

1 EINLEITUNG

Die Photodynamische Therapie (PDT) stellt eine Form der Behandlung mittels Licht, lichtenergieumwandelnden Verbindungen und Sauerstoff dar. Sie gewinnt in den letzten Jahren in der kurativen Behandlung von Präkanzerosen und oberflächlichen Tumoren und in der palliativen Tumorthherapie an Bedeutung. Die PDT ist in der Urologie und Dermatologie bereits fest etabliert, und gewinnt an Bedeutung in anderen medizinischen Fachdisziplinen. Unter anderen haben sich die Pulmonologie^{1,2}, Gastroenterologie^{3,4} und Ophthalmologie^{5,6} als Schwerpunktbereiche etabliert. Ihre wachsende Bedeutung in den erwähnten Gebieten wird unterstrichen durch einen Vergleich mit herkömmlichen Chemo- bzw. Bestrahlungstherapien, deren Wirkung mit der Zellteilungsrate zusammenhängt, und die gesunde Zellen und körpereigenes Immunsystem in einem mehr oder minder starken Ausmaß belasten. So werden solche Therapien durch Toxizitätseffekte in ihrer Anwendbarkeit stark eingeschränkt. Die PDT, die einen völlig anderen Wirkmechanismus hat, kann dagegen mehrmals wiederholt werden, ohne daß Resistenzen klinisch beobachtet werden. Darüber hinaus kann die PDT wirkungsvoll bei dysplastischem Gewebe eingesetzt werden, wo der Einsatz einer Strahlen- bzw. Chemotherapie meist wenig verspricht.

Geschichtlich blickt die PDT auf eine lange empirische Entwicklung zurück. Die historischen Anfänge der PDT sind in der Antike zu finden. Dies erklärt sich durch das natürliche Vorkommen lichtsensibilisierender Substanzen, darunter z.B. die Psoralene. Die naturwissenschaftliche Basis der therapeutischen Wirksamkeit hat sich erst in den letzten Jahrzehnten geklärt: sie liegt in der Eigenschaft mancher Verbindungen, Lichtenergie zu absorbieren, auf Sauerstoffmoleküle zu übertragen, und dadurch hochaggressive zelltoxische Sauerstoffspezies zu bilden. Solche Verbindungen werden als Photosensibilisatoren bezeichnet, wobei es nach deren Aufnahme ins Gewebe und einer darauffolgenden Lichteinwirkung zum Untergang von einzelnen Zellen beziehungsweise Zellverbänden kommen kann.

Die aktivierten Sauerstoffspezies werden in „Typ I“-Reaktionsprodukte, wie z. B. Hydroxyl- und Superoxidradikale, und das nicht-radikalische „Typ II“-Reaktionsprodukt Singulett-Sauerstoff unterteilt. Während die Radikale durch Elektronentransferprozesse entstehen, wird Singulett-Sauerstoff durch Energietransfer gebildet. Einige dieser photoaktiven

Substanzen können sich wesentlich mehr in manchen Arten von Tumorgewebe anreichern als im gesunden Gewebe. Diese spezifische Speicherung in Verbindung mit einer gezielt applizierten und genau dosierten Lichtbestrahlung erlaubt eine selektive Schädigung des entarteten Gewebes. Der Photosensibilisator bewirkt die Aktivierung, ohne dabei selbst verbraucht zu werden.

In Zusammenfassung stützt sich die PDT auf die drei photochemischen Komponenten

- Photosensibilisator
- Licht
- Sauerstoff

Insbesondere Photosensibilisatoren aus der Klasse der Porphyrine haben bisher eine therapeutische Anwendung gefunden, hauptsächlich in Form der Hämatorporphyrine und ihrer Derivate. Vor allem Hämatorporphyrinderivate (HpD) wie Photosan 3[®] und Photofrin II[®] wurden in letzter Zeit bezüglich ihrer Ansprechraten untersucht. Diese Substanzen gehören zur sogenannten „ersten Generation“ von Photosensibilisatoren.

Derzeit zielen Forschungsaktivitäten auf Verbesserungen der biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften, wie beispielsweise eine Erhöhung der Tumorselektivität, die zu den wichtigsten Kriterien für eine erfolgreiche Anwendung zählt. Dies sollte nämlich gleichzeitig zu der Verminderung von Nebenwirkungen wie der Hautphotosensibilisierung⁷⁻¹⁰ führen. Dabei soll der hohe Wirkungsgrad dieser „Natursubstanzen“ bezüglich der Umsetzung der Lichtenergie in die Bildung der aktivierten Sauerstoffspezies möglichst beibehalten werden.

Im Laufe der Zeit ist eine beachtliche Palette vielversprechender Verbindungen entstanden. In dieser Hinsicht ist für die Erstellung eines patientengerechten Therapieplans ein wissenschaftlich fundiertes Verständnis der Wirkmechanismen unerlässlich.

Der Ausstrahlung und Absorption von Licht entsprechen Veränderungen der Energiezustände der Elektronen der beteiligten Moleküle. Damit es zu einer Übertragung kommen kann, müssen die physikalischen Parameter der möglichen Zustände aller beteiligten Moleküle einander angepaßt sein, analog zum „Schlüssel und Schloss“-Prinzip, da sonst keine Übertragungen stattfinden. Der theoretische Hintergrund unseres heutigen Verständnisses

dieser Zustände und auch der Kriterien für die Übertragungen wird durch die Quantenphysik gebildet. Die quantentheoretischen Charakterisierungen der Zustände dienen als Basis für die Beschreibung der Wechselwirkungen zwischen Photosensibilisator und Licht, und für die der Folgen der energetischen Anregung.

Vielfältige Reaktionswege sind nötig, um Sauerstoff intrazellulär zu verwerten. Sie sind z.B. in der Atmungskette, im Zitratzyklus und bei der β -Oxidation zu finden. Hierbei werden viele unterschiedliche Enzyme und Coenzyme benötigt, wie beispielsweise die mischfunktionellen Oxidasen mit zugehörigen Häm-Gruppen, NAD(P)⁺, die Flavine und Ubichinon. Dies alles zeugt für die grundlegende Reaktionsträgheit zwischen organischen Molekülen und Sauerstoff. Dies kann anhand der erwähnten quantenmechanischen Anpassungsregel erklärt werden.

