken würde.

4.5 Thermische Behandlung

Bei den von uns eingesetzten Temperaturen hatte die thermische Behandlung der Zellkulturen allein keinen Einfluss auf das Zellwachstum, was sowohl bei MB49 als auch bei JIMT1 der Fall war. Nach in Vorversuchen ermittelten Ergebnissen wurde die

Temperatur bewusst so gewählt – 50°C über 20 Minuten –, dass das alleinige Erhitzen möglichst keine Auswirkung auf die Proliferation haben sollte.

In der klinischen Anwendung wirkt eine Hyperthermiebehandlung auch schon bei Temperaturen von 40-44 °C auf Tumorzellen zytotoxisch (Takasu et al., 1998). Es ist jedoch nachgewiesen, dass höhere Temperaturen auf Krebszellen deshalb schädigend wirken, weil im Tumorgewebe hypoxische und saure Bedingungen vorherrschen (Reinhold und Endrich, 1986; Takasu et al., 1998), die ihren Ursprung in der pathologisch veränderten Gefäßversorgung haben. Doch in den Zellkulturen der hier vorliegenden Versuche war die Versorgung mit Nährstoffen nicht von der Ausbildung von Blutgefäßen abhängig, so dass sie Nährstoffe aus dem Kulturmedium in ausreichender Menge zur Verfügung hatten und daher nicht die notwendigen Bedingungen herrschten, um die Zellen allein durch Hyperthermie zu schädigen.

Wir untersuchten auch, ob eine Inhibition des Zellwachstums durch eine thermische Behandlung des Kulturmediums und damit einhergehender Veränderung zusammenhängen könnte. Doch es zeigten sich keine Unterschiede in der Zellzahl, unabhängig davon, ob das Medium nach der thermischen Behandlung ersetzt wurde oder nicht. Wir konnten also davon ausgehen, dass es durch die Hitze nicht zu wirksamen Veränderungen der Inhaltsstoffe des Kulturmediums und damit schädigenden Einflüssen auf die Zellkulturen gekommen ist.

Bei MB49 bewirkte die thermische Behandlung der Zellkulturen eine Steigerung des ¹³¹I-Photosan-Uptake. Dies war unabhängig vom Zeitpunkt der Hitzeapplikation. Es zeigte sich jedoch, dass die thermische Behandlung möglichst zeitnah zur Porphyrin-Gabe erfolgen sollte, da es nach Erhitzen zu einem späterem Zeitpunkt zu einem signifikant niedrigeren Uptake kam. Lediglich bei Kulturen mit niedrigerer spezifischer Aktivität konnte eine thermische Behandlung den Uptake nicht signifikant steigern. Dies könnte damit zusammenhängen, dass der Uptake von Porphyrin zwar insgesamt gesteigert wurde, jedoch die im Verhältnis zu kaltem Porphyrin geringe Zunahme an ¹³¹I-Photosan zu keinem signifikanten Unterschied führte.

Diese Ergebnisse sind gut mit dem aktuellen Stand der Forschung vereinbar. So wurde für beide Hypothesen der Porphyrin-Aufnahme nachgewiesen, dass sie durch erhöhte Temperaturen verstärkt wird. Worthington et al., 2001 und Vaghefi et al., 2001 wiesen dies für die rezeptorvermittelte Endozytose nach. Shayeghi et al. zeigten, dass die Porphyrinaufnahme über den HCP1-Transporter temperaturabhängig ist (Shayeghi et al., 2005). Auch für den FLVCR-Transporter, für den bisher allerdings nur ein Häm-Transport aus den Zellen nachgewiesen wurde, konnte eine Temperaturabhängigkeit gezeigt werden

(Quigley et al., 2004). Wenn dieser Transporter auch Porphyrine transportieren sollte, würde dies bedeuten, dass durch eine vermehrte Expression von HCP1 und FLVCR bei erhöhten Temperaturen die Porphyrinkonzentration in der Zelle ausgeglichen sein müsste. Da dies nicht der Fall ist, sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Versuche dafür, dass die Aufnahme der Porphyrine durch MB49-Zellen über die rezeptorvermittelte Endozytose eine größere Rolle spielt als ein Transportmechanismus. Es könnte aber auch vermutet werden, dass FLVCR nur ein Transporter für Häm und nicht für weitere Porphyrine ist und somit nicht das Photosan aus der Zelle hinaus transportiert. Auch kann es ebenso gut sein, dass FLVCR nicht von MB49-Zellen exprimiert wird.

Im Gegensatz dazu zeigten die JIMT-Zellen nach thermischer Behandlung keinerlei Veränderung im ^{131}I -Photosan-Uptake. Es könnte sein, dass es zu einer Aufnahme und wieder gleichzeitigem Efflux über die potentiellen Porphyrin-Transporter kam. Dies würde dafür sprechen, dass bei diesen Zellen die Photosan-Aufnahme nicht vornehmlich über Endozytose abläuft. Falls FLVCR als Porphyrintransporter fungiert, würde dies bei Temperaturerhöhung für eine gesteigerte Abgabe der Porphyrine aus der Zelle führen. Mit ABCB6 und ABCG2 gibt es noch 2 weitere Efflux-Transporter. Für ABCB6 wurde nachgewiesen, dass erhöhte intrazelluläre Porphyrinkonzentrationen eine vermehrte Expression bewirken (Krishnamurthy et al., 2006; Paterson et al., 2007). Da dieser Transporter jedoch auch für die Aufnahme der Porphyrine in die Mitochondrien sorgt, dürfte sich der Einfluss dieses Transportproteins in den vorliegenden Versuchen aufheben. Für den ABCG2-Transporter konnte eine Induktion durch Hypoxie nachgewiesen werden (Krishnamurthy et al., 2007), was vermuten lässt, dass auch ein weiterer äußerer Störfaktor, wie z.B. die Hyperthermie, eine ähnliche Wirkung haben könnte. Dies würde dann zu einem gesteigerten Efflux der Porphyrine beim Erhitzen führen. Dadurch könnten die durch vermehrte HCP1-Expression gewonnenen erhöhten Porphyrinkonzentrationen wieder ausgeglichen werden. Dies würde dem Ergebnis einer Studie entsprechen, bei der eine verminderte Wirksamkeit der PDT mit Porphyrinen für Zellen nachgewiesen wurde, die ABCG2 exprimieren (Usuda et al., 2009). Es sind Substanzen in der Entwicklung, die diesen Transporter blockieren bzw. seine Expression verringern, um die Effizienz einer PDT-Behandlung zu erhöhen (Hardwick et al., 2007). Hierzu gehören beispielsweise Mycotoxin, Fumitremorgin C (Rabindran et al., 2000) und Gefitinib als blockierende Wirkstoffe sowie Rzb1, das die Expression von ABCG2 verringert. Es wäre interessant, zu untersuchen, ob sich die Effekte von ^{131}I -Photosan in Kombination mit Hyperthermie durch Anwendung einer dieser Wirkstoffe noch steigern ließe. Gleichzeitig könnte so nachgewiesen werden, ob die jeweilige Zelllinie ABCG2 exprimiert.

Das Zellwachstum wurde bei allen Versuchsvarianten deutlich inhibiert, wenn die Zellkulturen sowohl mit ^{131}I -Photosan in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert als auch thermisch behandelt wurden. Da wir nachweisen konnten, dass es durch die thermische Behandlung zu einem höheren Uptake des ^{131}I -Photosans kam, hängt der proliferationshemmende Effekt wahrscheinlich mit der höheren intrazellulären Konzentration von ^{131}I -Photosan zusammen. Hierdurch wurde sowohl die Strahlendosis als auch der vermutete Effekt von Photosan als Radiosensibilisator gesteigert.

