

Aus dem Institut für Biomedizinische Optik
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. phil. nat. R. Birngruber

**Selektive Zerstörung von EMT6 Tumoren mittels
farbstoffgestützter Photothermotherapie im Mausmodell**

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Henning Hanken
aus Bremen

Lübeck 2008

1. Berichterstatter

- **Prof. Dr. phil. nat. Dr. med. habil. Reginald Birngruber**

2. Berichterstatter

- **Prof. Dr. med. Rainer Broll**

Tag der mündlichen Prüfung

- **18.11.2008**

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 18.11.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
1.1	PHOTODYNAMISCHE THERAPIE (PDT)	1
1.1.1	<i>Grundlagen der photodynamischen Therapie</i>	1
1.1.2	<i>Vor- und Nachteile der PDT</i>	3
1.2	LASERINDUZIERTE INTERSTITIELLE THERMOTHERAPIE (LITT)	4
1.2.1	<i>Vor- und Nachteile der LITT</i>	8
1.3	SELEKTIVE PHOTOTHERMOLYSE (SPT)	8
1.3.1	<i>Vor- und Nachteile der SPT</i>	12
1.4	NANOSHELL-ASSISTIERTE PHOTOTHERMOTHERAPIE (NAPT)	13
1.4.1	<i>Vor- und Nachteile der NAPT</i>	14
1.5	FARBSTOFFGESTÜTZTE PHOTOTHERMOTHERAPIE (PTT)	15
1.6	FRAGESTELLUNG	20
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	KARZINOMTYP	21
2.2	MAUSSTAMM	21
2.3	ANÄSTHESIE	21
2.4	TUMORTRANSPLANTATION	22
2.4.1	<i>Serielle Passagen</i>	22
2.4.2	<i>Explantation</i>	23
2.4.3	<i>Implantation</i>	23
2.5	TUMORGRÖÖBE AM BEHANDLUNGSTAG	24
2.6	PHOTOSENSIBILISATOR	24
2.6.1	<i>Injektionslösung PdNc(OBu)₈</i>	24
2.7	LASER, VERSUCHSAUFBAU UND -DURCHFÜHRUNG	25
2.8	DOSIMETRIE	28
2.9	TUMORVOLUMEN	28
2.10	HISTOLOGIE	29
2.11	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN	29
2.11.1	<i>Murines Ki-67 Protein</i>	29
2.11.2	<i>Murines Membranprotein CD45</i>	30
2.12	NEKROSEANTEIL DES TUMORGESAMTVOLUMENS	31
2.13	STATISTISCHE AUSWERTUNG	32

3	ERGEBNISSE	33
3.1	WACHSTUMSVERHALTEN DER TUMOREN	33
3.1.1	<i>Makroskopische Aspekte der Behandlung</i>	34
3.2	KONTROLLGRUPPEN.....	35
3.3	PHOTOTHERMOTHERAPIE	39
3.3.1	<i>Bestrahlungsstärke 30 Wcm⁻² und Bestrahlungszeit 10 Sekunden</i>	39
3.3.2	<i>Bestrahlungsstärke 30 Wcm⁻² und Bestrahlungszeit 15 Sekunden</i>	43
3.3.3	<i>Bestrahlungsstärke 30 Wcm⁻² und Bestrahlungszeit 20 Sekunden</i>	48
3.4	AUSWERTUNG DER NEKROSEAREALE	55
4	DISKUSSION	58
4.1	WACHSTUMSVERHALTEN DER TUMOREN	58
4.2	MAKROSKOPISCHE ASPEKTE DER BEHANDLUNG	59
4.3	KONTROLLGRUPPEN.....	61
4.4	PHOTOTHERMOTHERAPIE	62
4.4.1	<i>Bestrahlungsstärke 30 Wcm⁻² und Bestrahlungszeit 10 Sekunden</i>	62
4.4.2	<i>Bestrahlungsstärke 30 Wcm⁻² und Bestrahlungszeit 15 Sekunden</i>	64
4.4.3	<i>Bestrahlungsstärke 30 Wcm⁻² und Bestrahlungszeit 20 Sekunden</i>	65
4.5	AUSWERTUNG DER NEKROSEAREALE	67
4.6	DIE FARBSTOFFGESTÜTZTE PHOTOTHERMOTHERAPIE IM VERGLEICH	68
4.7	ALTERNATIVE KÜHLMETHODEN	79
4.8	AUSBLICK	81
5	ZUSAMMENFASSUNG	84
6	LITERATUR	85
7	ANHANG	92
7.1	NEKROSEZONENAUSWERTUNG IN DEN KONTROLLGRUPPEN.....	92
7.2	NEKROSEZONENAUSWERTUNG IN DEN BEHANDLUNGSGRUPPEN.....	93
7.3	TIERVERSUCHSANTRAG.....	94
8	DANKSAGUNG	A
9	ERKLÄRUNG	B
10	LEBENS LAUF	C

Abkürzungen

etc.	et cetera
h	Stunde(n)
Hz	Hertz
LITT	Laserinduzierte interstitielle Thermotherapie
M	Mol
min	Minute(n)
mJ	Millijoule
n	Versuchsanzahl
ns	Nanosekunden
NAPT	Nanoshell-assistierte Photothermotherapie
Nd:YAG-Laser	Neodym dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
PBS	phosphate-buffered saline, Phosphatpufferlösung
PDT	Photodynamische Therapie
p.i.	post irradiationem
PTT	Farbstoffgestützte Photothermotherapie
s	Standardabweichung
sog.	sogenannte
SPT	Selektive Photothermolyse
TBS	tris buffered saline
TTBS	tris tween buffered saline
u. a.	unter anderem
Wcm ⁻²	Watt pro Quadratcentimeter
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert

1 Einleitung

Die Anwendung des Lasers in der Medizin hat im Verlauf der letzten Jahre mehr und mehr an Bedeutung gewonnen: derzeit kommt der Laser in zahlreichen medizinischen Fachbereichen in unterschiedlichster Art zur Anwendung und hat somit in der modernen Medizin einen nicht mehr wegzudenkenden Stellenwert erlangt.

Im Folgenden werden wichtige und grundlegende Anwendungsmöglichkeiten vorgestellt um im Anschluss aus diesen das Konzept der selektiven, farbstoffgestützten Photothermotherapie, die Kerninhalt dieser Dissertationsarbeit ist, zu entwickeln.

1.1 Photodynamische Therapie (PDT)

1.1.1 Grundlagen der photodynamischen Therapie

Die photodynamische Therapie ist die am längsten bekannte Einsatzmöglichkeit von Licht in der Behandlung von maligne entartetem oder entzündlich verändertem Gewebe.

Bereits vor etwa 3000 Jahren erkannten die Ägypter und Chinesen, dass bestimmte Substanzen zusammen mit starkem Lichteinfall therapeutisch in der Behandlung der Vitiligo genutzt werden können (Spikes, 1985).

Um malignes oder entzündlich verändertes Gewebe behandeln zu können, wird in der photodynamischen Therapie der zytotoxische Synergismus zwischen einem Photosensibilisator und Licht ausgenutzt. Wie bereits weiter oben angeklungen, ist der Photosensibilisator ein Farbstoff, der dem Patienten lokal oder systemisch appliziert wird. Idealerweise sollte er dabei von dem entzündlich oder maligne veränderten Gewebe besser aufgenommen oder länger retiniert werden, um im Gegensatz zum umliegenden, nicht veränderten Gewebe eine höhere Konzentration zu erreichen. Nach Applikation des Farbstoffes folgt eine Bestrahlung der veränderten Region mit Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich, um damit eine Folge photochemischer Reaktionen auszulösen, deren Produkte letztendlich zytotoxisch sind.

Die Wellenlänge des eingesetzten Lichtes wird dabei dem Absorptionsspektrum des Photosensibilisators angepasst, d.h. die Wellenlänge des Lichtes entspricht der Wellenlänge eines Absorptionsmaximums des Photosensibilisators. Durch die Absorption eines Photons geht die Elektronenkonfiguration des Moleküls in einen energiereicheren, d.h. angeregten Zustand über (erst Singulett- dann Tripletzustand). Aus dem relativ langlebigen Tripletzustand ($> 10 \mu\text{s}$ für Hämatorporphyrinderivate, McGarvey und Truscott, 1990) kann das Photosensibilisatormolekül über unterschiedliche Reaktionen in

den Grundzustand zurückkehren. Zum einen kann der Photosensibilisator durch Elektronenübertragung mit Substraten in der Zelle (z.B. Sauerstoff, Wasser, Membranen und Proteine) reagieren. In der Folge einer solchen Reaktion kommt es zur Bildung von freien Radikalen, die selbst oder wiederum über Folgereaktionen wichtige Zellfunktionen stören bzw. zerstören (sog. Typ I – Reaktion). Auf der anderen Seite kann das Photosensibilisatormolekül auch die aufgenommene Energie direkt auf molekularen Sauerstoff übertragen, der dadurch vom Grundzustand – beim Sauerstoff ist dies der Triplettzustand – in den hochreaktiven Singulettzustand übergeht (sog. Typ II – Reaktion, Boulnois, 1986; Henderson und Dougherty, 1992). Diese angeregten Sauerstoffmoleküle können nun über Oxidation von zellulären Molekülen photosensibilisierte Zellen schädigen (Moan et al., 1989). Nach diesen Typ II -Reaktionen steht der Photosensibilisator wieder unverändert für eine weitere Anregung zur Verfügung, sofern nicht eine der genannten Folgereaktionen den Photosensibilisator selber chemisch modifiziert (siehe auch Abb. 1.1.2a).

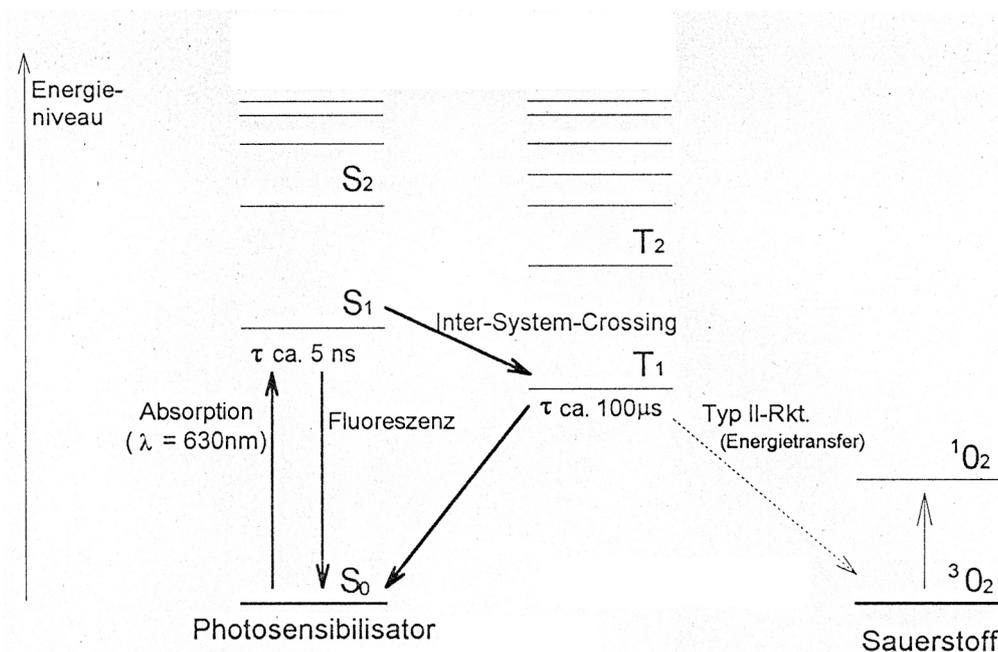


Abb. 1.1.2a: Vereinfachtes Schema der Energiezustände des Photosensibilisators (Jablonski-Diagramm); nicht eingezeichnet ist die Typ I – Reaktion, bei der das Photosensibilisatormolekül von T_1 ausgehend über Elektronentransfer zur Radikalbildung in der Zelle führen kann. (τ : mittlere Lebensdauer des jeweiligen energetischen Zustandes im Gewebe).

Neben der direkten letalen Wirkung der photodynamischen Therapie auf z.B. Tumorzellen beruht die Wirkung bei Verwendung bestimmter Photosensibilisatoren (z.B. Hämatoporphyrinderivaten) zusätzlich auch auf Schäden an der Gefäßversorgung von Karzinomen (sog. Sekundäreffekte). Durch die photodynamische Therapie kommt es zu einer wesentlichen Minderperfusion mit partiellem vollständigen Erliegen der Mikrozirkulation durch eine induzierte Vasokonstriktion, Thrombozytenaggregation sowie perivasale Einblutungen (Star et al., 1986, Wiemann et al., 1988, Henderson und Dougherty, 1992).

Ein weiterer Sekundäreffekt, der insbesondere in den letzten Jahren in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen gekommen ist, ist eine induzierte Immunreaktion auf Tumorbestandteile nach photodynamischer Therapie. Hierbei kommt es zum einen zu einer erhöhten Aktivität von Entzündungszellen gegen Tumorzellen sowie zum anderen zu einer spezifischen Immunreaktion gegen Tumorbestandteile. Dieser Effekt ist erklärbar durch einen phototoxischen Schaden, der nicht notwendigerweise letal ist, aber einen entzündlichen Reiz darstellt. In diesem Zusammenhang ist bereits die Induktion einer Immunität nach photodynamischer Therapie auf zuvor transplantierte und vitale Tumoren beschrieben worden (Korbelik 1996, Hendrzak-Henion et al., 1999, Korbelik und Dougherty 1999). In diesen Experimenten wurden als Tumormodell EMT6 Tumoren und als Tiermodell BALB/c Mäuse verwendet, wie sie auch in den Versuchen dieser Arbeit verwendet wurden. Eine neuere Arbeit von Gollnick et al. (2006) untersuchte die anti-Tumor Immunität nach PDT auch auf zellulärer Ebene und kommt zu Ergebnissen, die die Theorie der Induktion einer Immunität gegen Tumoren stützen.

Einen kompletten Überblick über den aktuellen Stand der photodynamischen Therapie geben beispielweise Dougherty et al. (1998) und Dougherty (2002).

1.1.2 Vor- und Nachteile der PDT

Als Schwachpunkt der photodynamischen Therapie kann man zunächst die Abhängigkeit der rein photochemischen Reaktionen von der Anwesenheit von Sauerstoff im zu behandelndem Gewebe festhalten. Dies ist insbesondere bei Malignomen äußerst nachteilhaft, da die Tumoren in der Regel durch ihr zügelloses Wachstum mit einem extrem gesteigerten Metabolismus nur geringe Sauerstoffkonzentrationen im Gewebe aufweisen wodurch die Effektivität der PDT gerade dort, wo sie wirken sollte, abgeschwächt wird. Zudem diktiert die Sauerstoffabhängigkeit der Methode die Höhe der anwendbaren Bestrahlungsstärke welche bei der PDT generell auf einem niedrigem Niveau gehalten werden muss, so dass während der Bestrahlung genügend Zeit verbleibt,

um im Gewebe den verbrauchten durch nachdiffundierenden Sauerstoff zu ersetzen. Daher werden bei der PDT relativ geringe Bestrahlungsstärken für einen relativ langen Bestrahlungszeitraum angewandt. Typische Behandlungsparameter der PDT wären z.B. die relativ geringe Bestrahlungsstärke von 50 bis 200 mW/cm² und eine Lichtdosis von 50 bis 200 J/cm².

Als weiterer Nachteil der PDT ist die begrenzte Tiefenwirkung im Gewebe (maximal 6 mm) festzuhalten, welche die Einsatzmöglichkeiten auf oberflächliche Läsionen begrenzt. Weiterhin kann es bei einigen Photosensibilisatoren noch Tage bis Wochen nach Applikation bei übermäßiger Sonnenbestrahlung zu phototoxischen Reaktionen kommen. Dies bedeutet, dass sich die Patienten bei entsprechendem Photosensibilisator über einen langen Zeitraum vor direkter Sonneneinstrahlung schützen müssen.

Stärken der photodynamischen Therapie sind hingegen die Selektivität des induzierten photochemischen Schadens sowie die mögliche Induktion einer Immunität bzw. einer immunologischen Reaktion auf Tumorbestandteile.

1.2 Laserinduzierte interstitielle Thermotherapie (LITT)

Wie bereits der Name dieser thermischen Behandlungsmethode beschreibt, muss eine Laserlichtfaser (bzw. -fasern) direkt in dem zu behandelnden Tumor bzw. Gewebe positioniert werden. Die LITT ist somit eine Lasertherapie mit direktem Kontakt im Gegensatz zur PDT, bei der kein direkter Kontakt eines Lichtleiters (außer bei der interstitiellen PDT) mit dem Gewebe stattfindet.

Das Prinzip der LITT beruht auf der Induktion eines unspezifischen letalen thermischen Schadens im Tumorgewebe bzw. dem Gewebe, welches den interstitiell eingebrachten Lichtleiter umgibt. Das Erwärmen von Tumorzellen auf eine ausreichend hohe Temperatur für einen ausreichend langen Zeitraum führt zu einem irreversiblen Zellschaden und -tod durch Denaturierung von Proteinen, Inhibition der Proteinsynthese, DNA- und RNA-Strangbrüche sowie durch einen Integritätsverlust von Lipiddoppelmembranen. Die Anwendung einer LITT mit Bestrahlungsstärken von 5 bis 30 W für bis zu 30 Minuten induziert im Gewebe, welches den Laserlichtleiter bzw. die Laserlichtleiter umgibt, ein beständig durch Wärmeleitung größer werdendes, sphärisches Areal, in dem eine unspezifische Gewebserwärmung stattfindet (siehe Abb. 1.2a und 1.2b). Eingesetzt werden dabei z.B. Neodym dotierte Yttrium-Aluminium-Granat-Laser (kurz Nd:YAG-Laser) mit einer Wellenlänge von 1064 nm oder auch Diodenlaser mit Wellenlängen zwischen 800 bis 1000 nm. Irreversible zytotoxische Schäden treten dabei in Zellen auf, die für eine

bestimmte Zeit auf eine bestimmte Temperatur erwärmt wurden. So können irreversible thermische Schäden bereits mit relativ geringen Temperaturerhöhungen (auf z.B. 50 °C) erreicht werden, wenn diese Temperatur über einen relativ langen Zeitraum von ca. 5 – 10 Minuten aufrecht erhalten wird und *vice versa* - eine starke Temperaturerhöhung (auf z.B. 90 °C) im Gewebe kann in verhältnismäßig kurzer Zeit (Millisekunden) einen irreversiblen Schaden induzieren.

Die physikalischen und chemischen Vorgänge, die letztendlich zu einer Schädigung des Gewebes mit der beschriebenen Kinetik in Abhängigkeit von Zeit und Temperaturerhöhung führen, lassen sich mathematisch mit Hilfe einer Ratengleichung, dem so genannten Arrhenius-Formalismus, beschreiben.

Da die direkte Messung des Schädigungsstatus von Gewebe nicht möglich ist, hat sich zur Beschreibung der Gewebeerstörung durch Wärmeeinwirkung die Benutzung von Ratengleichungen etabliert (Henriques, 1947; Welch, 1984; Agah et al., 1994). Hierbei wird die Gewebeerstörung dadurch quantifiziert, dass man den Anteil des durch Wärme zerstörten (koagulierten) Gewebes im Vergleich zu dem noch nicht koagulierten Gewebe betrachtet. Die Koagulation von Gewebe ist eine Folge der Denaturierung der einzelnen Proteine, aus denen das Gewebe zusammengesetzt ist. Die Denaturierung ist bedingt durch das Aufbrechen von Disulfid-Bindungen, durch das es zu einer irreversiblen chemischen Veränderung der räumlichen Molekülketten kommt. Die Beschreibung der Proteindenaturierung in Abhängigkeit der Temperatur baut auf der Reaktionsgeschwindigkeit auf. Die Abhängigkeit wiederum der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur wurde ursprünglich von Arrhenius beschrieben (Arrhenius, 1889), so dass die Berechnung der Proteindenaturierung in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur nach ihm benannt wurde – der sog. Arrhenius-Formalismus.

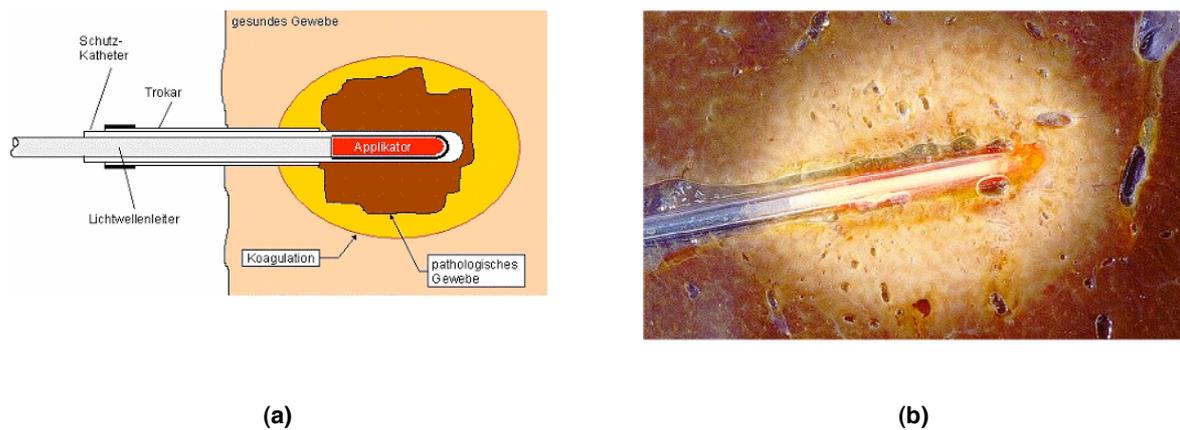


Abb. 1.2a: Schematische Darstellung der Applikation einer LITT. Über einen Trokar wird der Lichtwellenleiter mit dem Applikator (CT-gesteuert) in das Zielgewebe (z.B. eine Metastase) eingebracht. Während der Behandlung wird gleichermaßen gesundes wie auch pathologisches Gewebe um den Applikator herum geschädigt.

Abb. 1.2b: In-vitro Darstellung der Effekte der LITT am Beispiel einer Schweineleber. Der Lichtleiter wird nach der Applikation von einer homogenen, hier weißlich gefärbten, Koagulationsnekrose umgeben, die pathologisches wie auch gesundes Gewebe undifferenziert erfasst (aus: Internet; http://www.lmtb.de/themen/thera_de.html).

Die LITT induziert eine unspezifische lokale Erwärmung von Gewebe, in dem die Photonen des Laserlichtes mit natürlich vorkommenden, endogenen Absorbern (wie Wasser und (Oxy-) Hämoglobin) interagieren (Germer et al., 1998a).

Abhängig von der Wellenlänge des Laserlichtes, der benutzen Bestrahlungsstärke, der Spezifikationen des Lichtapplikators und den spezifischen optischen Eigenschaften des Gewebes wird das Laserlicht bei Anwendung der LITT in unterschiedlicher Ausprägung gestreut, reflektiert und absorbiert. Basierend auf der Gewebeszusammensetzung, der Gewebevaskularisierung, einer Fibrose oder einer Nekrose können dabei die spezifischen optischen Eigenschaften bedeutend von einem Areal zum anderen in einem Tumor oder auch im Normalgewebe schwanken. Allgemein gilt allerdings, dass (wie bereits im Abschnitt über die photodynamische Therapie angeklungen) die optische Eindringtiefe des Lichtes bis zu einer Grenze bei ca. 1000 nm mit der Größe der Wellenlänge zunimmt. Im nahen Infrarot absorbieren die beiden Hauptfarbstoffe Hämoglobin und Melanin sowie das Wasser relativ schwach. Somit besteht im Bereich von ca. 700 bis 1000 nm ein so genanntes „optisches Fenster“, in dem die Eindringtiefe des Lichtes maximiert ist. Daher werden in der LITT Diodenlaser (Wellenlänge 800 bis 1000 nm) oder häufiger Nd:YAG-Laser (Wellenlänge 1064 nm) verwandt (Germer et al., 1998; Muralidharan und Christophi, 2001) (siehe auch Abb. 1.2c).

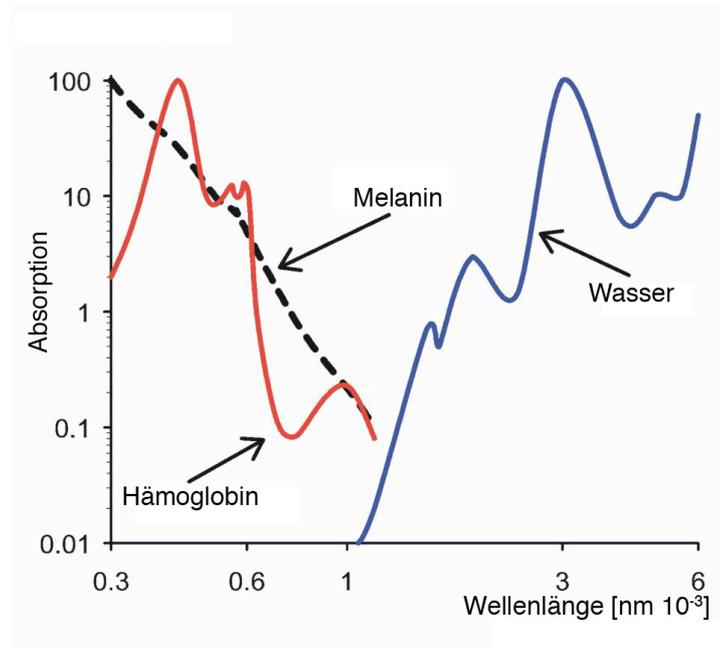


Abb. 1.2c: Relative Absorptionen der beiden Hauptpigmente des Gewebes (Melanin und Hämoglobin) und des Wassers. Zwischen ca. 800 bis 1000nm besteht ein „optisches Fenster“ in dem die Chromophore und das Wasser nur relativ schwach absorbieren und damit Licht besonders tief in das Gewebe eindringen kann. Unter Berücksichtigung weiterer physiologischer Pigmente (hier nicht abgebildet) ergibt sich eine maximale Eindringtiefe des Lichtes zwischen 700 bis 900 nm.

Das Laserlicht mit einer Wellenlänge von 1064 nm welches vom Nd:YAG-Laser generiert wird hat eine optische Gewebepenetrationstiefe von bis zu 10 bis 12 mm (Jacques 1992). Im Gegensatz zu anderen medizinischen Laseranwendungen bei denen Laserlicht hoher Bestrahlungsstärke in kurzen Pulsen appliziert wird um eine schnelle Photokoagulation zu erreichen, wird in der LITT Laserlicht niedriger Bestrahlungsstärke (5 bis 30 Watt) im Dauerstrichmodus (**continuous wave, cw**) für bis zu 30 Minuten eingesetzt. Eine langsame Erwärmung des Gewebes muss in der LITT erreicht werden um eine Verkohlung und Verdampfung des Gewebes in der Nähe des Lichtapplikators zu vermeiden. Die schnelle Bildung eines Gewebekoagulum durch Verkohlung reduziert die optische Eindringtiefe des Lichtes in das Gewebe und schränkt die Ausbreitung des erhitzten Gewebebereiches ein, in dem Temperaturen vorherrschen, die ausreichend hoch sind, um einen letalen Schaden an Tumorzellen zu induzieren. Eine schnell induzierte Koagulationsnekrose reduziert die optische Eindringtiefe um ca. 25% im Normal- wie im Tumorgewebe (Germer et al., 1998b).

1.2.1 Vor- und Nachteile der LITT

Die Vor- und Nachteile der LITT ergeben sich aus den oben besprochenen Charakteristika dieser Technik. Vor allem muss die komplizierte Anwendung der Methode als nachteilig angemerkt werden. Am Beispiel von Lebermetastasen muss die Lage der Lichtleiter im Gewebe vor und während der Behandlung exakt bestimmt und festgehalten werden. Dies gelingt z.Zt. nur mit ausreichender Präzision unter einer magnetresonanztomographischen Führung bzw. Lagekontrolle, was einen hohen apparativen, zeitlichen und unökonomischen Aufwand zur Durchführung der LITT bedeutet.

Ein weiterer sehr wichtiger Nachteil der LITT im Gegensatz auch zur PDT ist der nicht selektive Schaden der Behandlung. Das die Laserfaser oder den Applikator umgebende Gewebe wird unspezifisch auf Grund der Gewebeabsorption (s.o.) koaguliert, d.h. auch gesundes, nicht entartetes Gewebe wird geschädigt.

Ein Vorteil der LITT im Gegensatz zur PDT ist die sauerstoffunabhängige photothermische Reaktion. Ein Sauerstoffmangel, wie er häufig in Tumoren vorherrscht (s.o.) beeinträchtigt somit nicht das Behandlungsergebnis der LITT. Des Weiteren ist die hohe Eindringtiefe des verwendeten infraroten Lichtes vorteilhaft, da so große Gewebevolumina koaguliert werden können.

1.3 Selektive Photothermolyse (SPT)

Im Gegensatz zur LITT handelt es sich bei der selektiven Photothermolyse (SPT) um eine Behandlungsmethode ohne direkten Kontakt der Laserfaser mit dem zu behandelndem Gewebe. Die Laserstrahlung bei Anwendung der SPT wird perkutan unter externer Kühlung der obersten Hautschichten appliziert. Typische Anwendungsgebiete der SPT sind z.B. die Behandlung von Besenreiservarizen, also erworbene Gefäßmalformationen der Haut und Unterhaut, sowie die Reduktion von Körperhaaren z.B. bei der Behandlung des Hirsutismus (Sanchez et al., 2002) oder aus anderen kosmetischen Gründen. Zielstrukturen der SPT bei der Behandlung von Besenreiservarizen sind die Blutgefäße, bei der Reduktion von Körperhaaren sind es Melanozyten in den Haarfollikeln, welche durch einen thermischen Schaden letal geschädigt werden und somit zu einem Absterben des Haares führen. Dabei ist die besondere Eigenschaft der SPT, dass sie durch Wahl einer der räumlichen Ausdehnung der Zielstruktur angepassten Bestrahlungsdauer den thermisch vermittelten Strahlungsschaden auf ausgewählte pigmentierte Ziele auf der

ultrastrukturellen, zellulären oder auch Gewebestrukturbene begrenzt. Die Begrenzung des thermischen Schadens ist ähnlich präzise wie bei Anwendung von Mikrostrahltechniken, allerdings mit dem immensen Vorteil, dass Millionen der anvisierten Strukturen in vivo gleichzeitig geschädigt werden, ohne ein präzises Fokussieren auf die einzelnen Strukturen durchführen zu müssen. Dies ist besonders vorteilhaft in unübersichtlichen Geweben die, im Gegensatz zum Auge, die Möglichkeit der genauen Exposition von einzelnen Zielstrukturen gegenüber dem Laserlicht nicht zulassen. Die gering pigmentierten Gewebe zwischen den Zielstrukturen, inklusive der überlagernden und direkt benachbarten Zellen, werden durch den thermischen Schaden nicht erfasst. Dies reduziert eine ausgedehnte, ansonsten bei Laseranwendungen an der Haut beobachtete, großflächige Zerstörung und Vernarbung des Bestrahlungsareals. Zudem ermöglicht diese Eigenschaft ein äußerst effektives, ökonomisches Arbeiten z.B. bei der Haarentfernung. Ohne jeden Haarbalg einzeln anvisieren zu müssen (um beim Beispiel der Haarentfernung zu bleiben) können mit der SPT hunderte Haarbälge in kürzester Zeit selektiv thermisch koaguliert werden.

Das Prinzip der SPT wurde grundlegend und erstmalig von Anderson und Parrish (1983) beschrieben.

Die Methode der SPT beruht auf der selektiven Absorption eines kurzen Laserpulses (bzw. auch von mehreren aufeinander folgenden Laserpulsen), der in den pigmentierten Zielen einen Hitzeschaden induziert sowie - durch Wahl einer entsprechenden Pulsdauer - den Schaden auf die Zielstrukturen begrenzt. Eine absolute Voraussetzung zur Anwendung der SPT ist, dass die anvisierten pigmentierten Ziele eine größere optische Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge als das umgebende Gewebe haben. Diese Voraussetzung kann über die Nutzung von endogenen, physiologisch vorhandenen, pigmentierten Zielen erfolgen (wie es für die SPT typisch ist). Während der Exposition der Zielstrukturen gegenüber dem Laserlicht wird über eine Anregung der Pigmentmoleküle durch Absorption der Photonen mit anschließender strahlungsloser Deexzitation im gesamten Behandlungsfeld die Strahlungsenergie des Laserlichtes in jeder pigmentierten Zielstruktur in Wärme umgewandelt. In der Folge geben die erhitzten Ziele die Wärme hauptsächlich über thermische Diffusion an die Umgebung ab. Dieser Prozess der Wärmeabgabe benötigt aber einige Zeit, so dass die Wärme initial, während der Bestrahlung, auf die Zielstrukturen begrenzt bleibt. Am Ende eines angemessen kurzen Laserpulses hat dadurch die Temperatur in den Zielstrukturen die benötigte Temperatur für eine thermische Denaturation deutlich überschritten, wohingegen die Temperatur in der Umgebung deutlich unter diesem Wert bleibt. Direkt nach der Exposition gegenüber dem Laserlicht sinkt die Temperatur in den Zielstrukturen unter Erwärmung der

Umgebungsstrukturen wieder ab. Allerdings werden die Umgebungsstrukturen dabei nicht notwendigerweise auf Denaturierungstemperaturen erwärmt.

Ein physikalisches Maß dafür, wie schnell an einem bestimmten Ort nach Erwärmung, z.B. durch einen Laserstrahl, die Temperatur wieder abnimmt, ist die sogenannte thermische Relaxationszeit. Die Zielstruktur gibt die aufgenommene Wärme über eine einsetzende Wärmediffusion an das umliegende Gewebe ab, so dass eine Verteilung der Wärmeenergie in die Umgebung stattfindet. Mit welcher Geschwindigkeit dieser Prozess der „Wärmeumverteilung“ abläuft hängt im Wesentlichen von der Dichte, der Wärmekapazität und der Wärmeleitfähigkeit des umgebenden Gewebes ab. Sie lässt sich mathematisch berechnen und wird dann allgemein als thermische Relaxationszeit bezeichnet.