Die Wirksamkeit sowie einige Nebenwirkungen der PDT sind durch Ergebnisse aus experimentellen Arbeiten mit beispielsweise implantierten Tumoren an Mäusen, und auch in klinischen Studien mit unterschiedlichen Photosensibilisatoren nachgewiesen worden¹¹⁻¹⁷. Sie haben auch wichtige Aspekte der Pharmakokinetik klären können. Die Entwicklung von photophysikalisch orientierten Methoden, die quantitative Nachweise bezüglich der Erzeugung der verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies liefern können, ist jedoch eine Voraussetzung für eine theoretische Basis. Damit soll die gezielte Entwicklung verbesserter Substanzen und Behandlungsstrategien verfolgt werden, damit spezifische und auf die Erfordernisse des individuellen Patienten gestaltete Therapiepläne ermöglicht werden. Ein umfassendes Konzept für die Planung einer Photodynamischen Therapie bedarf Kenntnisse der photochemischen Eigenschaften, der Pharmakokinetik der Photosensibilisatoren und der biologischen Auswirkungen.

1.1 Biologischer Hintergrund

1.1.1 Die Zelle

Die direkte Zerstörung der Zielzellen kann durch die Auslösung einer Nekrose oder die Induktion der Apoptose erfolgen. Beide Prozesse werden hervorgerufen durch Schäden auf verschiedenen Ebenen, nämlich:

- individuelle Moleküle (z.B. Enzyme)
- molekulare Komplexe (vorhanden in Cytosol, Membranen oder Kern)
- intrazelluläre Strukturen, z.B. Organellen

Alle Photosensibilisatoren verdanken ihre biologische Effektivität der Generierung von aktivierten Sauerstoffspezies, deren zelltoxische Effekte für die therapeutische Wirkung verantwortlich sind¹⁸. Der direkte Untergang der Zielzelle kann über zwei Mechanismen ausgelöst werden: durch Einleitung der Zellnekrose¹⁹⁻²¹, oder durch Induktion der Apoptose²²⁻²⁶. Beiden Prozessen liegt eine Schädigung von einzelnen Molekülen (wie Enzymen), Molekülkomplexen (in Zytosol, Membranen oder Kern), oder intrazellulären Strukturen bzw. Organellen zugrunde. Welcher dieser Prozesse maßgebend für die Wirkung ist, wird im wesentlichen bestimmt durch die – teilweise ganz unterschiedliche - Natur der erzeugten Sauerstoffspezies, durch deren Konzentration sowie deren Entstehungsort in der Zelle. Diese Faktoren sind wiederum von den Verteilungen der Photosensibilisatoren und Sauerstoff in der Zelle abhängig, also von physikochemischen Eigenschaften, wie beispielsweise der Lipophilie.

Der Behandlungseffekt ist ein Zielgewebsdefekt im Rahmen der Nekrose oder eine Rückbildung des Zielgewebes nach Apoptoseinduktion. Darüber hinaus können indirekte Schädigungen von Tumorgewebe ausgelöst werden durch die unvermeidlichen aber auch zum Teil erwünschten Auswirkungen der PDT an den Endothelzellen in und um den Tumor, die zu Thrombosierungen der blutzuführenden Gefäße führen können. Auch die Induktion von Zytokinen wie z. B. TNF- α und resultierende immunmodulatorische Effekte sind beschrieben und diskutiert worden²⁷⁻²⁹.

1.1.2 Das Membransystem von Zellen

Zellmembranen werden vor allem wegen ihrer oxidierbaren, ungesättigten Fettsäureanteile als einer der Hauptangriffsorte der reaktiven Sauerstoffspezies in der Photodynamischen Therapie angesehen. Arachidonsäure beispielsweise, ein üblicher Bestandteil von Membranen, bildet das Substrat für entzündliche Vermittler, wie Prostaglandine, Prostazykline und Leukotriene³⁰.

Zellen werden nach außen durch eine Plasmamembran abgegrenzt. Innen wird die Zelle durch Membranen in verschiedene Kompartimente, Zellorganellen und Zytoplasma strukturell gegliedert. Membranen sind auch für eine effektive Zusammenwirkung der Zellorganellen

untereinander verantwortlich, wie zum Beispiel für den Signal- und Stoffaustausch. Der Spezialisierung auf unterschiedliche Aufgaben, wie z.B. beim endoplasmatischen Retikulum und bei der Mitochondrienmembran, wird durch die unterschiedlichen Zusammensetzungen entsprochen. Das Zytoskelett dient als mechanisches Zellgerüst, als Motor für Bewegungsvorgänge und als Schiene für den intrazellulären Transport³¹.

All diese spezialisierten Strukturen können durch die Einwirkung von Singulett-Sauerstoff leichte bis schwerste Schädigungen erfahren.

Wegen der extremen Reaktionsfreudigkeit von Singulett-Sauerstoff und den Radikalen sind ihre Lebensdauer sehr kurz, nämlich im Bereich von höchstens Mikrosekunden. Dementsprechend können sie nur in engster Nachbarschaft ihres Entstehungsortes ihre primären Schäden ausrichten. Dies führt zur Annahme, daß die bevorzugte Anreicherung der Photosensibilisator-Moleküle in bestimmten Zellstrukturen zu charakteristischen Schäden führt. Diese würden dementsprechende Funktionsausfälle der betroffenen Strukturen hervorrufen. Als Beispiel wird die nachgewiesene Zerstörung von Mitochondrien während der PDT als eine der Ursachen für die therapeutische Wirksamkeit angesehen^{32,33}.