4.6 Mögliche Störfaktoren

4.6.1 Freies ^{131}I

Die Prüfung der Stabilität der Verbindung ^{131}I -Photosan ergab, dass bei Inkubation in Medium bei 37 °C nach 72 Stunden noch 60 % des vorhandenen ^{131}I an Photosan gebunden waren. Dies kann eine Erklärung dafür sein, dass bei einigen Versuchsvarianten der Uptake im zeitlichen Verlauf signifikant geringer wurde. ^{131}I kann nur an Photosan gebunden aufgenommen werden, da beide Zellreihen keinen Iodid-Transporter exprimieren. Der NIS (Natrium-Iodid-Symporter) wird hauptsächlich von den Follikelzellen der Schilddrüse exprimiert und ist auch in laktierenden Brustdrüsenzellen nachgewiesen (Riesco-Eizaguirre und Santisteban, 2006). Somit entsprach der gemessene Uptake auch nur der Menge des aufgenommenen ^{131}I -Photosan und nicht gleichzeitig aufgenommenem freiem ^{131}I . Dies ist ein Hinweis für die Spezifität der Aufnahme von ^{131}I -Photosan.

4.6.2 Licht

Da nicht unter Lichtausschluss gearbeitet wurde, muss bedacht werden, dass es durch Photonen zu einer Aktivierung des Photosans hätte kommen können, wie es bei der PDT genutzt wird (Dougherty et al., 1998). Doch dieser Einfluss kann hier als minimal betrachtet werden, da sich in der Zellzahl zwischen Kulturen, die mit Photosan inkubiert wurden und Kulturen, die weder Photosan erhielten noch erhitzt wurden, kein signifikanter Unterschied zeigte. Somit lässt sich dieser Aspekt bei der Interpretation der Ergebnisse vernachlässigen. Es kann damit zusammenhängen, dass die für die Aktivierung des Photosans optimale Wellenlänge von 630 nm nur einen kleinen Teil des sichtbaren Lichts ausmacht. Außerdem war der Anteil der Belichtungszeit am Gesamtversuchszeitraum eher gering.

4.7 Radioaktiv markierte Porphyrine

Wie in der Einleitung beschrieben, ist nachgewiesen, dass Porphyrine im Vergleich zu Normalgewebe von Tumorzellen selektiv vermehrt aufgenommen werden. Es stellt sich aber die Frage, ob die Markierung mit ^{131}I einen Einfluss auf die Aufnahme des hier verwendeten Photosans durch die Zellen hatte. Eine Porphyrinmarkierung mit ^{131}I wurde bisher nicht beschrieben. Um einzuschätzen, ob es durch die Markierung zu Auswirkungen auf den Uptake kommt, wird hier auf in der Literatur beschriebene radioaktiv markierte Porphyrine eingegangen.

Schon vor über 2 Jahrzehnten entstand die Idee, Porphyrine mit einer γ -Strahlen emittierenden Substanz radioaktiv zu markieren und sich so ihre Tumorselektivität für Tumordiagnostik und -bildgebung zunutze zu machen. 1983 versuchte Wong als erster, Hämatorporphyrin mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$, einem kurzlebigen γ -Strahler, zu markieren, was aber nicht erfolgreich war (Wong, 1983). Shetty et al. gelang es dann 1996 ein strukturell verändertes Porphyrin, das Mesotetrakis[3,4-bis(carboxymethyleneoxy)phenyl]porphyrin ($\text{T}_{3,4}\text{CPP}$), zu synthetisieren und es mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ zu markieren. Ebenso konnten sie dessen selektive Anreicherung in Sarkomen von Mäusen nachweisen (Shetty et al., 1996). Auch Chatterjee et al. entwickelten durch Veränderung des Seitenketten ein neues Porphyrin, das sie mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ markierten und konnten dessen selektive Aufnahme durch Mammakarzinome in Ratten zeigen (Chatterjee et al., 1997). Gleiches gilt für Subbarayan et al., welche zwei weitere Porphyrine synthetisierten und mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ markierten, sowie die Anreicherung in C6-Glioblastom in Ratten nachwiesen (Subbarayan et al., 2001).

Es gibt aber auch Markierungsversuche mit Radioisotopen, die β^- -Strahlung emittieren und für die Tumorbehandlung infrage kämen. Banjaree et al. synthetisierten wie Shetty et al. $\text{T}_{3,4}\text{CPP}$, markierten es mit $^{186/188}\text{Re}$ und zeigten dessen selektive Aufnahme in Fibrosarkomen in Mäusen (Banjaree et al., 2001). Auch Jia et al. synthetisierten ^{188}Re - $\text{T}_{3,4}\text{CPP}$, wiesen dessen Tumoraффinität nach und schlugen es als potentiellen Wirkstoff für die Radionuklidtherapie vor (Jia et al., 2008). Chakraborty et al. verwendeten erfolgreich ^{109}Pd zur Markierung von $\text{T}_{3,4}\text{CPP}$ und wiesen eine verstärkte Anreicherung in Fibrosarkomen von in Mäusen nach (Chakraborty et al., 2007).

Es konnte bisher also für zahlreiche Radioisotop-Porphyrin-Verbindungen nachgewiesen werden, dass sie auch in dieser Form selektiv von Tumorzellen aufgenommen werden. Für den Uptake dieser Verbindungen durch die Zellen ist von entscheidender Bedeutung, an welcher Stelle im Porphyrinmolekül das Radionuklid gebunden wird. Wenn diese Bindung im Zentrum des Porphyrinrings erfolgt, scheint dies die Struktur so zu verändern, dass keine verstärkte Aufnahme in Tumorzellen mehr erfolgt (Zanelli und Kaelin, 1981). Dies

zeigte sich bei Uroporphyrinen, die mit ^{57}Co , ^{64}Cu und ^{109}Pd markiert wurden (Banerjee et al., 2001). Es ist also wichtig, dass das Radionuklid an eine Seitenkette des Porphyrins bindet. Für die oben erwähnten $^{99\text{m}}\text{Tc}$ und ^{188}Re ist nachgewiesen, dass sie nicht das Zentrum des Porphyrinrings besetzen (Shetty et al., 1996; Banerjee et al., 2001).

Es ist davon auszugehen, dass auch ^{131}I nicht das Zentrum des Porphyrinrings besetzt, sondern durch Substitution eines Protons am konjugierten System gebunden wird. Es ist also wahrscheinlich, dass die Aufnahme des ^{131}I -Photosans von den Tumorzellen nicht durch das Nichtmetall ^{131}I behindert wird.

Die Stabilität der Verbindung ^{131}I -Photosan über den Versuchszeitraum von 72 Stunden erwies sich nicht als völlig ideal. Die Uptake-Ergebnisse nach 72 Stunden lassen sich nur bedingt beurteilen, da hier im Medium bei den Brutschrankbedingungen von $37\text{ }^\circ\text{C}$ nur noch 48 % des ^{131}I an Photosan gebunden waren. Durch intrazellulär lokalisierte Deiodasen (Bianco et al., 2002) könnte es auch in den Zellen zu einer Spaltung von ^{131}I -Photosan in Photosan und ^{131}I gekommen sein, wobei ^{131}I dann über die Zellmembran wieder nach extrazellulär diffundieren würde. Auch dieser Effekt könnte ein Grund für den im zeitlichen Verlauf abnehmenden Uptake sein.

Interessanterweise erwies sich die Verbindung in reinem PBS-Puffer als sehr viel instabiler als im Medium. Nach 72 Stunden bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ waren hier nur noch 15 % des ^{131}I an Photosan gebunden, im Gegensatz zu 48 % im Medium. Diese Tatsache spricht dafür, dass die Verbindung im Medium noch durch Bindung an eine weitere Substanz stabilisiert wird. Dafür könnten LDL-Lipoproteine und Albumin infrage kommen, welche auch als Transportsubstanzen für Porphyrine im Blut bekannt sind (Muller-Eberhard und Morgan, 1975; Jori et al., 1984; Byrne et al., 1990; Géze et al., 1993). Eine Bindung an LDL wäre auch nützlich für die Aufnahme in die Zellen durch rezeptorvermittelte Endozytose und würde die im Organismus herrschenden Bedingungen imitieren. Hier ist bekannt, dass maligne Tumorzellen LDL-Rezeptoren vermehrt exprimieren (Goldstein et al., 1985) und sich Porphyrine, die an LDL gebunden sind, dort verstärkt anlagern (Biade et al., 1992; Korbelik, 1993).

4.8 Radionuklid- und multimodale Therapie

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich das Porphyrin Photosan – markiert mit ^{131}I – als Radiopharmakon in der Krebstherapie eignen könnte, wobei es sogar zu einem synergistischen Effekt durch Radiosensibilisierung kommen könnte.