Die wesentlichen Punkte der SPT sollen abschließend noch einmal zusammengefasst werden. Um bei der SPT einen Schaden zu induzieren, der auf das Zielgewebe begrenzt bleibt, müssen die folgenden Punkte beachtet werden:

- Das anvisierte Zielgewebe muss eine höhere Absorption als das umgebende Gewebe aufweisen.
- Die Deexzitation, d.h. die Energieabgabe nach Anregung der Chromophore, erfolgt dabei über die Abgabe von Wärme.
- Es muss eine ausreichende Bestrahlungsstärke gewählt werden, so dass im Zielgewebe eine ausreichend hohe Temperatur induziert werden kann.
- Die Länge des Laserpulses bzw. die Bestrahlungsdauer ist von entscheidender Bedeutung. Sie muss ausreichend lang sein, so dass es auf Grund der Temperaturerhöhung für eine bestimmte Zeit zu einer irreversiblen thermischen Schädigung des Zielgewebes kommt. Hierbei ist wiederum der Arrhenius-Formalismus, d.h. die Temperatur- und Zeitabhängigkeit einer thermischen Gewebeschädigung, (siehe auch Kapitel 1.2) wesentlich.
- Allerdings darf die Dauer des Laserpulses (bzw. die Bestrahlungsdauer) die thermische Relaxationszeit des Zielgewebes nicht überschreiten, da es sonst auf Grund von Wärmediffusion zu einer Schädigung des umliegenden (benachbarten) Gewebes kommt. Für das umliegende Gewebe ist dabei wiederum der Arrhenius-Formalismus bedeutend, um abschätzen zu können, wann hier ein thermischer Schaden durch Wärmediffusion auftreten könnte.

Um die thermischen Vorgänge in Abhängigkeit von der Zeit zu veranschaulichen, dient Abbildung 1.3a. Dabei wird von drei nebeneinander liegenden, stärker pigmentierten

Zielen ausgegangen, die mit der SPT, also einem Laserpuls angemessener Bestrahlungsstärke und Dauer, behandelt werden. Wiedergegeben wird nun die Temperaturerhöhung in den Zielen bzw. die darauf folgende Miterwärmung des umliegenden Gewebes durch Wärmediffusion.

Von den Zeiten T_0 bis T_2 erfolgt eine rapide Erwärmung ausschließlich der Zielgewebe, welche bei T_2 eine Temperatur von ca. 90 °C aufweisen. Diese Temperatur wird (in Anlehnung an den Arrhenius-Formalismus) ausreichend lange in den Zielstrukturen aufrecht erhalten, so dass ein irreversibler thermischer Schaden auftritt.

Die folgenden Kurven von T_3 bis T_6 geben nun die Wärmediffusion von den Zielgeweben in das umliegende Gewebe mit Bezug auf die thermische Relaxationszeit wieder. Die Wärmeenergie verteilt sich im gesamten umgebenden Gewebevolumen. Dabei ist besonders wichtig, dass hierbei im umliegenden Gewebe die Temperaturen nicht so hoch steigen, dass ein thermischer Schaden induziert wird. Zwar steigt die Temperatur allgemein (bei T_6) an, dieser Temperaturbereich wird allerdings nicht lange genug gehalten, um Schaden anrichten zu können. Nach dem Arrhenius-Formalismus müsste diese Temperatur von ca. 47 °C für die Dauer von über 30 Minuten gehalten werden, um schädlich zu sein – ein Zeitraum der *in vivo* durch weitere Wärmediffusion, Blutfluss und niedrigere Raumtemperaturen bei ausbleibender weiterer Wärmezufuhr nicht auftritt.

Ebenfalls wird die Bedeutung der thermischen Relaxationszeit für die Selektivität der SPT durch die Abbildung verdeutlicht. Erfolgt eine Wärmezufuhr in den Zielgeweben für einen längeren Zeitraum als die thermische Relaxationszeit des Gewebes, wird zwangsläufig – zunächst in kleinen Bereichen des Umgebungsgewebes, bei weiterer Wärmezufuhr in immer größeren Bereichen – ein thermischer Schaden durch die Wärmediffusion im Umgebungsgewebe auftreten. Hierbei erreicht das Umgebungsgewebe kritische Temperaturen für einen ausreichend langen Zeitraum, (Arrhenius-Formalismus) so dass ein irreversibler Schaden auftritt.

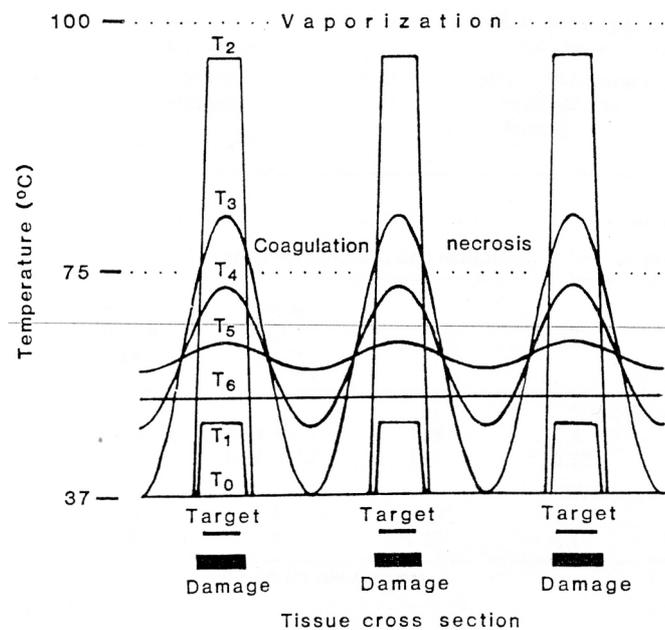


Abb. 1.3a: Schematische Darstellung der Temperaturprofile während der selektiven Photothermolyse (aus: Anderson, R.R., Parrish, J.A., 1983).

T₀: Temperatur vor Laserexposition (Körpertemperatur)

T₁: Temperatur während der Laserbestrahlung (selektive rapide Zielerwärmung)

T₂: Temperatur am Ende der Laserexposition (Ziele irreversibel geschädigt)

T₃: Temperatur eine thermische Relaxationszeit nach dem Laserpuls (Ziele kühlen ab, das umgebende Gewebe erwärmt sich)

T₄: Temperatur zwei thermische Relaxationszeiten nach dem Laserpuls

T₅: Temperatur fünf thermische Relaxationszeiten nach dem Laserpuls

T₆: die Temperatur im Gewebe kehrt langsam zum Ausgangszustand zurück

1.3.1 Vor- und Nachteile der SPT

Die SPT wird bereits vielfältig in der Klinik eingesetzt. Wie bereits angesprochen, sind typische Einsatzbereiche die Reduktion von Körperhaaren und die Behandlung von Besenreiservarizen oder anderen Gefäßmissbildungen wie z.B. ein Nävus flammeus.

Vorteile der SPT sind dabei die relativ einfache perkutane Handhabung ohne eine vorherige Applikation eines Farbstoffes sowie der selektive und sauerstoffunabhängige thermische Schaden, welcher während der Behandlung induziert wird.

Ein Nachteil der SPT ist die Notwendigkeit des Vorhandenseins einer stärker pigmentierten Zielstruktur, welche durch die SPT selektiv geschädigt werden soll. Zielstrukturen, die nicht stärker als die Umgebung pigmentiert sind, können somit nicht mit dem Verfahren der SPT behandelt werden. Das Behandlungsspektrum schließt somit onkologische Patienten mit nicht pigmentierten Tumoren aus, wobei die meisten malignen und benignen Tumoren nicht pigmentiert sind. Andererseits sollten natürlich auch

pigmentierte maligne Tumoren primär chirurgisch behandelt werden, da die Möglichkeit der Tumorstreuung bei Anwendung der SPT durchaus besteht und die Radikalität eines chirurgischen Eingriffes durch die SPT nicht erreicht werden kann. Insbesondere beim malignen Melanom, welches ansonsten die Voraussetzungen zur Anwendung der SPT - abgesehen vom amelanotischen Melanom - perfekt erfüllt, sollte diese Methode auf Grund der hohen Malignität dieses Tumors natürlich primär nicht zur Anwendung kommen und sollte nur bei palliativen Eingriffen bei diesem Tumor (multiple Hautmetastaten) in Betracht gezogen werden.

Typische Behandlungsparameter der SPT z.B. bei der Entfernung von Besenreiservarizen mit einem Nd:YAG Laser mit einer Wellenlänge von 1064 nm liegen bei einer Lichtdosis von 100 bis 200 Jcm⁻² und einer Pulsdauer von 10 bis 100 ms.

1.4 Nanoshell-assistierte Photothermotherapie (NAPT)

Um solide Tumoren auch durch andere, gesunde Gewebeschichten hindurch selektiv thermisch schädigen zu können, muss das Laserlicht zum einen die gesunden Gewebeschichten zu einem hohen Prozentsatz durchdringen können. Zum anderen haben einfache thermische Therapien wie z.B. die SPT Probleme, erkranktes Gewebe selektiv zu schädigen, wenn das zu behandelnde Gewebe nicht stärker als das umgebende gesunde Gewebe absorbiert, d.h. pigmentiert ist (s.o.). Dabei kommt es häufig zu einer unspezifischen Erwärmung und damit zu einem unspezifischen Schaden auch des gesunden Gewebes in der Umgebung des Zielgewebes. Bereits mehrere Forschungsgruppen untersuchten die Behandlung von soliden Tumoren über eine induzierte Hyperthermie unter Einsatz von tief penetrierendem Laserlicht im Bereich des nahen Infrarots mit oder auch ohne den Einsatz von absorptionsverstärkenden Substanzen wie z.B. Indocyanin-Grün (welches auch photochemische Reaktionen auslöst), allerdings bisher mit nur mäßigem Erfolg (Chen et al., 1996; Prudhomme et al., 1996; Chen et al., 1997).

Die Nanoshell-assistierte Photothermotherapie (NAPT) ist eine neuer Ansatz für eine laserinduzierte thermische Therapie unter Einsatz von systemisch applizierten, im nahen Infrarot absorbierenden Nanopartikeln, genannt „Nanoshells“. Dabei befindet sich die Entwicklung dieser Methode noch im experimentellen Stadium.

Nanoshells sind eine neue Klasse von Nanopartikeln mit veränderbaren optischen Eigenschaften. Sie bestehen aus einem dielektrischen Kern (Silikat) welcher mit einer ultradünnen metallischen Schicht (Gold) überzogen ist (Oldenburg et al., 1999). Durch Veränderung der relativen Kern- und Schalendicke können Nanoshells hergestellt werden,

die bei der benötigten Wellenlänge Licht hauptsächlich streuen oder absorbieren. Das Spektrum der „einstellbaren“ Wellenlängen erstreckt sich dabei über den sichtbaren Bereich sowie über die Wellenlängen des nahen Infrarots. Diese Veränderbarkeit der optischen Eigenschaften ermöglicht die Herstellung von Nanoshells mit einer höchsten optischen Absorption im Bereich des nahen Infrarots, einem Bereich, in dem die optische Penetration in das Gewebe optimal ist (Weissleder 2001). Des Weiteren konvertiert die metallische Schale der Nanoshells das absorbierte Licht mit einer hohen Effektivität und Stabilität in Wärme. Durch ihren besonderen Aufbau sind die Nanoshells in hohem Masse unempfindlich gegen das sogenannte „Ausbleichen“ durch die Lichtbestrahlung – ein Effekt, der oft bei herkömmlichen Farbstoffen beobachtet wurde.

Zur Anwendung der Nanoshells in einer laserinduzierten Photothermotherapie *in vivo* gibt es bisher zwei unterschiedliche Ansätze welche in Kapitel 4.6 ausführlich besprochen und diskutiert werden. Diese ersten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die NAPT einen sauerstoffunabhängigen, photothermischen Schaden in Tumoren bei Bestrahlung induzieren kann. Dabei wurden, je nach Ansatz der Arbeitsgruppen, die Nanoshelllösungen entweder direkt in das Tumorgewebe injiziert oder systemisch in eine Schwanzvene appliziert. Bei der ersten Arbeitsgruppe erfolgte die Bestrahlung 5 bis 30 Minuten nach Injektion mit einer Bestrahlungsstärke von 4 Wcm^{-2} und einer Bestrahlungszeit von unter 6 Minuten. Die zweite Arbeitsgruppe bestrahlte 6 Stunden nach Applikation mit einer Bestrahlungsstärke von ebenfalls 4 Wcm^{-2} und einer Bestrahlungszeit von 3 Minuten.

1.4.1 Vor- und Nachteile der NAPT

Im Vergleich zu den bereits besprochenen Anwendungsmöglichkeiten des Lasers in der Medizin scheint die NAPT einige interessante Eigenschaften aufzuweisen. Vorteilhaft scheint zu sein, dass der induzierte Schaden sauerstoffunabhängig (wie bei der LITT und der SPT) ist und gleichzeitig scheint die NAPT – wenn sich die bisherigen Ergebnisse bestätigen – nicht auf endogene Absorber (wie die SPT) angewiesen zu sein. Es bleiben aber zum jetzigen Zeitpunkt noch viele Fragen zur NAPT offen: Wie selektiv ist der induzierte Schaden? Welche Auswirkungen haben Nanoshells auf den Organismus? Auf diese und viele andere Fragen wird in Kapitel 4.6 noch einmal eingegangen.

1.5 Farbstoffgestützte Photothermotherapie (PTT)

Ziel dieser Arbeit ist es, ein neues Konzept zur lokalisierten thermischen Tumorzerstörung bei weitgehender Schonung des umgebenden, gesunden Gewebes zu entwickeln. Im Hinblick auf einen klinischen Einsatz dieser Methode soll hierfür ein einfach zu bedienender, kostengünstiger Diodenlaser verwendet werden.

Die Begrenzung der laserinduzierten Gewebeeffekte auf ein bestimmtes Gewebe kann nur über eine stärkere Absorption des Lichtes durch die Zielstruktur im Vergleich zum umgebenden Gewebe erzielt werden. Bei der Applikation von Licht ausreichender Bestrahlungsstärke in ausreichend kurzer Zeit bleibt die erzeugte Temperaturerhöhung und damit der induzierte Schaden auf das Zielgewebe begrenzt (siehe auch Kapitel 1.3 zur SPT). Zur Zeit ist der Anwendungsbereich der selektiven Photothermotherapie auf Zielstrukturen mit endogenen Absorbern, wie z.B. Hämoglobin oder Melanin, begrenzt.

In der vorliegenden Arbeit wird ein exogener, sich präferentiell in dem von uns benutzten subkutanen Modelltumor anreicherender Absorber in Kombination mit einem cw Diodenlaser für die selektive Schädigung dieser natürlicherweise nicht pigmentierten Zielstruktur eingesetzt. Als Absorber wird das Naphthalocyanin-Derivat Palladium (II) 5, 9, 14, 18, 23, 27, 32, 36 - Octabutoxynaphthalocyanin ($\text{PdNc}(\text{OBU})_8$) verwendet, das sich durch ein starkes Absorptionsmaximum im nahen Infrarot bei 828 nm mit einem hohen Extinktionskoeffizienten von $2,8 \times 10^5$ (Rihter et al., 1993) auszeichnet. Weiterhin ist der Absorber sehr photostabil d.h. er wird durch die anregenden Photonen nicht zerstört. Nach Anregung mit Licht wird die absorbierte Energie durch den Absorber hauptsächlich strahlungslos in Form von Vibration (Wärme) wieder abgegeben. Dies gewährleistet eine Unabhängigkeit von der Anwesenheit von Sauerstoff im Tumorgewebe, was einen limitierenden Faktor der PDT darstellt (s.o.). Die chemische Struktur des Sensibilisators zeigt Abbildung 1.5a.

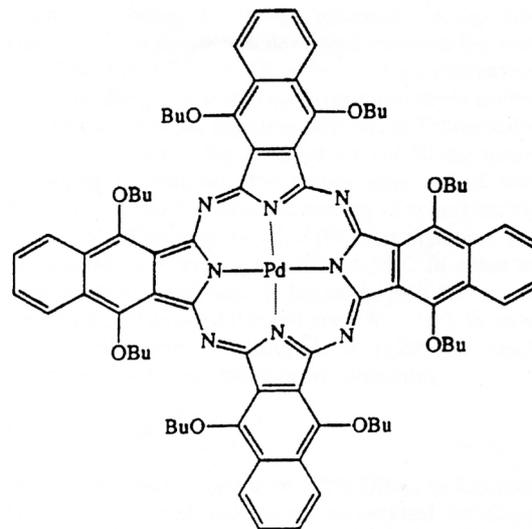


Abb. 1.5a: Chemische Strukturformel des verwendeten Photosensibilisators Palladium(II)Octabutoxynaphthalocyanin ($\text{PdNc}(\text{OBu})_8$) (aus: Bucking et al., 2000).

Die Lage des Absorptionsmaximums der Substanz im nahen Infrarot gewährleistet eine maximale Eindringtiefe der verwendeten Lichtwellenlänge durch die intakte Haut in das Gewebe (siehe auch Kapitel 1.2 sowie Abb. 1.5b).

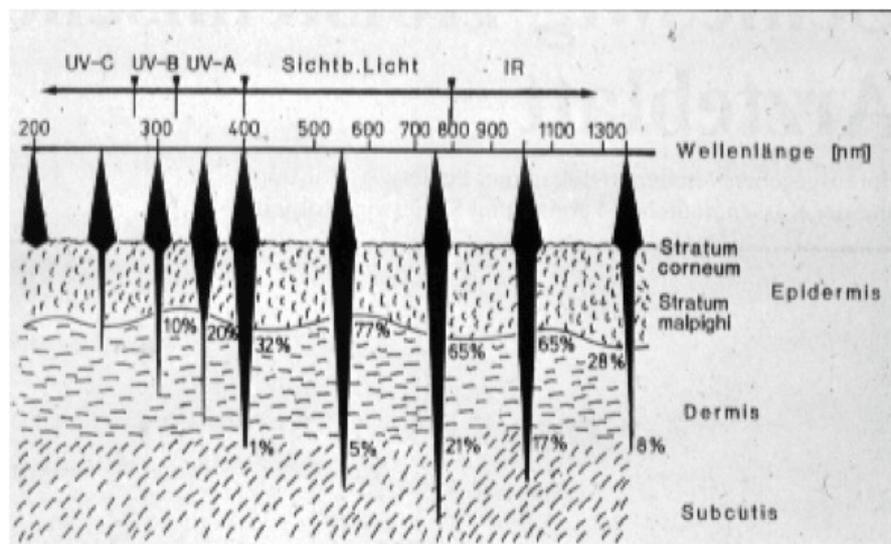


Abb. 1.5b: Eindringtiefen unterschiedlicher Lichtwellenlängen in die intakte Haut. Eine maximale Eindringtiefe besteht um 800nm.

Das pharmakokinetische Verhalten von $\text{PdNc}(\text{OBu})_8$ wurde von Bucking et al. (2000) ausgiebig untersucht, wobei in der Studie Balb/c Mäuse mit EMT6 Mammacarcinomen als Tiermodell verwendet wurden.

Die für die PTT wichtigsten Ergebnisse der Studie sind in der Abbildung 1.5b dargestellt. Demnach findet sich die beste Tumorselektivität für das Anreicherungsverhältnis zwischen Tumor/Muskel zwischen 48 und 175 Stunden nach i.p. Injektion, in denen eine durchschnittliche Tumorselektivität von 20 ± 9 erreicht wird. Die beste Tumor/Haut Selektivität mit 18 tritt ≤ 24 Stunden nach Injektion auf.

In den hier vorgestellten Untersuchungen wurde ein Zeitintervall von 96 Stunden nach i.p. Injektion zur Durchführung der Bestrahlung gewählt. In diesem Zeitabschnitt ist zum einen die Konzentration des Sensibilisators im Muskelgewebe minimal. Dies ist besonders wichtig, da aufgrund des gewählten Tiermodells das transplantierte Tumorgewebe direkt auf Muskelgewebe liegt und somit das Muskelgewebe bestmöglich vor eventuellen Schäden bei der Bestrahlung geschützt werden muss. Durch eine geringe Konzentration des Sensibilisators im Muskel 96 Stunden nach i.p. Injektion wird dies erreicht.

Des Weiteren erreicht die Konzentration des PdNc(OBu)₈ 96 h nach Injektion im Tumorgewebe einen Spitzenwert, welcher sich auch im weiteren Verlauf nicht weiter steigert. Dabei ist allerdings zu beachten, dass im Zeitraum nach 48 Stunden die Tumor/Haut Selektivität nur noch gering ist (da auch die Haut weiter PdNc(OBu)₈ anreichert), so dass die Haut ab diesem Zeitpunkt bei einer Bestrahlung zusätzlich gekühlt werden muss, wenn thermische Schäden an der Haut vermieden werden sollen.

Ein weiterer Grund für eine Bestrahlung 96 Stunden nach i.p. Injektion ist die Abnahme der Konzentration des Sensibilisators im Blutserum ab ca. 80 Stunden nach Injektion (Bucking et al., 2000). Hohe Sensibilisatorkonzentrationen im Serum könnten ebenfalls unspezifische Bestrahlungsschäden bedingen.

Ein späterer Betrachtungszeitpunkt konnte nicht gewählt werden, da ab ca. 100 Stunden nach i.p. Injektion die Konzentration des Sensibilisators in der Haut zunimmt. Da die intakte Haut in unserem Therapiemodell durchstrahlt wird, verbietet sich ein späterer Bestrahlungszeitpunkt mit weiterer Abnahme der Tumor/Haut Selektivität.

In Anbetracht der relativ niedrigen aber akzeptablen Tumor/Haut Selektivität 96 h nach i.p. Injektion des PdNc(OBu)₈ wurde die Hautoberfläche während der Bestrahlung mit 4 °C kaltem Eiswasser gekühlt (siehe auch 2.7).

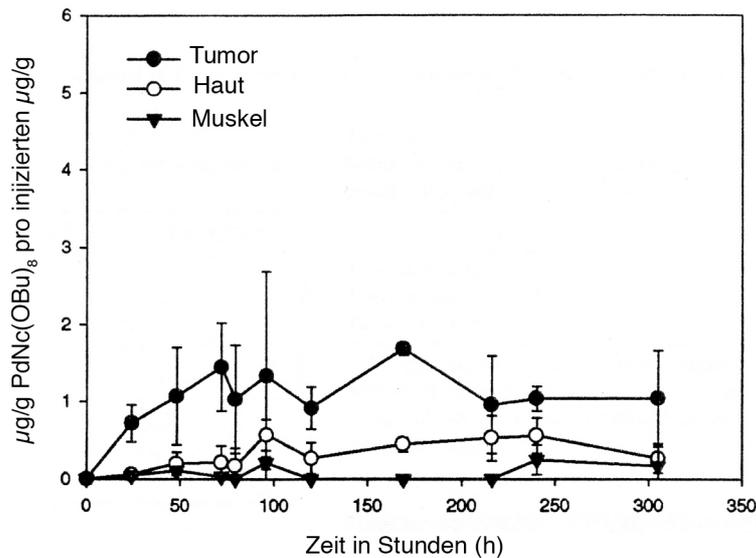


Abb. 1.5c: Gewebepharmakokinetik des PdNc(OBu)₈ im Tumor, in der Haut und im Muskel in EMT6 tumortragenden Balb/c Mäusen (aus: Bucking et al., 2000)

In unseren Versuchen verwenden wir dabei das gleiche Tiermodell wie in der vorausgegangenen Pharmakokinetikstudie (Bucking et al., 2000) mit immunkompetenten Balb/c - Mäusen und einem subkutan transplantierten EMT6-Adenokarzinom.

Von Diddens und Mitarbeitern (Diddens et al., 2000; 2001a; 2001b; Diddens 2001; Diddens et al., 2002a; 2002b; 2003; Fischer et al., 2000) konnte mit dem gleichen Tiermodell bereits gezeigt werden, dass sich PdNc(OBu)₈-markierte Tumore *in vivo* unter großflächiger Laserbestrahlung im Vergleich zum umgebenden Gewebe selektiv erwärmen. Histologische Präparate bestrahlter Gewebeareale wiesen nach Bestrahlung thermisch induzierte Nekrosen des Tumors ohne Schädigung der den Tumor bedeckenden Haut auf. Die eingesetzte Bestrahlungsstärke war bislang allerdings durch die maximale Ausgangsleistung von 5 W der seinerzeit zur Verfügung stehenden Laserdiode eingeschränkt. Daher konnten in den bisherigen Experimenten bei einer Bestrahlungsstärke von 5 Wcm⁻² für die Erzielung irreversibler thermischer Schäden nur Bestrahlungszeiten (100 s), die die thermische Relaxationszeit der experimentellen Tumore (10 bis 20 s) überschritten, eingesetzt werden. Dies limitierte erwartungsgemäß die räumliche Präzision der thermischen Schädigung. Histologisch wurde daher neben einer Schädigung des Tumors eine 0,5 bis 1 mm breite thermisch induzierte Schädigungszone unterhalb des Tumors im angrenzenden Normalgewebe (Muskel) beobachtet. Im Vergleich hierzu war bei Kontrolltieren ohne PdNc(OBu)₈ unter

Verwendung identischer Bestrahlungsparameter nur eine leichte unspezifische Erwärmung des gesamten Bestrahlungsareals zu verzeichnen und thermische Schäden an der Haut, dem Normalgewebe und dem Tumor wurden histologisch nicht beobachtet.

Zur Verbesserung der lokalen Präzision des thermischen Effektes werden in den von uns durchgeführten Versuchen höhere Bestrahlungsstärken bei kürzeren Expositionszeiten eingesetzt. Die Wahl der Bestrahlungsparameter basierte auf Kalkulationen der Temperaturverteilung im Tumor- und umgebenden Normalgewebe während der Bestrahlung und hieraus resultierenden Abschätzungen der Gewebeschädigung. Benutzt wurde eine analytische Lösung der Wärmeleitungsgleichung, in die u.a. Daten aus der Pharmakokinetikstudie, publizierte Werte für die optischen Eigenschaften von Gewebe im nahen Infrarot und publizierte Werte für die Kinetik der thermischen Schädigung nach dem Arrheniusformalismus eingingen. Ebenso wurden die Erfahrungen der oben genannten Pilotstudie für die Wahl der Bestrahlungsparameter herangezogen.

Somit ergaben sich drei Behandlungsgruppen mit unterschiedlichen Behandlungsparametern.

Die erste Gruppe sollte bei einer Bestrahlungsstärke von 30 Wcm^{-2} für 10 Sekunden behandelt werden, die zweite Gruppe mit 30 Wcm^{-2} für 15 Sekunden und die dritte Behandlungsgruppe mit 30 Wcm^{-2} für 20 Sekunden.

Ausgehend von diesen Voraussetzungen – die hochselektive Anreicherung von $\text{PdNc}(\text{OBu})_8$ im Tumorgewebe, die Abgabe der aufgenommenen Energie fast ausschließlich als Wärme, die deutlich erhöhte Bestrahlungsstärke bei radikal reduzierter Bestrahlungszeit sowie nach Abschätzung der erreichbaren Temperatur im Tumor – sollte die Induktion eines hochselektiven, sauerstoffunabhängigen, thermischen Schadens im Tumorgewebe mit Hilfe der PTT möglich sein.

1.6 Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Effektivität des neuartigen Therapieansatzes einer farbstoffgestützten Photothermotherapie am Beispiel eines subkutanen Tumors im Mausmodell untersucht. Dabei sollte das den Tumor umgebende gesunde Gewebe (Haut, Muskel, Fettgewebe, Gefäße) möglichst keinen Schaden durch die Therapie davontragen. Es sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist die farbstoffgestützte Photothermotherapie in der Lage, einen Tumor bei transkutaner Bestrahlung komplett zu zerstören?
2. Wenn ja, gelingt dies unter Schonung des umgebenden gesunden Gewebes?
3. Bei welchen Behandlungsparametern (Bestrahlungsstärke, Oberflächenkühlung) ist die farbstoffgestützte Photothermotherapie besonders effektiv?
4. Kann die farbstoffgestützte Photothermotherapie eine Tumorfreiheit nach der Behandlung gewährleisten?
5. Ist es von Interesse, die farbstoffgestützte Photothermotherapie auf den Menschen zu übertragen? Ist dies überhaupt möglich?

2 Material und Methoden

Bei dem Tiermodell, das für unsere Untersuchungen gewählt wurde, handelt es sich um das gleiche Modell, an dem die Pharmakokinetikstudie mit dem Absorber PdNc(OBu)₈ bereits durchgeführt wurde (Bucking et al., 2000).

2.1 Karzinomtyp

Bei dem verwendeten Tumor handelt es sich um ein strahlungsinduziertes Mammakarzinom des Mausstammes Balb/c mit der Typenbezeichnung EMT6 (NCI Frederick Cancer Research and Development Center CDT Tumor Repository).

Histopathologisch kann das Karzinom als geringgradig differenziertes, pleomorphes Adenokarzinom eingeordnet werden.

Makroskopisch besitzt der Tumor ein weißlich - homogenes Aussehen, die Konsistenz ist fest bis derb.

2.2 Mausstamm

Bei dem verwendeten Mausstamm Balb/cAnNCrI handelt es sich um weibliche, homozygote, immunkompetente Albino-Inzuchtmäuse, die von der Firma Charles River, Deutschland, bezogen wurden. Die Nomenklatur Balb/cAnNCrI geht auf den Erstzüchter H.J. Bagg zurück, der diesen Mausstamm 1913 aus dem Bestand eines Tierhändlers in Ohio entwickelte. Der Stamm wurde in der Folge „Bagg Albino“ mit der Kurzform „Balb“ benannt. Die darauf folgenden Buchstaben geben die „Entwicklungsgeschichte“ des Mausstammes von 1913 bis zum heutigen Tag wieder (Inzucht des Mausstammes 1923 durch McDowell, Wechsel des Stammes 1932 zu Snell und 1935 zu Andervont, 1951 zum National Institute of Health und 1974 zu Charles River).

Zum Zeitpunkt der Lieferung betrug das Alter der Mäuse 6-8 Wochen bei einem Gewicht von 18-20 g. Das Nahrungs- und Trinkwasseraufnahme erfolgte *ad libitum*.

2.3 Anästhesie

Die Anästhesie wurde mit Esketamin (150 mg/kg Körpergewicht, Ketanest[®], Analgetikum und Anästhetikum, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe) und Xylazin (10 mg/kg

Körpergewicht, Rompun[®], Sedativum, Analgetikum, Anästhetikum und Muskelrelaxans, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) durchgeführt. Die Anästhetika wurden als Stoffgemisch intraperitoneal injiziert. Bis zur vollen Wirkungsentfaltung vergingen ca. 90 bis 120 Sekunden und die Wirkdauer betrug 30 bis 50 Minuten.

Da die Anästhesie in der Regel etwa 30 Minuten länger anhielt als die Transplantation dauerte, wurde zur Vermeidung einer Unterkühlung der Tiere eine Wärmelampe eingesetzt, unter der die Tiere bis zum Aufwachen platziert wurden. Um Hyperthermieschäden der frisch transplantierten Tumorstücke zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass die operierte Seite von der Wärmequelle abgewandt platziert wurde.

2.4 Tumortransplantation

2.4.1 Serielle Passagen

Die Weitergabe der Tumoren erfolgte seriell, d.h. ein Tier der jeweils aktuell tumortragenden Gruppe wurde als Donor für die Weitergabe des Tumormaterials auf die nächste Tiergruppe geopfert.

Die Anwendung von kürzeren seriellen Passagen für die Versuche, d.h. die Transplantation von Tumorgewebe von einem konservierten Ursprungstumor auf alle weiteren Tiere während des gesamten Versuches, war leider nicht möglich.

Das ursprünglich zur Verfügung stehende Tumormaterial entstammte einer Zellkultur und wies somit zum einen keine solide Konsistenz auf, zum anderen war dieses Gewebe an den „neuen“ Wirtsorganismus der Maus mit intaktem Immunsystem nicht hinreichend adaptiert. Zu Beginn der Transplantationen traten damit sehr unvorhersehbare, unsymmetrische Wachstumsmuster der Tumoren auf. Des Weiteren war das Wachstumsverhalten großen Schwankungen unterworfen, was eine vergleichende Behandlung einer Tiergruppe während einer Behandlungssitzung unter den gleichen Bedingungen unmöglich machte.

Die Transplantationen erfolgten deshalb in weiteren Passagen seriell (s.o.), so dass sich der Tumor an den neuen Wirtsorganismus adaptieren konnte. Nach kurzer Zeit stellte sich nun das Wachstumsverhalten und -muster relativ einheitlich dar (siehe auch 3.1).

2.4.2 Explantation

Die Tumortransplantation erfolgte seriell, das heißt ein tumortragendes Tier wurde euthanisiert (Euthanisierung durch CO₂), das entnommene Tumorgewebe in Stücke definierter Größe zerteilt und auf die folgenden Empfängertiere transplantiert.

Zunächst wurden die Haare im Operationsareal großzügig mit Pilca-med[®] Enthaarungscreme (Kalziumthioglycolat, Keratolytikum, Asid Bonz, Böblingen) entfernt, welche ca. 10 Minuten einwirken musste um dann mit körperwarmem Wasser ausgespült zu werden. Die Hautirritationen ließen sich durch dieses Verfahren im Gegensatz zum Rasieren des Felles minimieren und das endgültige Enthaarungsergebnis - besonders bei prominenten Tumoren mit unebener Hautoberfläche - war kompletter.

Nach sorgfältiger Trocknung der Maus wurde die Haut auf dem und um den Tumor herum mit Ethanol desinfiziert. Unter sterilen Bedingungen wurde nun der im subcutanen Fettgewebe liegende Tumor mitsamt seiner Pseudokapsel aus dem Gewebe herauspräpariert. Das eigentliche Karzinomgewebe wurde hiernach von der Pseudokapsel befreit und in 3-5 mm³ (dies entspricht ungefähr einer Kantenlänge von 2x2x1 mm) große Stücke geschnitten, die bis zur anschließenden Transplantation in physiologischer Kochsalzlösung zwischengelagert wurden.

Dabei wurde die Ischämiezeit des Transplantattumors, also die Zeit von der Tötung des Donors bis zur Transplantation der angefertigten Tumorstücke auf die Empfängertiere, möglichst kurz gehalten und betrug im Mittel 15 bis 25 Minuten.

2.4.3 Implantation

Nachdem die anästhetische Wirkung voll eingetreten war, wurde mit einer Schere ein ca. 0,5 cm langer Hautschnitt dorsocaudal neben dem Schwanz senkrecht zur Längsachse des Tieres auf der zuvor desinfizierten Haut gesetzt. Anschließend wurde mit der stumpfen Präparierschere ein streng im subcutanen Bindegewebe gelegener Kanal nach cranio-lateral bis über die muskelstarke Region des Oberschenkels präpariert. Am Ende dieses Kanals wurde sodann eines der vorbereiteten Tumorstücke mit einer Pinzette platziert.