1.1.3 Membranaufbau

Membranen bestehen aus einer flüssigen Lipiddoppelschicht, in die Proteine und Kohlenhydrate eingebettet sind. Die jeweilige Zusammensetzung ist organell-, zell- und gewebstypisch. Außerdem existiert eine Polarität, d.h. die Zusammensetzung an der Außenseite einer Membran ist grundsätzlich anders als die an der Innenseite, woraus sich eine andere Funktionalität ergibt^{34,35}.

Die Lipide können in drei Klassen unterteilt werden. Die Klasse der Phospholipide stellt den Hauptbestandteil einer Membran dar. Phospholipide haben einen hydrophilen Phosphat-Rest als Kopfteil und einen hydrophoben Schwanzteil. Die zweite Klasse, das Cholesterin, regelt u.a. die Fluidität der Membran. Glykolipide kommen grundsätzlich an der Membranaußenseite vor. Unter ihnen sind viele Moleküle mit Rezeptorfunktion zu finden.

Die Einwirkung von Sauerstoffradikalen und Singulett-Sauerstoff auf die Lipide führt zum Phänomen der *Autooxidation*, wobei eine Art oxidative Kettenreaktion unter benachbarten Lipidmolekülen ausgelöst wird. Abhängig vom herrschenden Sauerstoffpartialdruck u.a. in der Membran können sich die Schäden weiter fortsetzen.

Die Proteine können integrale Bestandteile der Membran sein, oder, je nach der Aminosäurezusammensetzung, nur peripher an die Membran gebunden sein. Hydrophile Aminosäurereste befinden sich grundsätzlich außen, hydrophobe dagegen eher in der Lipiddoppelschicht. Ihre Schädigung durch Oxidation kann zu Veränderungen im Stoffaustausch oder in der Signaltransduktion durch die Zellmembran führen.

Lipophile Photosensibilisatoren reichern sich eher im Membransystem an, hydrophile eher im Zytoplasma.

1.1.4 Zellorganellen

Die größte Zellorganelle ist der Zellkern. Seine Membran, die die DNS der Zelle einschließt, ist mit dem in sich geschlossenen System des endoplasmatischen Retikulums verbunden. In-vitro Versuche deuten darauf hin, daß Singulett-Sauerstoff höchstens reparable Einzelstrangschädigungen an der DNS ausrichten kann^{18,36-39}. Andere reaktive Spezies, wie Hydroxyl-Radikale, können dagegen Doppelstrangbrüche mit potentiell mutagenen Folgen verursachen^{40,41}.

Das rauhe endoplasmatische Retikulum trägt die Ribosomen, die Proteine einschließlich der für die Zellfunktion essentiellen Enzyme synthetisieren.

Das glatte endoplasmatische Retikulum dient hauptsächlich der Lipidsynthese.

Der Golgi-Apparat stellt eine weitere Organelle dar. Er besteht aus membranumhüllten Kompartimenten und produziert vor allem Sekretgranula.

Endosomen und Exosomen sind bewegliche Membranvesikel. Sie sorgen für den Stoffaustausch mit der Zellumgebung durch die äußere Membran hindurch.

Lysosomen dienen dem Abbau von zelleigenen Organellen und auch von Stoffen, die die Zelle durch Phagozytose oder Endozytose aufgenommen hat.

Die Mitochondrien sind für den Energiehaushalt der Zelle von zentraler Bedeutung.

Das Zytoplasma ist der zentrale Reaktionsraum der Zelle. In ihm laufen die meisten Abbauvorgänge von eingeschleusten Stoffen und die Biosynthese von Fettsäuren und Proteinen ab³¹.

1.1.5 Mitochondrien

Mitochondrien sind bakteriengroße Organellen (zirka $1\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$). Es gibt typischerweise tausende pro Zelle, und im Normalfall nehmen sie zusammen bis zu ein Viertel des Zellvolumens ein. Sie sind von zwei Membranen umschlossen, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Die äußere ist glatt, und mit Poren ausgestattet, die die Membran für kleine Moleküle durchlässig machen. Die innere Membran ist dagegen stark gefaltet, die Oberfläche dementsprechend verhältnismäßig groß. In dieser befinden sich die Enzyme der Atmungskette und die ATP-Synthase. Mitochondrien liefern die Energie für den Stoffwechsel der Zelle. Darüberhinaus sind sie für manche Schritte des Stoffwechsels notwendig, wie z.B. für die Häm-Synthese und den Citrat-Zyklus. Auch die Apoptoseinduktion mit Cytochrom-c-Freisetzung geht von ihnen aus.

Die Einwirkung von Singulett-Sauerstoff auf ihre Membranen führt zu ihrer Zerstörung und zum Zelluntergang. Dies wird von manchen als maßgebend für die Wirkung der PDT angesehen^{42,43}.

1.2 Metabolismus

1.2.1 Die oxidative Phosphorylierung

Der erste Unterprozeß der oxidativen Phosphorylierung ist der Zitratzyklus⁴⁴. Zu seinen anabolischen Funktionen zählt die Versorgung von Vorläufern für die Biosynthese von

- Porphyrinen, durch Verwendung von Succinyl-CoA
- Fettsäuren, durch Aufnahme von Acetyl-CoA den meisten Aminosäuren, durch Verwendung von Malat
- 2-Oxoglutarat.

Alle dazugehörigen Enzymsysteme befinden sich in den Mitochondrien.

Der zweite Unterprozeß der oxidativen Phosphorylierung wird durch die besondere doppelte Membranstruktur der Mitochondrien ermöglicht. Sauerstoff wird durch $\text{NADH} + \text{H}^+$ und Ubihydrochinon reduziert mittels Enzymkomplexen, die sich in der inneren mitochondrialen Membran befinden. Das Vorhandensein von Häm-Gruppen und Cytochrom c in diesen Enzymkomplexen, das den Bedarf der Zelle an Häm widerspiegelt, ist notwendig für die Anreicherung von Protoporphyrin IX im Gewebe⁴⁵.