Im Rahmen eines multimodalen Therapieansatzes könnte eine kombinierte Hyperthermiebehandlung die Wirkung des Radiopharmakons durch eine höhere selektive Aufnahme durch das Tumorgewebe noch verstärken.

Einschränkend lässt sich jedoch sagen, dass die Aufnahme von ¹³¹I-Photosan durch die Zellen relativ gering – nie höher als 3,5 % – war.

Um eine Anwendung von markierten Porphyrinen in der Radionuklidtherapie sowie eine Hyperthermiebehandlung zu erwägen, müssen mögliche Vor- und Nachteile bedacht werden.

Porphyrine sind für die PDT als Medizinprodukte zugelassen (Mitteilung des Herstellers Seehof Laboratorium Forschungs- und Entwicklungs-Gesellschaft mbH). Dies ist deshalb erstaunlich, weil sie als Photosensibilatoren eindeutig eine chemische Wirkung entfalten und damit eigentlich in die Kategorie der Arzneimittel fallen würden.

Für den Einsatz von Porphyrinen in der Krebstherapie spricht ihre vielfach nachgewiesene Tumorselektivität, die auf verschiedenen Aspekten des pathologisch veränderten Tumorgewebes beruht. Hierzu zählen u.a. die hohe Anzahl an LDL-Rezeptoren (Biade et al., 1992; Korbelik, 1993), der saure pH-Wert (Friberg et al., 2003), die stärkere Vaskularisierung, der vergrößerte Interstitialraum, unterentwickelte Lymphgefäße (Dougherty et al., 1998), eine stark vermehrte Bildung von Kollagen, welches Porphyrine an sich bindet (Musser et al., 1980), die Lipophilie der Porphyrine (Chwilkowska et al., 2003) und eine vermehrte Aufnahme der Porphyrine durch tumor-assoziierte Makrophagen (Bugelski, 1981; Korbelik et al., 1991a und b). Im Besonderen ist eine Tumorselektivität auch für das hier verwendete Photosan nachgewiesen (Gupta et al., 2003).

Der Hauptnachteil beim systemischen Einsatz von Porphyrinen ist die Gefahr der phototoxischen Reaktion mit Bildung von Ödemen, Erythemen und Blasen bis hin zu oberflächlichen Hautnekrosen (Pass, 1993; Dougherty et al., 1990). Hierfür sind vor allem monomere und dimere Molekülanteile verantwortlich, deren Anzahl zwischen den einzelnen Porphyrinderivaten stark variiert. Das Risiko einer phototoxischen Reaktion lässt sich verringern, wenn die Patienten darüber aufgeklärt werden, dass sie in einem Zeitraum von Tagen bis Wochen nach Porphyrinapplikation das Sonnenlicht meiden und ihre Haut durch Kleidung größtenteils vor Licht schützen müssen. Bei dem in unseren Versuchen verwendeten Photosan beträgt dieser Zeitraum längstens 2 Wochen, bei anderen Porphyrinen schwankt er zwischen 2 Tagen – bei Verteprofin – bis zu mehreren Wochen – bei Photofrin II (Pfeifer et al., 2006). Für schwerkranke Patienten, die palliativ behandelt werden, ist der mehrwöchige Aufenthalt in abgedunkelten Räumen eine starke Einschränkung der Lebensqualität. Daher wäre es sinnvoll, eine lokale Applikation der

Porphyrine – wenn möglich – der systemischen vorzuziehen. Bei der systemischen Applikation wäre es von Vorteil, Porphyrinderivate zu verwenden, die nur eine geringe und kurz andauernde Photosensibilisierung der Haut verursachen.

Im Vergleich zu der für die PDT zugelassenen Patientendosis von Photosan, die 2 mg/kg beträgt, was 2×10^5 µg/l entspricht, waren die von uns verwendeten Konzentrationen von 0,21 - 2,33 µg/l sehr gering.

Bei der Anwendung der Hyperthermie muss darauf geachtet werden, dass gesundes Gewebe nicht zu stark und lange erhitzt und dadurch geschädigt wird (Lee et al., 1998; van der Zee et al., 1999). Als Grenzwerte gelten hier 44 °C bei einer Anwendung über eine Stunde (Fajardo, 1984). Auch steht noch eine Standardisierung der Hitzeapplikation aus (Fiorentini und Szasz, 2006). Es wäre sicherlich von Vorteil, wenn eine lokale Porphyrin-Applikation mit einer ebenfalls lokalen Applikation der Hyperthermie kombiniert werden könnte.

Die Nebenwirkungen einer Radionuklidtherapie sind gering. Hauptsächlich kommt es zu einer Myelosuppression, die jedoch reversibel ist. Nach Normalisierung der Blutwerte kann eine Radionuklidtherapie auch wiederholt werden (Lewington, 2003), was ein großer Vorteil der Behandlung ist.

In unseren Versuchen zeigte sich bei MB49 ein proliferationshemmender Effekt bei einer ^{131}I -Photosan-Konzentration von 2,33 µg/l und damit einer Strahlendosis von 2,7-7,6 Gy, wenn auf eine parallele thermische Behandlung verzichtet wurde. Bei einer kombinierten Anwendung von Hitze und radioaktivem Porphyrin war bei MB49 eine applizierte Konzentration von 0,21 µg/l, was einer Strahlendosis von 0,3-0,7 Gy entspricht, ausreichend für eine Inhibition des Zellwachstums um 50 %. Bei höherer Konzentration und Strahlendosis konnte die Inhibition des Zellwachstums durch die thermische Behandlung noch von 30 % auf 70 % gesteigert werden.

Bei JIMT1 dagegen kam es bei einer Konzentration von 0,21 µg/l bzw. einer Dosis von 0,3-0,7 Gy und Erhitzen nur zu einer Wachstumsinhibition von 20 %.

Da sich die Auswirkungen der Behandlungen auf die beiden untersuchten Zelllinien unterschieden, kann man vermuten, dass dies mit einem unterschiedlichen Aufnahmemechanismus oder einer unterschiedlichen Strahlensensibilität zusammenhängen könnte. Es bleibt daher Gegenstand weiterführender Forschung, wie der genaue Aufnahmeweg von Porphyrinen der einzelnen Zelllinien ist und wie dieser mit den erforderlichen Wirkstoffkonzentrationen zusammenhängt.

Es wäre interessant, die beschriebenen Versuche mit Zellen durchzuführen, bei denen bekannt ist, ob sie Porphyrine über Endozytose aufnehmen oder Porphyrintransporter

exprimieren. Dann könnten auch gezielter die oben erwähnten transportermodulierenden Wirkstoffe erprobt werden, um z.B. den ABCG2-Effluxtransporter zu blockieren.

Es konnte also gezeigt werden, dass eine Hyperthermiebehandlung die Aufnahme eines Radiopharmakons durch die Tumorzellen erhöhen kann. Ein ähnlicher Effekt konnte bisher auch für andere äußere Einflüsse nachgewiesen werden, denen Zellkulturen ausgesetzt wurden. So wurde gezeigt, dass eine externe Bestrahlung den Uptake von verschiedenen Radiopharmaka erhöhen konnte. Dazu gehören ^{131}I selbst (Meller et al., 2006) sowie [18F]Fluoro-2-deoxy-D-Glucose (Furuta et al., 1997; Higashi et al., 2000; Yamamoto et al., 2001), radioaktiv markierte Aminosäuren und 5-Fluorouracil (Higashi et al., 1993; Senekowitsch-Schmidtke et al., 1998). Auch wurde nachgewiesen, dass Tumorzellen durch eine externe Bestrahlung verstärkt EGFR exprimieren, was man sich bei einer kombinierten Therapie mit markiertem EGFR-Antikörper – ^{131}I -Cetuximab – als Radionuklid zunutze machen kann (Rades et al., 2009).

Ebenso konnten Radiopharmaka entwickelt werden, die unter hypoxischen Bedingungen verstärkt von den Zellen aufgenommen werden. Ein selektiver Uptake durch hypoxische Zellen konnte beispielsweise für die mit ^{18}F markierten [18F]Fluoromisonidazol und [18F]Fluoroazomycinarabinofuranosid gezeigt werden (Piert et al., 1999; Sorger et al., 2003). Ein vermehrt aktiver Transport – wie er für die anderen Behandlungsmethoden diskutiert werden muss – ist hypoxie-bedingt jedoch nicht nachgewiesen.