Um ein Verrutschen des Tumorstückes direkt nach der Operation zu verhindern, wurde im Anschluss ein Steri-Strip[®] (sterile, elastische Wundverschlusspflaster, 3M Deutschland GmbH, Neuss) quer zum Verlauf des subcutanen Kanals geklebt.

Der Wundverschluss erfolgte ebenfalls mit einem Steri-Strip[®].

Die postoperative Phase gestaltete sich durchweg problemlos - es kam zu keinen Wundinfektionen und die Narbenbildung war gering - obwohl sich die Tiere die angebrachten Pflaster bald nach der Operation gegenseitig oder auch selber entfernten.

2.5 Tumorgroße am Behandlungstag

Das Wachstum der Tumoren wurde vom Tag der Implantation an täglich überwacht. Die Größe der Tumoren wurde mit einer elektronischen Schiebelehre bestimmt (Länge, Breite und Höhe). Aus diesen Werten wurde sodann das Tumolvolumen errechnet (s.u.). Nach ca. 2 Wochen Wachstum hatten die Tumoren Volumen zwischen 50 bis 250 mm³ erreicht. In diesem Größenbereich erfolgte sodann die Behandlung der Tiere.

2.6 Photosensibilisator

Der von uns verwendete Photosensibilisator Palladium (II) 5, 9, 14, 18, 23, 27, 32, 36 - Octabutoxynaphthalocyanin (PdNc(OBu)₈) wurde freundlicherweise von Malcolm Kenney, Institut für Chemie, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA, zur Verfügung gestellt (Rihter et al., 1993).

Den Versuchstieren wurde 48 Stunden vor der Bestrahlung PdNc(OBu)₈ (0,5 mg PdNc(OBu)₈/kg Körpergewicht) intraperitoneal mit Hilfe einer Cremophor-EL haltigen Trägerlösung (siehe 2.6.1) injiziert. Die Konzentration der Injektionslösung betrug dabei 0,025 mg/ml. Schwankungen der Konzentration, die durch laufende Überprüfung mit einem Absorptionsspektrometer festgestellt wurden, konnten durch Veränderung des injizierten Flüssigkeitsvolumens ausgeglichen werden. Ein 20 g schweres Tier erhielt beispielsweise 400 µl der Lösung (dies entspricht 10 µg PdNc(OBu)₈). Nach Injektion des Sensibilisators wurden die Tiere vor Lichtquellen, die eine unspezifische phototoxische Reaktion hervorrufen könnten (wie z.B. Sonnenlicht), isoliert.

2.6.1 Injektionslösung PdNc(OBu)₈

PdNc(OBu)₈ ist braun und solide, löslich in Toluol, Dichlormethan, Benzen und Tetrahydrofuran (THF).

Bei der Herstellung der Injektionslösung war zu beachten, dass PdNc(OBu)₈ eine nur begrenzte Löslichkeit in den meisten potentiellen Injektionslösungen aufweist, da es unter anderem ausgeprägt lipophil ist. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde, wie bereits in

der Pharmakokinetikstudie von Bucking et al (2000), Cremophor EL (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) in der Injektionslösung verwendet.

Die Herstellung der Lösung folgte den Angaben von Bucking et al., die im Folgenden kurz dargestellt wird.

5 ml Cremophor EL wurden auf 55°C erhitzt und 1,65 ml Propylene-Glycol tropfenweise hinzugefügt. Die erforderliche Menge PdNc(OBu)₈ für eine Konzentration von 2,5 mg/ml wurde in Tetrahydrofuran (THF) gelöst. Zu der insgesamt benötigten Menge des Cremophor EL / Propylen-Glycol Gemisches wurde nun ein Volumen der THF-Lösung hinzugefügt, welches ein Verdünnungsverhältnis der THF-Lösung von 1:50 ergab.

Die aus diesem Arbeitsschritt hervorgegangene Cremophor EL Lösung wurde gewogen und danach in einem offenen Behältnis auf 55°C unter langsamem Rühren erwärmt, wodurch das hinzugefügte THF langsam verdampfte. Der Prozess des Verdampfens wurde durch konstantes Wiegen der Lösung überwacht, um abschätzen zu können, wann der Verdampfungsprozess abgeschlossen war.

Nachdem das gesamte THF verdampft war wurde die zurückgebliebene Lösung 1:1 mit gefilterter, steriler, normaler Salinenlösung verdünnt.

Die jeweils aktuelle Konzentration des PdNc(OBu)₈ in der Injektionslösung war variabel (0,030±0,008 mg/ml) und wurde durch spektralphotometrische Bestimmung über den Extinktionskoeffizienten abschliessend festgestellt und die applizierte Menge dem Ergebnis angepasst.

2.7 Laser, Versuchsaufbau und -durchführung

Als kontinuierlich strahlender Laser wurde ein industrieller Hochleistungsdiodenlaser der Firma LISA laser products OHG, Katlenburg-Lindau, Deutschland, mit einer Nennleistung von 60W und einer Wellenlänge von 830,3 (±2,7) nm eingesetzt. Das Licht des Lasers wurde in eine 600 µm Glasfaser eingekoppelt und über diese in den Versuchsaufbau eingebracht. Mit Hilfe einer plankonvexen Linse wurde das Faserende auf die Ebene des Tumors der Maus abgebildet, was eine homogene und scharf begrenzte Ausleuchtung des Behandlungsareals ermöglichte (siehe Abb. 2.7b). Als Kühlmittel verwendeten wir Leitungswasser, welches mit Hilfe von Eiswürfeln auf eine Ausflusstemperatur von ca. 4°C gekühlt wurde.

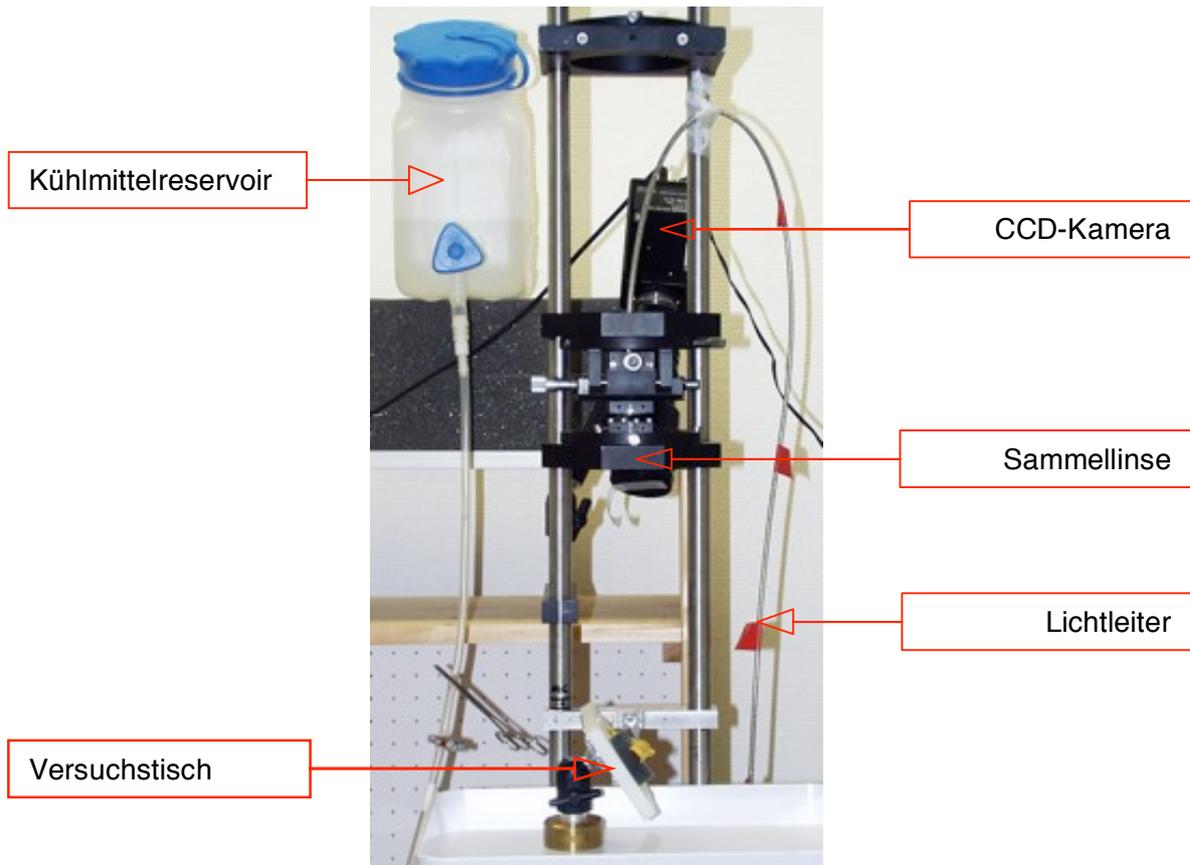


Abb. 2.7a: Versuchsaufbau. Mit Hilfe der Sammellinse wurde das über den Lichtleiter eingebrachte Laserlicht homogen auf das Behandlungsareal abgebildet. Der Versuchstisch ist in allen Ebenen frei einstellbar.

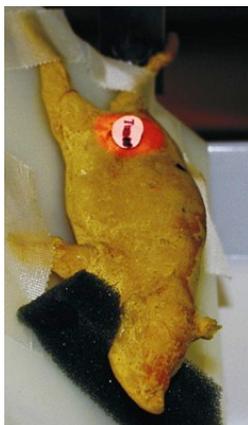


Abb. 2.7b: Mausmodell in Bestrahlungsposition bei aktiviertem Pilotlaser (rot). Das Bestrahlungsareal ist immer größer als der zu bestrahlende Tumor. Weiterhin regelrechte Fixierung der Extremitäten sowie im vorderen Bereich sichtbarer Aspirationsschutz unter dem Kopf des Mausmodells.

Zur Bestimmung der optimalen Flussgeschwindigkeit des Kühlmittels erfolgten eine Reihe von empirischen Vorversuchen an Rinderlebern und Hühnerbrüsten. Diese ergaben einen maximalen Kühleffekt mit Schonung der oberen Gewebslagen bei möglichst geringer Verwirbelung der Flüssigkeitsoberfläche im Bestrahlungsfeld (eine größere Verwirbelung würde mehr Streustrahlung und damit einen geringen Effekt der Behandlung bedingen) und bestmöglichem Behandlungsergebnis bei einer Flussgeschwindigkeit von ca. 500 ml/min.

Zur Durchführung der Bestrahlung wurden die Mäuse wiederum mit einer i.p. Injektion analog zur Beschreibung in Kapitel 2.3 anästhesiert. Nach dem vollständigen Eintreten der anästhetischen Wirkung wurden die Mäuse auf dem Versuchstisch mit Hilfe von Leukosilk[®] Klebeband (BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) an allen Extremitäten fixiert und die Augen mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe[®] (Bayer Vital GmbH, Köln, Deutschland) gegen Austrocknung geschützt.

Die Einstellung des Tumors in das Bestrahlungsfeld des Lasers erfolgte mit Hilfe eines rotfarbigen Helium-Neon (HeNe) Pilotlasers, der die Größe des tatsächlichen Bestrahlungsfeldes des Diodenlasers sichtbar machte. Das Bestrahlungsfeld hatte dabei in der Bestrahlungsebene einen definierten Durchmesser von 15mm und war damit immer deutlich größer als die zu bestrahlenden Tumoren. Dies gewährleistete eine homogene Bestrahlungsstärke auch in den Randbereichen des Tumorgewebes.

Der verwendete Versuchstisch war in allen Ebenen verstellbar, so dass das Behandlungsareal mit dem Tumor optimal zum Bestrahlungsfeld und zum Strahlengang ausgerichtet werden konnte. Um möglichst weitestgehend Streustrahlung zu vermeiden, wurden der Tumor und die Hautoberfläche senkrecht zum Strahlengang eingestellt.

Zur Vermeidung einer Kühlwasseraspiration seitens der Maus wurde der Kopf der Maus auf ein Schaumkissen gelagert, welches eine ungestörte Atmung der Maus während des Versuches garantierte.

Während der Versuchsdurchführung erfolgte die Kühlmittelapplikation in der angegebenen Flussgeschwindigkeit mit einem biegsamen Plastikschlauch. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Schlauch nicht in den Strahlengang gerät, da dies zu einer Reduktion der Bestrahlungsstärke im Behandlungsareal geführt hätte. Des Weiteren wurde auf eine möglichst ebene und ruhige Flüssigkeitsoberfläche geachtet, um die Streustrahlung zu minimieren.

Die einzelnen Schritte des Versuches (Tumormorphologie vor der Bestrahlung, Einstellung des Tumors in das Bestrahlungsfeld und Tumormorphologie nach der Bestrahlung) wurden mit einer in den Versuchsaufbau integrierten CCD-Kamera

festgehalten. Beispielhafte Aufnahmen der einzelnen Schritte sind Kapitel 3 wiedergegeben.

2.8 Dosimetrie

Der Durchmesser des Bestrahlungsfeldes betrug konstant 15mm und war damit immer deutlich größer, als der zu bestrahlende Tumor. Dies gewährleistete eine vollständige Ausleuchtung auch der Randbereiche.

Die Tiere wurden drei Behandlungsgruppen und sieben Kontrollgruppen zugeteilt (siehe Kapitel 3 und Anhang). Behandlungsgruppe 1 wurde 96h nach Sensibilisierung mit 30 Wcm^{-2} für 10 Sekunden, Behandlungsgruppe 2 mit 30 Wcm^{-2} für 15 Sekunden und Behandlungsgruppe 3 mit 30 Wcm^{-2} für 20 Sekunden bestrahlt. Diese Bestrahlungswerte umfassen den von uns erwarteten, mathematisch bestimmten therapeutischen Bereich.

In den Kontrollgruppen wurden die Messvariablen dieser Versuche untersucht. Als Variablen untersuchten wir tumortragende und nicht- tumortragende, sensibilisierte und nicht- sensibilisierte sowie bestrahlte und nicht- bestrahlte Tiere. Die Variablen wurden in alle möglichen Kombinationen zueinander gebracht, so dass wir insgesamt sieben Kontrollgruppen untersuchten (für Einzelheiten siehe 3.2).

2.9 Tumorvolumen

Um das Tumorvolumen zu bestimmen, wurde mit einer Schiebelehre Höhe (h), Länge (l) und Breite (b) des Tumors in Millimetern gemessen.

Näherungsweise lässt sich das Volumen in mm^3 aus der Formel für Ellipsoide (mit der Annahme, dass $\pi = 3$ ist) errechnen:

$$V = (l \cdot b \cdot h) / 2$$

Volumenbestimmungen, die anhand dieser Formel erhoben werden, korrelieren am besten mit dem tatsächlichen Gewicht der Tumoren (Tomayko, 1989).

Das Tumorvolumen wurde nach der Transplantation jeden zweiten Tag bis zur Opferung der Maus bestimmt.

2.10 Histologie

Um die Wirksamkeit der Photothermotherapie zu beurteilen, wurden alle Mäuse nach der Opferung histologisch aufgearbeitet, wobei besonderes Augenmerk auf die Größe der induzierten Nekrosen sowie auf mögliche Umgebungsschäden gelegt wurde.

Behandelte Mäuse wurden 96 Stunden nach der Bestrahlung getötet, nicht behandelte Mäuse (Vergleichsmäuse) zu einem Zeitpunkt, an dem Alter der Maus, Gewicht und Tumorgöße (sofern vorhanden) mit den behandelten Tieren weitestgehend übereinstimmten.

Die für die histologische Auswertung wichtigen Teile der Maus wurden nach Opferung als Ganzes (d.h. mitsamt dem Knochengewebe) mindestens 24 Stunden lang in Formalinlösung (5%) fixiert. Danach wurde der Tumor bzw. das Körperteil halbiert und das Knochengewebe vorsichtig mit Hilfe kleinlumiger Kanülen herauspräpariert. Anschließend folgte die Einbettung des Gewebelöckchens in Paraffin.

Von diesen Präparaten wurden histologische, mit Hämatoxylin - Eosin gefärbte Schnitte von ca. 5 μm Dicke angefertigt.

2.11 Immunhistochemische Färbungen

2.11.1 Murines Ki-67 Protein

Um proliferierende, vitale Tumorzellen im histologischen Präparat auffinden zu können wurde von uns der monoklonale Ratte anti - Maus Antikörper, Klon TEC3, DAKOCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland (DAKO), als Proliferationsmarker eingesetzt, der gegen das murine Ki-67 Antigen gerichtet ist.

Das Ki-67 Antigen ist ein großes nukleäres Protein (345, 395 kDa) dessen Expression streng mit der Zellproliferation assoziiert ist (Scholzen und Gerdes, 2000). Der Umstand, dass das Ki-67 Protein in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G(1), S, G(2) und in der Mitose) nachzuweisen ist, in ruhenden Zellen (G(0)) aber fehlt, macht es zu einem exzellenten Marker um die sogenannte „Wachstumsfraktion“ einer Zellpopulation zu bestimmen und um generell proliferierende, vitale Zellen aufzufinden.

Die vorbereiteten, in Paraffin eingebetteten Schnitte wurden im Forschungslabor der Chirurgie der Universität Lübeck immunhistochemisch gefärbt.

Die Anfärbung mit den TEC-3 Antikörpern folgte den Empfehlungen des Herstellers, die im Folgenden kurz dargestellt werden.

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung der Schnittserien mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 70%). Danach folgte die sog. Hitze- induzierte „Epitop –

Wiederherstellung“ durch Kochen der Schnitte im Citratpuffer (pH=6) im Mikrowellenofen bei höchster Leistung für 15 Minuten. Danach Abkühlen der Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur, hiernach Blocken der endogenen Peroxidase mit 0,5% Wasserstoffperoxidlösung für 20 Minuten. Dreimaliges Spülen der Schnitte mit TBS (tris buffered saline; 50mM, pH 7,6) für jeweils 5 Minuten. Danach Inkubation mit dem primären Antikörper TEC3 (1:25 v/v) über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Morgen dreimaliges Spülen mit TBS für jeweils 5 Minuten. Nun folgte die sog. Biotin/Streptavidin Prozedur: Inkubation der Schnitte mit biotinylierten Kaninchen anti-Ratte Immunglobulinen (DAKO, E0468), Verdünnung 1:200 für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach dreimalige Spülung mit TBS für jeweils 5 Minuten. Dann Inkubation mit Streptavidin-HRP (Horseradish-Peroxidase) (DAKO, P0397), Verdünnung 1:100 für 30 Minuten. Dreimaliges Spülen in TBS für jeweils 5 Minuten. Als Farbstoffsubstrat wurde 3-Amino-9-Cabazol benutzt. Abschließend Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

2.11.2 Murines Membranprotein CD45

Zur Visualisierung einer immunologischen Reaktion nach der Behandlung wurde von uns ein monoklonaler Ratte - anti Maus Antikörper eingesetzt (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland (BD Biosciences); Klon 30-F11; 550539), welcher gegen das Zellmembranprotein CD45 (cluster of differentiation 45) gerichtet ist.

CD 45 ist ein Transmembran-Glykoprotein, das auf den meisten kernhaltigen Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert wird. Im peripheren Blut weisen praktisch alle Leukozyten dieses Oberflächenprotein auf. Fünf verschiedene Isoformen des CD45, genannt ABC, AB, BC, B und 0, wurden bis dato auf humanen Leukozyten identifiziert.

Grundlegende Untersuchungen zum CD45 Protein erfolgten durch Warnke et al. (1983).

Der von uns verwendete CD45 Antikörper ist gegen ein Epitop gerichtet, welches sich auf allen Isoformen findet. Dadurch markiert dieser Antikörper in den Paraffinschnitten alle Leukozyten und ist damit funktionell ein Panleukozytenmarker.

Die Anfärbung mit den CD45 Antikörpern wird im Folgenden kurz dargestellt.

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte mit einer absteigenden Alkoholreihe. Danach folgte die sog. Hitze- induzierte „Epitop – Wiederherstellung“ durch Kochen der Schnitte im Citratpuffer im Mikrowellenofen bei höchster Leistung für 15 Minuten. Nach einer 20 minütigen Abkühlzeit erfolgte eine Spülung mit bidestilliertem, ultrafiltriertem Wasser, danach wurden die Tumoren auf den Objektträgern mit einem Fettstift umrandet. Hiernach Spülung mit einer Wasserstoffperoxidlösung (3%) für 5 Minuten und danach

dreifache Spülung mit TTBS (tris tween buffered saline). Hiernach erfolgte die Überschichtung des Objektträgers mit dem Antikörper CD45 (Verdünnung 1:50 v/v) für den Zeitraum einer Nacht.

Am nächsten Tag zunächst dreimalige Spülung mit TTBS, dann erfolgte die Biotin/Streptavidin Prozedur. Zunächst Zugabe von biotinylierten Kaninchen anti- Ratte Immunglobulinen (DAKO, E0468) (Verdünnung 1:25) welche 45 Minuten auf dem Objektträger belassen werden. Dann dreimaliges Spülen für jeweils 5 Minuten mit TTBS. Hiernach Zugabe von Streptavidin-HRP (Horseradish-Peroxidase) (DAKO P0397; Verdünnung 1:100) für 30 Minuten. Dreimaliges Spülen für jeweils 5 Minuten mit TTBS. Als Farbstoffsubstrat wurde 3-Amino-9-Cabazol benutzt. Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

2.12 Nekroseanteil des Tumorgesamtvolumens

Die Hämatoxylin - Eosin (HE) gefärbten Schnitte wurden mit einer Digitalkamera photographiert. Mit Hilfe des im Internet frei verfügbaren Programms ImageJ des National Institute of Health (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) wurden in allen HE gefärbten Schnitten die Nekrosezonen - nach Vergleich mit dem histologischen Originalpräparat unter dem Mikroskop - bestimmt.

Nekrotische Areale des Tumorgewebes sind mikroskopisch leicht von vitalen Bereichen abgrenzbar, da die Zellen eindeutige klassische, virchowianische, morphologische Kennzeichen nekrotischer (respektive apoptotischer) Vorgänge mit Karyorrhesis (Kernstaub), Karyopyknose (geschrumpfter, hyperchromatischer Zellkern), Karyolysis (Kernschatten) und eine Eosinophilie des Zytoplasmas aufweisen. Große Teile der von uns behandelten Tumoren wiesen Koagulationsnekrosen auf, die leicht durch kompletten Verlust der Zellgrenzen und der Zellkerne zu erkennen ist.

Zur Auswertung wurde das Bild des jeweiligen Tumors im JPG-Format in das Programm geladen. Zuerst wurde die Gesamtfläche durch Umfahren des Tumors mit der Maus bestimmt, danach wurden die Flächen aller Nekroseareale bestimmt und addiert. Dividiert man nun den Wert für die Gesamtfläche der Nekrosen durch den Wert der Gesamtfläche des Tumors, so ergibt sich der Nekroseanteil.

2.13 Statistische Auswertung

Mittelwerte und Standardabweichungen der mit dem Bildauswertungsprogramm „ImageJ“ berechneten Daten werden im Ergebnisteil dargestellt. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit dem t-Test nach Student, einem nicht-parametrischen Test für ungepaarte Stichproben (Computerprogramm SPSS, Version 13). p-Werte $<0,05$ wurden als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumsverhalten der Tumoren

Das Wachstumsverhalten der transplantierten Tumoren bestimmt anhand der ermittelten Tumorumfängen gibt mit einer repräsentativen Auswahl Abbildung 3.1.a wieder. Die Wachstumsverläufe werden vom Tage der Transplantation (Tag 0) bis zum Tage der Bestrahlung (Endpunkt der jeweiligen Kurve) gezeigt.

Die zu beobachtenden Schwankungen der Kurven resultieren aus Messungenauigkeiten bei der Erhebung der Messwerte. Bedingt durch das intermittierende Auftreten von subkutanen Ödemen in der Wachstumsphase der Tumoren war die Bestimmung der Tumordaten (Höhe, Länge, Breite) mit dem Messschieber oft schwierig und schwankend. Trotzdem lässt sich eine generelle Tendenz des Wachstumsverhaltens erkennen. Insgesamt wächst der Tumor relativ gleichmäßig, das Wachstumsverhalten erinnert an ein exponentielles Wachstumsmuster.

Die Endvolumina, bei denen eine Bestrahlung erfolgte, lagen zwischen 50 mm^3 und 250 mm^3 .

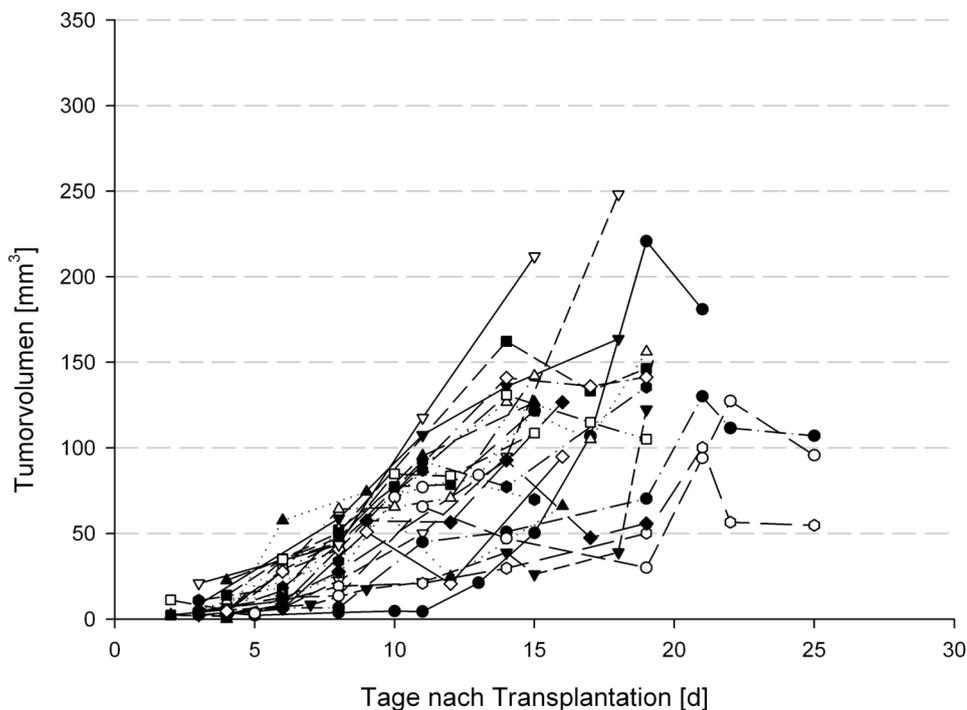


Abb. 3.1.a Wachstumsverläufe der transplantierten Tumoren anhand der ermittelten Tumorumfängen vom Tage der Transplantation (Tag 0) bis zum Tag der Bestrahlung (jeweiliges Kurvenende).

3.1.1 Makroskopische Aspekte der Behandlung

Die Abbildungen 3.1.1a bis 3.1.1c zeigen beispielhaft den makroskopischen Aspekt eines typischen Behandlungsablaufes anhand von drei Bildern, welche mit der in den Versuchsaufbau integrierten CCD-Kamera (siehe Kapitel 2) aufgenommen wurden.

Abbildung 3.1.1a zeigt den rechten Oberschenkel der Maus direkt vor der Behandlung. Das Fell der Maus wurde im Behandlungsareal mit einem Keratolytikum entfernt. Gut zu erkennen ist der subkutan gelegene, leicht oval geformte Tumor. Weiter caudal im Bereich der Schwanzwurzel ist die Implantationsnarbe zu erkennen, von der aus ein Tumorstückchen unter der Haut platziert wurde. Die narkotisierte Maus wurde mit Leukosilk® Pflasterstreifen auf dem Behandlungstisch fixiert.

Abbildung 3.1.1b zeigt das Bestrahlungsareal anhand des aktivierten Pilotlasers. Die Größe des hier rot markierten Areals gibt die Größe des später tatsächlich bestrahlten Bereiches exakt wider. Es ist zu erkennen, dass das Bestrahlungsareal deutlich größer als der Tumor ist. Dabei ist die Implantationsnarbe aber, wie zu erkennen ist, nicht im Bestrahlungsfeld. Dies ist wichtig, da Narben zu einer deutlichen lokalen Zunahme der Absorption des Laserlichtes in der Haut führen würden – insbesondere bei Auflagerung von Wundschorf und Ausbildung von subcutanen Hämatomen.

Abbildung 3.1.1c zeigt den Zustand nach Bestrahlung des Tieres. Auf der Hautoberfläche sind noch Rückstände der Kühlflüssigkeit zu erkennen. Die Lage des Tieres sowie die Einstellung des Tumors zum Bestrahlungsfeld haben sich nicht verändert.

Im direkten Vergleich des makroskopischen Tumoraspektes direkt nach Behandlung zum Aspekt direkt vor der Behandlung (siehe Abb. 3.1.1a) ist eine dezente subkutane Schwellung zu erkennen. Hierdurch sind die Tumorgrenzen nicht mehr klar abgrenzbar und der Tumor wirkt im direkten Vergleich prominenter. Ein Effekt, der nach jeder Behandlung auftrat.

Tiere der Kontroll- sowie der Behandlungsgruppe wurden mit genau diesem Vorgehen der Behandlung unterzogen und die einzelnen Schritte wurden wie hier gezeigt fotografisch festgehalten.

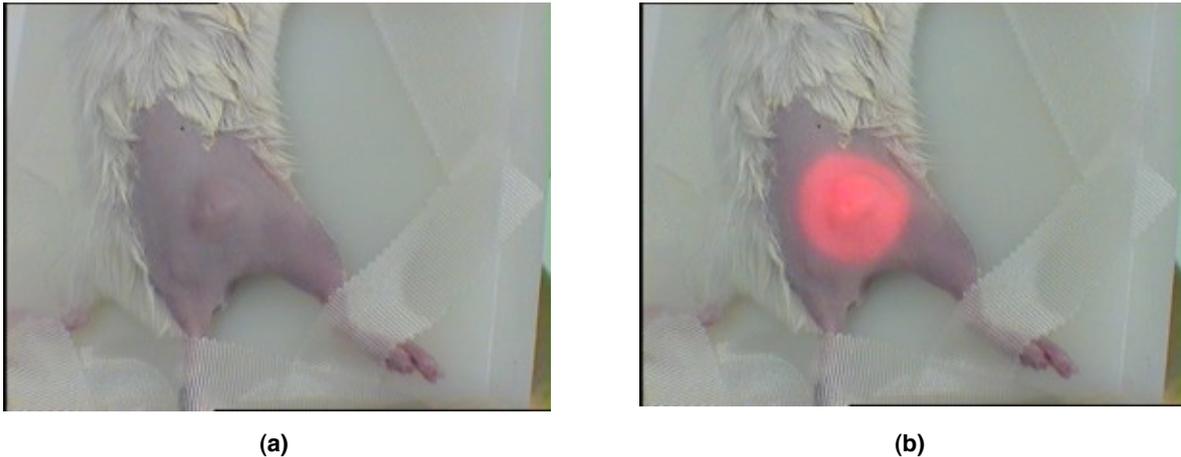


Abb. 3.1.1a: Maus mit Tumor direkt vor der Behandlung. Keratolytisch entferntes Fell, fixierte Extremitäten. Gute Abgrenzbarkeit des subkutanen Tumors.

Abb. 3.1.1b: Gleiche Maus wie in (a). Visualisierung des Bestrahlungsareales mit dem roten (632 nm) He-Ne- Pilotlaser. Das Bestrahlungsareal ist deutlich größer als der Tumor, die kaudale Implantationsnarbe befindet sich nicht im Strahlengang.



(c)

Abb. 3.1.1c: Gleiche Maus wie in (a) und (b). Makroskopischer Aspekt unmittelbar nach der Behandlung. Der Tumor wirkt prominenter, mit verstrichenen seitlichen Konturen. Kühlmittelrückstände auf der Hautoberfläche. Unveränderte Lage der Maus.

3.2 Kontrollgruppen

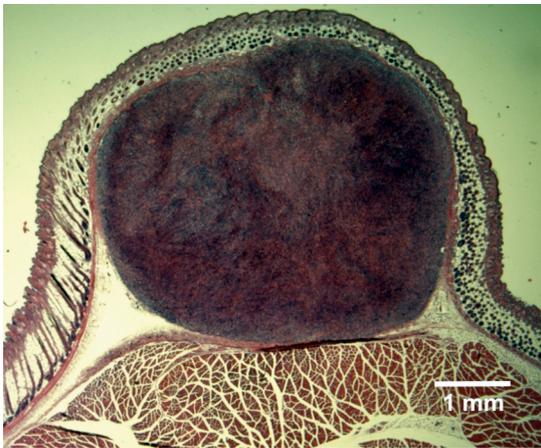
Abbildung 3.2a zeigt die H.-E.-gefärbte Histologie eines subkutan lokalisierten Tumors eines Kontrolltieres. Das Tumorgewebe ist insgesamt homogen eosinophil gefärbt. Der Tumor wächst bei der hier gezeigten Größe lokal verdrängend, nicht invasiv, umgeben von einer Tumorpseudokapsel. Das umgebende Gewebe umfasst intaktes Bindegewebe,

Muskelgewebe sowie Haut mit Hautanhangsgebilden, welches sich durch das Tumorstadium unbeeinflusst zeigt.

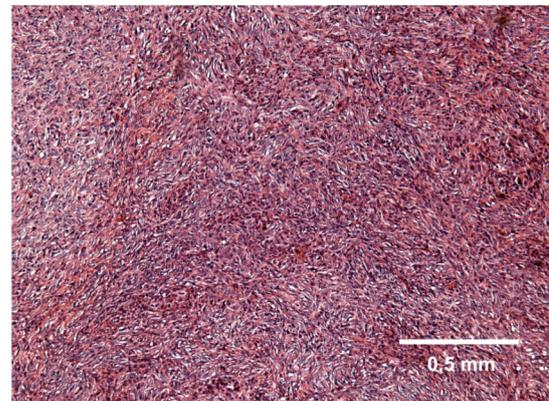
Im Zentrum des Tumors (siehe Abbildung 3.2b) erkennt man neben den vitalen Tumorzellen des entdifferenzierten, pleomorphen Adenokarzinoms EMT6 kleinere spindelförmige bis fadenförmige Stromazellen sowie Lymphozyten.

Die spindelförmigen Tumorzellen weisen einen großen, blasigen Zellkern mit einem großen Anteil von Euchromatin auf, der von einem schmalen, eosinophilen Zytoplasmasaum umgeben wird.

Im gesamten Tumor zeigen sich keine Spontannekrosen, welche als umschriebene aufgehellte Areale leicht zu identifizieren wären (s.u.).