Diese Redox-Reaktionen liefern Energie, die benutzt wird, um Protonen aus der Matrix, dem Raum zwischen den zwei Membranen. Dies führt zum Aufbau eines

elektrochemischen Gradienten, da die Protonen als geladene Teilchen nicht durch die Membran zurückdiffundieren können. Die Protonen können zurückströmen in die mitochondriale Matrix nur durch die ATP-Synthetasen, besondere Transportproteine in der Membran. ADP wird zu ATP phosphoryliert. Im Endeffekt läßt sich der Energieträger ATP durch Sauerstoff und die "Verbrennung" von Reduktionsäquivalenten regenerieren. Die Verbindung der Atmungskette mit dem Zitratzyklus liefert 12 Moleküle von ATP für jedes Molekül von Acetyl-CoA.

1.2.2 Tumormetabolismus

Bekannte Aspekte von entarteten Zellen sind eine abnorm hohe Zellteilungsrate, ein relativ großer Kern, ein erhöhter Energiebedarf für die Zellteilung und der Verlust von regulativen Kräften. Im Rahmen der PDT ist die allgemeine Anreicherung des Photosensibilisators im Tumorgewebe von grundlegender Bedeutung. Ein Grund für diese Anhäufung wird in Änderungen von metabolischen Prozessen insbesondere innerhalb der Mitochondrien gesehen. Die Anhäufung von Protoporphyrin IX (PPIX) bei der Anwendung von δ -Aminolaevulinsäure (δ -ALA) kann so zum Teil erklärt werden.

Eine Reduktion der Mitochondrienanzahl von bis zu 50 % im Vergleich mit normalen Zellen wird häufig beobachtet. Darüberhinaus sind die Mitochondrien oft kleiner und haben weniger Cristae, so daß die Oberfläche, die die Enzyme der Atmungskette trägt, geringer ist. Außerdem werden Tumorzellen oft hypoxisch aufgrund einer unzureichenden Blutzufuhr. Sie müssen dann ihren erheblichen Energiebedarf durch eine erhöhte Glykolyserate decken^{46,47}.

Die starke Reduktion in der Aktivität der Atmungskette führt zu einem entsprechend verminderten Bedarf an Cytochromen und Hämgruppen. Weiterhin verlangsamt sich der Zitratzyklus und somit die Bereitstellung von Succinyl-CoA, das nötig ist für die endogene Herstellung von Hämgruppen. Über eine negative Rückkopplung wird die Generierung von δ -ALA gehemmt. Genau dies stellt eine Erklärung für die beobachteten Folgen der Anwendung von exogenem ALA dar. Die Herstellung von Häm läuft auf Hochtouren bis zu dem Punkt, an dem die Ferrochelatase Protoporphyrin IX herstellt. Hier verlangsamt sich der Prozeß sehr stark, und der Spiegel von PPIX in den Tumorzellen steigt erheblich an.

1.3 Klinik der Photodynamischen Therapie

1.3.1 Pharmakokinetik

Für die Anreicherung in der Zelle spielen sowohl aktive als auch passive Mechanismen eine Rolle. Als aktive Mechanismen gelten eine erhöhte Membranaffinität und eine vermehrte Aufnahme in die Zellen über Carrier. Als passive Mechanismen der Anreicherung sind ein verzögerter Abbau photochemisch unwirksamer Metabolite des Photosensibilisators, und seine verzögerte Clearance zu sehen.

Bei der PDT spielen auch nicht-tumorspezifische Wirkungen eine wichtige Rolle. Nahezu alle zur Zeit eingesetzten Photosensibilisatoren, einschließlich Photofrin II[®] und Photosan 3[®], haben eine hohe Affinität zu Gefäßendothelien. Deshalb ist eine Gefäßzerstörung mit hämorrhagischer Nekrose⁴⁸⁻⁵⁰ eine der ersten Erscheinungen während einer PDT. Diese hat erhebliche Auswirkungen auf die Ergebnisse der Photodynamischen Therapie. Sie ist nachteilig bei diffus infiltrierenden Tumoren wegen des Risikos einer ausgedehnten Nekrose mit Weichteilzerstörung. Da eine Tumorselektivität in dieser Hinsicht nicht gegeben ist, müssen die Auswirkungen der PDT auf das gesunde Gewebe durch eine optimale und exakte Gestaltung des Bestrahlungsfeldes minimiert werden. Die unselektive Wirkung hat aber auch Vorteile:

- es werden zusätzlich die Tumoranteile zerstört, die aufgrund gestörter Mikrozirkulation eventuell nicht ausreichend Photosensibilisator aufnehmen konnten
- es wird die Perfusion im bestrahlten Anteil unterbrochen, so daß Tumorzellen, die durch die PDT gegebenenfalls nur reversibel geschädigt wurden, dennoch zerstört werden.

1.3.2 Klinische Ergebnisse

Sowohl Photosan 3[®] als auch Photofrin II[®] gehören zu den klassischen Photosensibilisatoren, für die eine gute Wirksamkeit in verschiedenen Einsatzbereichen nachgewiesen werden konnte.

In der Dermatologie berichten Calzavara-Pinton et al beim Einsatz von sowohl Hämatoporphyrinderivaten als auch von Photofrin II[®] von sehr guten Ergebnissen bei Fällen von Morbus Bowen, Kaposi-Sarkomen, und Basaliomen, und schlechteren Ansprechraten bei Plattenepithelzellkarzinomen⁵¹. Feyh berichtet von Behandlungen, bei denen die PDT mit Photosan 3[®] zu einer kompletten Remission bei 51 von 57 Patienten mit Basaliomen, und bei 6 von 7 Patienten mit Spinaliomen geführt hat⁵².

Neben der direkten zelltoxischen Wirkung scheinen auch andere zelluläre Mechanismen aktiviert zu werden. Lim konnte beobachten, daß die PDT mit Porphyrinen und Photofrin II[®] neben einer Aktivierung des Komplementsystems und der dermalen Mastzellen die Bildung und Freisetzung von vasoaktiven, inflammatorischen (z.B. Eicosanoide) und immunmodulierenden Mediatoren induziert, und vermutlich sekundär eine Akkumulation von Neutrophilen auslöst⁵³.