Es ergeben sich damit interessante Therapieoptionen für Patienten mit Krebserkrankungen. Zum einen könnte der Einsatz von radioaktiv markierten Porphyrinen in der Radionuklidtherapie erfolgreich sein und zum anderen eine multimodale Therapie bestehend aus einem Radiopharmakon in Kombination mit einer Hyperthermiebehandlung. Ein Thema für nachfolgende Studien wäre es, eine Hyperthermiebehandlung in Kombination mit zugelassenen Radiopharmaka zu testen, um herauszufinden, ob sich ähnliche Effekte auf die Zellproliferation zeigen.

5 Zusammenfassung

Porphyrine sind organisch-chemische Substanzen, die das Grundgerüst vieler lebenswichtiger Verbindungen des tierischen Organismus' bilden. Der Ablauf ihrer Aufnahme in die Zellen ist Gegenstand jüngster Forschung, wobei sich mit rezeptorvermittelter Endozytose und einem energieabhängigen Transportmechanismus zwei Möglichkeiten abzeichnen. Porphyrine haben sich als Photosensibilatoren in der Photodynamischen Therapie etabliert, wo sie, durch UV-Licht angeregt, in Anwesenheit von Sauerstoff zu Radikalbildung und letztendlich zytotoxischen Effekten führen. Sie zeichnen sich durch Tumorselektivität und -verglichen mit anderen Krebstherapeutika-relativ geringen Nebenwirkungen aus.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Effekten einer Hyperthermiebehandlung bei paralleler Porphyrin-Applikation auf zwei Karzinom-Zelllinien, wobei das Porphyrin sowohl mit ^{131}I radioaktiv markiert als auch nicht markiert eingesetzt wurde. Die Wahl der untersuchten Zelllinien fiel auf murine Blasenkarzinom- und humane Mammakarzinomzellen, bei denen in vivo eine lokale Applikation von Porphyrinen und Hyperthermie erfolgen könnte, um systemische Nebenwirkungen größtenteils zu vermeiden. Es wurden die Auswirkungen auf die Zellproliferation sowie auf den Uptake des radioaktiven Porphyrins untersucht, welcher über den radioaktiven Zerfall bestimmt werden konnte. Die Messungen erfolgten jeweils über einen Zeitraum von drei Tagen, wobei die spezifische Aktivität und die Porphyrinkonzentrationen variiert wurden.

Die Ergebnisse zeigten, dass für Porphyrine keine thermosensibilisierende Wirkung nachzuweisen war. Dagegen wirkte das radioaktiv markierte Porphyrin dosisabhängig bereits ohne Erhitzen inhibitorisch auf das Zellwachstum. Durch eine thermische Behandlung der Zellkulturen wurde die Aufnahme in die Zellen erhöht und damit auch – abhängig von der intrazellulären ^{131}I -Porphyrinmenge – die proliferationshemmende Wirkung.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Kombination von Hyperthermie und tumorspezifischen Radiopharmaka eine zukunftsweisende Kombination im Rahmen einer multimodalen Therapie sein könnte. Da sich die beschriebenen Effekte schon bei – im Vergleich zur klinischen Onkologie – geringen Dosen des Porphyrins bzw. der radioaktiven Strahlung zeigten, kann eine synergistische Wirkung im Sinne einer Radiosensibilisierung vermutet werden.

In zukünftigen Studien müsste untersucht werden, ob sich radioaktiv markierte Porphyrine als Radiopharmaka auch in der klinischen Anwendung eignen würden.

6 Literaturverzeichnis

BABILAS, P., LANDTHALER, M., AND SZEIMIES, R. Photodynamic therapy in dermatology. *Eur J Dermatol* 16 (2006), 340–348.

BANERJEE, S., DAS, T., SAMUEL, G., SARMA, H., VENKATESH, M., AND PILLAI, M. A novel [186/188re]-labelled porphyrin for targeted radiotherapy. *Nucl Med Commun* 22 (2001), 1101–1107.

BATES, D., AND MACKILLOP, W. The effect of hyperthermia in combination with melphalan on drug-sensitive and drug-resistant cho cells in vitro. *Br J Cancer* 62 (1990), 183–188.

BIADE, S., MAZIÈRE, J., MORA, L., SANTUS, R., MORLIÈRE, P., MAZIÈRE, C., SALMON, S., GATT, S., AND DUBERTRET, L. Photosensitization by photofrin ii delivered to wi26va4 sv40-transformed human fibroblasts by low density lipoproteins: inhibition of lipid synthesis and fatty acid uptake. *Photochem Photobiol* 55 (1992), 55–61.

BIANCO, A., SALVATORE, D., GEREBEN, B., BERRY, M., AND LARSEN, P. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23 (2002), 38–89.

BIEL, M. Photodynamic therapy and the treatment of head and neck cancers. *J Clin Laser Med Surg* 14 (1996), 239–244.

BOMANJI, J. Radionuclide therapy. *Clin Med* 6 (2006), 249–53.

BUGELSKI, P., PORTER, C., AND DOUGHERTY, T. Autoradiographic distribution of hematoporphyrin derivative in normal and tumor tissue of the mouse. *Cancer Res* 41 (1981), 4606–4612.

BURD, R., DZIEDZIC, T., XU, Y., CALIGIURI, M., SUBJECK, J., AND REPASKY, E. Tumor cell apoptosis, lymphocyte recruitment and tumor vascular changes are induced by low temperature, long duration (fever-like) whole body hyperthermia. *J Cell Physiol* 177 (1998), 137–147.

BYRNE, C., MARSHALLSAY, L., AND WARD, A. The composition of photofrin ii. *J Photochem Photobiol B* 6 (1990), 13–27.

CASTANO, A., MROZ, P., AND HAMBLIN, M. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer* 6 (2006), 535–545.

CECIC, I., AND KORBELIK, M. Mediators of peripheral blood neutrophilia induced by photodynamic therapy of solid tumors. *Cancer Lett* 8 (2002), 43–51.

- CECIC, I., STOTT, B., AND KORBELIK, M. Acute phase response-associated systemic neutrophil mobilization in mice bearing tumors treated by photodynamic therapy. *Int Immunopharmacol* 6 (2006), 1259–1266.
- CEELEN, W., HESSE, U., DE HEMPTINNE, B., AND PATTYN, P. Hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion in the treatment of locally advanced intra-abdominal cancer. *Br J Surg* 88 (2000), 1006–1015.
- CHAKRABORTY, S., DAS, T., BANERJEE, S., SARMA, H., AND VENKATESH, M. Preparation and preliminary biological evaluation of a novel 109pd labeled porphyrin derivative for possible use in targeted tumor therapy. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 51 (2007), 16–23.
- CHATTERJEE, S., MURUGESAN, S., KAMAT, J., SHETTY, S., SRIVASTAVA, T., NORONHA, O., SAMUEL, A., AND DEVASAGAYAM, T. Photodynamic effects induced by meso-tetrakis[4-(carboxymethyleneoxy)phenyl]porphyrin using rat hepatic microsomes as model membranes. *Arch Biochem Biophys* 339 (1997), 242–249.
- CHEN, Q., CHEN, H., SHAPIRO, H., AND HETZEL, F. Sequencing of combined hyperthermia and photodynamic therapy. *Radiat Res* 146 (1996), 293–297.
- CHWILKOWSKA, A., SACZKO, J., MODRZYCKA, T., MARCINKOWSKA, A., MALARSKA, A., BIELEWICZ, J., PATALAS, D., AND BANAS, T. Uptake of photofrin ii, a photosensitizer used in photodynamic therapy, by tumour cells in vitro. *Acta Biochim Pol* 50 (2003), 509–513.
- COIT, D. Hyperthermic isolation limb perfusion for malignant melanoma: a review. *Cancer Invest* 10 (1992), 277–284.
- DAS, M., DIXIT, R., MUKHTAR, H., AND BICKERS, D. Role of active oxygen species in the photodestruction of microsomal cytochrome p-450 and associated monooxygenases by hematoporphyrin derivative in rats. *Cancer Res* 45 (1985), 608–615.
- DIXIT, R., MUKHTAR, H., AND BICKERS, D. Destruction of microsomal cytochrome p-450 by reactive oxygen species generated during photosensitization of hematoporphyrin derivative. *Photochem Photobiol* 37 (1983), 173–176.
- DORN, R., KOPP, J., VOGT, H., HEIDENREICH, P., CARROLL, R., AND GULEC, S. Dosimetry-guided radioactive iodine treatment in patients with metastatic differentiated thyroid cancer: largest safe dose using a risk-adapted approach. *J Nucl Med* 44 (2003), 451–456.
- DOUGHERTY, T., COOPER, M., AND MANG, T. Cutaneous phototoxic occurrences in patients receiving photofrin. *Lasers Surg Med* 10 (1990), 485–488.