(a)



(b)

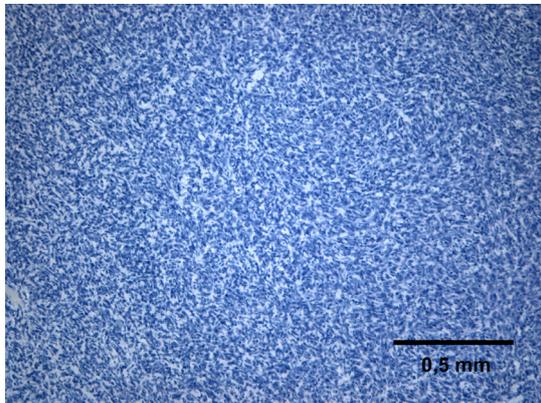
Abb. 3.2a: Subkutaner, vitaler, lokal verdrängend wachsender EMT6 Tumor eines unbehandelten, nicht PdNc(OBu)₈-markierten Kontrolltieres. H.-E.-Färbung.

Abb. 3.2b: Zentraler Bereich des vitalen EMT6 Tumors eines unbehandelten, nicht PdNc(OBu)₈-markierten Kontrolltieres. Vitale, entdifferenzierte, pleomorphe Adenokarzinomzellen. H.-E.- Färbung.

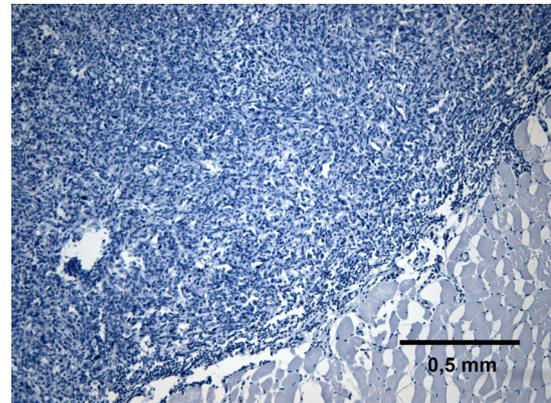
Zur Übersicht über die weiteren durchgeführten Kontrollen dient Tabelle 3.2a. Die histologischen Ergebnisse der jeweiligen Kontrollen werden in der Tabelle kurz erläutert. Die Fallzahlen der Kontrollgruppen finden sich ebenfalls in der Tabelle.

Verallgemeinernd ist anzumerken, dass in den einzelnen Untergruppen der Kontrollen - neben dem vitalen Tumor - keine weiteren pathologischen Befunde erhoben werden konnten. Insbesondere fanden sich nach Bestrahlung ohne eine vorherige Markierung der Tiere mit PdNc(OBu)₈ keine größeren Nekroseareale im Tumorgewebe im Vergleich zu gänzlich unbehandelten Kontrolltieren (siehe auch 3.4). Des Weiteren zeigte sich keine Infiltration des Tumor- oder gesunden Umgebungsgewebes mit Leukozyten. Diese

Beobachtung bestätigte sich auch in den immunhistochemischen Färbungen mit dem Panleukozytenmarker, welcher gegen das CD45 Antigen gerichtet ist (siehe Abb. 3.2c, 3.2d und 3.2e). CD45 positive Zellen (d.h. Leukozyten) finden sich in den Kontrolltumoren und in deren Umgebung nicht.



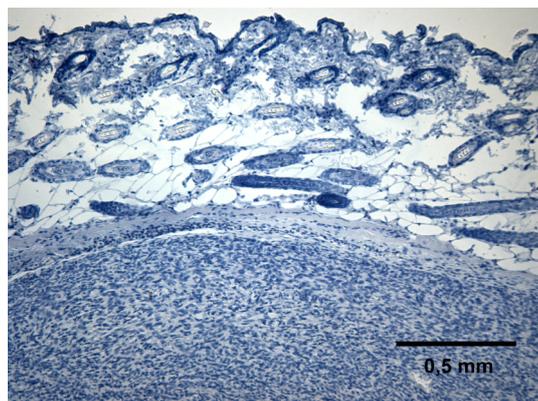
(c)



(d)

Abb. 3.2c: Immunhistochemische Färbung mit dem Panleukozytenmarker CD45. Gleicher Ausschnitt wie in (b) (Tumorzentrum) des unbehandelten, nicht PdNc(OBu)₈-markierten Kontrolltieres. Kein Nachweis CD45 positiver Zellen.

Abb. 3.2d: Immunhistochemische Färbung mit dem Panleukozytenmarker CD45. Der Ausschnitt zeigt den Übergang vom Tumorgewebe zum darunterliegenden Muskelgewebe des unbehandelten Kontrolltieres. Kein Nachweis CD45 positiver Zellen.



(e)

Abb. 3.2e: Immunhistochemische Färbung mit dem Panleukozytenmarker CD45. Der Ausschnitt zeigt den Übergang vom Tumorgewebe zu darüberliegender Haut des unbehandelten Kontrolltieres. Kein Nachweis CD45 positiver Zellen.

Variablen der Kontrollen			Histologische Beschreibung
Bestrahlung	PdNc(OBu) ₈ Markierung	Tumor vorhanden	
-	-	-	Es findet sich eine unbeeinflusste Kontrollhistologie des Oberschenkels der Mäuse ohne pathologische Veränderungen der Gewebe. (n=20)
+	-	-	Keine pathologischen Veränderungen, insbesondere keine Veränderungen der Haut und des Muskelgewebes. (n=3)
+	+	-	Keine pathologischen Veränderungen, insbesondere keine Veränderungen der Haut und des Muskelgewebes. Ablagerungen oder Kristallbildungen durch die Markierung sind nicht zu beobachten. (n=3)
-	+	-	Keine pathologischen Veränderungen, insbesondere keine Veränderungen der Haut und des Muskelgewebes. Ablagerungen oder Kristallbildungen durch die Markierung sind nicht zu beobachten. (n=3)
-	+	+	Keine Veränderung des Tumorgewebes durch die Markierung. Insbesondere keine größeren Spontannekrosen nachzuweisen (s.u.). (n=3)
-	-	+	Homogene, rundlich und verdrängend wachsende Tumoren mit keinen, oder nur kleinen Spontannekrosearealen (s.u.) ohne Veränderungen des gesunden Umgebungsgewebes. (n=9)
+	-	+	Keine Veränderungen im Tumorgewebe oder dem umgebenden Gewebe nachzuweisen. Insbesondere keine größeren Nekroseareale nach Bestrahlung ohne Markierung. (n=3)

Tab. 3.2a

Legende: + Variable in der Kontrollgruppe vorhanden.
- Variable in der Kontrollgruppe nicht vorhanden.

3.3 Photothermotherapie

Alle Tiere wurden 96 Stunden nach der durchgeführten Behandlung euthanisiert und nach Präparation der Gewebeteile histologisch aufgearbeitet. In diesen vier Tagen erholten sich die Tiere allgemein sehr gut und zeigten sich durch die Bestrahlung wenig beeinflusst. Bei allen behandelten Tieren setzte am 2. Tag post irradiationem das Haarwachstum im Behandlungsareal wieder ein. Lediglich bei einzelnen Mäusen kam es zu einer vorübergehenden Parese der behandelten Extremität, die sich aber immer bis zum Zeitpunkt der Euthanisierung zurückgebildet hatte.

Im Folgenden werden nun die mikroskopischen Ergebnisse der einzelnen Behandlungsgruppen vorgestellt.

3.3.1 Bestrahlungsstärke 30 Wcm^{-2} und Bestrahlungszeit 10 Sekunden

Die Ergebnisse unserer Versuche mit PdNc(OBu)₈-markierten Tumoren 96 Stunden nach Behandlung bei einer Bestrahlungsstärke von 30 Wcm^{-2} und einer Bestrahlungszeit von 10 Sekunden werden im Folgenden beispielhaft dargestellt. In dieser Gruppe behandelten wir n = 5 Tiere.

Bereits in der Übersichtsaufnahme (Abb. 3.3.1a) sind deutliche morphologische Veränderungen zu erkennen. Der Tumor wirkt insgesamt homogen aufgehellert mit einem dunkleren Randbereich. Die Hautstrukturen sind nicht verändert, insbesondere zeigen sich keine thermischen Veränderungen wie z.B. Blasen oder Ulcera der Haut bzw. der Hautanhangsgebilde. Das den Tumor umgebende gesunde Gewebe zeigt sich im Gegensatz zum Tumorgewebe unbeeinflusst.

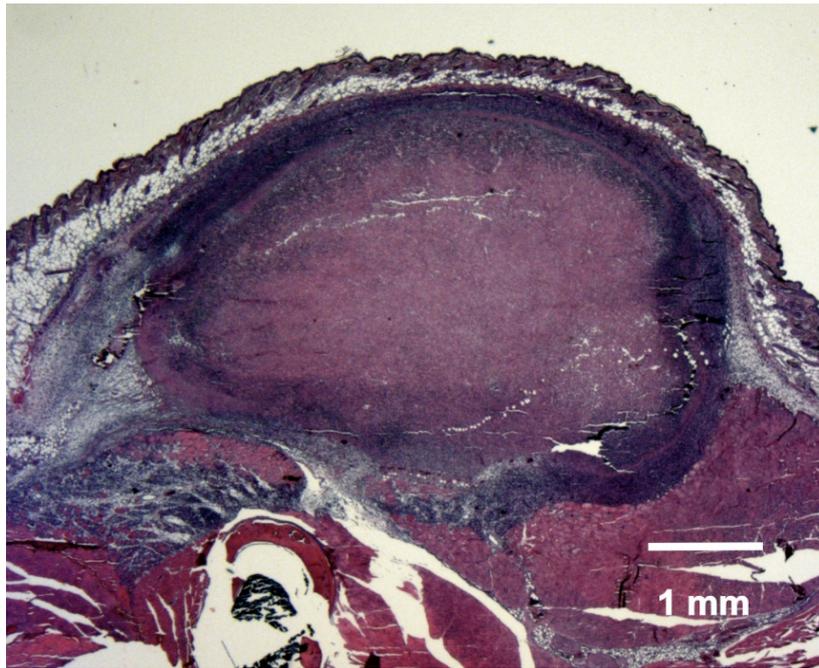


Abb. 3.3.1a: Subkutaner PdNc(OBu)₈-markierter Tumor 96h nach Bestrahlung mit 30 Wcm^{-2} für 10 Sekunden bei 830nm. Homogene zentrale Nekrose des Tumors mit vitalen Zellen (Leukozyten, Stromazellen, Tumorzellen) im Randbereich. Das umgebende Gewebe inklusive der Haut ohne morphologische Schäden. H.-E.-Färbung.

Abbildung 3.3.1b zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus dem Zentrum des Tumors. In diesem Bereich lassen sich keine Zellgrenzen und keine Zellkerne mehr unterscheiden. Lediglich einzelne sehr dichte, hyperdense Strukturen im Sinne von Kernstaub sind nachweisbar. Dies entspricht dem Vollbild einer Koagulationsnekrose mit den typischen virchowianischen Kriterien einer Nekrose mit Karyopyknosis, Karyorhexis und Karyolysis. Auch die immunhistochemische Färbung dieses Bereiches (siehe Abb. 3.3.1c) unterstützt die morphologische Diagnose. Es zeigen sich keine proliferierenden, vitalen Zellen.

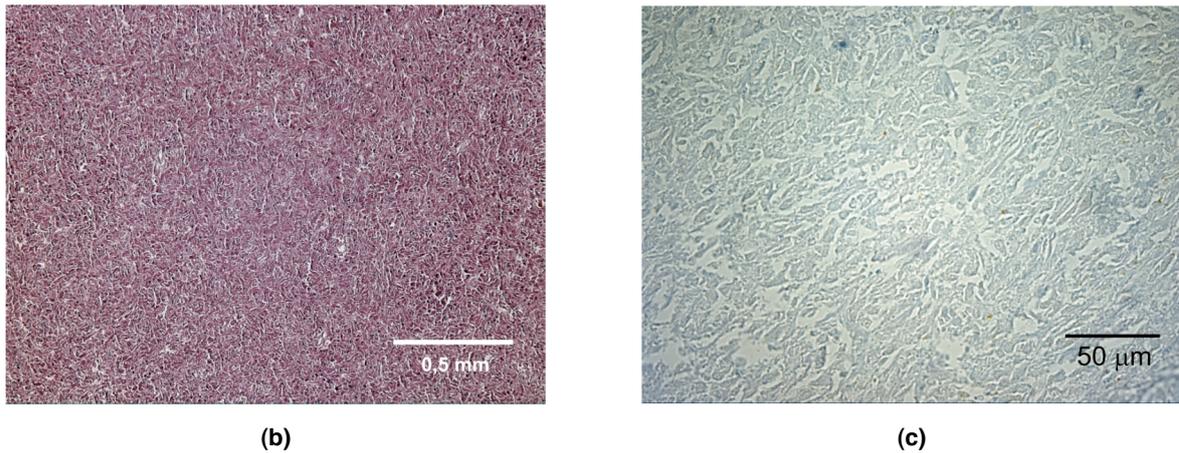
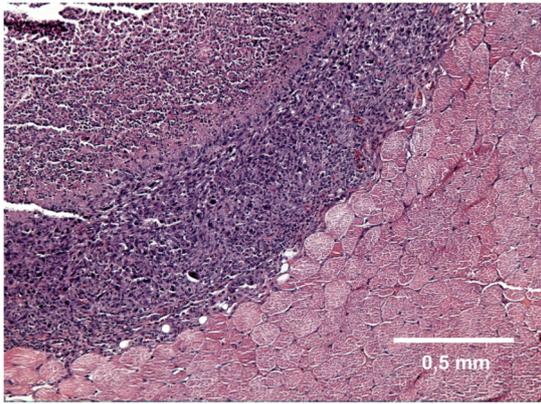


Abb. 3.3.1b: Zentrum des mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm⁻², 10s). PTT-induzierte Nekrose. Zellkerne und Zellgrenzen sind nicht mehr erkennbar; alle Zellen sind irreversibel geschädigt. H.-E.-Färbung.

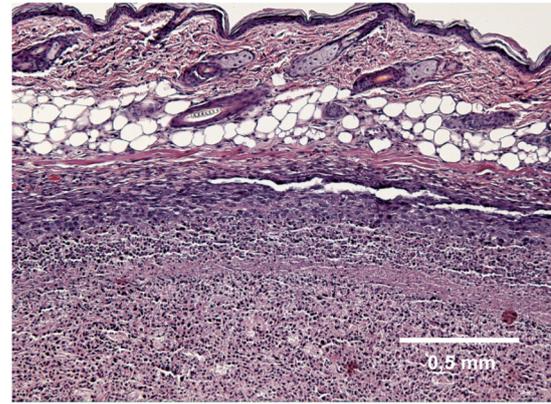
Abb. 3.3.1c: Immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker TEC3. Gleicher Ausschnitt wie in (b) (Tumorzentrum) des mit PTT behandelten Tumors. Kein Nachweis proliferierender, vitaler Zellen.

Im Übergangsbereich des behandelten Tumors zum darunterliegenden Muskel (Abb. 3.3.1d) zeigt sich ein Bereich von ca. 10 Zelllagen, der morphologisch verdächtig auf noch vitale, verbliebene Tumorzellen ist. In dieser Schicht zeigen sich des weiteren Leukozyten und kleinere Stromazellen des Tumorgewebes. Das direkt angrenzende Muskelgewebe zeigt sich unverändert und nicht thermisch geschädigt. Insbesondere zeigen sich keine größeren inflammatorischen Areale oder Muskelzellregenerate in Form von Myotuben.

Im Übergangsbereich des Tumors zur darüberliegenden Haut (Abb. 3.3.1e) zeigt sich ebenfalls eine Schicht von Zellen, die morphologisch am ehesten Tumorzellen zugerechnet werden müssen. Hier ist allerdings die Schichtdicke nur 2 bis 3 Zelllagen stark. Im Randbereich zeigt sich des weiteren eine deutliche inflammatorische Infiltration mit Leukozyten. Die darüberliegende Haut weist keine morphologischen Veränderungen einzelner Schichten bzw. Ulcera auf, die auf einen Schaden thermischer Natur hindeuten könnten. Dies entspricht auch dem klinischen Verlauf post irradiationem, der nach Behandlung engmaschig überwacht wurde. Dabei zeigte sich die Haut im Behandlungsareal bis zum Zeitpunkt der Euthanisierung unverändert. Die Haarfollikel wiesen ebenfalls keine Veränderungen auf. Das Haarwachstum setzte nach Behandlung regelmäßig nach 48 h wieder ein.



(d)



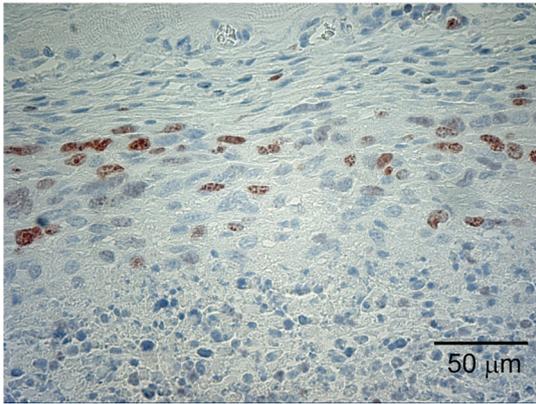
(e)

Abb. 3.3.1d: Vitaler, ungeschädigter Muskel unterhalb des mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm^{-2} , 10s). An der Grenze zwischen Muskel und Tumor: Leukozyten, Stromazellen und ca. 10 Lagen evtl. vitale Tumorzellen. H.-E.-Färbung.

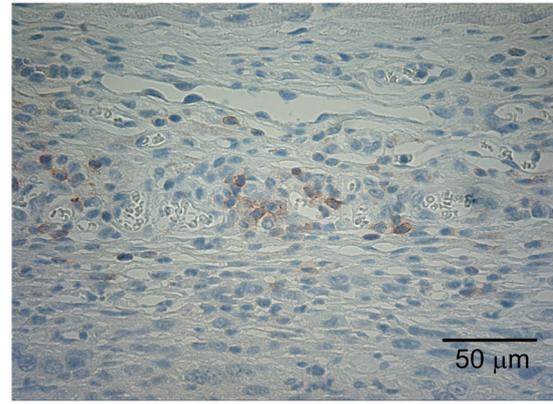
Abb. 3.3.1e: Vitale, ungeschädigte Haut oberhalb des mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm^{-2} , 10s). An der Grenze zwischen Unterhautgewebe und Tumor: Leukozyten, Stromazellen und ca. 2 bis 3 Lagen evtl. vitale Tumorzellen. H.-E.-Färbung.

In den immunhistochemischen Färbungen mit dem Proliferationsmarker TEC3 zeigen sich im Übergangsbereich zur Haut (Abb. 3.3.1f) proliferierende Zellen in der Schicht der fraglich verbliebenen Tumorzellen. In Zusammenschau der morphologischen Befunde und der immunhistochemischen Befunde dieser Schicht muss somit von verbliebenen vitalen Tumorzellen ausgegangen werden.

Weitere immunhistochemische Färbungen mit dem Panleukozytenmarker anti-CD45 zeigen eine massive inflammatorische Infiltration der Randbereiche des Tumors, die exemplarisch in Abb. 3.3.1g gezeigt wird. Diese umgibt das nekrotische Tumorgewebe von allen Seiten und ist auf den Randbereich des ehemaligen Tumors beschränkt. Rein morphologisch setzt sich die inflammatorische Infiltration aus hauptsächlich neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten zusammen. Vereinzelt sind auch Mastzellen aufzufinden. Die leukozytären Subpopulationen wurden allerdings nicht weiter immunhistochemisch untersucht.



(f)



(g)

Abb. 3.3.1f: Immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker TEC3. Der Ausschnitt zeigt den Grenzbereich zwischen Unterhautgewebe und Tumor [in Anlehnung an Abbildung (e)] mit verbliebenen evtl. vitalen Tumorzellen. Nachweis proliferierender, vitaler Zellen. Auf Grund der Morphologie handelt es sich damit um verbliebene vitale Tumorzellen.

Abb. 3.3.1g: Immunhistochemische Färbung mit dem murinen anti-CD45 Panleukozytenmarker. Der Ausschnitt zeigt wiederum den Grenzbereich zwischen Unterhautgewebe und Tumor [in Anlehnung an (e) und (f)]. Nachweis CD45-positiver Zellen (Leukozyten) die eine massive Infiltration des Gewebes wie hier gezeigt im gesamten Tumorrandgebiet zeigen.

3.3.2 Bestrahlungsstärke 30 Wcm^{-2} und Bestrahlungszeit 15 Sekunden

Die Ergebnisse unserer Versuche mit PdNc(OBu)₈-markierten Tumoren 96 Stunden nach Behandlung bei einer Bestrahlungsstärke von 30 Wcm^{-2} und einer Bestrahlungszeit von 15 Sekunden werden im Folgenden wiederum beispielhaft dargestellt. In dieser Gruppe behandelten wir n = 25 Tiere.

Bereits die Übersichtsaufnahme (siehe Abb. 3.3.2a) weist im Vergleich deutliche Unterschiede zur Histologie des mit 30 Wcm^{-2} für 10 Sekunden bestrahlten Tumors auf. So zeigt sich wiederum eine ausgeprägte zentrale Koagulationsnekrose die nun allerdings deutlich größer ist. Lediglich im Übergangsbereich des Tumorgewebes zur Haut findet sich ein dunklerer Saum, in dem fraglich eine Lage Tumorzellen verblieben ist.

Die umgebenden Strukturen weisen keine morphologischen Veränderungen im Sinne von thermischen Schäden auf. Die Haut zeigt sich ebenfalls unbeeinflusst.



Abb. 3.3.2a: Subkutaner PdNc(OBu)₈- markierter Tumor 96h nach Bestrahlung mit 30 Wcm⁻² für 15 Sekunden bei 830nm. Homogene zentrale Nekrose des Tumors. Vitale Zellen (Leukozyten, Stromazellen und 1 Lage Tumorzellen) nur im Übergangsbereich zur Haut zu finden. Zum vitalen Muskel scharf begrenzte Nekrose des Tumors ohne vitale Zellen. Das umgebende Gewebe inklusive der Haut ohne morphologische Schäden. H-E-Färbung.

Abbildung 3.3.2b zeigt einen repräsentativen Bereich der zentralen Koagulationsnekrose des Tumorgewebes. Wiederum lassen sich keine Zellgrenzen oder Zellkerne abgrenzen. Lediglich einige hyperdense Strukturen im Sinne von Kernstaub bzw. in Form von apoptotischen Restkörpern sind zu finden. Dies entspricht dem Vollbild einer Koagulationsnekrose.

Die irreversible Schädigung der Tumorzellen im Zentrum bestätigt sich in den immunhistochemischen Färbungen mit dem Proliferationsmarker TEC3 (siehe Abb. 3.3.2c), in denen keine proliferierenden Zellen bzw. Tumorzellen in diesem Areal nachweisbar sind.

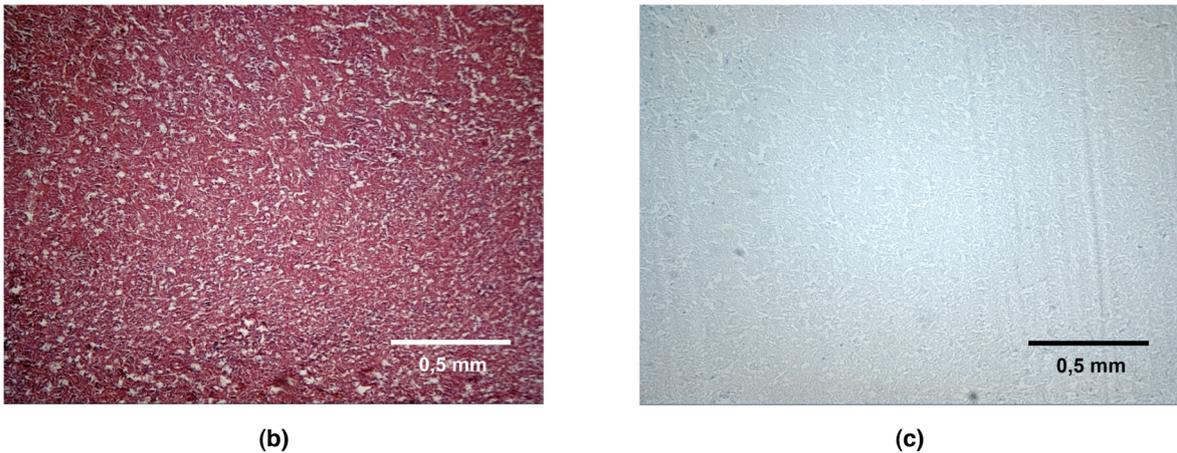


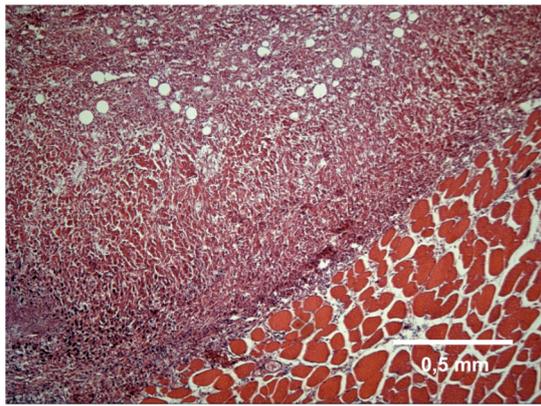
Abb. 3.3.2b: Zentrum des mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm^{-2} , 15s). PTT-induzierte Koagulationsnekrose, Zellkerne und Zellgrenzen sind nicht mehr erkennbar, alle Zellen sind irreversibel geschädigt. H.-E.-Färbung.

Abb. 3.3.2c: Immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker TEC3. Gleicher Ausschnitt wie in (b) (Tumorzentrum) des mit PTT behandelten Tumors. Kein Nachweis proliferierender Zellen.

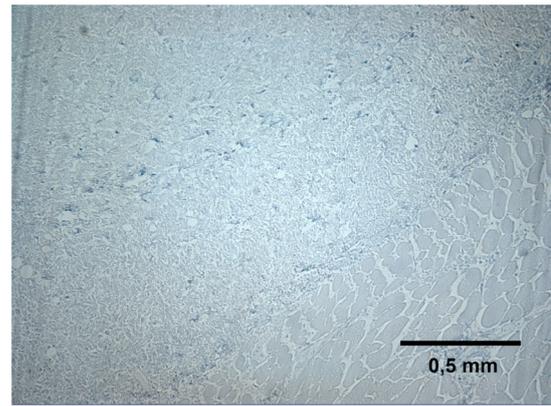
Unterhalb des Tumors im Übergangsbereich zum Muskel finden sich keine lebenden Tumorzellen (siehe Abb. 3.3.2d). Der Muskel ist morphologisch auch in direkter Nachbarschaft zur induzierten Koagulationsnekrose des Tumorgewebes morphologisch ungeschädigt. Es finden sich im Muskelgewebe keine entzündlichen Infiltrate oder reparativen Vorgänge.

Diese Beobachtungen werden von den immunhistochemischen Untersuchungen mit dem Proliferationsmarker TEC3 unterstützt (siehe Abb. 3.3.2e). Im Tumorgewebe und insbesondere im Übergangsbereich zum Muskel finden sich keine proliferierenden Zellen. Das direkt angrenzende Muskelgewebe weist keine proliferierenden Zellen auf, was auf die Intaktheit der Muskelfasern hindeutet.

Insgesamt zeigt sich somit in diesem Bereich ein hochselektiver, auf das Tumorgewebe begrenzter irreversibler thermischer Schaden.



(d)



(e)

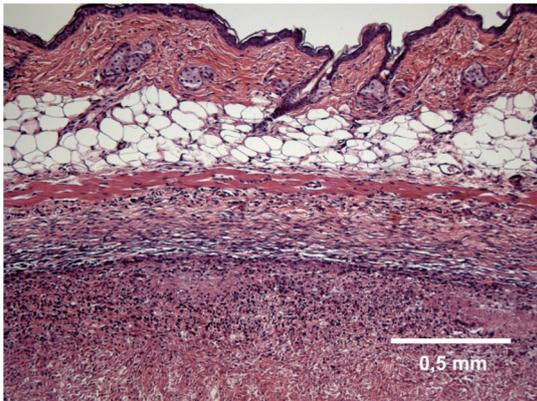
Abb. 3.3.2d: Vitaler, ungeschädigter Muskel unterhalb des mit PdNc(OBu)₈-markierten und mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm², 15s). Scharfer Übergang zwischen ausgedehnter Koagulationsnekrose des Tumorgewebes und angrenzendem vitalen Muskelgewebe. Hochselektiver, auf den Tumor begrenzter thermischer Schaden. H.-E.-Färbung.

Abb. 3.3.2e: Immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker TEC3. Gleicher Ausschnitt wie in (d) des mit PTT behandelten Tumors. Kein Nachweis proliferierender Zellen. Insbesondere kein Nachweis von proliferierenden Tumorzellen oder von proliferierenden Muskelzellregeneraten (Myotuben).

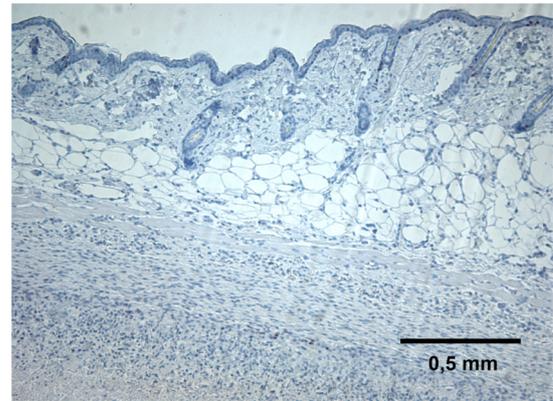
Der Randbereich des Tumors zur Haut hin (siehe Abb. 3.3.2f) zeigt einen mehrschichtigen Aufbau: am äußeren Rand der Koagulationsnekrose beginnend mit einem Saum von Kernfragmenten, gefolgt von einer bindegewebigen Schicht (Pseudokapsel des Tumors), welche nach außen in die ungeschädigte Haut übergeht. Angrenzend an die zentrale Nekrose, in der keine Zellen zu identifizieren sind, befinden sich direkt unter der bindegewebigen Schicht Leukozyten (hauptsächlich neutrophile Granulozyten und Lymphozyten), Stromazellen sowie eine Lage morphologisch am ehesten als verbliebene Tumorzellen zu klassifizierende Zellen mit einem großen, blasigen Kern und einem schmalen Zytoplasmasaum.

Die über der bindegewebigen Schicht liegende Haut zeigt sich in allen Schichten vital und ungeschädigt. Hier finden sich keine Entzündungszellen, die Haarfollikel sind intakt und die Schichten der Cutis lassen sich gut gegeneinander abgrenzen.

Die immunhistochemischen Färbungen mit dem Proliferationsmarker TEC3 (siehe Abb. 3.3.2g) zeigen unter der bindegewebigen Schicht ein bis zwei Lagen proliferierender Zellen, die in Zusammenschau der morphologischen und immunhistochemischen Befunde als verbliebene Tumorzellen klassifiziert werden müssen. Die Zellen der Haarfollikel der darüberliegenden Haut proliferieren stark, was die Intaktheit der Haut und der Hautanhangsgebilde unterstreicht.



(f)

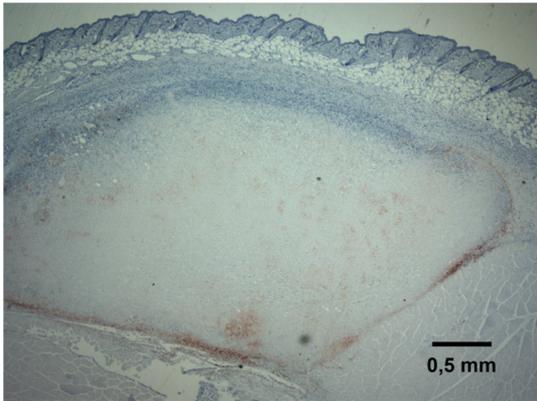


(g)

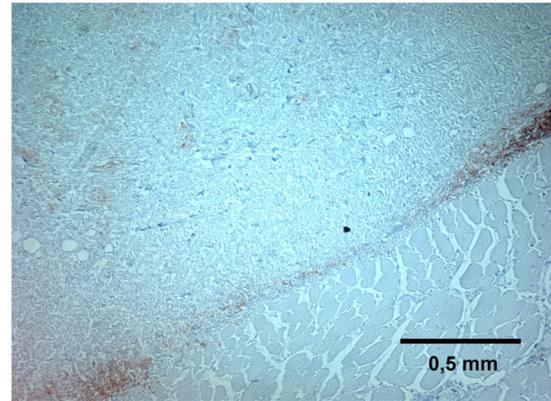
Abb. 3.3.2f: Vitale, morphologisch ungeschädigte Haut und Haarfollikel oberhalb des mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm², 15s). An der Grenze zwischen Unterhaut und Tumor: Leukozyten, Stromazellen und 1 Lage verbliebene Tumorzellen. H.-E.-Färbung.

Abb. 3.3.2g: Immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker TEC3. Gleicher Bereich wie in (f) des mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm², 15s). Zwischen Unterhaut und Tumor zeigt sich 1 Lage proliferierender, verbliebener Tumorzellen. Proliferierende und damit vitale Haarfollikel.

Weitere immunhistochemische Färbungen mit dem Panleukozytenmarker anti-CD45 (siehe Abb. 3.3.2h) zeigen eine massive inflammatorische Infiltration insbesondere der Randbereiche des Tumors sowie eine diffusere Infiltration der zentralen Tumoranteile. Dabei setzt sich die zelluläre Zusammensetzung des Infiltrats morphologisch, wie zuvor beschrieben, aus hauptsächlich neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten zusammen. Das umliegende gesunde Gewebe weist keine inflammatorisch-leukozytäre Infiltration auf. Abbildung 3.3.2i zeigt den Übergangsbereich des Tumors zum darunterliegenden Muskel (in Anlehnung an den Ausschnitt der Abbildung 3.3.2d). Das Muskelgewebe wird nicht leukozytär-entzündlich infiltriert, wohingegen der Randbereich des Tumors massiv leukozytär infiltriert ist. Ebenso zeigt sich die bereits beschriebene diffusere leukozytäre Infiltration zentraler Anteile des Tumorgewebes, die oftmals um kleinere Gefäße im Tumorgewebe angeordnet ist.