Boehncke et al berichten von den Auswirkungen von PDT mit Photosan 3[®] an Psoriasis-Patienten. Darin beschreiben sie, wie die Expression der Interleukine 1 und 6 und TNF- α signifikant reduziert wurde⁵⁴.

In der HNO berichtet Schweitzer von der Behandlung von Karzinomen und Sarkomen des Nasopharynx und des Gaumens mit Dihämatoporphyrinether bei 12 Patienten, von denen 11 in eine Teil- bzw. Komplette Remission gebracht werden konnten⁵⁵. Delbove et al berichten von einer Remissionsrate von 73% bei 33 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Stimm lippen, die sie mit Hämatoporphyrinderivat sensibilisierten⁵⁶. Feyh et al berichten von 94 Patienten mit unterschiedlichen Tumoren (Tis - T2) im Kopf – Hals – Bereich, und 21 Patienten mit laryngealer Papillomatosis, die mit Photosan 3[®] behandelt wurden, wovon 95% eine komplette Remission zeigten⁵⁷.

Seit Anfang der 90er Jahre wird auch der Barrett-Ösophagus mit unterschiedlichen Photosensibilisatorn (ALA, systemisch) behandelt. Overholt et al berichten von einer kompletten Heilung nach Behandlung mit Dihämatoporphyrinether bei 43 von 100 Patienten, bzw. einer Elimination des dysplastischen Epithels mit der Neubildung von unauffälligem Plattenepithel bei 78 dieser Patienten⁵⁸. Andere Autoren berichten über Behandlungen superfizieller Karzinome des Magen-Darmtraktes nach oral verabreichter ALA. Nebenwirkungen, die im Rahmen der PDT mit HpD als Photosensibilisator auftreten können, sind Dysphagie, Strikturen, bis hin zu Fisteln. Savary et al führten eine Studie mit 31 Patienten durch, die an einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (Tis bzw. T1a) erkrankt waren. Jeweils ein Drittel des Patientenkollektivs wurde mit Hämatoporphyrinderivaten, Photofrin II[®] und m-THPC behandelt. Bei 84% der Patienten entwickelte sich innerhalb des Nachbeobachtungszeitraumes von 2 Jahren kein Rezidiv⁵⁹.

In der Gynäkologie haben Koren und Alth in einer Pilotstudie 7 Patientinnen mit primärem Endometrium-Ca (FIGO 1a) und 4 mit Rezidiven nach Behandlungen durch etablierte Therapien mit Photosan 3[®] behandelt. Dabei wurde die interstitielle PDT für Tumoren mit

einer Tiefe von mehr als 1cm als alternatives Verfahren eingesetzt. Eine komplette Remission wurde bei 8, und eine Teilremission bei 2 Patientinnen erreicht⁶⁰. Tsukagoshi⁶¹ erwähnt eine Erfolgsquote von 94% für die Behandlung von zervikalen Dysplasien mit Photofrin II[®].

Faßt man die Berichte zusammen, so stellt zum heutigen Zeitpunkt die PDT eine sinnvolle Alternative zu den etablierten Therapiemodalitäten nicht nur für die palliative, sondern unter Berücksichtigung des Stadiums auch für die kurative Therapie von Tumoren von unterschiedlichen Malignitätsgraden dar. Photosensibilisatoren der ersten Generation haben ihren Stellenwert in vielen Studien bewiesen. Die Photosensibilisatoren der neuen Generation mit interessanten pharmakologischen und physikochemischen Eigenschaften müssen ihren Stellenwert noch künftig nachweisen

Die Verwendung neuer Photosensibilisatoren mit kurzer biologischer Halbwertszeit und entsprechend geringem Hautsensibilisierungspotential hat zu neuen Anwendungsmöglichkeiten geführt. Hierzu gehört vor allem der Einsatz des Benzoporphyrinderivats bei der Behandlung der feuchten Makuladegeneration in der Ophthalmologie^{5,70}.

1.3.3 Nebenwirkungen

Die Photosensibilisierung der Haut, die wichtigste Nebenwirkung einer PDT mit Porphyrinen, entspricht der anderer photoaktiver Substanzen wie Antibiotika, Phytotherapeutika, Kosmetika u.a. ^{38,62}. Die Sensibilisierung kann, abhängig vom Sensibilisator und der nachfolgenden Lichtexposition, das Bild eines leichten Schubs einer polymorphen Lichtdermatose zeigen, bis hin zu schweren Epidermolysen und Nekrosen, ähnlich der kongenitalen erythroetischen Porphyrie. Der Grundmechanismus der kongenitalen erythroetischen Porphyrie, nämlich ein Defekt der Ferrochelatase, entspricht genau dem einer Photodynamischen Therapie⁴⁵. In der Regel sind solche Hautirritationen passager, und hinterlassen Narben nur bei völliger Außerachtlassung aller Schutzmaßnahmen.

1.3.4 Toxizität

Erkenntnisse bezüglich der Dunkeltoxizität und Pharmakokinetik sind zum großen Teil anhand von Versuchen mit Zellkulturen gewonnen worden. Die Gruppe von Chang et al untersuchte die Wirkung von 5-ALA und Photofrin auf menschliche Endothelzellen, und konnte zeigen, daß beide Substanzen in den verwendeten Konzentrationen ähnliche

Zelltoxizitäten aufweisen⁶³. In einer Arbeit von Vonarx-Coinsman et al an HepG2-Zellen konnte gezeigt werden, daß die Applikation von 5-ALA in einer Konzentration von 50 µg/ml eine Dunkeltoxizität von 21%, in einer Konzentration von 100 µg/ml dagegen eine von 34% aufwies, während HpD nur eine geringe Dunkeltoxizität bei den verwendeten Konzentrationen von 2,5 und 5 µg/ml besaß⁶⁴. Fiedler et al inkubierten Hepatozyten aus Ratten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Photosan 3[®], und stellten eine zytotoxische Schwelle zwischen 10 und 100 µg/ml fest⁶⁵. Diese Ergebnisse werden durch Tierversuche bestätigt. Einem Bericht eines Forschungszentrums zufolge⁶⁶ liegt die i.v. LD50 für Photosan 3[®] bei 500 mg/kg Körpergewicht für Ratten, während Dougherty eine LD50 für Photofrin II[®] von 130 mg/kg Körpergewicht für Mäuse berichtet⁶⁷.