DOUGHERTY, T., GOMER, C., HENDERSON, B., JORI, G., KESSEL, D., KORBELIK, M., MOAN, J., AND PENG, Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 90 (1998), 889–905.

DOYLE, L., AND ROSS, D. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein bcrp (abcg2). *Oncogene* 20 (2003), 7340–7358.

DOYLE, L., YANG, W., ABRUZZO, L., KROGMANN, T., GAO, Y., RISHI, A., AND ROSS, D. A multidrug resistance transporter from human mcf-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 22 (1998), 15665–15670.

EE, P., HE, X., ROSS, D., AND BECK, W. Modulation of breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) gene expression using rna interference. *Mol Cancer Ther* 3 (2004), 1577–1583.

FAJARDO, L. Pathological effects of hyperthermia in normal tissues. *Cancer Res* 44 (1984), 4826–4835.

FIEL, R., DATTA-GUPTA, N., MARK, E., AND HOWARD, J. Induction of dna damage by porphyrin photosensitizers. *Cancer Res* 41 (1981), 3543–3545.

FIorentini, G., AND SZASZ, A. Hyperthermia today: Electric energy, a new opportunity in cancer treatment. *J Cancer Res Ther* 2 (2006), 41–46.

FRIBERG, E., CUNDERLÍKOVÁ, B., PETTERSEN, E., AND MOAN, J. ph effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer. *Cancer Lett* 195 (2003), 73–80.

FURUTA, M., HASEGAWA, M., HAYAKAWA, K., YAMAKAWA, M., ISHIKAWA, H., NONAKA, T., MITSUHASHI, N., AND NIIBE, H. Rapid rise in fdg uptake in an irradiated human tumour xenograft. *Eur J Nucl Med* 24 (1997), 435–438.

GALBRAITH, R., SASSA, S., AND KAPPAS, A. Heme binding to murine erythroleukemia cells. evidence for a heme receptor. *J Biol Chem* 260 (1985), 12198–12202.

GERAD, H., VAN ECHO, D., WHITACRE, M., ASHMAN, M., HELRICH, M., FOY, J., OSTROW, S., WIERNIK, P., AND AISNER, J. Doxorubicin, cyclophosphamide, and whole body hyperthermia for treatment of advanced soft tissue sarcoma. *Cancer* 53 (1984), 2585–2591.

GOLDSTEIN, J., BROWN, M., ANDERSON, R., RUSSELL, D., AND SCHNEIDER, W. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the ldl receptor system. *Annu Rev Cell Biol* 1 (1985), 1–39.

GOLLNICK, S., OWCZARZAK, B., AND MAIER, P. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Lasers Surg Med* 38 (2006), 509–515.

- GOMER, C. Dna damage and repair in cho cells following hematoporphyrin photoradiation. *Cancer Lett 11* (1980), 161–167.
- GRIFFIN, R., LEE, S., ROOD, K., STEWART, M., LYONS, J., LEW, Y., PARK, H., AND SONG, C. Use of arsenic trioxide as an antivasular and thermosensitizing agent in solid tumors. *Neoplasia 2* (2000), 555–560.
- GRÄSBECK, R., KOUVONEN, I., LUNDBERG, M., AND TENHUNEN, R. An intestinal receptor for heme. *Scand J Haematol 23* (1979), 5–9.
- GUPTA, S., DWARAKANATH, B., MURALIDHAR, K., AND JAIN, V. Cellular uptake, localization and photodynamic effects of haematoporphyrin derivative in human glioma and squamous carcinoma cell lines. *J Photochem Photobiol B 69* (2003), 107–120.
- GUTTER, B., SPECK, W., AND ROSENKRANZ, H. The photodynamic modification of dna by hematoporphyrin. *Biochim Biophys Acta 18* (1977), 307–314.
- GÈZE, M., MORLIÈRE, P., MAZIÈRE, J., SMITH, K., AND SANTUS, R. Lysosomes, a key target of hydrophobic photosensitizers proposed for photochemotherapeutic applications. *J Photochem Photobiol B 20* (1993), 23–35.
- HARARI, P., HYNYNEN, K., ROEMER, R., ANHALT, D., SHIMM, D., STEA, B., AND CASSADY, J. Development of scanned focussed ultrasound hyperthermia: clinical response evaluation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys 21* (1991), 831–40.
- HARDWICK, L., VELAMAKANNI, S., AND VAN VEEN, H. The emerging pharmacotherapeutic significance of the breast cancer resistance protein (abcg2). *Br J Pharmacol 151* (2007), 163–174.
- HARMON, B., CORDER, A., COLLINS, R., GOBÉ, G., ALLEN, J., ALLAN, D., AND KERR, J. Cell death induced in a murine mastocytoma by 42-47 degrees c heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. *Int J Radiat Biol 58* (1990), 845–858.
- HAYATA, Y., KATO, H., KONAKA, C., ONO, J., AND TAKIZAWA, N. Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer. *Chest 81* (1982), 269–277.
- HENDERSON, B., WALDOW, S., POTTER, W., AND DOUGHERTY, T. Interaction of photodynamic therapy and hyperthermia: tumor response and cell survival studies after treatment of mice in vivo. *Cancer Res 45* (1985), 6071–6072.

- HIGASHI, K., CLAVO, A., AND WAHL, R. In vitro assessment of 2-fluoro-2-deoxy-d-glucose, l-methionine and thymidine as agents to monitor the early response of a human adenocarcinoma cell line to radiotherapy. *J Nucl Med* 34 (1993), 773–779.
- HIGASHI, T., FISHER, S., BROWN, R., NAKADA, K., WALTER, G., AND WAHL, R. Evaluation of the early effect of local irradiation on normal rodent bone marrow metabolism using fdg: preclinical pet studies. *J Nucl Med* 41 (2000), 2026–2035.
- HILDEBRANDT, B., WUST, P., AHLERS, O., DIEING, A., SREENIVASA, G., KERNER, T., FELIX, R., AND RIESS, H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol* 43 (2002), 33–56.
- HILF, R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy. *J Bioenerg Biomembr* 39 (2007), 85–89.
- HILF, R., SMAIL, D., MURANT, R., LEAKEY, P., AND GIBSON, S. Hematoporphyrin derivative-induced photosensitivity of mitochondrial succinate dehydrogenase and selected cytosolic enzymes of r3230ac mammary adenocarcinomas of rats. *Cancer Res* 44 (1984), 1483–1488.
- ITO, A., SHINKAI, M., HONDA, H., WAKABAYASHI, T., YOSHIDA, J., AND KOBAYASHI, T. Augmentation of mhc class i antigen presentation via heat shock protein expression by hyperthermia. *Cancer Immunol Immunother* 50 (2001), 515–522.
- JIA, Z., DENG, H., PU, M., AND LUO, S. Rhenium-188 labelled meso-tetrakis[3,4-bis(carboxymethyleneoxy)phenyl] porphyrin for targeted radiotherapy: preliminary biological evaluation in mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35 (2008), 734–742.
- JICHLINSKI, P. Photodynamic applications in superficial bladder cancer: facts and hopes! *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 25 (2006), 441–451.
- JORI, G., BELTRAMINI, M., REDDI, E., SALVATO, B., PAGNAN, A., ZIRON, L., TOMIO, L., AND TSANOV, T. Evidence for a major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carriers in vivo. *Cancer Lett* 24 (1984), 291–297.
- JORI, G., AND REDDI, E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers. *Int J Biochem* 25 (1993), 1369–1375.
- JUARRANZ, A., JAÉN, P., SANZ-RODRÍGUEZ, F., CUEVAS, J., AND GONZÁLEZ, S. Photodynamic therapy of cancer. basic principles and applications. *Clin Transl Oncol* 10 (2008), 148–154.