(h)



(i)

Abb. 3.3.2h: Immunhistochemische Färbung mit dem Panleukozytenmarker anti-CD45 des mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm^{-2} , 15s). Massive leukozytäre (inflammatorische) Infiltration der Randbereiche des Tumors sowie der zentralen Tumoranteile. Das umliegende gesunde Gewebe weist keine inflammatorische Infiltration auf.

Abb. 3.3.2i: Immunhistochemische Färbung mit dem Panleukozytenmarker anti-CD45 des mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm^{-2} , 15s). Übergang vom Tumorgewebe zum darunterliegenden Muskelgewebe. Massive inflammatorische, leukozytäre Infiltration der Randbereiche des Tumors sowie der zentralen Tumoranteile. Das Muskelgewebe wird nicht leukozytär infiltriert.

3.3.3 Bestrahlungsstärke 30 Wcm^{-2} und Bestrahlungszeit 20 Sekunden

Die Ergebnisse der Versuche mit PdNc(OBu)₈-markierten Tumoren 96 Stunden nach Behandlung bei einer Bestrahlungsstärke von 30 Wcm^{-2} und einer Bestrahlungszeit von 20 Sekunden werden im Folgenden wiederum beispielhaft dargestellt. In dieser Gruppe behandelten wir $n = 4$ Tiere.

Abbildung 3.3.3a zeigt eine Übersicht über den behandelten Tumor. Zentral zeigt sich wiederum eine großflächige Koagulationsnekrose, die aber im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Histologien relativ inhomogen ist. Lediglich im rechten und linken Randbereich dieses Tumors finden sich im Übergangsbereich zum Muskelgewebe bzw. zum subkutanen Bindegewebe zwei kleinere Areale morphologisch vitaler Tumorzellen. Dies zeigt sich auch in den weiter unten präsentierten immunhistologischen TEC3-Färbungen.

Das umgebende gesunde Gewebe ist auch bei diesen Behandlungsparametern unbeeinflusst. Die Haut mit Hautanhangsgebilden weist keine Veränderungen auf, die Haarbälge sind intakt. Ebenso weist das umgebende Muskelgewebe keine thermischen Schäden auf.

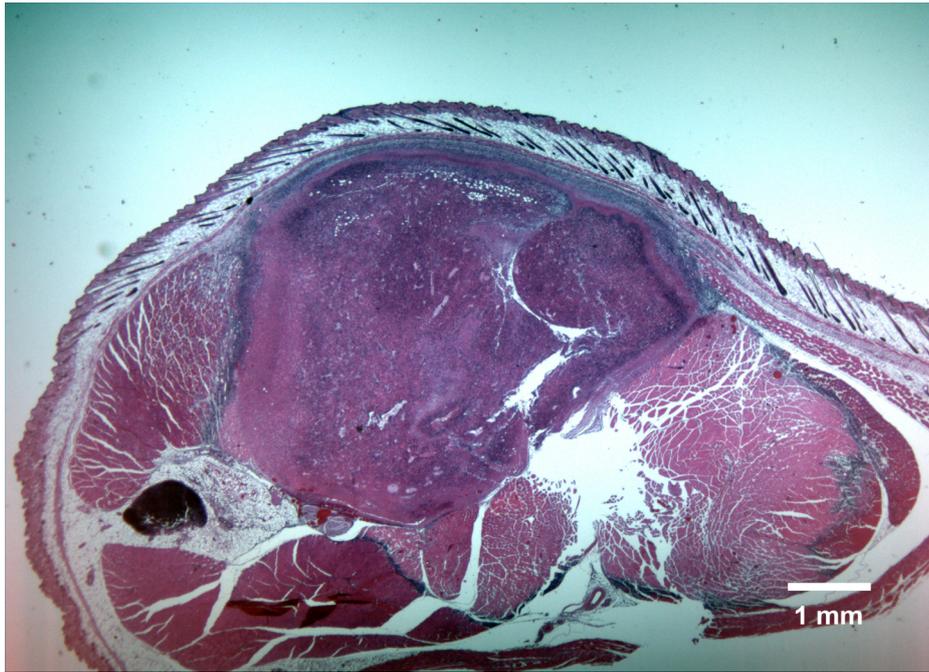
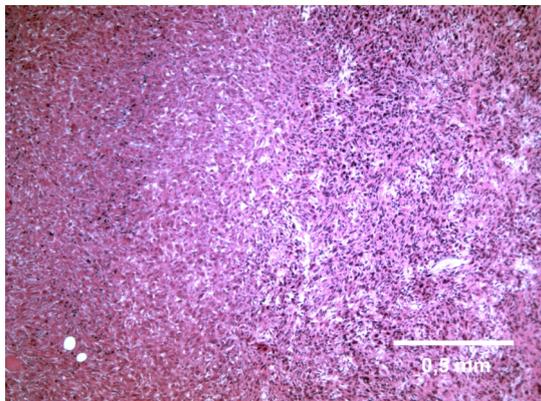


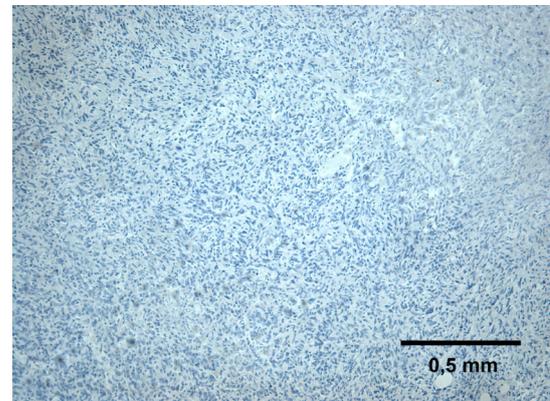
Abb. 3.3.3a: Subkutaner PdNc(OBU)₈-markierter Tumor 96h nach Bestrahlung mit 30 Wcm⁻² für 20 Sekunden bei 830nm. Große zentrale Nekrose des Tumors. Vitale Zellen (Leukozyten, Stromazellen und 2 bis 3 Lagen Tumorzellen) nur im rechten und linken Randbereich zu finden. Zum vitalen Muskel scharf begrenzte Nekrose des Tumors ohne vitale Zellen. Das umgebende Gewebe inklusive der Haut ohne morphologische Schäden. H.-E.-Färbung.

Abbildung 3.3.3b zeigt in einer höheren Vergrößerung einen repräsentativen Ausschnitt der Koagulationsnekrose, die sich in diesem Fall anders als in den vorherigen Histologien inhomogener darstellt. Neben relativ homogenen Arealen mit einer zu den vorherigen Histologien vergleichbaren Koagulationsnekrose sind in angrenzenden Arealen noch einige Zellkerne und Zellgrenzen zu identifizieren. Trotz dieser morphologischen Unterschiede haben auch diese Zellen einen irreversiblen thermischen Schaden im Sinne einer Koagulationsnekrose erlitten bzw. es wurde über den thermischen Reiz eine Apoptose induziert, welche zum Absterben der Zellen geführt hat. Dies zeigt sich an der intensiv eosinophilen Färbung des Zytoplasmas der Tumorzellen sowie an den sehr dichten, kleinen und homogen gefärbten Zellkernen mit einem hohen Anteil an Heterochromatin im Sinne einer Karyopyknosis. Des Weiteren weisen die Zellen nicht mehr lange dendritische Zellausläufer oder eine langgestreckte Spindelform auf. Die Zellform ist nunmehr klein und rundlich, alles im Sinne eines irreversiblen Zellschadens. Dieser Befund bestätigt sich in der immunhistochemischen Färbung mit dem proliferationsassoziierten Antikörper TEC3 (siehe Abb. 3.3.3c). Auch diese Abbildung

zeigt einen repräsentativen Ausschnitt der zentralen Koagulationsnekrose. Es finden sich keine proliferierenden, vitalen Tumorzellen.



(b)



(c)

Abb. 3.3.3b: Zentrum des mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm^{-2} , 20s). im Bildbereich links PTT-induzierte Koagulationsnekrose. Im Bildbereich rechts lassen sich noch Zellkerne und Zellgrenzen identifizieren. Diese Zellen weisen eindeutige morphologische Veränderungen (Karyopyknosis, Eosinophilie, kugelige Zellform) im Sinne eines irreversiblen Zellschadens auf. H.-E.-Färbung.

Abb. 3.3.3c: Immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker TEC3. Gleicher Ausschnitt wie in (b) (Tumorzentrum) des mit PTT behandelten Tumors. Kein Nachweis proliferierender Zellen.

Im Übergangsbereich des Tumors zum darunterliegenden Muskelgewebe (siehe Abb. 3.3.3d) findet sich ein schichtweiser Aufbau. Vom Tumorzentrum kommend mit einer inhomogenen Koagulationsnekrose ohne vitale Tumorzellen folgt ein schmaler Saum einer homogenen Koagulationsnekrose, worauf das intakte Muskelgewebe folgt. Der Muskel weist keine weiteren morphologischen Veränderungen auf, die auf einen thermischen Schaden hindeuten würden.

Die immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker TEC3 dieses Übergangsbereiches zeigt die Abbildung 3.3.3e. Auch hier finden sich keine vitalen, proliferierenden Tumorzellen. Das Muskelgewebe weist keine reparativen Vorgänge auf. Auch hier zeigt sich somit ein hochselektiver, auf das Tumorgewebe beschränkter Schaden.

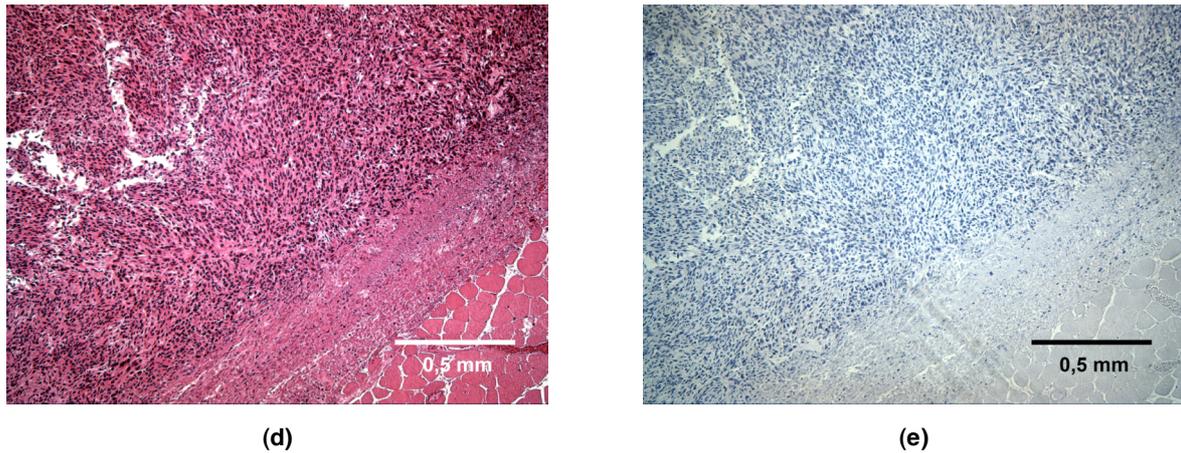


Abb. 3.3.3d: Vitaler, ungeschädigter Muskel unterhalb des mit PdNc(OBu)₈-markierten und mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm², 20s). Scharfer Übergang zwischen ausgedehnter, inhomogener Koagulationsnekrose des Tumorgewebes und angrenzendem vitalen Muskelgewebe. Hochselektiver, auf den Tumor begrenzter thermischer Schaden. H.-E.-Färbung.

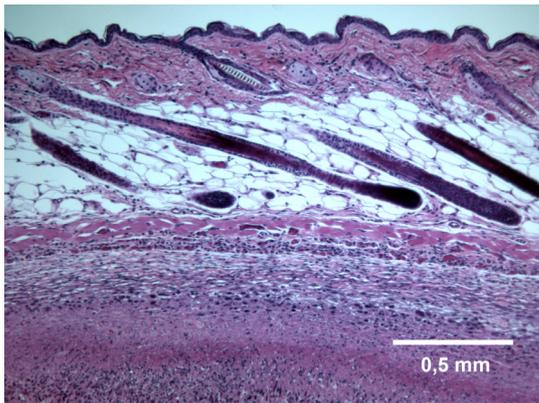
Abb.3.3.3e: Immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker TEC3. Gleicher Ausschnitt wie in (d) des mit PTT behandelten Tumors. Kein Nachweis proliferierender Zellen. Insbesondere kein Nachweis von proliferierenden Tumorzellen oder von proliferierenden Muskelzellregeneraten (Myotuben).

Im Übergangsbereich des Tumors zur darüber liegenden Haut (siehe Abb. 3.3.3f) zeigt sich auch hier ein geschichteter Aufbau: kommend von der in diesem Bereich homogenen zentralen Koagulationsnekrose mit einzelnen Kerntrümmern sowie einigen Entzündungszellen (Lymphozyten, Granulozyten) folgt die bekannte bindegewebige Schicht (im Sinne einer Tumorpseudokapsel) woraufhin die intakte Cutis folgt.

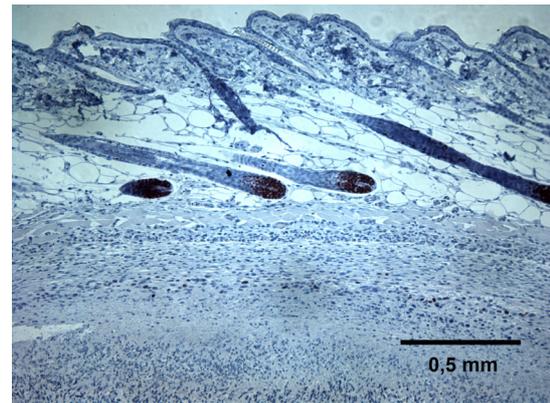
Unterhalb der Tumorpseudokapsel finden sich lediglich Entzündungszellen sowie einzelne Stromazellen. Vereinzelt finden sich allerdings noch einzelne tumorverdächtige Zellen direkt unter der Tumorpseudokapsel, ohne das durch die verdächtigen Zellen hier eine durchgehende Zellschicht gebildet wird.

Die darüberliegende Haut zeigt sich in allen Schichten unbeeinflusst und intakt. Hier finden sich keine Entzündungszellen, die Haarfollikel weisen keine Veränderungen auf.

Die immunhistochemischen Färbungen mit dem Proliferationsmarker TEC3 (siehe Abb. 3.3.3g) dieses Bereiches zeigen im Tumorgewebe ebenfalls vereinzelt proliferierende Tumorzellen direkt unter der Pseudokapsel. Somit muss auch bei diesen Behandlungsparametern von einzelnen verbliebenen vitalen Tumorzellen ausgegangen werden. Die Haarfollikel sind stark TEC3 positiv, was die Unversehrtheit der Haut und der Hautanhangsgebilde nach Bestrahlung unterstreicht.



(f)



(g)

Abb. 3.3.3f: Vitale, morphologisch ungeschädigte Haut und Haarfollikel oberhalb des mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm⁻², 20s). An der Grenze zwischen Pseudokapsel und Tumor: Leukozyten, Stromazellen und vereinzelt verbliebene Tumorzellen. H.-E.-Färbung.

Abb. 3.3.3g: Immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker TEC3. Gleicher Bereich wie in (f) des mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm⁻², 20s). Zwischen Pseudokapsel und Tumor zeigen sich vereinzelt proliferierende, verbliebene Tumorzellen. Proliferierende und damit vitale Haarfollikel.

Weitere immunhistochemische Färbungen mit dem proliferationsassoziierten Antikörper TEC3 aus dem linken (Abb. 3.3.3h) und rechten (Abb. 3.3.3i) Randbereich des Tumors zeigen in diesen Bereichen zwei kleinere, proliferierende und damit als vital einzustufende Tumorzellnester, die 4 bis 5 Tumorzelllagen stark sind (siehe auch die Beschreibung der H.-E. gefärbten Übersicht). Beide Tumorzellnester befinden sich in direkter Nachbarschaft zu einem größeren Gefäß. Die weiteren Tumoren dieser Behandlungsgruppe wiesen keine größeren Gefäße und auch keine vitalen Tumorzellnester im Randbereich auf. Das direkt angrenzende Muskelgewebe bzw. das angrenzende Subcutangewebe weist keine morphologischen oder immunhistochemische Veränderungen auf.

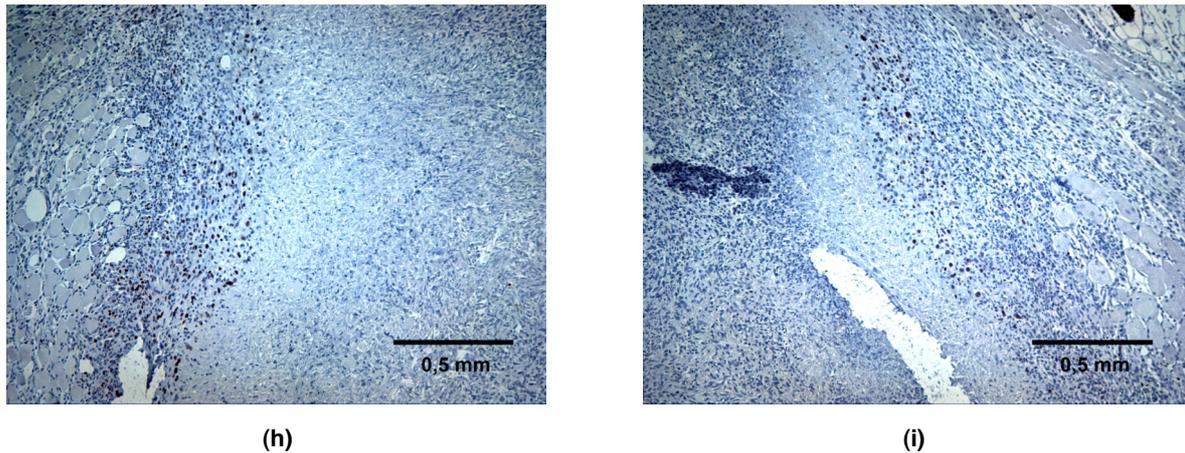
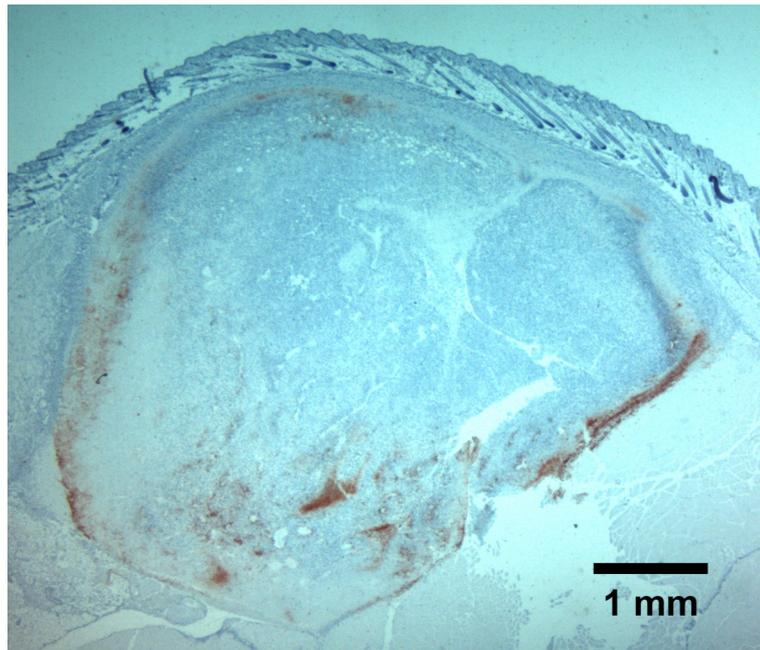


Abb. 3.3.3h: Immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker TEC3. Linker Randbereich des mit PTT behandelten Tumors (30Wcm^{-2} ; 20s) mit angrenzendem vitalem Muskelgewebe. Im Übergangsbereich zum Muskel zeigt sich in direkter Nachbarschaft zu einem größeren Gefäß ein proliferierendes, verbliebenes, 4-5 Zellschichten starkes Tumorzellnest.

Abb. 3.3.3i: Immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker TEC3. Rechter Randbereich des mit PTT behandelten Tumors (30Wcm^{-2} ; 20s) mit angrenzendem unverändertem subcutanem Bindegewebe. Im Übergangsbereich zum Bindegewebe zeigt sich in direkter Nachbarschaft zu einem größeren Gefäß ein proliferierendes, verbliebenes, 4-5 Zellschichten starkes Tumorzellnest.

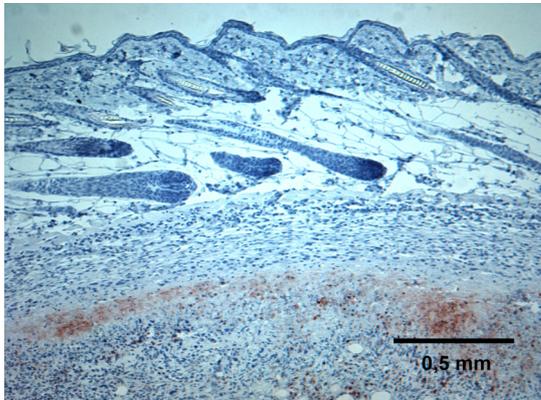
Die immunhistochemischen Färbungen mit dem Panleukozytenmarker anti-CD45 zeigen in Anlehnung zu den bereits besprochenen Histologien eine massive inflammatorisch-leukozytäre Infiltration insbesondere der Tumorrandbereiche in bekannter zellulärer Zusammensetzung (siehe Abb. 3.3.3j). Dabei wird der Tumor von der inflammatorischen Reaktion komplett umfasst (siehe Abb. 3.3.3k und Abb. 3.3.3l). Des Weiteren wird das gesamte Tumorgewebe diffus aber deutlich inflammatorisch durchsetzt, wobei die Infiltration um kleinere Gefäßen im Tumorgewebe angeordnet ist (siehe Abb. 3.3.3m).

Das umliegende Gewebe weist keine inflammatorische Infiltration auf, so dass wiederum in Synopsis der morphologischen und immunhistochemischen Befunde die Intaktheit des umliegenden gesunden Gewebes bestätigt wird.

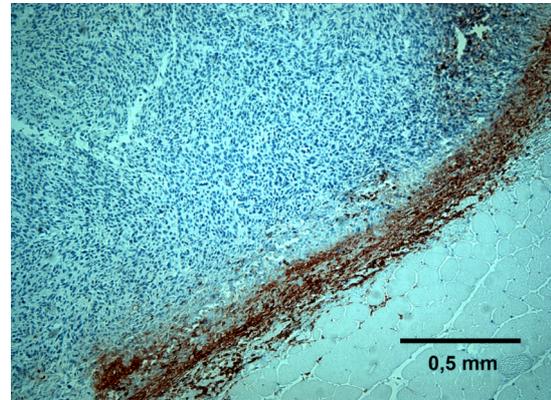


(j)

Abb. 3.3.3j: Immunhistochemische Färbung mit dem Panleukozytenmarker anti-CD45 des mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm^{-2} , 20s). Massive leukozytäre (inflammatorische) Infiltration der Randbereiche des Tumors sowie diffuser der zentralen Tumoranteile. Das umliegende gesunde Gewebe weist keine inflammatorische Infiltration auf.



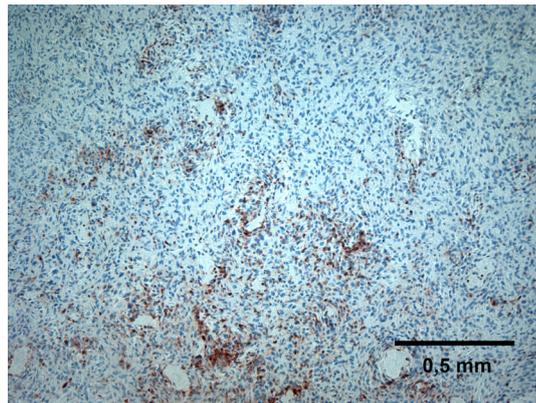
(k)



(l)

Abb. 3.3.3k: Immunhistochemische Färbung mit dem Panleukozytenmarker anti-CD45 des mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm^{-2} , 20s). Übergangsbereich vom Tumorgewebe zur darüberliegenden Haut. Massive leukozytäre (inflammatorische) Infiltration der Randbereiche des Tumors. Die darüberliegende Haut weist keine inflammatorische Infiltration auf.

Abb. 3.3.3l: Immunhistochemische Färbung mit dem Panleukozytenmarker anti-CD45 des mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm^{-2} , 20s). Übergangsbereich vom Tumorgewebe zum darunterliegenden Muskelgewebe. Massive leukozytäre (inflammatorische) Infiltration der Randbereiche des Tumors sowie der zentralen Tumoranteile. Das Muskelgewebe wird von der inflammatorischen Infiltration nicht erfasst.



(m)

Abb. 3.3.3m: Immunhistochemische Färbung mit dem Panleukozytenmarker anti-CD45 des mit PTT behandelten Tumors (30 Wcm^{-2} , 20s). Diffuse aber deutliche leukozytäre (inflammatorische) Infiltration der zentralen Tumoranteile ausgehend von kleineren Gefäßen.

3.4 Auswertung der Nekroseareale

Die Ergebnisse der Auswertung der Nekroseareale mit dem Grafikprogramm „ImageJ“ in Bezug auf die Tumorquerschnittsfläche zeigen die Tabellen 3.4a und 3.4b sowie Abbildung 3.4a.

Kontrollgruppe	\bar{x} [%]	s
nicht sensibilisiert / nicht bestrahlt (n=9)	2,138	2,101
sensibilisiert / nicht bestrahlt (n=3)	0,123	0,110
nicht sensibilisiert / bestrahlt (n=3)	2,165	0,146

Tab. 3.4a: Ergebnisse der Auswertung der Nekroseareale in Bezug auf die Tumorquerschnittsfläche in den tumortragenden Kontrollgruppen. Angegeben ist der arithmetische Mittelwert (\bar{x}) der jeweiligen Gruppe sowie die Standardabweichung (s).

Behandlungsgruppe	\bar{x} [%]	s
30 Wcm ⁻² für 10 Sekunden (n=5)	92,293	5,035
30 Wcm ⁻² für 15 Sekunden (n=25)	94,406	3,809
30 Wcm ⁻² für 20 Sekunden (n=4)	99,428	0,661

Tab. 3.4b: Ergebnisse der Auswertung der Nekroseareale in Bezug auf die Tumorquerschnittsfläche in den Behandlungsgruppen. Angegeben ist der arithmetische Mittelwert (\bar{x}) der jeweiligen Gruppe sowie die Standardabweichung (s).

In Abbildung 3.4a sind auf der Abszisse neben den Kontrollgruppen mit transplantiertem Tumor die Ergebnisse aller Behandlungsgruppen abgetragen. Auf der Ordinate sind die arithmetischen Mittelwerte der Nekroseareale der jeweiligen Gruppe mit Standardabweichung ($\pm s$) abgetragen.

Im Vergleich der Behandlungsgruppen zu den Kontrollgruppen zeigt sich eine signifikante Zunahme der Nekroseareale.

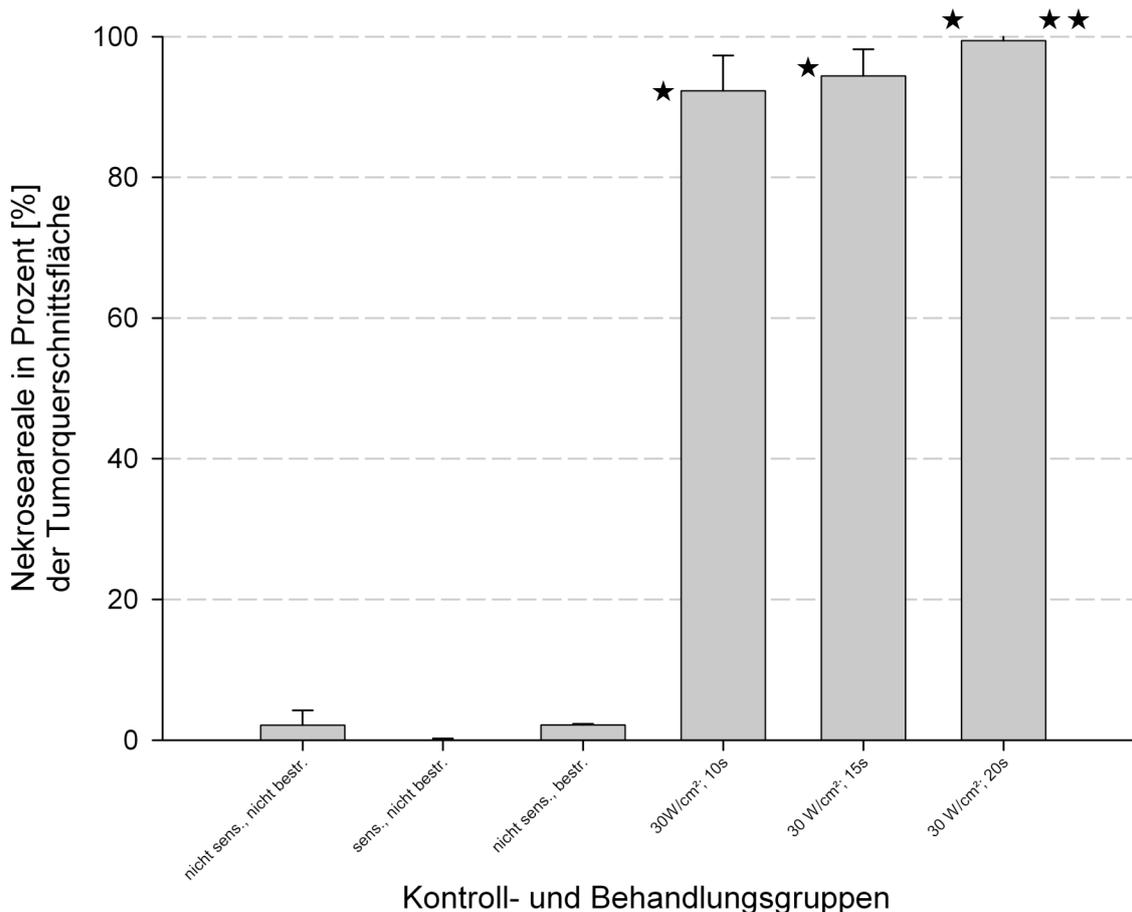


Abb. 3.4a: Vergleich der Kontroll- und Behandlungsergebnisse anhand der Nekroseareale in Prozent der Tumorquerschnittsfläche. Arithmetische Mittelwerte (für n siehe Anhang) und Standardabweichungen ($\pm s$).

★ signifikant gegenüber allen Kontrollgruppen ($p < 0.05$)

★★ signifikant gegenüber allen Behandlungsgruppen ($p < 0,05$)

Legende

nicht sens., nicht bestr.: Die Tiere dieser Kontrollgruppe wurden nicht PdNc(OBu)₈-markiert und erhielten keine Bestrahlung.

sens., nicht bestr.: Die Tiere dieser Kontrollgruppe wurden PdNc(OBu)₈-markiert. Eine Bestrahlung wurde nicht durchgeführt.

nicht sens., bestr.: Die Tiere dieser Kontrollgruppe wurden nicht PdNc(OBu)₈-markiert. Eine Bestrahlung bei allen verwendeten Parametern der Behandlungsgruppen wurde durchgeführt.

30 W/cm²; 10s: Die Tiere dieser Behandlungsgruppe wurden PdNc(OBu)₈-markiert. Eine Bestrahlung wurde mit 30 W/cm² für 10s durchgeführt.

30 W/cm²; 15s: Die Tiere dieser Behandlungsgruppe wurden PdNc(OBu)₈-markiert. Eine Bestrahlung wurde mit 30 W/cm² für 15s durchgeführt.

30 W/cm²; 20s: Die Tiere dieser Behandlungsgruppe wurden PdNc(OBu)₈-markiert. Eine Bestrahlung wurde mit 30 W/cm² für 20s durchgeführt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Umsetzung einer selektiven Photothermotherapie mit dem Farbstoff Palladium-Octabutoxynaphthalocyanin zur Behandlung von Tumorgewebe im Mausmodell untersucht werden. Im Folgenden werden zunächst die einzelnen Versuchsergebnisse getrennt betrachtet um abschließend im Zusammenhang und im Kontext mit anderen Phototherapien und der Literatur diskutiert zu werden.

4.1 Wachstumsverhalten der Tumoren

Das von uns beobachtete relativ inhomogene Wachstumsverhalten der Tumoren vom Tag der Implantation bis zum Tag der Bestrahlung kann auf eine Reihe von Ursachen zurückgeführt werden. Zu Beginn ist hierfür die Darstellung des Wachstumsverhaltens der Tumoren mit verantwortlich, welche einen Querschnitt durch das Wachstum aller Tumoren während der gesamten Versuchsreihen widerspiegelt. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass auch bei Tieren, die Transplantate von demselben Spendertumor erhalten haben, diese unterschiedlichen Wachstumsverhalten aufwiesen. Somit ist die Transplantation von einem Spendertumor auf eine Reihe von weiteren Tieren offensichtlich nicht der Garant für ein gleichartiges Wachstumsverhalten bei den Mäusen.

Des Weiteren zogen wir, um das Wachstumsverhalten zu erklären, unsere Technik der Weitergabe von Tumorbestandteilen von Maus zu Maus in Betracht. Die Tumorweitergabe erfolgte während des gesamten Versuches sequentiell, das heißt die Transplantate wurden nicht von ein und demselben Ausgangstumor entnommen, sondern von einem Spendertier einer jeweils aktuell tumortragenden Tiergruppe. Eine Transplantation des Tumors von einem Ausgangstumor wäre nicht durchführbar gewesen, da die ursprünglich zur Verfügung stehenden Zellen einer Zellkultur entstammten. Das weitere Benutzen einer solchen Ausgangstumormasse war ebenfalls nicht möglich, da die damit induzierten Tumoren eine zu unterschiedliche Morphologie aufwiesen, sich also insgesamt das spätere Aussehen der Tumoren nicht oder nur wenig beeinflussen ließ.

Insgesamt ist eine Anpassung der Tumorzellen auf die neuen Umgebungsbedingungen in der Folge der sequentiellen Transplantation durchaus denkbar. Allerdings waren auch zum Ende der Versuchsreihen die Tumoren der bereits beschriebenen inhomogenen Wachstumsweise unterworfen, so dass dieser Erklärungsansatz ebenfalls das Wachstumsverhalten nicht abschließend klären kann.