Bei all diesen Untersuchungen hat sich also herausgestellt, daß eine Dunkeltoxizität erst bei Konzentrationen von Relevanz ist, die weit über denen liegen, die für phototoxische Reaktionen benötigt werden, und die in vivo nicht erreicht werden können.

1.3.5 Stoffwechselstörungen

Der wesentliche Metabolismus- und Ausscheidungsweg von sowohl Photofrin II[®] als auch Photosan 3[®] führt über die Leber. Leberfunktionsstörungen stellen nicht automatisch eine Kontraindikation zur Therapie mit diesen Substanzen dar, da ihr Einsatz wegen der fehlenden Dunkeltoxizität eine große therapeutische Breite aufweist. Bei Leberfunktionsstörungen ist gegebenenfalls an eine erheblich verlängerte und verstärkte Photosensibilisierung zu denken.

1.3.6 Immunreaktion

Präparationen der Hämatoporphyrinderivate besitzen ein allergisches Potential, das im wesentlichen eine Frage der Reinheit ist. Die heute erhältlichen Pharmaka, wie Dihämatoporphyrinäther (DHE: Photofrin[®]) oder ein Hämatoporphyrinderivat (HpD) wie z.B. Photosan 3[®], besitzen einen so hohen Reinheitsgrad, daß Berichte über allergische Reaktionen eine Ausnahme sind. Das HpD wird seit langer Zeit vielen Geriatrika in signifikanten Konzentrationen zugesetzt. Dadurch besteht zwar ein Photosensibilisierungsrisiko, das aber zu keiner Häufung an Zwischenfällen geführt hat.

1.4 Photosensibilisatoren

1.4.1 Klassifikation der Photosensibilisatoren

Die PDT ist eine *selektive* Therapie, da die verwendeten photoaktiven Substanzen sich mehr im entarteten Gewebe anhäufen als im normalen. Diese Anreicherung, zusammen mit der gezielten Applikation des Lichts, bestimmt wie exakt PDT in der Schädigung des entarteten Gewebes sein kann. Die selektive Anreicherung im Zielgewebe hängt nicht nur vom Photosensibilisator ab, sondern auch von der biochemischen Zusammensetzung und Verteilung der Zellkompartimente.

Im Gegensatz hierzu ist der Grad, in dem optische Energie in die Sauerstoffaktivierung umgesetzt wird, eine quantitative physikalische Größe. Er ist, wie das Absorptionsspektrum, charakteristisch für die individuelle Substanz, und hängt von der angewendeten optischen Wellenlänge ab.

Die für aktuelle und zukünftige klinische Anwendungen interessanten Photosensibilisatoren können entsprechend ihren unterschiedlichen chemischen, physikalischen und pharmakokinetischen Eigenschaften unterteilt werden.

Grundsätzlich gilt für alle Photosensibilisatoren das gleiche Hauptziel, nämlich die selektive Generierung von aktiviertem Sauerstoff in den Tumorzellen. Die am häufigsten in der systemischen PDT benutzten Substanzen sind die Porphyrine, die der ersten Generation der Photosensibilisatoren angehören.

Unter den wichtigen Photosensibilisatoren, die bei der topischen PDT Verwendung finden, befinden sich die Thiazin-Farbstoffe Methyleneblau und Toluidin-Blau, und das Protoporphyrin IX, das aus dem Vorläufer δ -Aminolaevulinsäure generiert wird.

1.4.2 Farbstoffe

Die Thiazin-Farbstoffe enthalten ein dreifaches Ringsystem. Sie können auf Schleimhäuten topisch appliziert werden, z.B. in der Zahnheilkunde, wo sie zur Zerstörung von Bakterien führen, ohne wesentliche Nebenwirkungen zu verursachen. Sie werden auch in der HNO benutzt, um oberflächliche Läsionen von Schleimhäuten, z.B. Leukoplakien, zu behandeln. Hierbei sind lange Remissionen erreicht worden. Methyleneblau ist wasserlöslich, und hat ein breites Absorptionsband mit einem Maximum, abhängig vom Lösungsmittel, um 665 nm. Toluidin-Blau ist sehr ähnlich, mit einem Maximum um 625 nm. Aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit können diese Substanzen biologische Membranen schlecht passieren.

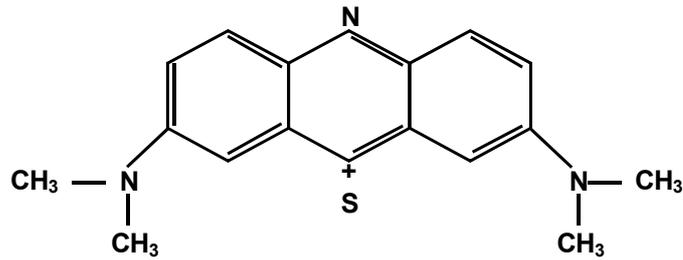


Abb. 1

Methylen-Blau

1.4.3 Porphyrine

1.4.3.1 Die Rolle von Porphyrinen in der PDT

Die wichtigsten Substanzen in der PDT gehören zur Familie der Porphyrine, hauptsächlich in Form der natürlich vorkommenden Hämatoporphyrine und ihrer Derivate. Sie bilden den Ausgangsstoff für viele der gegenwärtigen Entwicklungen. Porphyrine werden oft „Photosensibilisatoren der ersten Generation“ genannt. Sie sind die am häufigsten eingesetzten Substanzen. Ihre nachgewiesene Wirksamkeit dient als Maßstab für neuere Substanzen.