- KAMPINGA, H., AND DIKOMEY, E. Hyperthermic radiosensitization: mode of action and clinical relevance. *Int J Radiat Biol* 77 (2001), 399–408.
- KASSIS, A., AND ADELSTEIN, S. Radiobiologic principles in radionuclide therapy. *J Nucl Med* 46 (2005), 4S–12S.
- KESSEL, D. Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization. *Cancer Lett* 33 (1986), 183–188.
- KESSEL, D., AND LUO, Y. Mitochondrial photodamage and pdt-induced apoptosis. *J Photochem Photobiol B* 42 (1998), 89–95.
- KESSEL, D., LUO, Y., DENG, Y., AND CHANG, C. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 65 (1997), 422–426.
- KICK, G., MESSER, G., AND PLEWIG, G. Historical development of photodynamic therapy. *Hautarzt* 47 (1996), 644–649.
- KLAUNIG, J., SELMAN, S., SHULOK, J., SCHAFER, P., BRITTON, S., AND GOLDBLATT, P. Morphologic studies of bladder tumors treated with hematoporphyrin derivative photochemotherapy. *Am J Pathol* 119 (1985), 236–243.
- KOHN, K., AND KESSEL, D. On the mode of cytotoxic action of photo-activated porphyrins. *Biochem Pharmacol* 15 (1979), 2465–2470.
- KONGSHAUG, M., MOAN, J., AND BROWN, S. The distribution of porphyrins with different tumour localising ability among human plasma proteins. *Br J Cancer* 59 (1989), 184–188.
- KORBELIK, M. Cellular delivery and retention of photofrin: Iii. role of plasma proteins in photosensitizer clearance from cells. *Photochem Photobiol* 57 (1993), 846–850.
- KORBELIK, M. Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg* 14 (1996), 329–334.
- KORBELIK, M. Pdt-associated host response and its role in the therapy outcome. *Lasers Surg Med* 38 (2006), 500–508.
- KORBELIK, M., CECIC, I., MERCHANT, S., AND SUN, J. Acute phase response induction by cancer treatment with photodynamic therapy. *Int J Cancer* 15 (2008), 1411–1417.
- KORBELIK, M., AND DOUGHERTY, G. Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors. *Cancer Res* 15 (1999), 1941–1946.

- KORBELIK, M., KROSL, G., AND CHAPLIN, D. Photofrin uptake by murine macrophages. *Cancer Res* 51 (1991), 2251–2255.
- KORBELIK, M., KROSL, G., OLIVE, P., AND CHAPLIN, D. Distribution of photofrin between tumour cells and tumour associated macrophages. *Br J Cancer* 64 (1991), 508–512.
- KOWALSKI, P., STEIN, U., SCHEFFER, G., AND LAGE, H. Modulation of the atypical multidrug-resistant phenotype by a hammerhead ribozyme directed against the abc transporter bcrp/mxr/abcg2. *Cancer Gene Ther* 9 (2002), 579–586.
- KRAYBILL, W., OLENKI, T., EVANS, S., OSTBERG, J., O’LEARY, K., GIBBS, J., AND REPASKY, E. A phase i study of fever-range whole body hyperthermia (fr-wbh) in patients with advanced solid tumours: correlation with mouse models. *Int J Hyperthermia* 18 (2002), 253–266.
- KRISHNAMURTHY, P., DU, G., FUKUDA, Y., SUN, D., SAMPATH, J., MERCER, K., WANG, J., SOSA-PINEDA, B., MURTI, K., AND SCHUETZ, J. Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature* 443 (2006), 586–589.
- KRISHNAMURTHY, P., ROSS, D., NAKANISHI, T., BAILEY-DELL, K., ZHOU, S., MERCER, K., SARKADI, B., SORRENTINO, B., AND SCHUETZ, J. The stem cell marker bcrp/abcg2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* 279 (2004), 24218–25.
- KRISHNAMURTHY, P., AND SCHUETZ, J. The abc transporter abcg2/bcrp: role in hypoxia mediated survival. *Biometals* 18 (2005), 349–58.
- KRISHNAMURTHY, P., AND SCHUETZ, J. Role of abcg2/bcrp in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46 (2006), 381–410.
- KRISHNAMURTHY, P., XIE, T., AND SCHUETZ, J. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol Ther* 114 (2007), 345–358.
- KUROKI, M., HACHIMINE, K., ABE, H., SHIBAGUCHI, H., KUROKI, M., MAEKAWA, S., YANAGISAWA, J., KINUGASA, T., TANAKA, T., AND YAMASHITA, Y. Sonodynamic therapy of cancer using novel sonosensitizers. *Anticancer Res* 27 (2007), 3673–3677.
- LATUNDE-DADA, G., SIMPSON, R., AND MCKIE, A. Recent advances in mammalian haem transport. *Trends Biochem Sci* 31 (2006), 182–188.
- LEE, H., ANTELL, A., PEREZ, C., STRAUBE, W., RAMACHANDRAN, G., MYERSON, R., EMAMI, B., MOLMENTI, E., BUCKNER, A., AND LOCKETT, M. Superficial hyperthermia and irradiation for recurrent breast carcinoma of the chest wall: prognostic factors in 196 tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 40 (1998), 365–375.

- LEWINGTON, V. Targeted radionuclide therapy for neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 10 (2003), 497–501.
- LI, J., CHEN, Y., ZHAO, S., ZHANG, L., AND SONG, S. Application of hematoporphyrin derivative and laser-induced photodynamical reaction in the treatment of lung cancer: a preliminary report on 21 cases. *Lasers Surg Med* 4 (1984), 31–37.
- LUO, Y., CHANG, C., AND KESSEL, D. Rapid initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 63 (1996), 528–534.
- LYONS, J., AND SONG, C. Killing of hypoxic cells by lowering the intracellular ph in combination with hyperthermia. *Radiat Res* 141 (1995), 216–218.
- MAJURI, R. Heme-binding plasma membrane proteins of k562 erythroleukemia cells: adsorption to heme-microbeads, isolation with affinity chromatography. *Eur J Haematol* 43 (1989), 220–225.
- MALIEPAARD, M., SCHEFFER, G., FANEYTE, I., VAN GASTELEN, M., PIJENBORG, A., SCHINKEL, A., VAN DE VIJVER, M., SCHEPER, R., AND SCHELLENS, J. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 61 (2001), 3458–3464.
- MARCHETTI, P., HIRSCH, T., ZAMZAMI, N., CASTEDO, M., DECAUDIN, D., SUSIN, S., MASSE, B., AND KROEMER, G. Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 157 (1996), 4830–4836.
- MAZIERE, J., SANTUS, R., MORLIERE, P., REYFTMANN, J., CANDIDE, C., MORA, L., SALMON, S., MAZIERE, C., GATT, S., AND DUBERTRET, L. Cellular uptake and photosensitizing properties of anticancer porphyrins in cell membranes and low and high density lipoproteins. *J Photochem Photobiol B* 6 (1990), 61–68.
- MELLER, B., DEISTING, W., WENZEL, B., PETHE, A., NADROWITZ, R., MELLER, J., RICHTER, E., AND BAEHRE, M. Increased radioiodine uptake of thyroid cell cultures after external irradiation. *Strahlenther Onkol* 182 (2006), 30–36.
- MILLER, K., REICH, E., RÜCK, A., AND HAUTMANN, R. Photodynamic therapy of bladder cancer—uptake and phototoxicity of photosan in vitro. *Urol Res* 19 (1991), 353–356.
- MOAN J, WAKSVIK H, C. T. Dna single-strand breaks and sister chromatid exchanges induced by treatment with hematoporphyrin and light or by x-rays in human nhik 3025 cells. *Cancer Res* 40 (1980), 2915–2918.