Einer der wichtigsten Einflussfaktoren ist wahrscheinlich bei der Technik der Transplantatgewinnung aufgetreten. Zur Gewinnung der Tumorgewebestückchen wurde

der Ausgangstumor in kleine Würfel mit einer Kantenlänge von 1 mm unterteilt. Dabei konnte die Vitalität des Gewebes nur anhand des makroskopischen Aspektes festgestellt werden. Eindeutig nekrotische Areale wurden dabei entfernt. Trotzdem war die Vitalität der Transplantate höchstwahrscheinlich Schwankungen unterworfen, die sich leicht über z.B. im Tumor befindliche minderversorgte Bereiche im Tumorzentrum und sehr gut versorgte Bereiche in der Nähe von Gefäßen erklären ließen. Diese unterschiedlichen Ausgangsvoraussetzungen der Transplantate haben wahrscheinlich hauptsächlich zu dem beobachteten unterschiedlichen Wachstumsverhalten beigetragen.

Des Weiteren war die Technik der Tumorvermessung Schwankungen unterworfen. Zum Teil kam es auf Grund des schnellen Wachstums der Tumoren zu einem subkutanen Ödem, welches ein exaktes Vermessen der Tumorgrößen durch den Weichteilmantel der Haut schwierig gestaltete.

Neben dem inhomogenen Wachstumsmuster fällt ein weiterer Aspekt des allgemeinen Tumorwachstums auf. Vier Tage vor dem Bestrahlungstermin, also in diesem Fall vier Tage vor dem jeweiligen Kurvenende, erfolgte die Sensibilisierung mit PdNc(OBu)₈. Ein Einfluss des Sensibilisators auf das Wachstumsverhalten lässt sich nicht erkennen. Eine Eigentoxizität des Sensibilisators vorausgesetzt, müsste sich diese in den Kurven durch eine Stagnation des Wachstums bzw. sogar durch einen Volumenrückgang der Tumoren bemerkbar machen. Diese Phänomene sind aber nicht zu erkennen, der Sensibilisator weist aus dieser Sicht keine Eigentoxizität auf. Eine Induktion des Wachstums ist ebenfalls nicht zu erkennen. Die Sensibilisierung der Tiere ist somit ohne Effekt auf das Wachstum der Tumoren. Dies zeigte sich ebenfalls in den relevanten Voruntersuchungen des Sensibilisators von Bucking et al. (2000), den Untersuchungen von Richter et al. (1993) und den Versuchen von Diddens et al. (2000 bis 2003) in denen keine toxischen Effekte der Substanz beschrieben wurden.

4.2 Makroskopische Aspekte der Behandlung

Durch die Ergebnisse der makroskopischen Beobachtungen im Zeitraum von der Bestrahlung bis zur Euthanisierung der Tiere lassen sich bereits wichtige Rückschlüsse insbesondere auf die Effektivität des Kühlsystems und die Selektivität der angewandten Methode ziehen.

Eine Ineffektivität der Kühlmethode hätte zu schweren Schäden der Cutis in Form von Verbrennungen aller Grade führen können, da es zu einer unspezifischen Absorption der Strahlung in den Hautstrukturen kommt. Zudem hätte es unmittelbar nach der Bestrahlung zu dem Phänomen des so genannten „Nachbrennens“ kommen können, welches sich auf

Grund der Wärmeausbreitung im Gewebe entwickelt. Makroskopische Aspekte der thermischen Schädigung der Haut hätten sich in Anlehnung an die allgemeine Verbrennungslehre durch eine Rötung, Blasenentwicklung und bei höhergradigen Verbrennungen durch eine Zerstörung der Hautsanhangsgebilde (in diesem Fall die Haarbälge der Mäuse) gezeigt. Eine direkte Koagulation der Cutis hätte zu einer homogenen Abblassung und Schrumpfung der dermalen Strukturen im Bestrahlungsfeld führen können. Diese Symptome waren bei angewandter Eiswasserkühlung der Haut nicht zu beobachten. Eine Schädigung tiefer gelegener Hautstrukturen konnte ebenfalls über eine regelmäßige Kontrolle des Nachwachsens der Haare nach der Behandlung bereits klinisch ausgeschlossen werden. Wie bereits erwähnt, wuchs bei allen Tieren innerhalb der 96 h post irradiationem das Fell wieder nach. Diese Befunde bestätigten sich in der späteren histologischen Auswertung.

Bei vereinzelt Tieren, welche tumortragend und sensibilisiert waren, kam es nach der Bestrahlung zu einer transienten Parese der tumortragenden Extremität. Diese bildete sich aber bei allen Tieren innerhalb des Nachbeobachtungszeitraumes komplett zurück. Dabei trat diese Symptomatik bei allen Bestrahlungsstärken auf; eine womöglich nahe liegendes vermehrtes Auftreten insbesondere bei höheren Bestrahlungsstärken (z.B. bei 30Wcm^{-2} für 20 Sekunden) war nicht nachzuweisen.

Bei diesen Tieren ließen sich histologisch allerdings wesentliche Unterschiede zu Tieren aufweisen, die keine Parese nach der Behandlung erfahren hatten. Es zeigte sich, dass die nervalen Strukturen (z.B. Nervus femoralis etc.) bei diesen Mäusen direkt an den behandelten Tumor angrenzten. Somit waren die nervalen Strukturen bei den transient geschädigten Mäusen nicht von einer schützenden Muskelschicht vom Tumor getrennt, wie dies bei den unbeeinflusst gebliebenen Mäusen histologisch zu beobachten war. Durch die intensive Bestrahlung des Tumors und die direkte Nachbarschaft ist es in diesen Fällen zu einer reversiblen Irritation der Nerven gekommen, welche aber in keinem Fall zu einem irreversiblen Schaden geführt hat.

Insgesamt kann man von einer Nebenwirkung der Behandlung ausgehen, die auf Grund des gewählten Tiermodells aufgetreten ist. Bei Anwendung dieser Methode am Menschen wäre eine solch enge Nachbarschaft dermalen bzw. subdermalen Tumoren zu wichtigen motorischen Nerven höchst unwahrscheinlich. Auch wenn eine Nachbarschaft bestehen sollte, ist dennoch ein kompletter Ausfall der nervalen Funktionen unwahrscheinlich, da die motorischen Nerven einen viel größeren Querschnitt als die Nerven der Maus aufweisen. Denkbar wäre allerdings beim Menschen bei Bestrahlung der Haut ein kurzfristiger Ausfall von sensiblen dermalen Endästen, so dass z.B. um das Behandlungsareal eine kurzfristige Hypästhesie auftritt.

4.3 Kontrollgruppen

In den Kontrollgruppen wurden alle wesentlichen Einflussfaktoren auf das Behandlungsergebnis untersucht. Zu diesen Faktoren zählten die Bestrahlung jeweils unterschiedlicher Stärke, die Sensibilisierung mit PdNc(OBu)₈ und das Vorliegen eines Tumors bei den Tieren. Diese Faktoren wurden in jeder möglichen Konstellation miteinander kombiniert (siehe Ergebnissteil).

Die Kernaussage der Kontrollgruppen ist, dass insgesamt keine wesentlichen, durch die jeweiligen Behandlungsparameter induzierten, pathologischen Veränderungen nachgewiesen werden konnten. Die wichtigste Beobachtung in Hinblick auf nicht-sensibilisierte und nicht-bestrahlte, tumortragende Tiere ist eine fehlende, respektive nur geringe Größe von Spontannekrosen bei der von uns verwendeten Tumorgroße. Die induzierten, von uns beobachteten Nekroseareale in den Behandlungsgruppen sind somit nicht alleiniges Resultat einer maximal ausgeprägten Spontannekrose der Tumorzellen auf Grund z.B. einer Minderversorgung und müssen durch andere Faktoren bedingt sein. Bei der Auswertung der Histologien dieser Kontrollgruppe zeigte sich des Weiteren keine massive leukozytäre Infiltration des Tumorgewebes bzw. der Randbereiche des Tumors. Somit muss die in den Behandlungsgruppen auch immunhistochemisch nachgewiesene massive leukozytäre Infiltration insbesondere der Randbereiche durch die Behandlung direkt bedingt sein.

Wie bereits weiter oben postuliert, weist der von uns verwendete Absorber PdNc(OBu)₈ keine Eigentoxizität auf. Dies bestätigt sich in den Ergebnissen der Kontrollgruppen. Histologische Veränderungen bei nicht sensibilisierten, nicht-bestrahlten, tumortragenden oder nicht-tumortragenden Tieren lassen sich nicht nachweisen. Insbesondere findet sich keine Veränderung des Tumorgewebes oder der umgebenden Weichgewebestrukturen durch den Sensibilisator. In immunhistochemischen Untersuchungen dieser Präparate ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Klinisch gab es bei ordnungsgemäßer intraperitonealer Injektion der Substanz keine Anhaltspunkte für eine toxische systemische Beeinflussung der Tiere.

Eine alleinige Applikation des intensiven Laserlichtes in therapeutischer Stärke bei nicht-sensibilisierten Tieren führt zu keinen nachweisbaren Veränderungen im Bestrahlungsareal. Dies konnte anhand der histologischen Präparate der Kontrollgruppen ebenfalls nachgewiesen werden. Die Bestrahlung eines Tumors ohne Absorber führt zu keiner Erhöhung der Nekroseareale im Tumorgewebe. Des Weiteren wird das umgebende Gewebe ebenfalls nicht beeinflusst.

In Zusammenschau der Befunde lässt sich der weiter unten beschriebene induzierte Schaden nur durch eine ordnungsgemäße Anwendung der hier präsentierten Methode schlüssig erklären und ist nicht Folge eines zufälligen Geschehens oder wird durch einen der untersuchten Behandlungsparameter alleine bedingt. Nur das korrekte Zusammenspiel des Absorbers mit dem Laserlicht führt zu einem selektiven thermischen Schaden, der das umgebende Gewebe nicht mit erfasst.

4.4 Photothermotherapie

Die Behandlungsergebnisse werden im Folgenden zunächst nach den Behandlungsgruppen geordnet diskutiert, um anschließend gruppenübergreifend die Ergebnisse im Kontext zu erläutern.

4.4.1 Bestrahlungsstärke 30 Wcm⁻² und Bestrahlungszeit 10 Sekunden

Im Vergleich der histologischen Ergebnisse in den Behandlungsgruppen mit den Kontrollhistologien ergeben sich deutliche Unterschiede. Durch die von uns in dieser Gruppe durchgeführte Behandlung war es möglich, in den Tumoren eine Nekrose zu induzieren, die ca. 90% des Tumorumfanges erfasste. Solch große Nekroseareale waren bei keinen der Kontrolltumoren in Form von Spontannekrosen (0,1 – 2,1 %; siehe 3.4) aufzufinden. Ebenfalls erwähnenswert ist die Tatsache, dass es zu keiner thermischen Schädigung der Umgebung des Tumors gekommen ist. Wie im Ergebnisteil beschrieben zeigte sich das umliegende Gewebe ohne morphologische Veränderungen. Es findet sich vitaler Muskel unmittelbar neben nekrotischem Tumorgewebe. Ein selektiver, auf das zu behandelnde Gewebe begrenzter, thermischer Schaden unter kompletter Schonung der Umgebung konnte durch die Behandlung erreicht werden.

Auch alle dermalen Strukturen mit Anhangsgebilden zeigen sich morphologisch und in den immunhistochemischen Färbungen unbeschädigt. Eine Schädigung der Haarbälge war bereits auf Grund des klinischen Verlaufs (s.o.) weitgehend auszuschließen. Die Unversehrtheit der Hautanteile ist auf die suffiziente Kühlung mit Eiswasser während der Bestrahlung und auf die selektive Anreicherung des PdNc(OBu)₈ im Tumorgewebe zurückzuführen. Trotz einer großen thermisch-induzierten zentralen selektiven Nekrose des Tumors konnte die durch unspezifische Absorption entstandene Wärme im durchstrahlten Weichgewebe effizient durch die Kühlflüssigkeit abgefangen werden.

Im Randbereich der behandelten Tumoren dieser Gruppe zeigte sich in Synopsis der konventionellen Histologien und den immunhistochemischen Färbungen ein Saum von ca.

4-5 Lagen vitaler Tumorzellen. Insbesondere im Übergangsbereich zum darunter liegenden Muskelgewebe war diese Zellschicht besonders breit. Im Übergangsbereich des Tumors zur darüber liegenden Haut war die vitale Schicht dünner (ca. 2-3 Tumorzellagen), aber vorhanden. Die möglichen Gründe für ein Versagen der Therapie in diesen Bereichen sind vielfältig. Grundsätzlich spielt die Bestrahlungszeit, die in dieser Gruppe als eher kurz anzusehen ist, eine Rolle. Durch die Behandlung konnte offensichtlich in den Randbereichen keine ausreichend hohe Temperatur für eine ausreichend lange Zeit erreicht werden. Der Saum vitaler Tumorzellen im Übergangsbereich zur darüber liegenden Haut hat zudem wahrscheinlich einen weiteren Grund. Die Eiswasserkühlung der Hautoberfläche war, auch unter Berücksichtigung der weiter unten diskutierten Ergebnisse der anderen Behandlungsgruppen, derart effektiv, dass auch die oberste Schicht des Tumorgewebes auf subkoagulative, subtherapeutische Temperaturen abgekühlt wurde.

In den ausgewerteten Histologien der Behandlungsgruppe zeigte sich weiterhin eine massive inflammatorische Reaktion nach der Behandlung, welche die Randbereiche des Tumors allseitig umfasste. Diese leukozytäre Infiltration zeigte sich hingegen in der unbehandelten, nicht sensibilisierten, tumortragenden Kontrollgruppe nicht (s.o.). Die genaue zelluläre Zusammensetzung der entzündlichen Reaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings noch nicht untersucht. In Anbetracht der Ausprägung der entzündlichen Reaktion ist allerdings die Induktion einer spezifischen Immunantwort auf Tumorbestandteile, welche durch die Behandlung freigesetzt wurden, durchaus denkbar, zu diesem Zeitpunkt allerdings noch von einem rein spekulativen Charakter und wird durch die vorliegenden Daten noch nicht unterstützt. Sollte allerdings diese Theorie zutreffen, so könnten die beschriebenen vitalen Tumorzellen nach Behandlung im weiteren Verlauf durch sensibilisierte Lymphozyten abgeräumt bzw. abgetötet werden. Dieser Mechanismus einer induzierten spezifischen Immunantwort auf einen behandelten malignen Tumor durch eine Phototherapie wurde bereits bei der photodynamischen Therapie postuliert und auch nachgewiesen (Korbelik und Dougherty, 1999; Gollnick et al., 2006).

Zum zweifelsfreien Nachweis der Induktion einer spezifischen immunologischen Antwort gegen Tumorbestandteile müssen die genauen Mechanismen allerdings bei der PTT noch eingehend sowie ausführlich untersucht werden und eine detaillierte zelluläre Differenzierung der Leukozytensubpopulationen muss erfolgen. Diese weiterführenden Versuche könnten gegebenenfalls eine immunologische spezifische Sensibilisierung gegen Tumorbestandteile nachweisen, welche sich klinisch in einem ausbleibendem erneuten Tumorwachstum nach einer PTT-Behandlung trotz primär persistierender vitaler

Tumorzellen zeigen würde. Langzeitversuche sollten somit einen Kernpunkt für wünschenswerte weitere Untersuchungen in diesem Forschungsgebiet darstellen.

4.4.2 Bestrahlungsstärke 30 Wcm⁻² und Bestrahlungszeit 15 Sekunden

Die Behandlungsergebnisse bei einer Bestrahlungsstärke von 30 Wcm⁻² und einer Bestrahlungszeit von 15 Sekunden weisen gegenüber den vorher beschriebenen Ergebnissen einige Veränderungen auf.

Die wichtigste Veränderung ist, dass sich das induzierte Nekroseareal erwartungsgemäß in den ausgewerteten Histologien auf durchschnittlich 95% des Tumorgesamtvolumens vergrößert hat. Diese Beobachtung ist direktes Resultat der verlängerten Bestrahlungszeit. Trotzdem finden sich auch in den Histologien dieser Behandlungsgruppe keine Schäden der durchstrahlten Haut bzw. der Hautanhangsgebilde, wie die morphologischen Untersuchungen anhand der konventionellen Histologien und die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen zeigen. Die immunhistochemischen Untersuchungen mit dem proliferationsassoziierten Antikörper TEC3 zeigen stark proliferierende Haarbälge und eine proliferierende Epidermis. Reparative Vorgänge in der Haut oder inflammatorische Infiltrate in den immunhistochemischen Untersuchungen mit dem panleukozytären Marker CD45 lassen sich in der Haut und den umgebenden Weichgewebestrukturen nicht nachweisen. Weiterhin ist auch hier der thermische Schaden selektiv auf das Tumolvolumen begrenzt. Somit liegt ein selektiver, großer, thermisch induzierter Schaden des Tumorgewebes vor. Im Übergangsbereich zum unter dem Tumor befindlichen Muskelgewebe findet man nun morphologisch und in den immunhistochemischen Färbungen keine vitalen Tumorzellen mehr. Diese Beobachtung kann ebenfalls über die verlängerte Bestrahlungszeit erklärt werden, welche eine stärkere Temperaturerhöhung für eine längere Zeit in den tiefer liegenden Tumorschichten hervorrufen konnte. Im Vergleich zu den bereits diskutierten Ergebnissen der vorherigen Behandlungsgruppe ist das ein klarer Fortschritt: Erhöhung des induzierten Nekrosevolumens bei absoluter Schonung des umliegenden Weichgewebes.

Im Übergangsbereich zur über dem Tumor liegenden Haut mit den Hautanhangsgebilden finden sich allerdings auch in dieser Behandlungsgruppe verbliebene vitale Tumorzellen. Die Schichtdicke beträgt nun nur noch maximal eine Zelllage. Wiederum ist die wahrscheinlichste Erklärung für das Überleben einzelner Zellen in diesem Areal die

angewandte Eiswasserkühlung, welche die Temperatur in den oberflächlichen Tumorschichten im subkoagulativen Bereich gehalten hat.

Eine ausgeprägte inflammatorische Reaktion auf die Behandlung und die große Nekrose lässt sich auch hier morphologisch und in den immunhistochemischen Färbungen mit dem panleukozytären Marker CD45 nachweisen. Einziger Unterschied der entzündlichen Reaktion dieser Behandlungsgruppe zu der vorher beschriebenen Reaktion ist eine nun zu beobachtende stärkere direkte Infiltration auch des nekrotischen Tumorgewebes inklusive des Tumorzentrums. Ansonsten umfasst die inflammatorische Reaktion das nekrotische Tumorgewebe von allen Seiten. Auch hier sei noch einmal darauf hingewiesen, dass sich eine inflammatorische Reaktion in den tumortragenden Kontrollgruppen nicht nachweisen ließ, d.h. völlig fehlte.

Die Beobachtungen der Reaktion des Immunsystems der Maus auf die Behandlung lässt auch in dieser Gruppe die z.Zt. noch rein spekulative Theorie einer induzierten spezifischen Immunantwort möglich erscheinen, wie sie oben bereits kurz dargestellt wurde.

4.4.3 Bestrahlungsstärke 30 Wcm⁻² und Bestrahlungszeit 20 Sekunden

Die Behandlungsergebnisse bei einer Bestrahlungsstärke von 30 Wcm⁻² und einer Bestrahlungszeit von 20 Sekunden weisen einige Veränderungen gegenüber den bereits diskutierten Ergebnissen auf.

Anfänglich ist hier eine inhomogene Koagulationsnekrose zu nennen, die große Teile der untersuchten Tumoren erfasst. Dabei finden sich im Tumorzentrum noch zellkernähnliche Strukturen. Bei näherer Betrachtung ist allerdings ein eindeutiger irreversibler Schaden der Tumorzellen zu erkennen. Dabei lassen sich keine eindeutigen Zellgrenzen mehr erkennen und die beschriebenen kernähnlichen Strukturen stellen sich als Zellkernrümpfer dar. Die Nekrose umfasst dabei im Mittel 99% des Tumorumfanges. Gründe für diesen eindeutigen Unterschied im Vergleich zu den bereits beschriebenen Ergebnissen lassen sich nicht eindeutig finden. Die Veränderung ist aber am wahrscheinlichsten Resultat der längeren Bestrahlungsdauer, da diese Variable die einzige ist, die in dieser Versuchsgruppe verändert wurde. Auf Grund der Einzigartigkeit und Neuartigkeit der hier angewandten Methode der Tumorbehandlung ließen sich in der Literatur keine eindeutigen Erklärungen für das beschriebene Phänomen finden.

Weiterhin besteht aber kein Zweifel an der Irreversibilität der Tumorzellnekrose. Sie zeigt sich morphologisch wie auch in den immunhistochemischen Untersuchungen.

Morphologisch wie auch immunhistochemisch zeigen sich aber auch in dieser Behandlungsgruppe vereinzelt vitale Tumorzellen. Durch eine Verlängerung der Bestrahlungsdauer sollten auch die letzten vitalen Zellen abgetötet werden. Dies gelang teilweise. So finden sich auch in dieser Behandlungsgruppe keine Tumorzellen in den tiefen Tumorschichten im Übergangsbereich zum Muskel (vgl. auch 4.4.2). In den oberflächlichen Schichten im Übergang zur darüber liegenden Haut konnte die in der vorigen Gruppe noch eine Zelllage starke Tumorzellschicht auf wenige vitale Zellen reduziert werden, die keine zusammenhängende Schicht mehr bilden. Somit bestand hier offensichtlich ein besseres Verhältnis zwischen Bestrahlungsstärke und Kühlung der Hautoberfläche.

In dieser Gruppe kam es bei einem einzelnen Tier im Randbereich des Tumors zum morphologischen und immunhistochemisch nachgewiesenen Auftreten von einem kleinen vitalen Tumorzellnest, welches sich in der Nähe zu einem größeren Gefäß befand. Das Überleben der Zellen kann unserer Meinung nach in diesem Bereich auf folgendem Umstand begründet sein. Auf Grund der Morphologie der Tumoren, welche die Haut mit einem ausgeprägten Steigungswinkel in den Randbereichen auf ein deutlich erhabenes Plateau von im Mittel 5 mm Höhe über dem allgemeinen „Hauthöheniveau“ aufwerfen, kann es in den Randbereichen durch Streuung zu einer Reduktion der Bestrahlungsstärke kommen. Die Bestrahlungsstärke wurde in diesem Fall durch eine sehr steile Seitenwand des Tumors, welche eine Abschattung der Randbereiche des Tumors bedingte, weiter reduziert. Des Weiteren bedingt die Nähe zu größeren Gefäßen einen Überlebensvorteil für die Zellen. Das größere Gefäß stellte sich in allen Histologien nicht thrombosiert nach der Behandlung dar. Ein Blutfluss – auch während der Bestrahlung - sorgt für eine raschere Abkühlung der Areale per Konvektion, so dass dies den Behandlungseffekt schmälern kann. Darüber hinaus sorgen Gefäße durch raschen Abtransport saurer Metabolite sowie durch die konstante Bereitstellung von Nährstoffen und Sauerstoff für eine bessere metabolische Situation der umgebenden Zellen.

Zur Effektivitätssteigerung der angewandten Methode erwogen wir ebenfalls eine weitere Verlängerung der Bestrahlungsdauer. Bei deutlicher Verlängerung der Bestrahlungszeit hätte dies wahrscheinlich auf Grund der vorliegenden Ergebnisse und unserer allgemeinen Überlegungen im Vorfeld zu diesen Versuchen negative Auswirkungen auf die Selektivität der Methode mit größeren Schäden der umliegenden, gesunden Gewebe. Eine geringfügige Verlängerung der Bestrahlungsdauer dürfte hingegen keinen Effekt auf die Selektivität der Methode haben. Somit wären Ergebnisse bei einer Bestrahlung von 30 Wcm^{-2} für 25 Sekunden und länger für zukünftige Versuche wünschenswert, da hiermit der Übergangspunkt einer selektiven zu einer nicht-selektiven Therapie besser definiert

werden könnte. Des Weiteren könnte der dann auftretende Umgebungsschaden quantifiziert und qualifiziert werden und die Frage geklärt werden, ob ein marginaler Schaden gesunden Gewebes vertretbar wäre, wenn dabei das Tumorgewebe komplett zerstört werden könnte. Diese Ergebnisse wären im Hinblick auf die Anwendung der Therapie am Menschen wünschenswert, um später auch klinisch definitive Aussagen über Nebenwirkungen und damit Aussagen über die therapeutische Breite der PTT treffen zu können. In den hier beschriebenen Versuchen konnten wir einen durchweg selektiven therapeutischen Effekt beobachten. Dies hatten unsere mathematischen Abschätzungen korrekt vorausgesagt.

Abschließend konnte auch in dieser Behandlungsgruppe eine ausgeprägte entzündliche Reaktion mit den immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen werden. Diese umfasst den Tumor schalenartig von allen Seiten und infiltriert auch das Tumorzentrum.

4.5 Auswertung der Nekroseareale

Die Auswertung der induzierten Nekroseareale in den einzelnen Behandlungsgruppen veranschaulicht deutlich den erreichten Therapieerfolg mit der hier zum Einsatz gekommenen Methode.

Gegenüber den Kontrollgruppen mit mittleren Spontannekrosengrößen im Tumorgewebe von 2,1%, 0,1% und 2,2% weisen alle Behandlungsgruppen mit induzierten Nekrosengrößen von 92,3%, 94,4% und 99,4% im Tumorgewebe signifikante Unterschiede auf. Die Größe der induzierten Nekrosen ist dabei bei konstanter Bestrahlungsstärke direkt abhängig von der Bestrahlungszeit. Bei Einsatz einer Bestrahlungsstärke von 30 Wcm^{-2} für 10 Sekunden konnte im Mittel eine Nekrose von 90% des Tumolvolumens induziert werden. Bei einer Bestrahlungszeit von 15 Sekunden erhöhte sich die Nekrosengröße auf einen Mittelwert von 95% und bei einer Bestrahlungszeit von 20 Sekunden auf gar 99% des Tumolvolumens. Durch weitere Steigerung der Bestrahlungszeit könnte wahrscheinlich eine Totalnekrose des Tumors erreicht werden. Dies könnte allerdings auch, wie bereits kurz angesprochen, zu einer Reduktion der Selektivität der Methode mit Schädigung von gesundem Umgebungsgewebe führen. Eine Erhöhung der Bestrahlungsstärke wäre theoretisch auch möglich, dann könnte die Bestrahlungszeit wieder kürzer gewählt werden. Ein Laser mit noch höherer Ausgangsleistung bei der benötigten Wellenlänge von 830 nm stand aber für diese Untersuchungen nicht zur Verfügung. Somit ist eine Behandlung bei einer Bestrahlungsstärke von 30 Wcm^{-2} und einer Bestrahlungszeit von 20 Sekunden laut den

hier präsentierten Ergebnissen z.Zt. am effektivsten, um große Tumoreareale selektiv zu schädigen.

In den Kontrollgruppen fanden sich bei den Tumorgößen, welche auch in den Behandlungsgruppen verwendet wurden, keine größeren Spontannekrosen.

Somit belegt diese Auswertung, dass die beobachteten Nekrosen in den Behandlungsgruppen auf die verwendete Therapie zurückzuführen sind.

In den Behandlungsgruppen kam es auch bei Verwendung der längsten Bestrahlungszeit von 20 Sekunden, wie oben beschrieben und diskutiert, zu keinem Auftreten unspezifischer Schädigung auch von Normalgewebe. Des Weiteren konnten auch keine weiteren eventuellen Nebenwirkungen der Therapie an den Tieren erkannt werden.

Wie oben ebenfalls bereits angesprochen, wären für weitere Untersuchungen in diesem Gebiet eine Exploration der Nebenwirkungen bzw. des „Umschlagspunktes“ einer selektiven zu einer unselektiven Therapie wünschenswert. Insbesondere im Hinblick auf die mögliche Anwendung dieser Therapie am Menschen würden aus solchen Untersuchungen wertvolle Schlussfolgerungen gezogen werden können.

4.6 Die farbstoffgestützte Photothermotherapie im Vergleich

Die in dieser Promotionsarbeit dargestellte Methode der farbstoffgestützten Photothermotherapie (PTT) weist gegenüber bereits im klinischen Einsatz befindlichen anderen Phototherapien wie der photodynamischen Therapie (PDT), der Laser induzierten interstitiellen Photothermotherapie (LITT) und der selektiven Photothermolysen (SPT) diverse Vorteile auf bzw. vereint die Vorteile der einzelnen Therapien in sich.

Im Folgenden sollen die Charakteristika der einzelnen Phototherapien kritisch mit der PTT verglichen werden. Zunächst möchte ich auf die Eigenschaften der PDT eingehen.

Das Ziel einer kurativen photodynamischen Therapie unter onkologischen Bedingungen ist die vollständige Zerstörung des Tumorgewebes. Dies kann zum einen über eine direkte Zerstörung der Tumorzellen erreicht werden (primäre Zytotoxizität) oder zum anderen durch Beeinflussung bzw. Zerstörung der Blutversorgung und / oder Induktion einer immunologischen Reaktion auf Tumorbestandteile (sekundäre Zytotoxizität) oder durch eine Kombination beider Mechanismen. Um die photodynamische Therapie erfolgreich einsetzen zu können müssen die Tumoren allerdings bestimmte Charakteristika aufweisen. Primär einzelne Tumoren des Stadiums T_{is} , $T_1N_0M_0$ und $T_2N_0M_0$ sind optimal für eine erfolgreiche photodynamische Therapie, allerdings können auch große Areale oberflächlicher präkanzeröser oder maligner Veränderungen und multifokale maligne Veränderungen erfolgreich behandelt werden. Des Weiteren sollten sich die

Veränderungen ganz allgemein auf Oberflächen befinden. Dabei ist der einfachste Zugang unter diesen Voraussetzungen zur Hautoberfläche gegeben. Eine photodynamische Therapie von Hohlorganen, z.B. der Harnblase oder des Ösophagus, mit einer Applikation des Lichtes über ein Endoskop mit dem jeweiligen organangepassten Lichtapplikator, ist allerdings ebenfalls eine bereits etablierte Methode. Tiefer eindringende Tumoren können z.B. durch eine primäre Exzision des Tumors mit nachfolgender photodynamischer Therapie des Tumorbettes oder durch eine interstitielle photodynamische Therapie erfolgreich behandelt werden.

Allerdings gibt es auch Tumoren, welche resistent gegen die photodynamische Therapie sind. Dies liegt zum einen an der Sauerstoffabhängigkeit der photochemischen Prozesse, welche die Grundlage der photodynamischen Therapie darstellen (siehe 1.1). So gibt es in schnell proliferierenden Tumoren hypoxische oder anoxische Areale, in denen Sauerstoff nicht vorhanden oder unter 2% vorhanden ist (Mitchell et al., 1985). Eine klinische Sauerstoffdruckmessung im zu behandelnden Gewebe vor einer photodynamischen Therapie kann sogar eine prognostische Aussage über den Erfolg einer Behandlung machen (Vaupel et al., 1989; Tromberg et al., 1990) und eine Steigerung des Sauerstoffdruckes im Gewebe vor Behandlung kann zu einem verbesserten Ergebnis führen (Jirsa Jr. et al., 1991). Die wahrscheinlich größte Einschränkung der photodynamischen Therapie ist aber die begrenzte Eindringtiefe des eingesetzten roten Lichtes in das Gewebe (Anderson und Parrish, 1981). Die eingesetzten Wellenlängen reichen dabei von 630 nm für Photofrin® bis zu 700 nm für Photosensibilisatoren der zweiten Generation, z.B. Benzoporphyrinderivate (BPD) oder Phthalocyanine. Die Dicke der behandelten Tumoren darf somit 4 mm für den kurzwelligen Spektralbereich und maximal 6 mm für den langwelligen Spektralbereich nicht überschreiten, um eine komplette Remission nach Behandlung zu erreichen. Anzumerken ist, dass eine begrenzte Eindringtiefe bei der PDT teilweise gewünscht ist und klinisch mit grünem Licht zur Behandlung von oberflächlichen Läsionen wie z.B. dem Barrett-Ösophagus zur Vermeidung von Perforationen ausgenutzt wird.

Als Schwachpunkte der photodynamischen Therapie kann man somit die Sauerstoffabhängigkeit der rein photochemischen Reaktionen sowie eine begrenzte Tiefenwirkung im Gewebe (maximal 6 mm) festhalten, welche die Einsatzmöglichkeit auf oberflächliche Läsionen begrenzt. Des Weiteren kann es bei einigen Photosensibilisatoren noch Tage bis Wochen nach Applikation bei übermäßiger Sonnenbestrahlung zu phototoxischen Reaktionen kommen. Dies bedeutet, dass sich die Patienten bei entsprechendem Photosensibilisator über einen langen Zeitraum vor direkter Sonneneinstrahlung schützen müssen.

Stärken der photodynamischen Therapie sind hingegen die Selektivität des induzierten photochemischen Schadens sowie die mögliche Induktion einer Immunität bzw. einer immunologischen Reaktion auf Tumorbestandteile.

Typische Behandlungsparameter der PDT sind eine relativ geringe Bestrahlungsstärke von 50 bis 200 mWcm⁻² und eine Lichtdosis von 50 bis 200 Jcm⁻². Im Vergleich zu anderen Phototherapien ist diese Bestrahlungsstärke gering und wird über einen verhältnismäßig langen Zeitraum appliziert. Die Gründe für die Anwendung von solchen Bestrahlungsparametern liegen in den photochemischen Reaktionen, auf denen die Wirkungsweise der PDT beruht. Wie in der Einleitung angesprochen, ist die PDT zwingend an das Vorhandensein von einer ausreichend hohen Konzentration von Sauerstoff im Gewebe angewiesen, um wirken zu können. Die Bestrahlung mit einer relativ geringen Bestrahlungsstärke über einen langen Zeitraum gewährleistet das nachdiffundieren von Sauerstoff in das Behandlungsgebiet. Würde die Bestrahlungsstärke weiter erhöht werden, würde dies den vorhandenen Sauerstoff zu schnell verbrauchen, neuer Sauerstoff könnte nicht schnell genug nachströmen und damit würde der Effekt der Methode nicht gesteigert werden können. Bei zu hoher Bestrahlungsstärke würde es sogar zum vermehrten Auftreten von unspezifischen Effekten wie die Schädigung von gesundem Gewebe durch unspezifische Absorption kommen. Somit ist die Einhaltung der Bestrahlungsparameter für die Anwendung der PDT äußerst wichtig. Des Weiteren muss die Bestrahlungsstärke immer auch der Situation angepasst werden, da insbesondere maligne Tumoren einen viel geringeren Sauerstoffgehalt im Gewebe aufweisen (bedingt durch den erhöhten Metabolismus) als gesundes Normalgewebe.