1913 unternahm Meyer-Betz mit intravenös appliziertem Hämatoporphyrin den ersten dokumentierten klinischen Versuch in der modernen Geschichte der PDT als Selbstversuch. Wegen der seitdem mit Porphyrinen gemachten Erfahrungen, und wegen ihrer geringen Dunkeltoxizität, werden vornehmlich Porphyrine als Photosensibilisatoren angewandt. Diese in der Natur ubiquitär vorkommenden Substanzen sind seit Jahrzehnten insbesondere bezüglich ihrer chemischen und photophysikalischen Eigenschaften weiterentwickelt worden, so daß der gezielte Einsatz in der Tumorthherapie verbessert werden kann, vor allem im Hinblick auf

- die Selektivität, d.h. die Spezifität einer erhöhten Aufnahme und Speicherung durch entartetes Gewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe
- die Ansprechraten
- die Nebenwirkungen
- die Eindringtiefe in das Tumorgewebe

1.4.3.2 Grundstrukturen der Porphyrine und ihrer Derivate

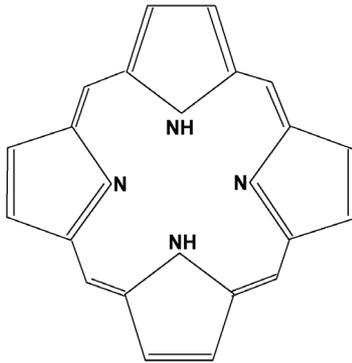
Einige der aktuell vielversprechendsten Photosensibilisatoren werden auf der Basis der Porphyrine durch die Expansion des Ringsystems und Modifikation der Seitenketten synthetisiert. Die Substanzen der sogenannten zweiten Generation zeigen Verbesserungen in ihrer Pharmakokinetik, sowie eine Verschiebung der Maxima der Absorptionsspektren zu längeren Wellenlängen. Die Pharmakokinetik der monomeren Einheiten hängt hauptsächlich von den Seitenkettenen, die photophysikalischen Qualitäten hängen vom Ringsystem ab.

Der hydrophobe Tetrapyrrolring stellt das Gerüst der Porphyrine dar. Er besteht aus Kohlenstoff, Stickstoff und Wasserstoffatomen, und ist apolar. Porphyrinderivate werden durch die Bildung von Seitenketten und die Zusammenkopplung der monomeren Untereinheiten erzeugt und hierdurch voneinander unterschieden. Die Wasserlöslichkeit der Derivate wird stark von den Seitenketten beeinflusst. Sie wird durch die Anwesenheit von geladenen Seitengruppen, zum Beispiel Säure-Gruppen, erhöht. Die Dimere und Oligomere, die bei der PDT Verwendung finden, entstehen durch Ester- oder Äther-Verbindungen. Lockere Aggregate von Monomeren entstehen bei der Herstellung einer Lösung. Ihre Tendenz zur Bildung wird durch hohe Konzentrationen verstärkt. Die Membrandurchgängigkeit wird hauptsächlich von den Seitenketten bestimmt.

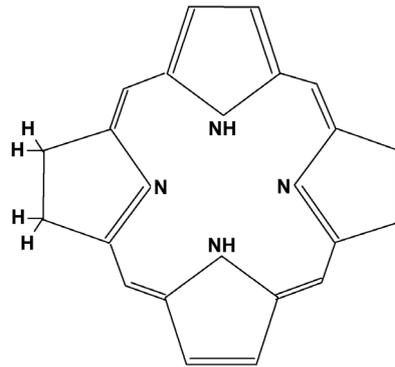
Die gegenwärtigen Entwicklungen zielen hauptsächlich auf Verbesserungen, die zu einer besseren Selektivität bei der Tumorzellaufnahme führen. Diese ist das wichtigste Kriterium für eine erfolgreiche Anwendung, und bedeutet eine gleichzeitige Verminderung der Nebenwirkungen, wie z.B. Hautphotosensibilisierung. Überdies soll die nachgewiesene hohe Wirksamkeit dieser natürlichen Substanzen bei der Umwandlung optischer Energie in die Aktivierung von Sauerstoff erhalten bleiben.

Die Chlorine, eine Gruppe der zweiten Generation, sind im Wesentlichen reduzierte Porphyrine, und finden eine breite Verwendung⁹. Hierzu zählt das Benzoporphyrinderivat (BPD)¹⁰. Bacteriochlorophyll-Derivate und Pheophorbide, stabile Derivate der bakteriellen Chlorophylle, sind mit den Porphyrinen eng verwandt. Phthalocyanine und Naphthalocyanine, die Azaporphyrin-Derivate sind, zeigen eine hohe Tumorselektivität, sind einfach zu synthetisieren, und sehr stabil. Ein wesentlicher Unterschied zu den Porphyrinen besteht in der Existenz von 8 Stickstoffatomen im inneren Ring des Moleküles, anstelle von 4. Sie weisen eine hohe Absorption, eine hohe Ausbeute von reaktivem Sauerstoff und eine gute Tumorselektivität auf^{8,68,69}.

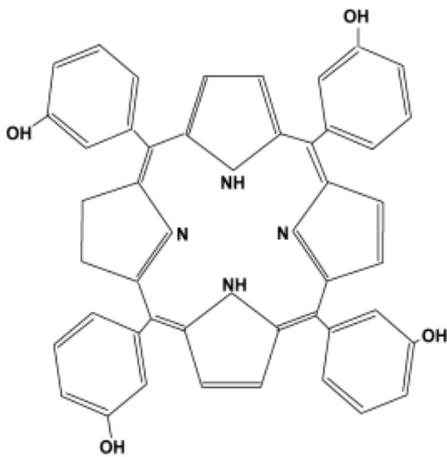
Die neueren Verbindungen befinden sich teilweise noch in der vorklinischen Evaluierung, andere sind, wie schon erwähnt, bereits zugelassen, wie beispielsweise Verteporfin® (Benzoporphyrinderivat) zur Therapie der feuchten Makuladegeneration^{5,70}.