- MULLER-EBERHARD, U., AND MORGAN, W. Porphyrin-binding proteins in serum. *Ann N Y Acad Sci* 244 (1975), 624–650.
- MULTHOFF, G., BOTZLER, C., WIESNET, M., EISSNER, G., AND ISSELS, R. Cd3- large granular lymphocytes recognize a heat-inducible immunogenic determinant associated with the 72-kd heat shock protein on human sarcoma cells. *Blood* 15 (1995), 1374–1382.
- MUSSER, D., WAGNER, J., WEBER, F., AND DATTA-GUPTA, N. The binding of tumor localizing porphyrins to a fibrin matrix and their effects following photoirradiation. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 28 (1980), 505–525.
- NAKAMURA, Y., OKA, M., SODA, H., SHIOZAWA, K., YOSHIKAWA, M., ITOH, A., IKEGAMI, Y., TSURUTANI, J., NAKATOMI, K., KITAZAKI, T., DOI, S., YOSHIDA, H., AND KOHNO, S. Gefitinib ("iressa", zd1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, reverses breast cancer resistance protein/abcb2-mediated drug resistance. *Cancer Res* 15 (2005), 1541–1546.
- PASS, H. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst* 17 (1993), 443–456.
- PATERSON, J., SHUKLA, S., BLACK, C., TACHIWADA, T., GARFIELD, S., WINCOVITCH, S., ERNST, D., AGADIR, A., LI, X., AMBUDKAR, S., SZAKACS, G., AKIYAMA, S., AND GOTTESMAN, M. Human abcb6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane. *Biochemistry* 21 (2007), 9443–9452.
- PEREIRA, P., TRÜBENBACH, J., AND SCHMIDT, D. Radiofrequency ablation: basic principles, techniques and challenges. *Röfo* 175 (2003), 20–27.
- PFEIFER, B., PREIB, J., AND UNGER, C. *Onkologie integrativ*. URBAN & FISCHER, 2006.
- PRINSZE C, DUBBELMAN TM, V. S. J. Potentiation of thermal inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by photodynamic treatment. a possible model for the synergistic interaction between photodynamic therapy and hyperthermia. *Biochem J* 276 (1991), 357–362.
- QIU, A., JANSEN, M., SAKARIS, A., MIN, S., CHATTOPADHYAY, S., TSAI, E., SANDOVAL, C., ZHAO, R., AKABAS, M., AND GOLDMAN, I. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 5 (2006), 917–928.
- QUAN-HONG, L., SHI-HUI, S., YA-PING, X., HAO, Q., JIN-XUAN, Z., YAO-HUI, R., MENG, L., AND PAN, W. Synergistic anti-tumor effect of ultrasound and hematoporphyrin on

sarcoma180 cells with special reference to the changes of morphology and cytochrome oxidase activity of tumor cell. *J Exp Clin Cancer Res* 23 (2004), 333–341.

QUIGLEY, J., BURNS, C., ANDERSON, M., LYNCH, E., SABO, K., OVERBAUGH, J., AND ABKOWITZ, J. Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup c (felv-c), a retrovirus that induces red cell aplasia. *Blood* 95 (2000), 1093–1099.

QUIGLEY, J., YANG, Z., WORTHINGTON, M., PHILLIPS, J., SABO, K., SABATH, D., BERG, C., SASSA, S., WOOD, B., AND ABKOWITZ, J. Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell* 118 (2004), 757–766.

RABINDRAN, S., ROSS, D., DOYLE, L., YANG, W., AND GREENBERGER, L. Fumitremogin c reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res* 1 (2000), 47–50.

RADES, D., WOLFF, C., NADROWITZ, R., BREUNIG, C., SCHILD, S., BAEHRE, M., AND MELLER, B. Radioactive egfr antibody cetuximab in multimodal cancer treatment: Stability and synergistic effects with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 6 (2009), [Epub ahead of print].

REINHOLD, H., AND ENDRICH, B. Tumour microcirculation as a target for hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2 (1986), 111–137.

RIESCO-EIZAGUIRRE, G., AND SANTISTEBAN, P. A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications. *Eur J Endocrinol* 155 (2006), 495–512.

ROCCHI, E., KHODJAKOV, A., VOLK, E., YANG, C., LITMAN, T., BATES, S., AND SCHNEIDER, E. The product of the abc half-transporter gene *abcg2* (*bcrp/mxr/abcp*) is expressed in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 271 (2000), 42–46.

SALET, C. Hematoporphyrin and hematoporphyrin-derivative photosensitization of mitochondria. *Biochimie* 68 (1986), 865–868.

SCHAER, C., VALLELIAN, F., IMHOF, A., SCHOEDON, G., AND SCHAER, D. Heme carrier protein (*hcp-1*) spatially interacts with the *cd163* hemoglobin uptake pathway and is a target of inflammatory macrophage activation. *J Leukoc Biol* 83 (2008), 325–333.

SCHAFFER, M., ERTL-WAGNER, B., SCHAFFER, P., KULKA, U., JORI, G., DÜHMKE, E., AND HOFSTETTER, A. The application of photofrin ii as a sensitizing agent for ionizing radiation—a new approach in tumor therapy? *Curr Med Chem* 12 (2005), 1209–1215.

SCHAFFER, M., SCHAFFER, P., CORTI, L., GARDIMAN, M., SCOTTI, G., HOFSTETTER, A., JORI, G., AND DUHMKE, E. Photofrin as a specific radiosensitizing agent for tumors: studies in

comparison to other porphyrins, in an experimental vivo model. *J Photochem Photobiol B* 66 (2002), 157–164.

SCHEFFER, G., MALIEPAARD, M., PIJNENBORG, A., VAN GASTELEN, M., DE JONG, M., SCHROEIJERS, A., VAN DER KOLK, D., ALLEN, J., ROSS, D., VAN DER VALK, P., DALTON, W., SCHELLENS, J., AND SCHEPER, R. Breast cancer resistance protein is localized at the plasma membrane in mitoxantrone- and topotecan-resistant cell lines. *Cancer Res* 60 (2000), 2589–93.

SENEKOWITSCH-SCHMIDTKE, R., MATZEN, K., TRUCKENBRODT, R., MATTES, J., HEISS, P., AND SCHWAIGER, M. Tumor cell spheroids as a model for evaluation of metabolic changes after irradiation. *J Nucl Med* 39 (1998), 1762–1768.

SHANG, Z., GEN, S., BAI, Y., AND TIAN, H. Experimental study on killing tumor cells by activation of hematoporphyrin derivatives by bi-frequency focal ultrasound in vitro. *Ultrasonics* 44 (2006), 251–253.

SHAYEGHI, M., LATUNDE-DADA, G., OAKHILL, J., LAFTAH, A., TAKEUCHI, K., HALLIDAY, N., KHAN, Y., WARLEY, A., MCCANN, F., HIDER, R., FRAZER, D., ANDERSON, G., VULPE, C., SIMPSON, R., AND MCKIE, A. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 9 (2005), 789–801.

SHEN, R., LU, L., YOUNG, P., SHIDNIA, H., HORNBACK, N., AND BROXMEYER, H. Influence of elevated temperature on natural killer cell activity, lymphokine-activated killer cell activity and lectin-dependent cytotoxicity of human umbilical cord blood and adult blood cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1 (1994), 821–826.

SHETTY, S., MURUGESAN, S., CHATTERJEE, S., BANERJEE, S., SRIVASTAVA, T., NORONHA, O., AND SAMUEL, A. A new ^{99m}Tc labeled porphyrin for specific imaging of sarcoma 120: Synthesis and biological study in a swiss mouse model. *J Label Comp Radiopharm* 38 (1996), 411–418.

SHULOK, J., KLAUNIG, J., SELMAN, S., SCHAFFER, P., AND GOLDBLATT, P. Cellular effects of hematoporphyrin derivative photodynamic therapy on normal and neoplastic rat bladder cells. *Am J Pathol* 122 (Feb 1986), 277–283.

SNYDER, S., VERMA, A., AND TRIFILETTI, R. The peripheral-type benzodiazepine receptor: a protein of mitochondrial outer membranes utilizing porphyrins as endogenous ligands. *FASEB J* 1 (1987), 282–288.