Die hier vorgestellte PTT ist in Anlehnung an die PDT in der Lage, einen selektiven Schaden zu induzieren, der nur erkranktes Gewebe erfasst. Gleichzeitig scheint auf Grund unserer Ergebnisse die Induktion einer spezifischen Immunität gegen Tumorbestandteile, wie sie bereits für die PDT nachgewiesen wurde (Korbelik 1996, Hendrzak-Henion et al., 1999, Korbelik und Dougherty 1999; Gollnick et al., 2006), nach Durchführung einer PTT aufzutreten. Dieses Phänomen bedarf jedoch noch weiterer Klärung bzw. weiterer Untersuchungen.

Nachteilige Eigenschaften der PDT weist die PTT hingegen nicht auf. Die PDT ist auf Grund der photochemischen Reaktionen sauerstoffabhängig, was die Effektivität in hypoxischen Tumorarealen deutlich reduziert. Des Weiteren weist die PDT auf Grund der verwendeten Farbstoffe und der damit verbundenen einsetzbaren Wellenlängen des Laserlichtes eine begrenzte Tiefenwirkung von max. 6 mm Eindringtiefe auf. Somit ist die PDT auf die Anwendung oberflächlicher Veränderungen begrenzt. Die PTT hingegen

induziert durch den Einsatz von Licht im nahen Infrarot einen selektiven, nicht-sauerstoffabhängigen Schaden bei deutlich verbesserter Tiefenwirkung von bis zu 1,5 cm. Die Anwendung der PTT bei Übertragbarkeit auf den Menschen wäre somit nicht auf oberflächliche Läsionen begrenzt, sondern könnte auch, wie in den hier vorgestellten Versuchen, Zielgewebe erreichen, welches unter Schichten von gesundem Gewebe verborgen liegt. Beim Vergleich der zum Einsatz kommenden Bestrahlungsparameter der PDT und der PTT zeigt sich, dass bei der PTT deutlich höhere Bestrahlungsstärken zum Einsatz kommen. Dies liegt wiederum daran, dass die PTT nicht wie die PDT auf das Vorhandensein von Sauerstoff angewiesen ist, um wirken zu können sondern den Effekt über die direkte Umwandlung der Photonenenergie in Wärme erreicht. Somit ist die PTT auch als deutlich effektiver bei der Behandlung von Geweben mit einem niedrigen Sauerstoffgehalt einzustufen was bei der Tumor- und Metastasentherapie ein großer Vorteil ist.

Die LITT wird wie die PDT in der Klinik bereits in vielen Bereichen eingesetzt. Häufig findet diese Art der Laserbehandlung Anwendung in der palliativen Therapie von Lebermetastasen (z.B. kolorektaler Karzinome). Aber auch in anderen Gebieten wie z.B. Hirnmetastasen oder zur Behandlung von venösen Malformationen wird sie angewendet. Die Grenzen der LITT ergeben sich aus den in Kapitel 1.2 besprochenen Charakteristika dieser Behandlung. Die klinische Handhabung der LITT ist komplex. Der Lichtleiter (oder auch mehrere Lichtleiter) muss am Beispiel von Lebermetastasen perkutan oder laparoskopisch bis in das Zielvolumen vorgeschoben werden. Dabei muss die Lage der Faser exakt bestimmt und festgehalten werden, was zurzeit ein Gegenstand vieler Untersuchungen ist. Als ein geeignetes Instrument hat sich z.B. die Magnetresonanztomographie gesteuerte LITT erwiesen (Vogl et al., 2001), welche aber mit einem hohen apparativen und zeitlichen Aufwand vor und während der Behandlung verbunden ist. Ein weiterer sehr wichtiger Nachteil der LITT ist der nicht selektive Schaden der Behandlung. Das die Laserfaser oder den Applikator umgebende Gewebe wird unspezifisch auf Grund der Gewebeabsorption (siehe 1.2) koaguliert, d.h. auch gesundes, nicht entartetes Gewebe wird geschädigt.

Ein Vorteil der LITT im Gegensatz zur PDT ist die sauerstoffunabhängige photothermische Reaktion. Ein Sauerstoffmangel, wie er häufig in Tumoren vorherrscht (s.o.) beeinträchtigt somit nicht das Behandlungsergebnis der LITT. Des Weiteren ist die hohe Eindringtiefe des in der LITT verwendeten infraroten Lichtes vorteilhaft, da so große Gewebelumina effektiv koaguliert werden können.

Vorteilhafte Eigenschaften der LITT werden durch die PTT ebenfalls aufgegriffen. Die LITT stellt eine sauerstoffunabhängige Methode dar, ihre Wirkung ist photothermischer Natur. Diese Eigenschaften finden sich in der PTT wieder. Des Weiteren wird die hohe Eindringtiefe des in der LITT verwendeten infraroten Lichtes auch in der PTT in Form von tief penetrierendem Licht im nahen Infrarot angewendet.

Die Nachteile der LITT mit der sehr aufwändigen Handhabung sowie der Induktion eines nicht-selektiven Schadens teilt die PTT hingegen nicht. Die PTT induziert einen selektiven Schaden und kann mit einer im Vergleich recht simplen Handhabung überzeugen, wobei keine aufwändige Bildgebung der Zielregion nötig wäre.

Eine weitere Photothermotherapie die bestimmte vorteilhafte Eigenschaften aufweist, welche sich wiederum in der PTT widerspiegeln, ist die SPT.

Die SPT, wie sie erstmals von Anderson und Parrish 1983 beschrieben wurde, verfügt ebenfalls über eine Reihe von positiven Charakteristika. Die SPT ist auf das Vorhandensein von endogenen, natürlichen Absorbern angewiesen. Zur Induktion eines selektiven thermischen Schadens mit der SPT wird eine hohe Bestrahlungsstärke und eine kurze Bestrahlungszeit verwandt, die an die thermische Relaxationszeit der Zielstruktur angepasst sein muss. Wie lange ein bestimmtes Temperaturniveau in der Zielstruktur gehalten werden muss um einen irreversiblen thermischen Schaden zu induzieren kann mit Hilfe des Arrhenius-Formalismus bestimmt werden. Die Selektivität der Methode beruht auf der höheren Absorption der Zielstruktur.

Die SPT überzeugt durch eine einfache perkutane Handhabung, durch die Induktion eines selektiven thermischen Schadens sowie durch die Sauerstoffunabhängigkeit der Methode. Mit der SPT lassen sich elegant und einfach pigmentierte Strukturen, wie z.B. Haarbälge (Sanchez et al., 2002) oder Gefäßmalformationen, behandeln.

Der große Nachteil der SPT besteht darin, dass die Zielstruktur gegenüber der Umgebung stärker pigmentiert sein muss. Nicht- pigmentierte Strukturen, welche den Hauptteil der dermalen Veränderungen darstellen, lassen sich durch diese Methode nicht behandeln. Das Behandlungsspektrum schließt somit auch onkologische Patienten mit nicht pigmentierten Tumoren aus. Pigmentierte Tumoren könnten theoretisch mit der SPT behandelt werden, allerdings sollten insbesondere maligne Tumoren immer primär chirurgisch behandelt werden (z.B. malignes Melanom) da die SPT niemals an die Radikalität einer Operation mit den geforderten Sicherheitsabständen heranreichen kann. Zudem ist es denkbar, dass Tumorzellen die SPT überleben oder im schlimmsten Fall sogar gestreut werden. Eine Anwendung der SPT bei malignen pigmentierten Tumoren sollte somit erst als palliativer Eingriff in Betracht gezogen werden, wenn z.B. eine

Metastasierung schon weit fortgeschritten ist. Das primäre Einsatzgebiet der SPT ist daher nicht im onkologischen Bereich zu sehen sondern in Bereichen wie der Entfernung von Besenreiservarizen oder allgemein der Behandlung von Venenerkrankungen oder der Entfernung von Haaren.

Es wurde allerdings versucht, mit herkömmlichen Farbstoffen eine Absorptionserhöhung in soliden nicht-pigmentierten Tumoren für die SPT herbeizuführen – allerdings mit nur mäßigem Erfolg (Chen et al., 1996; Prudhomme et al., 1996; Chen et al., 1997). Die PTT hingegen mit dem Farbstoff Palladium-Octabutoxynaphthalocyanin schließt diese Behandlungslücke. Mit ihr können auch primär nicht-pigmentierte Strukturen selektiv thermisch geschädigt werden.

Die Methoden der SPT und der PTT haben ein paar gemeinsame Eigenschaften wie die Induktion eines selektiven thermischen Schadens und die Unabhängigkeit von Sauerstoff im zu schädigenden Gewebe. Allerdings ist die PTT auch in der Lage primär alle nicht-pigmentierten Strukturen zu schädigen. Die Behandlungsparameter unterscheiden sich allerdings deutlich. In der SPT kommen Lichtdosen für die Verödung von Besenreiservarizen von 100 bis 200 Jcm^{-2} bei einer Bestrahlungsdauer von 10 bis 100 ms zum Einsatz. In der PTT wird eine Bestrahlungsstärke von 30 Wcm^{-2} für 10 bis 20 Sekunden eingesetzt. Diese Unterschiede, bei ansonsten sehr ähnlichen Mechanismen der Methoden, beruhen auf der Größe der zu schädigenden Zielstrukturen. Wo in der SPT nur kleinere Blutgefäße oder Haarbälge geschädigt werden, die eine geringe Masse und einen geringen Querschnitt aufweisen, werden in der PTT Tumoren mit einem Volumen von bis zu 250 mm^3 bestrahlt. Es ist einleuchtend, dass eine kleinvolumige Zielstruktur deutlich weniger Energie aufnehmen muss um einen koagulativen Temperaturbereich für einen ausreichend langen Zeitraum zu erreichen um irreversibel geschädigt zu werden als eine großvolumige Struktur wie ein subkutan lokalisierter Tumor.

Eine zurzeit ebenfalls noch in der Entwicklung befindliche Konkurrenzmethode zur PTT ist die Nanoshell-assistierte Photothermotherapie (NAPT). Hierbei werden Nanopartikel zur Absorptionssteigerung im Zielgewebe eingesetzt (siehe 1.4).

Zur Anwendung der Nanoshells in einer laserinduzierten Photothermotherapie *in vivo* gibt es bisher zwei unterschiedliche Ansätze. In einer ersten Studie wurde eine definierte Menge einer Nanoshell-Lösung perkutan in einen subkutanen Tumor appliziert (Hirsch et al., 2003). Bei dem Tumor handelte es sich um einen übertragbaren Geschlechtstumor des Kaninchens (sog. „CTVT cells“ oder canine transmissible venereal tumor cells“). Dieser wurde bei sechs weiblichen, immuninkompetenten Mäusen in Form einer

Zellsuspension (0,25 ml) subkutan im Bereich des rechten und linken Hinterlaufs injiziert und bis zu einer Tumorgröße von ca. 1 cm im Durchmesser wachsen gelassen. Hatte der Tumor die entsprechende Größe erreicht, erfolgte auf einer Seite eine interstitielle Injektion von 20-50 μ l Nanoshell-Lösung in einer Tiefe von schätzungsweise 5 mm im Tumolvolumen und auf der Gegenseite die Injektion einer entsprechenden Menge Kochsalzlösung als Kontrolle. Die Behandlung wurde bereits 5 bis 30 Minuten nach Injektion durchgeführt und erfolgte mit einem Diodenlaser bei einer Wellenlänge von 820 nm, bei einer Bestrahlungsstärke von 4 Wcm^{-2} , einem Strahldurchmesser von 5 mm und einer Bestrahlungszeit von <6 Minuten ohne Hautkühlung. Gezeigt werden konnte, mit Hilfe einer magnetresonanztomographischen Auswertung, dass es zu einer nur sehr oberflächlichen maximalen Temperaturzunahme bei den nanoshellbehandelten Tumoren um durchschnittlich $37,4 \text{ }^\circ\text{C}$ in einer Tiefe von 1 mm von der Hautoberfläche kam. In der Bestrahlung der Kontrollen erwärmten sich die Tumoren hingegen nur um durchschnittlich $9,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Histologische Resultate zeigten in den nanoshellbehandelten Tumoren einen thermisch induzierten Schaden wohingegen die Kontrolltumoren keine Veränderungen aufwiesen. Dieser thermische Schaden erstreckte sich allerdings nur bis zu einer Tiefe von bis zu 4 mm, was insgesamt nur einen kleinen Teil des Gesamttumolvolumens ausmachte. Die komplette Zerstörung des gesamten Tumorgewebes war in diesen ersten Untersuchungen nicht das Ziel und wurde auch nicht weiter untersucht.

Im Vergleich zu den hier präsentierten Ergebnissen der PTT sind die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe zur NAPT äußerst vage und dürftig und ermöglichen es nicht das Potential der NAPT wirklich abzuschätzen. In diesen ersten Versuchen konnte lediglich gezeigt werden, dass durch die Bestrahlung in Kombination mit dem Einsatz von Nanoshells ein kleiner thermischer Schaden im Tumorgewebe induziert werden kann. Ob dieser Schaden selektiv für das Tumorgewebe ist und ob diese Methode überhaupt in der Lage ist in dieser Form das gesamte Tumorgewebe zu zerstören – eine Antwort auf diese wichtigen Fragen bleiben diese ersten Versuche, die letztendlich nur beweisen, dass die Nanoshells die Laserbehandlung eines nicht-pigmentierten Tumors ein klein wenig effektiver machen, schuldig. Die Ergebnisse PTT sind hingegen eindeutig und unterstreichen das große Potential dieser neuartigen Therapieform.

Eine weitere Arbeitsgruppe injizierte zur Tumorthapie eine Nanoshell-Lösung systemisch in eine Schwanzvene (O'Neal et al., 2004). Zur Applikation in die Schwanzvene mussten die Nanoshells weiter modifiziert werden, um eine höhere Biokompatibilität zu gewährleisten. Dabei wurde über die dünne Metallschicht eine zusätzliche Schicht Polyethylenglycol aufgebracht, welche immunologische Reaktionen unterdrückt und damit die Verweildauer der Nanoshells im Blutkreislauf signifikant erhöht

(O'Neal et al., 2004; Chen und Scott 2001; Harris et al., 2001). Eine selektive Anreicherung der Nanoshells wie auch von dem von uns verwendeten PdNc(OBu₈) im zu behandelnden Tumor ist durch die einzigartigen Eigenschaften der tumorversorgenden Gefäße gewährleistet. Frühere Forschungsarbeiten zur Verteilung von Makromolekülen und kleineren Partikeln durch die Tumorgefäße zeigten eine Extravasation und Akkumulation von Makromolekülen und kleineren Partikeln im Größenbereich von 60-400nm über einen passiven Mechanismus im Tumorgewebe (Kong et al., 2000; Ishida et al., 1999; Litzinger et al., 1994; Yuan et al., 1994; Hobbs et al., 1998). Dieser Effekt wurde „gesteigerter Permeabilitäts- und Retentionseffekt“ benannt (Maeda 2001; Maeda et al., 2003). Er beruht auf den besonderen Charakteristika der tumorversorgenden Gefäße mit großen interendothelialen Verbindungen, einer inkompletten oder sogar fehlenden Basalmembran, einem nicht funktionierendem lymphatischen System und einer großen Anzahl von transendothelialen Kanälen (Ishida et al., 1999; Dvorak et al., 1988). Da die Nanoshells im Größenbereich dieser untersuchten Moleküle liegen, zeigen auch sie eine selektive Anreicherung im Tumorgewebe über den oben beschriebenen Effekt.

Als Tiermodell verwendete diese zweite Arbeitsgruppe 25 immunkompetente, weibliche BALB/cAnNHsd Albinomäuse im Alter von 5 bis 6 Wochen und einem Gewicht von 15 bis 20 g. Den Tieren wurden ca. $1,5 \times 10^5$ murine CT26.WT Kolonkarzinomzellen in einer Zellsuspension von 50 μ l subcutan im Bereich der rechten caudalen Flanke injiziert. Acht bis sechzehn Tage nach Inoculation der Tumorzellen, hatte der Tumor eine Größe von 3 bis 5,5 mm erreicht. Der maximale Tumordurchmesser von 5,5 mm wurde durch den Laserstrahldurchmesser – welcher 5,5 mm betrug – vorgegeben. Es erfolgte die zufällige Verteilung der Tiere in drei Gruppen; einer Behandlungsgruppe, einer Kontrollgruppe und einer Scheinbehandlungsgruppe, in denen die Tiere eine entsprechende Menge einer sterilen Kochsalzlösung injiziert bekamen.

In der Behandlungsgruppe befanden sich 7 Tiere, welche 100 μ l einer Lösung mit $2,4 \times 10^{11}$ Nanoshells pro Milliliter erhielten. Sechs Stunden nach Applikation der Lösung in die Schwanzvene erfolgte eine Bestrahlung der Behandlungs- und Scheinbehandlungsgruppe mit einem Diodenlaser bei einer Wellenlänge von 808 nm, einer Bestrahlungsstärke von 4 Wcm^{-2} und einer Bestrahlungszeit von 3 Minuten ohne Hautkühlung.

Die Arbeitsgruppe beobachtete im Folgenden leider lediglich das Wachstumsverhalten der Tumoren – eine histologische oder gar immunhistologische Auswertung der Behandlungsergebnisse wäre wünschenswert gewesen, erfolgte aber nicht. In der Behandlungsgruppe resorbierte sich die Tumormasse bis zum 10. Tag nach Bestrahlung vollständig, wohingegen in der Scheinbehandlungs- und Kontrollgruppe die Tumoren

rapide weiter wuchsen, so dass die Tiere dieser Gruppen am zehnten Tag nach Bestrahlung euthanisiert werden mussten. Die Behandlungsgruppe blieb bis zum 90. Tag nach Bestrahlung tumorfrei, so dass die weitere Beobachtung abgebrochen wurde.

Auch die Ergebnisse dieser zweiten Arbeitsgruppe lassen noch viele Fragen zur NAPT offen. Fraglich bleibt, da keine histologische Auswertung der Ergebnisse erfolgte, inwiefern der induzierte Schaden selektiv auf das Tumorgewebe beschränkt blieb und ob der induzierte Schaden das komplette Tumolvolumen erfasste. Ein selektiver Schaden ist äußerst unwahrscheinlich, da die verwendeten Bestrahlungsparameter die thermische Relaxationszeit des Zielgewebes deutlich überschreiten. Es wäre weiterhin interessant, auch im Hinblick auf die beschriebenen immunologischen Reaktionen bei der PDT und die denkbaren bei der PTT, ob auch bei der NAPT immunologische Reaktionen mit der möglichen Induktion einer spezifischen Immunität gegen Tumorgewebe eine Rolle spielen.

Auf Grund dieser wenig umfangreichen Ergebnisse (Hirsch et al., 2003; O`Neal et al., 2004) erscheint die NAPT in Ihren Charakteristika zwar grundsätzlich vergleichbar mit der PTT, allerdings sind diese ersten Ergebnisse noch mehrdeutig.

Im Vergleich zu den bereits besprochenen Anwendungsmöglichkeiten des Lasers in der Medizin, weist die NAPT wie die PTT einige interessante Eigenschaften auf. Vorteilhaft scheint zu sein, dass der induzierte Schaden sauerstoffunabhängig (wie bei der LITT und der SPT) ist und gleichzeitig scheint die NAPT – wenn sich die bisherigen Annahmen bestätigen – nicht auf endogene Absorber (wie die SPT) angewiesen zu sein. Sie scheint in der Lage zu sein einen thermischen Schaden in einem primär nicht pigmentierten Gewebe zu induzieren. Dabei werden ähnliche Wellenlängen wie bei der hier vorgestellten PTT verwandt. Inwiefern der thermisch induzierte Schaden wie bei der PTT auch selektiv ist, bleibt abzuwarten. Es bleiben allgemein noch viele Fragen zur NAPT offen: Welche Auswirkungen haben Nanoshells auf den Organismus? In welchen anderen Organen reichern sich Nanoshells an? Reichern sich Nanoshells z.B. auch in der Haut an? Oder im Muskelgewebe? Dies könnte die Selektivität des induzierten Schadens deutlich senken. Ist die NAPT weiterhin auch in der Lage Tumoren mit einem größeren Durchmessers effektiv und selektiv zu behandeln?

Die Methode der NAPT weist schon jetzt absehbare Nachteile gegenüber der Methode der PTT auf. Die Herstellung der Nanopartikel ist sehr aufwändig und kostenintensiv. Weiterhin sind die Auswirkungen von Nanopartikeln auf den menschlichen Organismus gänzlich unbekannt, auf Grund der Neuheit dieser Methode.

Neben dem Einsatz der Nanoshells in der NAPT gibt es weitere interessante Einsatzgebiete dieser Technologie wie z.B. in Kombination mit thermisch sensitiven

Polymeren als neuartige Form einer photothermisch gesteuerten Substanzapplikation (Sershen et al., 2000), über eine Koppelung an Oligonukleotide zur hochsensitiven Detektion von spezifischen Genabschnitten oder als neuartige Marker in hochsensiblen Analysen von Biomaterialien wie z.B. Blut unter Einsatz eines Lasers (West und Halas, 2003) oder als kontrastverstärkende Substanz in der optischen Kohärenz Tomographie (OCT) zur frühzeitigen Detektion von z.B. malignen Neoplasien (Loo et al., 2004).

Eine abschließende Bewertung dieser neuartigen Therapieform der NAPT zu den Einsatzbereichen bzw. den Grenzen ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt natürlich noch nicht möglich. Hierzu bedarf es noch weiterer grundlegender Forschungsarbeit, die unter anderem auch die Einsatzmöglichkeiten am Menschen klären muss.

Abschließend sollen an dieser Stelle noch die Arbeiten der Gruppe um Giulio Jori diskutiert werden, welche parallel zu uns eine Methode entwickelten, die der von uns durchgeführten Form einer Photothermotherapie ähnelt (Busetti et al., 1999; Camerin et al., 2005a; 2005b). Sie benutzten als Sensibilisator für eine Photothermotherapie Nickel(II)octabutoxynaphthalocyanin, welcher dem PdNc(OBu)₈ chemisch und in den physikalischen Eigenschaften (Absorptionspeak bei 850 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von 280 000 M⁻¹cm⁻¹ sowie Abgabe der aufgenommenen Energie hauptsächlich in Form von Wärme (Camerin 2005b)) ähnlich ist. Die Arbeitsgruppe konnte außerdem den Sensibilisator mit Hilfe eines Liposomen-Trägersystems für eine intravenöse Injektion verfügbar machen.

In vitro Versuche (Busetti et al., 1999) hatten gezeigt, dass der Sensibilisator in dieser Darreichungsform in der Lage ist in amelanotischen Melanomzellen zu akkumulieren, allerdings wurde im Vorfeld nicht geklärt, wie selektiv dieser Vorgang für Tumorzellen im Vergleich zu unveränderten Zellen ist.

Eine Anwendung der Methode *in vivo* wurde an fünf C57/BL6 Mäusen durchgeführt, die ein subcutanes amelanotisches Melanom mit einem Durchmesser von 0,4 bis 0,6 cm zum Behandlungszeitpunkt im Bereich der oberen Flanke aufwiesen (Camerin et al., 2005a). Eine pharmakokinetische Studie zum Verhalten des intravenös applizierten Sensibilisators im Organismus der Maus mit der besonderen Fragestellung der Ermittlung des Zeitverlaufes und des Ausmaßes einer selektiven Anreicherung des Sensibilisators im Tumor *versus* Normalgewebe wurde vorher nicht durchgeführt. Nachdem die Tumoren die erforderliche Größe erreicht hatten, wurden 1,8 mg/kg Körpergewicht Liposomen-inkorporiertes Nickel(II)octabutoxynaphthalocyanin in die caudale Schwanzvene injiziert. 24 Stunden danach erfolgte die Bestrahlung der sensibilisierten Tiere mit einem

Titan:Saphir Laser bei einer Wellenlänge von 850 nm und einer gepulsten Bestrahlung mit 30 ns Pulsen, 10 Hz mit 200 mJ/Puls für 140 Sekunden.

Ergebnis dieser Behandlung war eine kurzzeitige geringfügige Beeinträchtigung des Wachstumsfortschritts der Tumoren. Ein schnelles Fortschreiten des Tumorwachstums konnte aber letztendlich nicht verhindert werden. Die Auswirkungen dieser Form einer photothermischen Therapie wurden in den bisher veröffentlichten Ergebnissen auch nie histologisch untersucht, so dass die Induktion eines selektiven Schadens, der auf das Tumorgewebe begrenzt ist, reine Spekulation ist. Dies sollte und muss noch weitergehend untersucht werden.

Der wesentliche Unterschied zu unserem Ansatz einer photothermischen Therapie besteht in der Applikation von gepulster Strahlung, mit der eine Begrenzung des thermisch induzierten Schadens auf das Tumorgewebe erreicht werden sollte. Dieser Ansatz stützt sich auf die grundlegenden physikalischen Überlegungen zur SPT, wie sie in Kapitel 1.3 dargestellt sind. Sie besagen, dass ein thermischer Schaden nur dann selektiv auf das Zielgewebe begrenzt bleibt, wenn die Behandlung mit einer ausreichenden Bestrahlungsstärke für eine begrenzte Bestrahlungszeit erfolgt. Anderfalls – bei zu langer Bestrahlungszeit – wird auch umliegendes Gewebe durch Wärmediffusion geschädigt. Hierzu ist anzumerken, dass diese Überlegungen für die selektive Schädigung von kleinen Zielen gelten (z.B. Haarbälge oder Besenreisvarizen).

Wie hingegen in den von uns vorgelegten Ergebnissen dieser Arbeit zweifelsfrei gezeigt werden konnte, ist eine photothermische Therapie mit PdNc(OBu)₈ und einer kontinuierlichen Bestrahlung über einen angemessenen langen Zeitraum in der Lage, größere Ziele wie solide subkutane Tumoren durch eine transdermale Bestrahlung hoch selektiv und extrem effektiv zu behandeln. Weiterhin, wie aus persönlichen Mitteilungen der Arbeitsgruppe um Giulio Jori zu erfahren war, kam es in bis heute noch nicht veröffentlichten Versuchen durch die gepulste Bestrahlung zu massiven Gewebszerreißen. Durch den kurzen, intensiven Laserimpuls kommt es zur explosionsartigen Bildung von kleinen Wasserdampfblasen im Gewebe, die dann letztendlich zu einer Zerreißen der Gewebeschichten führen. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Therapie von malignen Tumoren äußerst nachteilig, da durch diesen Effekt eine Metastasierung von Tumorzellen erleichtert wird, welche in die entstandenen Gewebespalten eindringen könnten oder sogar über eröffnete Gefäße zu hämatogenen Metastasen führen könnten.

Zusammenfassend vereint die PTT viele Vorteile der vorgestellten etablierten Photothermotherapien in sich.

Die PTT:

- Ist eine sauerstoffunabhängige Methode (wie SPT, LITT und NAPT)
- Verwendet einen photostabilen, exogenen Sensibilisator (wie PDT und NAPT)
- Weist eine selektive Anreicherung des Sensibilisators im Tumorgewebe auf (wie PDT und NAPT)
- Ermöglicht die selektive Behandlung auch von nicht-pigmentierten Strukturen möglich (wie PDT und NAPT)
- Induziert einen photothermischen Schaden (wie LITT und NAPT)
- Ist kostengünstig und einfach zu handhaben (wie PDT und SPT)

4.7 Alternative Kühlmethoden

Neben der von uns in diesen Versuchen verwandten Methode zur Oberflächenkühlung mit Leitungswasser, welches durch den Einsatz von Eiswürfeln auf eine Ausflusstemperatur von ca. 4 °C heruntergekühlt wurde, werden in der Literatur diverse weitere Methoden beschrieben (Alora und Anderson, 2000; Zenzie et al., 2000; Klavuhn und Green, 2002). Beliebte Methoden zur Oberflächenkühlung, die von uns im Vorfeld auf ihre Anwendbarkeit in der PTT theoretisch und praktisch überprüft wurden, sollen hier kurz vorgestellt werden.

Ein oft verwandtes Verfahren ist z.B. das sog. Sprayverfahren, bei dem eine Flüssigkeit vor, während oder auch noch nach dem Lasereinsatz zur Oberflächenkühlung eingesetzt wird. Diese Flüssigkeit muss einen niedrigen Siedepunkt aufweisen. Hierbei wird gerne Tetrafluorethan mit einem Siedepunkt von -26 °C eingesetzt. Wir konnten dieses Verfahren leider nicht anwenden, da der Kühleffekt der Methode nicht ausreichte, um einen unspezifischen Schaden der Haut zu verhindern. Die Laserleistung wäre zudem durch Streuung an in der Luft schwebenden Kühlmittelpartikeln deutlich vermindert worden.

Des Weiteren werden in der Literatur sog. Kontaktkühlmethoden beschrieben, bei der ein solides Kühlmedium direkten Kontakt zur Hautoberfläche aufweist. Die einfachste Methode hierbei ist die Kühlung mit Hilfe eines Eiswürfels, durch den – eine geringe Streuung des Eises vorausgesetzt – auch eine Bestrahlung erfolgen kann. Des Weiteren werden durchsichtige Platten aus Saphirglas, welche auf -27 °C gekühlt werden und durch die ebenfalls bestrahlt werden kann, eingesetzt. Diese beiden Möglichkeiten waren

im Bereich der PTT nicht einsetzbar, da sie eine ebene Oberfläche voraussetzen. Da die Tumoren auf den Flanken aber immer sehr vorgewölbt wuchsen, konnten diese Methoden nicht eingesetzt werden.

Eine neuere Kontaktkühlmethode (Sokoll et al., 1995), die sich auch Hautunebenheiten anpassen kann, wurde von uns in Vorversuchen länger getestet. Bei diesem Verfahren wird eine Küvette verwendet, durch die ein Kühlmittel fließt. Wir verwendeten eine bis zu 50 prozentige Glykol-Wasserlösung als Kühlmittel, wodurch der Gefrierpunkt der Flüssigkeit auf -36 °C gesenkt werden kann. Die Unterseite der Küvette besteht aus einer dünnen Latexmembran, die sich den Unebenheiten der Haut anpassen soll. Die Bestrahlung erfolgt durch die Küvette hindurch, wobei ein konstanter Kühlmittelfluss für eine effektive Kühlung der Hautoberfläche sorgt. Letztendlich konnten wir die Küvette aber nicht anwenden, da die Methode sich in unseren Vorversuchen als technisch sehr aufwändig darstellte. Zudem wurde die Bestrahlungsstärke durch die Küvette deutlich reduziert und der Kühleffekt der Küvette war der von uns letztendlich verwandten Methode nicht überlegen.

Eine der einfachsten Methoden zur Oberflächenkühlung die wir zur Verwendung in der PTT überprüften, ist ein Ventilator, der über den erzeugten Luftstrom die Wärmeenergie von der Hautoberfläche abführen kann. Hierbei gibt es Systeme, welche die Luft vorkühlen, um den Kühlungseffekt zu verbessern. Allerdings reichte der Kühleffekt dieser Methode nicht aus, um einen unspezifischen Schaden an der Haut bei Anwendung der PTT zu verhindern, so dass wir letztendlich ca. 4 °C kaltes Leitungswasser (s.o.) zur Kühlung der Oberfläche verwendeten. Das Wasser, welches das Bestrahlungsfeld zur Vermeidung von Lichtstreuung möglichst mit einer glatten Oberfläche durchströmen sollte, passte sich den Hautunebenheiten perfekt an, kühlte die Oberfläche mit einer ausreichenden Effektivität und hatte verhältnismäßig geringe Auswirkungen auf die Bestrahlungsstärke. Durch den Einsatz des Leitungswassers reduzierte sich die Bestrahlungsstärke in unseren Vorversuchen um ca. 10 %. Diese Reduktion der Bestrahlungsstärke wurde in den Lasereinstellungen berücksichtigt, so dass die effektive Bestrahlungsstärke beim Bestrahlen der Mäuse 30 Wcm^{-2} betrug. Somit setzte sich diese einfache Methode zur Oberflächenkühlung in unseren Vorversuchen durch.

Wie allerdings die Ergebnisse dieser Arbeit nahelegen, ist diese Kühlmethode wahrscheinlich noch nicht optimal auf die Anwendung in der PTT angepasst, da es fraglich bleibt, welchen Einfluss die Oberflächenkühlung auf das Überleben von einzelnen Tumorzellen direkt unterhalb der Haut gehabt hat. Hier sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Effektivität der PTT weiter steigern zu können.

4.8 Ausblick

Die generelle Machbarkeit einer farbstoffgestützten selektiven Photothermotherapie mit dem Sensibilisator Palladium-Octabutoxynaphthalocyanin konnte in der vorliegenden Arbeit bewiesen werden. Aus diesem Ergebnis resultieren aber eine Reihe von wichtigen Folgefragen. Weitere Versuche und Untersuchungen sind dringend notwendig, um diese viel versprechende Methode weiter entwickeln zu können.

Weitere Versuche sollten:

- Die Kühlungsmethode optimieren.
- gezielt nach möglichen Nebenwirkungen suchen.
- Die therapeutische Breite der PTT eingrenzen.
- eine Exploration von behandelbaren Tumorgößen durchführen.
- klären, ob mehrmalige, repetitive Bestrahlungen das Ergebnis verbessern.
- die mögliche Induktion einer spezifischen Immunität gegen Tumorbestandteile nach Therapie abklären (z.B. durch Langzeitversuche).