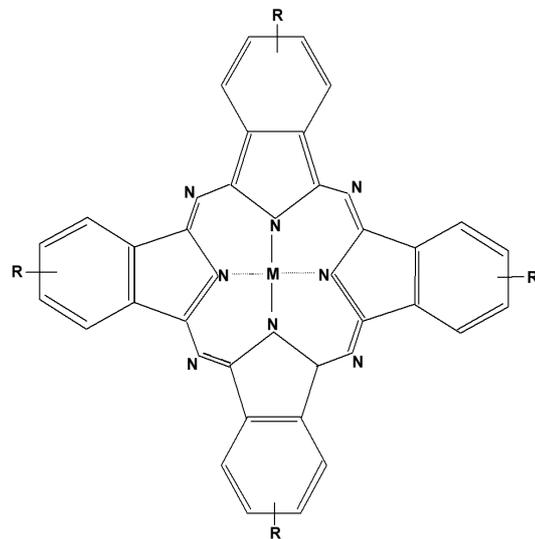
Tetrapyrrolring



Chlorin



m-THPC



Metallophthalocyanine

Abb. 2 **Strukturdiagramme repräsentativer Photosensibilisatoren**

1.4.4 Photosensibilisator-Verteilung in Gewebe

Die Hämatoporphyrinderivate können stark in der Milz und Leber, im Stroma des Tumors, in der Serosa und Submukosa des Magens und in der Dermis akkumulieren. Am ausgeprägtesten ist die Anreicherung im Retikuloendothelialen System, wie z.B. in den Kupffer-Stern-Zellen der Leber, den freien und ortsständigen Makrophagen des Bindegewebes und des Tumors, und den Makrophagen der Milz⁷¹.

Der zugrundeliegende Mechanismus der unterschiedlichen Verteilungen der Photosensibilisatoren in den verschiedenen Gewebsarten und Organen ist nicht in allen Einzelheiten klar. Der Transport im Blut spielt sicherlich eine Rolle, z.B. durch die Bindung der Photosensibilisatormoleküle an die Lipoproteine im Plasma oder an Albumin. Eine Lipoproteinbindung scheint die Aufnahme in die Tumorzellen zu begünstigen, womöglich mit Hilfe von LDL-Rezeptoren, während eine Bindung an Albumin eher die Anreicherung im Tumorstroma fördert⁷²⁻⁷⁵.

Im Wellenlängenbereich von UV bis ins tiefe Infrarot nimmt die Penetrationstiefe des Lichts im Gewebe mit höherer Wellenlänge zu. Aus diesem Grund erfolgt die Anregung eines Photosensibilisators generell bei der längstmöglichen Wellenlänge. Eine Behandlung mit Hämatoporphyrinderivaten wird deshalb im allgemeinen bei einer Lichtwellenlänge von circa 630nm durchgeführt. Solches Licht entspricht einem weit im roten Spektralbereich liegenden Absorptionsmaximum. Bei solchen Wellenlängen kann eine wirkungsvolle Penetration des Lichts, und damit eine Schädigung des Zielgewebes bis circa 1cm erreicht werden. Diese geringe Eindringtiefe bedeutet, daß das klassische Anwendungsfeld der PDT in der Bestrahlung beispielsweise von flachen Präkanzerosen oder Tumoren, bzw. in der palliativen Behandlung kutaner Metastasen besteht. Tieferliegendes Gewebe kann mittels interstitieller PDT behandelt werden. Ein zentrales Forschungsziel ist die Entwicklung von Photosensibilisatoren, die bei noch längeren Wellenlängen eingesetzt werden können.

Es gibt bestimmte Indikationen, wie etwa die Bestrahlung von Barrett-Ulcera oder Blasenkarzinomen, bei denen auch Lichtquellen mit einer kürzeren Wellenlänge, wie dem Argonlaser, eingesetzt werden. Dessen Wellenlänge von 514 nm liegt innerhalb eines Absorptionsmaximums von Hämatoporphyrinderivaten. Dieses repräsentiert jedoch den Ausnahmefall der absichtlichen Verwendung der Lichtpenetrationseinschränkung.

Der Sinn liegt in der Vermeidung der Schädigung von tieferliegenden Gewebsstrukturen. Dies verdeutlicht, wie man die PDT durch die Wahl der Wellenlänge modulieren kann.

Die Pharmokinetik eines Photosensibilisators hat eine essentielle Bedeutung für die optimale Therapieplanung. Kenntnisse der Verteilungsdynamik des Photosensibilisators hinsichtlich sowohl der Kompartimente Blut und Liquor als auch der einzelnen Organe sind unverzichtbar. Sie werden benötigt, um den besten Zeitpunkt für die Bestrahlung festzulegen, und die wesentlichen Nebenwirkungen, wie z.B. die Photosensibilisierung der Haut oder der Netzhaut durch Licht- bzw. Sonnenschutz zu vermeiden.

Die Anreicherung innerhalb eines Gewebes wird nicht nur durch die passive, sondern auch durch die selektive Aufnahme des Photosensibilisators bestimmt. Die Verteilung auf zellulärer Ebene kommt als zusätzlicher Faktor hinzu: so reichern sich hydrophile Photosensibilisatoren vorrangig in Lysosomen und im Zytoplasma an, hydrophobe dagegen in zellulären Membransystemen wie z.B. Mitochondrienmembranen, dem endoplasmatischen Retikulum und der Zellmembran selbst. Neben der direkten Aufnahme können auch Vorstufen des Photosensibilisators verabreicht werden, wie z.B. 5-Aminolävulinsäure, die in die Zelle aufgenommen und im Sinne eines Pro-Drugs zum aktiven Photosensibilisator Protoporphyrin IX umgewandelt wird. Hydrophobe Photosensibilisatoren (wie Phthalocyanine) werden an Trägermoleküle wie Lipoproteine oder Antikörper gebunden, um einerseits die selektive Aufnahme durch das Zielgewebe zu erhöhen, und andererseits ihre intravenöse Applizierbarkeit zu ermöglichen.

Die effektive Anreicherung wird auch durch die Vorgänge der Metabolisierung in den Zielzellen und durch die Diffusion aus dem Gewebe heraus mitbestimmt. Ein für die PDT adäquater Begriff der Selektivität muß all den genannten Elementen Rechnung tragen.