- SONG, C., KIM, G., LYONS, J., MAKEPEACE, C., GRIFFIN, R., RAO, G., AND CRAGOE, E. J. Thermosensitization by increasing intracellular acidity with amiloride and its analogs. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1 (1994), 1161–1169.
- SONG, C., LYONS, J., MAKEPEACE, C., GRIFFIN, R., AND CRAGOE, E. J. Effects of hma, an analog of amiloride, on the thermosensitivity of tumors in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30 (1994), 133–139.
- STATISTISCHES BUNDESAMT, DEUTSCHLAND. *Statistisches Bundesamt, Pressestelle*. Gustav-Stresemann-Ring 11, 65189 Wiesbaden.
- STEWART, F., AND DENEKAMP, J. The therapeutic advantage of combined heat and x rays on a mouse fibrosarcoma. *Br J Radiol* 51 (1978), 307–316.
- STOCKERT, J., CANETE, M., JUARRANZ, A., VILLANUEVA, A., HOROBIN, R., BORRELL, J., TEIXIDÓ, J., AND NONELL, S. Porphycenes: facts and prospects in photodynamic therapy of cancer. *Curr Med Chem* 14 (2007), 997–1026.
- STOTT, B., AND KORBELIK, M. Activation of complement c3, c5, and c9 genes in tumors treated by photodynamic therapy. *Cancer Immunol Immunother* 56 (2007), 649–658.
- SUBBARAYAN, M., SHETTY, S., SRIVASTAVA, T., NORONHA, O., SAMUEL, A., AND MUKHTAR, H. Water-soluble 99mTc-labeled dendritic novel porphyrins tumor imaging and diagnosis. *Biochem Biophys Res Commun* 281 (2001), 32–36.
- SUMMERHAYES, I., AND FRANKS, L. Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder epithelium in vitro. *J Natl Cancer Inst* 62 (1979), 1017–1023.
- TAILOR, C., WILLETT, B., AND KABAT, D. A putative cell surface receptor for anemia-inducing feline leukemia virus subgroup c is a member of a transporter superfamily. *J Virol* 73 (1999), 6500–6505.
- TAKASU, T., LYONS, J., PARK, H., AND SONG, C. Apoptosis and perturbation of cell cycle progression in an acidic environment after hyperthermia. *Cancer Res* 58 (1998), 2504–2508.
- TAKETANI, S., KOHNO, H., FURUKAWA, T., AND TOKUNAGA, R. Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the intracellular transport of heme and porphyrins. *J Biochem* 117 (1995), 875–880.
- TANNER, M., KAPANEN, A., JUNTILA, T., RAHEEM, O., GRENMAN, S., ELO, J., ELENIUS, K., AND ISOLA, J. Characterization of a novel cell line established from a patient with herceptin-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther* 3 (2004), 1585–1592.

- THIERENS, H., MONSIEURS, M., AND BACHER, K. Patient dosimetry in radionuclide therapy: the whys and the wherefores. *Nucl Med Commun* 26 (2005), 593–599.
- UC, A., STOKES, J., AND BRITIGAN, B. Heme transport exhibits polarity in caco-2 cells: evidence for an active and membrane protein-mediated process. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287 (2004), 1150–1157.
- USUDA, J., TSUNODA, Y., ICHINOSE, S., ISHIZUMI, T., OHTANI, K., MAEHARA, S., ONO, S., TSUTSUI, H., OHIRA, T., OKUNAKA, T., FURUKAWA, K., SUGIMOTO, Y., KATO, H., AND IKEDA, N. Breast cancer resistant protein (bcrp) is a molecular determinant of the outcome of photodynamic therapy (pdt) for centrally located early lung cancer. *Lung Cancer* 22 (2009), Epub ahead of print.
- VAGHEFI, N., GUILLOCHON, D., BUREAU, F., NEUVILLE, D., LEBRUN, F., ARHAN, P., AND BOUGLÉ, D. The effect of cysteine and 2,4-dinitrophenol on heme and nonheme absorption in a rat intestinal model. *J Nutr Biochem* 11 (2001), 562–567.
- VAN DER ZEE, J., VAN DER HOLT, B., RIETVELD, P., HELLE, P., WIJNMAALEN, A., VAN PUTTEN, W., AND VAN RHOON, G. Reirradiation combined with hyperthermia in recurrent breast cancer results in a worthwhile local palliation. *Br J Cancer* 79 (1999), 483–490.
- VAN DONGEN, G., VISSER, G., AND VROUENRAETS, M. Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 56 (2004), 31–52.
- VINCENT, R., DOUGHERTY, T., RAO, U., BOYLE, D., AND POTTER, W. Photoradiation therapy in advanced carcinoma of the trachea and bronchus. *Chest* 85 (1984), 29–33.
- VLAMING, M., LAGAS, J., AND SCHINKEL, A. Physiological and pharmacological roles of abcg2 (bcrp): recent findings in abcg2 knockout mice. *Adv Drug Deliv Rev* 61 (2008), 14–25.
- WALDOW, S., HENDERSON, B., AND DOUGHERTY, T. Hyperthermic potentiation of photodynamic therapy employing photofrin i and ii: comparison of results using three animal tumor models. *Lasers Surg Med* 7 (1987), 12–22.
- WENDLER, G., LINDEMANN, P., LACAPÈRE, J., AND PAPADOPOULOS, V. Protoporphyrin ix binding and transport by recombinant mouse pbr. *Biochem Biophys Res Commun* 28 (2003), 847–852.
- WONG, D. A simple chemical method of labeling hematoporphyrin derivative with technetium-99m. *J Label Comp Radiopharm* 20 (1983), 351–361.

- WORTHINGTON, M., COHN, S., MILLER, S., LUO, R., AND BERG, C. Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280 (2001), 1172–1177.
- YAMAMOTO, T., NISHIZAWA, S., MARUYAMA, I., YOSHIDA, M., TSUCHIDA, T., WAKI, A., FUJIBAYASHI, Y., KUBOTA, T., YONEKURA, Y., AND ITOH, H. Acute effects of stereotactic radiosurgery on the kinetics of glucose metabolism in metastatic brain tumors: Fdg pet study. *Ann Nucl Med* 15 (2001), 103–109.
- YANASE, K., TSUKAHARA, S., ASADA, S., ISHIKAWA, E., IMAI, Y., AND SUGIMOTO, Y. Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance. *Mol Cancer Ther* 3 (2004), 1119–1125.
- ZANELLI, G., AND KAELIN, A. Synthetic porphyrins as tumour-localizing agents. *Br J Radiol* 54 (1981), 403–407.
- ZHOU, F., XING, D., AND CHEN, W. Dynamics and mechanism of hsp70 translocation induced by photodynamic therapy treatment. *Cancer Lett* 264 (2008), 135–144.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. B. Meller für ihre gute Betreuung mit ständiger Hilfsbereitschaft und Ansprechbarkeit. Danke auch an ihren Mitarbeiter Christian Breunig vor allem für die Unterstützung in organisatorischen Angelegenheiten. Auch den MTAs und den weiteren Mitarbeitern in der Nuklearmedizin der Uni Lübeck danke ich für die Zusammenarbeit.

Bei meinen Mitdoktoranden Christian Wolff, Christina Reetz und Marcus Zimmermann möchte ich mich für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor bedanken, bei denen wir uns immer wieder gegenseitig motivieren konnten.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Vater für seine Unterstützung während Studium und Promotion, immer wieder aufbauende Worte sowie auch sachliche Kritik.

Natürlich auch Danke an alle Freunde und Verwandte, die sich immer wieder nach meiner Arbeit erkundigt haben und bereitwillig zuhörten, wenn ich unzufrieden war.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Lange
Vorname	Christiane
Geburtsdatum	06.09.1980
Geburtsort	Hannover
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1987-1991	Thiebauth-Grundschule, Ettlingen
1991-2000	Eichendorff-Gymnasium, Ettlingen
1997	Dreimonatiger Besuch der Palmer Highschool, Colorado Springs, USA
2000	Abitur

Studium

2001 - 2002	Chemiestudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms- Universität in Bonn
2002 - 2004	Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn
2004	Ärztliche Vorprüfung
2004 - 2009	Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der Universität zu Lübeck
01/2007-11/2007	Experimenteller Teil der Dissertation
2008	Praktisches Jahr am Landspítali in Reykjavík und an der MUL
2009	Ärztliche Prüfung und Dissertation

Sonstiges

2000 - 2001	Einjähriger Aufenthalt in Island mit Arbeit in der Landwirtschaft
-------------	--