Eine generelle Übertragbarkeit der Methode der PTT auf den Menschen stellt das Fernziel dar. Hierfür ist neben den oben genannten Untersuchungen aber auch eine erneute Grundlagenforschung von Nöten. Der in den Versuchen verwendete Sensibilisator Palladium-Octabutoxynaphthalocyanin weist einen Nachteil in Form der ausgeprägten Lipophilie auf. Dadurch ist zwar eine Resorption der Substanz über das Bauchfell sehr gut möglich – polarere Substanzen werden deutlich schlechter resorbiert – andererseits wäre die Menge der nötigen lipophilen, cremophorhaltigen Trägerlösung für den Menschen relativ groß und eine intravenöse Applikation ist z.Zt. noch nicht möglich. Um eine ausreichende Dosis des Sensibilisators systemisch bei einem 80 kg schweren Menschen verfügbar machen zu können müssten somit ca. 1,6 Liter der Trägerlösung in den Bauchraum injiziert werden. Insgesamt ist das Trägersystem auf Basis des Cremphor EL zwar gut verträglich und das Volumen der zu applizierenden Trägerlösung wäre noch vertretbar, allerdings wäre die standardmäßige Applikation über das Bauchfell eher unpraktisch im klinischen Alltag und müsste immer unter sterilen Bedingungen erfolgen. Somit sollte, nach Klärung der obigen Fragen und weiterem Überwiegen der positiven Eigenschaften dieser Therapie, entweder ein modifizierter Photosensibilisator mit verbesserter Löslichkeit zum Einsatz kommen, oder es könnte ein anderes Trägersystem (z.B. Liposomen) für das PdNc(OBu)₈ entwickelt werden, welches eine bessere Löslichkeit bzw. die Möglichkeit einer intravenösen Applikation bei gleichbleibender selektiver Anreicherung der Substanz im Tumorgewebe gewährleisten müsste. Die Einbettung eines

chemisch sehr ähnlichen aufgebauten Sensibilisators in ein Liposom mit anschließender intravenöser Applikation wurde bereits durch Buseti et al., 1999, durchgeführt und wäre für PdNc(OBu)₈ ebenfalls denkbar. Es gibt eine Reihe von weiteren denkbaren Möglichkeiten um den Sensibilisator bei gleichbleibender Selektivität für das Tumorgewebe intravenös applizierbar zu machen, bzw. dabei sogar noch die Selektivität für das Tumorgewebe zu erhöhen. Dabei wäre es möglich, sich an Konzepten der PDT oder der allgemeinen Tumorthherapie zu orientieren. Eine Übersicht über aktuelle Konzepte geben z.B. Solban et al. (2006).

Ein bereits eingesetztes Prinzip ist die Kopplung des Sensibilisators an low density lipoproteins (LDL) (Allison et al., 1994; Barel et al., 1986; Kessel et al., 1992; Richter et al., 1993). Hierbei kommt es auf Grund des gesteigerten Bedarfs der Tumorzellen an Cholesterin zur Zellmembransynthese zu einer verstärkten Anreicherung der in den LDL Partikeln inkorporierten Substanzen im Tumorgewebe.

Ein anderes Verfahren koppelt den Sensibilisator an einen monoklonalen Antikörper, welcher gegen spezifische Oberflächenantigene des Tumors gerichtet ist. Nachdem der Antikörper auf der Oberfläche der Tumorzelle angedockt hat, wird er im Idealfall mitsamt des Sensibilisators in die Zelle inkorporiert (Hasan et al., 1989; Yarmush et al., 1993; Jiang et al., 1990). Ein spezielles Oberflächenantigen, welches insbesondere bei Kopf- und Halstumoren übermäßig stark von den Tumorzellen exprimiert wird, ist der epidermale Wachstumsfaktor – Rezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR). Monoklonale Antikörper gegen EGFR wurden im Verbund mit Sensibilisatoren bereits erfolgreich in der frühzeitigen Diagnostik und nachfolgenden Therapie in Form einer PDT entwickelt und eingesetzt (Soukos et al., 2001; Shin et al., 1990).

Denkbar wäre ebenfalls, die Konzentration des Sensibilisators intrazellulär weiter zu erhöhen, in dem neuere Verfahren wie die photochemische Internalisation (photochemical internalization, PCI) verwendet werden. Diese Methode macht sich den Umstand zu Nutze, dass insbesondere hochmolekulare Substanzen durch Endozytose aufgenommen werden. Normalerweise können die Substanzen nach der Endozytose nicht aus den Endozytosebläschen in das Zytosol eindringen, wodurch ihre Wirksamkeit bei Phototherapien durch chemische Modifikation in den Bläschen und durch räumliche Distanz zu Strukturen, welche für die Zelle überlebenswichtig sind (z.B. Mitochondrien, Zellkern), deutlich vermindert wird. Die PCI schafft es, durch Einsatz eines weiteren Photosensibilisators, die Endozytosebläschen zu zerstören und so das Eindringen der Sensibilisatoren in das Zytosol zu ermöglichen, wodurch sich die Wirksamkeit der Therapien stark verbessert (Prasmickaite et al., 2002; Berg et al., 1999; Hogset et al., 2000; Selbo et al., 2000; Selbo et al., 2001).

Insgesamt sind somit noch viele Wege offen, um die hier vorgestellte Galenik des Palladium-Octabutoxynaphthalocyanin zu verbessern.

Wenn eine neue Galenik gefunden ist, sollten die zukünftigen Versuche – möglichst im Tiermodell – die Pharmakokinetik dieser neuen Form aufklären. Darauf aufbauend könnten dann wiederum neue Berechnungen zur nötigen Bestrahlungsstärke und zur nötigen Bestrahlungszeit durchgeführt werden. Daraufhin sollte der neue Sensibilisator wiederum im Tiermodell in der therapeutischen Effektivität überprüft werden. Dabei sollten zunächst Bestrahlungsparameter wie in den hier vorliegenden Versuchen verwendet werden, um vergleichende Untersuchungen zu ermöglichen. Bei diesen Untersuchungen zur therapeutischen Effektivität sollte möglichst ein Tiermodell verwendet werden welches einen chemisch induzierten Tumor verwendet. Diese Maßnahme könnte individuelle Unterschiede der Tumoren simulieren und zeigen, in wie weit die PTT unter diesen Umständen in der Lage ist, alle Tumoren effektiv zu behandeln.

In diesen Versuchsreihen sollten ebenfalls Langzeitversuche einen großen Stellenwert erlangen, da so (s.o.) der Langzeiterfolg bzw. der mögliche immuninduktive Effekt der PTT weiter untersucht werden könnten.

Abschließend sollen die denkbaren klinischen Einsatzgebiete der PTT diskutiert werden. Vom jetzigen Standpunkt aus erscheinen die möglichen Einsatzmöglichkeiten einer PTT im klinischen Alltag außerordentlich vielfältig. Alle dermalen Tumoren in ansonsten schwieriger chirurgischer Lokalisation aus ästhetischen Gründen (Gesicht, Hals, Handrücken) könnten von einer PTT profitieren. Nervenmetastasen könnten mit konkurrenzloser Präzision mit einer nur vorübergehenden Irritation der umliegenden nervalen Strukturen entfernt werden. Tumoren im Gastrointestinaltrakt, peritoneale Tumoren oder peritoneale Tumoraussaaten (z.B. Endometriose) sowie Harnblasentumoren könnten ebenfalls selektiv thermisch koaguliert werden. Das allgemeine Indikationsspektrum von Phototherapien am Menschen würde durch die PTT immens verbreitert werden. Weiterhin ist natürlich auch ein generell palliativer Einsatz der PTT z.B. beim Vorliegen von multiplen (Haut-) Metastasen denkbar, wenn eine chirurgische Therapie den Patienten zu sehr belasten würde.

Die klinische Einführung einer PTT mit den hier beschriebenen Eigenschaften wäre somit mehr als wünschenswert und sollte mit weiteren Forschungsprojekten vorangetrieben werden.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Umsetzung einer selektiven Photothermotherapie mit dem Farbstoff Palladium-Octabutoxynaphthalocyanin zur Behandlung von Tumorgewebe *in vivo*.

Die Bestrahlung der Tumoren führte zu einem Behandlungserfolg, der sich bei konstanter Bestrahlungsstärke abhängig von der Bestrahlungszeit zeigte. Bei einer Bestrahlung mit 30 Wcm^{-2} für 10 Sekunden zeigte sich eine homogene zentrale Nekrose in den Tumoren mit einer mittleren Nekrosegröße von 90 % vom Tumorgesamtvolumen. In den Randbereichen im Übergangsbereich zur Haut und zum Muskel zeigten sich verbliebene vitale Tumorzellen. Diese mikroskopisch-morphologische Beobachtung konnte in dieser Gruppe und den nachfolgenden mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen mit dem proliferationsassoziierten Antikörper Ki-67 bestätigt werden. Des Weiteren zeigte sich eine ausgeprägte Entzündungsreaktion in der Umgebung des behandelten Tumorgewebes, welche mit einer weiteren immunhistochemischen Färbung sichtbar gemacht werden konnte. Dabei kam ein Panleukozytenmarker zum Einsatz, welcher gegen CD45 gerichtet ist.

Bei einer Verlängerung der Bestrahlung auf 15 Sekunden bei 30 Wcm^{-2} konnte eine Nekrose von im Mittel 95 % des Tumorgesamtvolumens induziert werden. Die verbliebenen vitalen Tumorzellen waren im Übergangsbereich zur Haut zu finden. Eine deutliche Immunantwort konnte auch hier nach der durchgeführten Behandlung nachgewiesen werden.

Bei weiterer Verlängerung der Bestrahlung auf 20 Sekunden bei 30 Wcm^{-2} konnte ein Nekrosevolumen von im Mittel 99 % im Bezug zum Gesamttumolvolumen induziert werden. Die vereinzelt nachgewiesenen vitalen Zellen zeigten sich im Übergangsbereich zur Haut. Wiederum zeigte sich eine deutliche Entzündungsreaktion in der Umgebung des behandelten Tumors.

In allen Behandlungsgruppen waren die Schäden hoch selektiv auf das Tumorgewebe begrenzt. Das gesunde Gewebe in der direkten Nachbarschaft zum Tumor erlitt keinen Schaden.

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass die selektive Schädigung von Tumorgewebe unter Schonung des gesunden umgebenden Gewebes mit Hilfe einer farbstoffgestützten Photothermotherapie generell möglich ist. Die Behandlung führt zu einer deutlichen Entzündungsreaktion im Tumorgewebe und in der direkten Umgebung. Die Bedeutung dieser Reaktion muss allerdings noch detailliert untersucht werden.

6 Literatur

- Agah, R., Pearce, J. A., Welch, A. J., Motamedi, M.:** Rate Process Model for arterial tissue thermal damage: Implications on vessel photocoagulation. *Lasers Surg. Med.* **15**: 179-184 (1994)
- Allison, B.A., Pritchard, P.H., Levy, J.G.:** Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrine derivative. *Br. J. Cancer* **69**: 833-839 (1994)
- Alora, M.B., Anderson, R.R.:** Recent developments in cutaneous lasers. *Lasers Surg. Med.* **26** (2): 108-118 (2000)
- Anderson, R.R., Parrish, J.A.:** The optics of human skin. *J. Invest. Dermatol.* **77**: 13 (1981)
- Anderson, R.R., Parrish, J.A.:** Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. *Science* **220** (4596): 524-527 (1983)
- Arrhenius, S.:** Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker in Säuren. *Z. Phys. Chem.*, **4**: 226-248 (1889)
- Barel, A., Jori, G., Perin, A., Romandini, P., Pagnan, A., Biffanti, S.:** Role of high-, low- and very low-density lipoproteins in the transport and tumor-delivery of hematoporphyrin in vivo. *Cancer Lett.* **32**: 145-150 (1986)
- Berg, K., Selbo, P.K., Prasmickaite, L., Tjelle, T.E., Sandvig, K., Moan, J., Gaudernack, G., Fodstad, O., Kjolsrud, S., Anholt, H., Rodal, G.H., Rodal, S.K., Hogset, A.:** Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer Res.* **59**: 1180-1183 (1999)
- Boulnois, J.L.:** Photophysical processes in recent medical laser developments: a review. *Lasers in Medical Science* **1**: 47-66 (1986)
- Bucking, M., Gudgin Dickson, E.F., Farahani, M., Fischer, F., Holmes, D., Jori, G., Kennedy, J.C., Kenney, M.E., Peng, X., Pottier, R.H., Weagle, G.:** Quantification of the selective retention of palladium octabutoxynaphthalocyanine, a potential photothermal drug, in mouse tissues. *J. Photochem. Photobiol. B.* **58** (2-3): 87-93 (2000)
- Busetti, A., Soncin, M., Reddi, E., Rodgers, M.A.J., Kenney, M.E., Jori, G.:** Photothermal sensitization of amelanotic melanoma cells by Ni(II)-octabutoxynaphthalocyanine. *J. Photochem. Photobiol. B.* **53**: 103-109 (1999)
- Camerin, M., Rello, S., Villanueva, A., Ping, X., Kenney, M.E., Rodgers, M.A., Jori, G.:** Photothermal sensitization as a novel therapeutic approach for tumours: studies at the cellular and animal level. *Eur. J. Cancer* **41** (8): 1203-1212 (2005a)
- Camerin, M., Rodgers, M.A.J., Kenney, M.E., Jori, G.:** Photothermal sensitization: evidence for the lack of oxygen effect on the photosensitising effect. *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**: 251-253 (2005b)

- Chen, A.M., Scott, M.D.:** Current and future applications of immunological attenuation via pegylation of cells and tissue. *BioDrugs* **15**: 833-847 (2001)
- Chen, W.R., Adams, R.L., Higgins, A.K., Bartels, K.E., Nordquist, R.E.:** Photothermal effects on murine mammary tumors using indocyanine green and an 808-nm diode laser: an in vivo efficacy study. *Cancer Lett.* **98**: 169-173 (1996)
- Chen, W.R., Adams, R.L., Carubelli, R.E., Nordquist, R.E.:** Laserphotosensitizer assisted immunotherapy: a novel modality for cancer treatment. *Cancer Lett.* **115**: 25-30 (1997)
- Diddens, H., Fischer, F., Lilge, L., Hüttmann, G., Pottier, R.H.:** In-vivo photothermal therapy with palladium(II)octabutoxynaphthalocyanine and 826 nm irradiation. *13th International Congress on Photobiology*, 1.-6. July, San Francisco (2000)
- Diddens, H., Fischer, F., Pottier, R.H.:** In-vivo chromophore-enhanced photothermal therapy with palladium(II)octabutoxynaphthalocyanine. *European Conferences on Biomedical Optics (ECBO 2001, OSA)*, 17.-21. June, München, Germany (2001a)
- Diddens, H., Fischer, F., DeGroot, J., Pottier, R.H.:** In-vivo photothermal therapy with palladium(II)octabutoxynaphthalocyanine. *29th Annual Meeting of the American Society for Photobiology*, 7.-12. July, Chicago, USA (2001b)
- Diddens, H.:** Photothermal therapy with palladium(II)octabutoxynaphthalocyanine. *4th International Symposium on Photodynamic Diagnosis and Therapy*, 10.-13. October, Brixen, Italia (2001)
- Diddens, H., Fischer, F., Pottier, R.H.:** In-vivo photothermal therapy with palladium(II)octabutoxynaphthalocyanine. *IX International Conference Laser Applications in Life Sciences, Symposium Laser against cancer LALS`2002*, Vilnius, Lithuania, 7.-11. July (2002a)
- Diddens, H., Fischer, F., Pottier, R.H.:** In-vivo chromophore enhanced photothermal therapy with palladium(II)octabutoxynaphthalocyanine. *COST D20 Meeting on "Metal Compounds for the Treatment of Cancer and Viral Diseases"*, Bucharest, Romania, 14.-16. November (2002b)
- Diddens, H., Fischer, F., Pottier, R.H.:** In-vivo investigations on dye-enhanced photothermal tumor therapy with a naphthalocyanine derivative. *Oftalmologia* **1**: 59-61 (2003)
- Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Peng, Q.:** Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute* **90** (12): 889-905 (1998)
- Dougherty, T.J.:** An update on photodynamic therapy applications. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **20** (1): 3-7 (2002)
- Dvorak, H.F., Nagy, J.A., Dvorak, J.T., Dvorak, A.M.:** Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am. J. Pathol.* **133**: 95-109 (1988)
- Fischer, F., Diddens, H., Dickson, E.F., Pottier, R.H.:** In-vivo temperature measurements with thermocouple probes during 826 nm cw laser irradiation for

- palladium(II)octabutoxynaphthalocyanine photothermal therapy. *13th International Congress on Photobiology*, 1.-6. July, San Francisco (2000)
- Germer, C.T., Abrecht, D., Roggan, A., Buhr, H.J.:** Technology for in situ ablation by laparoscopic and image-guided interstitial laser hyperthermia. *Semin. Laparosc. Surg.* **5**: 195-203 (1998a)
- Germer, C.T., Roggan, A., Ritz, J.P., Isbert, C., Albrecht, D., Muller, G., Buhr, H.J.:** Optical properties of native and coagulated human liver tissue and liver metastases in the near infrared range. *Lasers Surg. Med.* **23** (4): 194-203 (1998b)
- Gollnick, S.O., Owczarczak, B., Maier, P.:** Photodynamic Therapy and Anti-Tumor Immunity. *Lasers Surg. Med.* **38**: 509-515 (2006)
- Harris, J.M., Martin, N.E., Modi, M.:** Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* **40**: 539-551 (2001)
- Hasan, T., Lin, A., Yarmush, D.:** Monoclonal antibody-chromophore conjugates as selective phototoxins. *J. Controlled Release* **10**: 107-117 (1989)
- Henderson, B.W., Dougherty, T.J.:** How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology* **55**: 145-157 (1992)
- Hendrzak-Henion, J.A., Knisely, T.L., Cincotta, L., Cincotta, E., Cincotta, A.H.:** Role of the immune system in mediating the antitumor effect of benzophenothiazine photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **69** (5): 575-581 (1999)
- Henriques, F. C.:** Studies of thermal injury V: the predictability and significance of thermally induced rate processes leading to irreversible epidermal injury. *Arch. Pathol.* **43**: 489-502 (1947)
- Hirsch, L.R., Stafford, R.J., Bankson, J.A., Sershen, S.R., Rivera, R.E., Price, R.E.:** Nanoshell-mediated near infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100** (23): 13549-13554 (2003)
- Hobbs, S.K., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, W.G., Griffith, L., Torchilin, V.P., Jain, R.K.:** Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4607-4612 (1998)
- Hogset, A., Prasmickaite, L., Tjelle, T.E., Berg, K.:** Photochemical transfection: a new technology for light-induced, site-directed gene delivery. *Hum. Gene Ther.* **11**: 869-880 (2000)
- Ishida, O., Maruyama, K., Sasaki, K., Iwatsuru, M.:** Sizedependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice. *Int. J. Pharm.* **190**: 49-56 (1999)
- Jacques, S.L.:** Laser-tissue interactions. Photochemical, photothermal, and photomechanical. *Surg. Clin. North. Am.* **72**: 531-558 (1992)
- Jiang, F.N., Jiang, S., Liu, D., Richter, A., Levy, J.G.:** Development of technology for linking photosensitizers to a model monoclonal antibody. *J. Immunol. Methods* **134**: 139-149 (1990)

- Jirsa, M.Jr., Pouckova, P., Dolezal, J., Pospisil, J., Jirsa, M.:** Hyperbaric oxygen and photodynamic therapy in tumor-bearing nude mice. *Eur. J. Cancer* **27** (1): 109 (1991)
- Kessel, D., Whitcomb, K.L., Schulz, V.:** Lipoprotein-mediated distribution of N-aspartyl chlorin-E6 in the mouse. *Photochem. Photobiol.* **56**: 51-56 (1992)
- Klavuhn, K.G., Green, D.:** Importance of Cutaneous Cooling During Photothermal Epilation: Theoretical and Practical Considerations. *Lasers Surg. Med.* **31** (2): 97-105 (2002)
- Kong, G., Braun, R.D., Dewhirst, M.W.:** Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: effect of particle size. *Cancer Res.* **60**: 4440-4445 (2000)
- Korbelik, M.:** Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **14**: 329-334 (1996)
- Korbelik, M., Dougherty, G.J.:** Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors. *Cancer Research* **59**: 1941-1946 (1999)
- Litzinger, D.C., Buiting, A.M., van Rooijen, N., Huang, L.:** Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochem. Biophys. Acta* **1190**: 99-107 (1994)
- Loo, C., Lin, A., Hirsch, L.R., Lee, M.H., Barton, J., Halas, N., West, J., Drezek, R.:** Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.* **3** (1): 33-40 (2004)
- Maeda, H.:** The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **41**: 189-207 (2001)
- Maeda, H., Fang, J., Inutsuka, T., Kitamoto, Y.:** Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. *Int. Immunopharmacol.* **3**: 319-328 (2003)
- McGarvey, D.J., Truscott, T.G.:** The triplet state and singlet oxygen generation. In "PDT of neoplastic disease", Vol. 2, pp. 179-189. ed. Daid Kessel, CRC Press Boca Raton, Ann Arbor, Boston (1990)
- Mitchell, J.B., McPherson, S., DeGraff, W., Gamson, J., Zbell, A., Russo, A.:** Oxygen dependence of hematoporphyrin derivative-induced photoinactivation of Chinese hamster cells. *Cancer Research* **45** (5): 2008-2011 (1985)
- Moan, J., Berg, K., Kvam, E., Western, A., Malik, Z., Rück, A., Schneckeburger, H.:** Intracellular localisation of photosensitizers. In: Bock, G., Harnett, S. (eds.), *Photosensitizing Compounds*, John Wiley & Sons, Chichester, 95-107 (1989)
- Muralidharan, V., Christophi, C.:** Interstitial laser thermotherapy in the treatment of colorectal liver metastases. *J. Surg. Oncol.* **76** (Suppl.): 73-81 (2001)
- Oldenburg, S.J., Jackson, S.L., Westcott, S.L., Halas, N.J.:** Infrared extinction properties of gold nanoshells. *Appl. Phys. Lett.* **111**: 2897 (1999)

- O'Neal, D.P., Hirsch, L.R., Halas, N.J., Payne, J.D., West, J.L.:** Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Lett.* **209**: 171-176 (2004)
- Pottier, R., Truscott, T.G.:** The photochemistry of haematoporphyrin and related systems. *Int. J. Radiat. Biol.* **50**: 421-452 (1986)
- Prasmickaite, L., Hogset, A., Selbo, P.K., Engesaeter, B.O., Hellum, M., Berg, K.:** Photochemical disruption of endocytic vesicles before delivery of drugs: a new strategy for cancer therapy. *Br. J. Cancer* **86**: 652-657 (2002)
- Prudhomme, M., Tang, J., Rouy, S., Delacretaz, G., Salathe, R.P., Godlewski, G.:** Interstitial diode laser hyperthermia in the treatment of subcutaneous tumor. *Lasers Surg. Med.* **19**: 445-450 (1996)
- Richter, A.M., Waterfield, E., Jain, A.K., Canaan, A.J., Allison, B.A., Levy, J.G.:** Liposomal delivery of a photosensitizer, benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD), to tumor tissue in a mouse tumor model. *Photochem. Photobiol.* **57**: 1000-1006 (1993)
- Rihter, B.D., Kenney, M.E., Ford, W.E., Rodgers, M.A.J.:** Photochromic reactions involving palladium(II)octabutoxynaphtalocyanine and molecular oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 8146-8152 (1993)
- Sanchez, L.A., Perez, M., Azziz, R.:** Laser hair reduction in the hirsute patient: a critical assessment. *Hum. Reprod. Update* **8** (2): 169-181 (2002)
- Scholzen, T., Gerdes, J.:** The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* **182** (3): 311-322 (2000)
- Selbo, P.K., Sivam. G., Fodstad, O., Sandvig, K., Berg, K.:** Photochemical internalisation increases the cytotoxic effect of the immunotoxin MOC31-gelolin. *Int. J. Cancer* **87**: 853-859 (2000)
- Selbo, P.K., Sivam. G., Fodstad, O., Sandvig, K., Berg, K.:** In vivo documentation of photochemical internalization, a novel approach to site specific cancer therapy. *Int. J. Cancer* **92**: 761-766 (2001)
- Sershen, S.R., Westcott, S.L., Halas, N.J., West, J.L.:** Temperature-sensitive polymer-nanoshell composites for photothermally modulated drug delivery. *J. Biomed. Mater. Res.* **51** (3): 293-298 (2000)
- Shin, D.M., Gimenez, I.B., Lee, J.S., Nishioka, K., Wargovich, M.J., Thacher, S., Lotan, R., Slaga, T.J., Hong, W.K.:** Expression of epidermal growth factor receptor, polyamine levels, ornithine decarboxylase activity, micronuclei and transglutaminase I in a 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis model. *Cancer Res.* **50**: 2505-2510 (1990)
- Sokoll, C., Philipp, C., Berlien, H.P.:** Behandlung von Besenreisern mit einer neuen Kühlkuvette. *Lasermedizin* **11**: 204-211 (1995)
- Solban, N., Rizvi, I., Hasan, T.:** Targeted Photodynamic Therapy. *Lasers Surg. Med.* **88**: 522-531 (2006)

- Soukos, N.S., Hamblin, M.R., Keel, S., Fabian, R.L., Deutsch, T.F., Hasan, T.:** Epidermal growth factor receptor-targeted immunophotodiagnosis and photoimmunotherapy of oral precancer in vivo. *Cancer Res.* **61**: 4490-4496 (2001)
- Spikes, J.D.:** The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in the health sciences. In: Bensasson, R.V., Jori, G. et al., *Primary Photo-Process in Biology and Medicine*, 209-227, Plenum Press, New York, 1985
- Star, W.M., Marijnissen, H.P.A., Berg-Blok, van den A.E., Versteeg, A.C., Franken, K.A.P., Reinhold, H.S.:** Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin observed in vivo in sandwich observation chambers. *Cancer Research* **46**: 2532-2540 (1986)
- Tomayko, M.M., Reynolds, C.P.:** Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **24** (3): 148-154 (1989)
- Tromberg, B.J., Orenstein, A., Kimel, S., Barker, S.J., Hyatt, J., Nelson, J.S., Berns, M.W.:** *In vivo* tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **52**: 375-385 (1990)
- Unsöld, E., Eil, C., Jocham, D., Sroka, D., Stocker, S.:** Quantitative and comparative study of haematoporphyrin-derived photosensitizers on a murine tumor model. *Lasers in Medical Science* **5**: 309-316 (1990)
- Vaupel, P., Kallinowski, F., Okunieff, P.:** Blood flow, oxygen and nutrient supply and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Research* **49** (23): 6449-6465 (1989)
- Vogl, T., Mack, M., Straub, R., Zangos, S., Woitaschek, D., Eichler, K., Engelmann, K.:** Thermal ablation of liver metastases. Current status and prospects. *Radiologe* **41** (1): 49-55 (2001)
- Warnke, R.A., Gatter, K.C., Falini, B., Hildreth, P., Woolston, R.-E., Pulford, K., Cordell, J.L., Cohen, B., De Wolf-Peeters, C., Mason, D.Y.:** Diagnosis of human lymphoma with monoclonal antileukocyte antibodies. *N. Engl. J. Med.* **309** (21): 1275-1281 (1983)
- Weissleder, R.:** A clearer vision for in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* **19**: 316-317 (2001)
- Welch, A. J.:** The thermal response of laser irradiated tissue. *IEEE Journal of Quantum Electronics Band 12*, **20**: 1471-1481 (1984)
- West, J.L., Halas, N.J.:** Engineered nanomaterials for biophotonics applications: improving sensing, imaging, and therapeutics. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **5**: 285-292 (2003)
- Wiemann, T.J., Mang, T.S., Fingar, V.H., Hill, T.G., Reed, W.R., Corey, T.S., Nguyen, V.Q., Render, E.R. Jr.:** Effect of photodynamic therapy on blood flow in normal and tumor vessels. *Surgery* **104**: 512-517 (1988)
- Yarmush, M.L., Thorpe, W.P., Strong, L., Rakestraw, S.L., Toner, M., Tompkins, R.G.:** Antibody targeted photolysis. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **10**: 197-252 (1993)

Yuan, F., Leunig, M., Huang, S.K., Berk, D.A., Papahadjopoulos, R.K., Jain, R.K.: Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res.* **54**: 3352-3356 (1994)

Zenzie, H.H., Altshuler, G.B., Smirnov, M.Z., Anderson, R.R.: Evaluation of Cooling Methods for Laser Dermatology. *Lasers Surg. Med.* **26** (2): 130-144 (2000)

7 Anhang

7.1 Nekrosezonenauswertung in den Kontrollgruppen

Kontrollgruppe	Tier	Nekroseanteil vom Tumorgesamtvolumen [%]
nicht sensibilisiert / nicht bestrahlt	1	3,385
	2	0,569
	3	2,558
	4	0,000
	5	0,258
	6	0,000
	7	2,260
	8	4,461
	9	5,750
	\bar{x}	2,138
	s	2,101
sensibilisiert / nicht bestrahlt	1	0,000
	2	0,210
	3	0,160
	\bar{x}	0,123
	s	0,110
nicht sensibilisiert / bestrahlt	1	2,154
	2	2,316
	3	2,025
	\bar{x}	2,165
	s	0,146

7.2 Nekrosezonenauswertung in den Behandlungsgruppen

Behandlungsgruppe	Tier	Nekroseanteil vom Tumorgesamtvolumen [%]
30 Wcm ² für 10 Sekunden	1	94,819
	2	92,892
	3	97,396
	4	84,010
	5	92,346
	\bar{x}	92,293
	s	5,035
30 Wcm ² für 15 Sekunden	1	94,250
	2	94,217
	3	90,907
	4	89,684
	5	94,711
	6	88,711
	7	92,151
	8	96,863
	9	97,946
	10	99,293
	11	94,253
	12	100,000
	13	94,241
	14	97,889
	15	97,600
	16	96,399
	17	88,845
	18	98,672
	19	92,646
	20	89,668
	21	100,000
	22	86,358
	23	95,369
	24	96,038
	25	93,170
\bar{x}	94,406	
s	3,809	
30 Wcm ² für 20 Sekunden	1	98,816
	2	100,000
	3	100,000
	4	98,895
	\bar{x}	99,428
	s	0,661

7.3 Tierversuchsantrag

Die Genehmigung des Tierversuchsantrages mit dem Aktenzeichen V252-72241.122-7 (89-10/02) erfolgte durch das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein und wurde am 20. Dezember 2002 erteilt.

8 Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. phil. nat. R. Birngruber, Direktor des Institutes für biomedizinische Optik (BMO) an der Universität zu Lübeck, unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit angefertigt wurde.

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Heyke Diddens (BMO) für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für die exzellente Betreuung mit einem bodenlosen fachlichen Wissen und einer fortwährenden Motivation während der gesamten Zeit der Erstellung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem Frau Dr. rer. nat. U. Windhövel und Frau Gisela Pape für die Anfertigung der immunhistologischen Färbungen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Barbara Flucke (BMO) für die Anfertigung der Histologien bedanken sowie für die nette Zusammenarbeit.

Bei Frau Astrid Rodewald möchte ich mich für die Hilfe bei allen kleineren und größeren Problemen im Laboralltag bedanken.

Herrn Rene Kube danke ich für sein immer offenes Ohr und für die brillanten Überarbeitungen der digitalen Fotografien.

Herrn Reinhard Schulz danke ich für die präzise Anfertigung der benötigten Metallarbeiten für den Versuchsaufbau.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die nicht nur durch die finanzielle Unterstützung Garant für das Gelingen des Studiums der Humanmedizin und für die Anfertigung dieser Promotionsarbeit waren, sondern mich insbesondere durch ihre Anteilnahme unterstützt haben.

Und dir, liebe Imke, danke ich für all die bisherige Zeit, in der du mir mit deinem unverwechselbaren Wesen und deiner wundervollen Art immer zur Seite standst.

9 Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für biomedizinische Optik und in der Klinik für Chirurgie der Universität Lübeck unter Aufsicht von Herrn Prof. Dr. Reginald Birngruber und Frau Dr. Heyke Diddens durchgeführt. Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und wörtlich oder inhaltlich entnommene Zitate aus den benutzten Werken als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere außerdem, nicht vorher oder gleichzeitig andernorts einen Zulassungsantrag gestellt zu haben und habe mich zuvor keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen. Die Arbeit wurde keiner anderen Promotionsbehörde im In- oder Ausland vorgelegt.

Lübeck, im April 2008

Henning Hanken

Löwenstraße 47 · 20251 Hamburg
Telefon: (040) 22623810 · e-mail: henning.hanken@gmx.net

10 Lebenslauf

Persönliche Informationen

- Name: Henning Hanken
- Geburtsdatum: 20.04.1980
- Geburtsort: Bremen
- Familienstand: ledig
- Eltern: Dr. rer. nat. Folkhard Hanken,
Pharmazeut
Margret Hanken, geb. Jaeger,
Studienrätin



Schulbildung

- 1986 - 1990: Grundschule Weyhe / Erichshof
- 1990 - 1992: Orientierungsstufe Weyhe / Leeste
- 1992 - 1999: bilinguale Gymnasiale Oberstufe, Kooperative Gesamtschule Stuhr - Brinkum
- 18.05.1999: bilinguales Abitur (Englisch / Deutsch)
- 1999 - 2000: Wehersatzdienst beim Malteser Hilfsdienst Bremen im Rettungsdienst, Ausbildung zum Rettungssanitäter
- außerschulische Aktivitäten: diverse Teilnahmen an Orchesterfahrten und Musicalproduktionen als Klarinettist, Saxophonist oder Schlagzeuger, Absolvierung des APIEL-Sprachdiploms in Englisch

Studium der Human- und Zahnmedizin

- 2000 - 2002: Vorklinisches Studium an der Universität zu Lübeck
- September 2002: Vorärztliche Prüfung
- seit 2002: Klinisches Studium an der Universität zu Lübeck
- August 2003: 1. Staatsexamen
- September 2005: 2. Staatsexamen
- Oktober 2006: 3. Staatsexamen
- seit Oktober 2006: Studium der Zahnmedizin an der Universität Hamburg
- März 2008: Vorzahnärztliche Prüfung

Klinische Tätigkeit

- 02/2003 – 03/2003: Famulatur in der Klinik für Innere Medizin, Krankenhaus Links der Weser, Bremen
- 06/2003: Fortbildung zum Laserschutzbeauftragten, Institut für Biomedizinische Optik, Lübeck
- 09/2003: Famulatur in der Radiologie, Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Lübeck
- 02/2004 – 03/2004: Famulatur in der Chirurgie, Sana Kliniken Lübeck GmbH, Lübeck
- 07/2004 – 08/2004: Famulatur in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Lübeck
- 09/2004: Praxisfamulatur in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Praxis Herr Prof. Dr. Herrberger / Herr Dr. Dr. Bierwolf, Lübeck
- 10/2005 – 09/2005: Praktisches Jahr
- 10/2005 – 02/2006: Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Lübeck
- 02/2006 - 05/2006: Klinik für Chirurgie Sana Kliniken Lübeck GmbH
- 05/2006 – 09/2006: Klinik für Innere Medizin, Sana Kliniken Lübeck GmbH
- seit Mai 2007: Assistenzarzt der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Hamburg – Eppendorf. Direktor: Prof. Dr. Dr. med. R. Schmelzle.

Promotion

- 04/2003 – 10/2005: Bearbeitung des experimentellen Themas „Selektive Zerstörung von EMT6 Tumoren mittels farbstoffgestützter Photothermotherapie im Mausmodell“ im Institut für Biomedizinische Optik in Zusammenarbeit mit dem Forschungslabor der Klinik für Chirurgie, Universität zu Lübeck