

Aus dem Institut für Experimentelle Medizin der
Universität zu Köln

eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie des
Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität
Berlin

**WIRKUNGEN DER PHOTODYNAMISCHEN
THERAPIE MIT DEM PHOTSENSIBILISATOR
MTHPC (FOSCAN[®]) AUF GROSSE BLUTGEFÄßE,
NERVEN UND MUSKELGEWEBE
IM KANINCHEN-TIERMODELL**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Maja Rühling

Tierärztin aus Berlin

Berlin, 2004

Journal Nr. 2842

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Leo Brunberg
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Roland Rudolph
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. J.H. Fischer
Dritter Gutachter:	Univ. Prof. Klaus-Dieter Budras

Tag der Promotion: 27. August 2004

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1.	Historische Entwicklung der photodynamischen Therapie.....	3
2.2.	Photodynamische Therapie und Photosensibilisatoren.....	5
2.2.1.	Mechanismus und Wirkungsweise der photodynamischen Therapie.....	6
2.2.1.1.	Mechanismus auf molekularer Ebene	6
2.2.1.2.	Wirkung auf zellulärer Ebene	8
2.2.1.3.	Wirkung auf Gewebeebene.....	9
2.2.1.4.	Immunologische Effekte	11
2.2.2.	Photodynamische Therapie mit Porphyrinen	11
2.2.3.	Photodynamische Therapie mit mTHPC.....	12
2.2.3.1.	mTHPC als Photosensibilisator	12
2.2.3.1.1.	Biochemische Eigenschaften von mTHPC	13
2.2.3.1.2.	Photochemische Eigenschaften von mTHPC.....	13
2.2.3.1.3.	Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von mTHPC.....	14
2.2.3.1.3.1.	Metabolismus	14
2.2.3.1.3.2.	Aufnahme, Bioverteilung und Ausscheidung	15
2.2.3.1.3.3.	Intrazelluläre Aufnahme und Verteilung.....	17
2.2.3.1.3.4.	Anreicherung in speziellen Geweben	18
2.2.3.1.3.4.1.	Anreicherung in Gefäßwänden	18
2.2.3.1.3.4.2.	Anreicherung in Muskelgeweben.....	18
2.2.3.1.3.4.3.	Anreicherung in Tumorgeweben	18
2.2.4.	Aktivierung des Photosensibilisators durch Lichtexposition.....	20
2.2.4.1.	Lasersysteme	20
2.2.4.2.	Bestrahlung.....	21
2.2.4.3.	Aktivierung von mTHPC.....	21
2.3.	Klinischer Einsatz der photodynamischen Therapie beim Menschen	22
2.3.1.	Kopf-Hals-Tumoren.....	22
2.3.2.	Klinischer Einsatz als intraoperative photodynamische Therapie.....	23
2.3.3.	Nebenwirkungen	24
2.4.	Fluoreszenzmikroskopie.....	26

3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....	28
3.1.	Zeitlicher Ablauf der photodynamischen Therapie.....	28
3.2.	Methodik der Versuche.....	28
3.2.1.	Kontrollgruppen	28
3.2.2.	Erster Versuchsteil	29
3.2.2.1.	Versuch I/1	29
3.2.2.2.	Versuch I/2	29
3.2.3.	Zweiter Versuchsteil (Versuch II)	30
3.2.4.	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	31
3.3.	Materialien.....	32
3.3.1.	Photosensibilisator	32
3.3.2.	Tiere.....	32
3.3.3.	Laser	32
3.4.	Methoden.....	33
3.4.1.	Injektion des Photosensibilisators.....	33
3.4.2.	Intraoperative Bestrahlung.....	33
3.4.2.1.	Anästhesie und Vorbereitung der Tiere.....	33
3.4.2.2.	Operation.....	34
3.4.2.3.	Photodynamische Behandlung / Bestrahlung.....	36
3.4.2.4.	Abschluss der Operation	36
3.4.2.5.	Weiterbehandlung	36
3.4.3.	Tötung und Entnahme der Gewebeproben.....	38
3.4.3.1.	Tötung und Perfusion.....	38
3.4.3.2.	Entnahme der Proben.....	39
3.4.3.3.	Weitere Probenbehandlung.....	41
3.4.4.	Histologische Untersuchung.....	42
3.4.5.	Detaillierte Bewertung der Veränderungen (Score).....	42
3.4.5.1.	Beurteilung der Arterien, Venen und Nerven	42
3.4.5.1.1.	Beurteilung der großen Arterien (Score).....	43
3.4.5.1.2.	Beurteilung der Venen (Score)	43
3.4.5.1.3.	Beurteilung der Nerven (Score).....	44
3.4.5.1.4.	Beurteilung der kleinen Gefäße (Score)	45
3.4.6.	Beurteilung der Muskulatur, des Binde- und Fettgewebes (Score).....	45
3.4.6.1.	Statistische Auswertung.....	54
3.4.7.	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	54
3.4.7.1.	Probenentnahme für die Fluoreszenzmikroskopie	54
3.4.7.2.	Aufbereitung der Biopsien.....	55
3.4.7.3.	Weiterverarbeitung der gefrorenen Biopsien	55
3.4.7.4.	Fluoreszenzmikroskopie	55

4.	ERGEBNISSE	57
4.1.	Kontrollgruppen.....	57
4.2.	Erster Versuchsteil.....	57
4.2.1.	Versuch I/1	58
4.2.1.1.	Histopathologische Resultate.....	58
4.2.1.1.1.	Gruppe I/1 a – d (BI 24 – 96 Std., 10 J/cm ²)	60
4.2.1.1.1.1.	Arterien, Venen, Nerven.....	60
4.2.1.1.1.2.	Kleine GefäÙe.....	60
4.2.1.1.2.	Gruppe I/1 e – h (BI 24 – 96 Std., 20 J/cm ²)	61
4.2.1.1.2.1.	Arterien, Venen und Nerven.....	61
4.2.1.1.2.2.	Kleine GefäÙe.....	62
4.2.1.1.3.	Muskulatur, Binde- und Fettgewebe (Versuch I/1).....	62
4.2.1.1.4.	Zusammenfassung des Versuchs I/1.....	63
4.2.1.1.4.1.	Schädigungen in Abhängigkeit von der Lichtintensität	63
4.2.1.1.4.2.	Schädigungen in Abhängigkeit vom Behandlungsintervall.....	65
4.2.1.2.	Nebenwirkungen	67
4.2.2.	Versuch I/2	68
4.2.2.1.	Histopathologische Resultate.....	68
4.2.2.1.1.	Arterien, Venen und Nerven.....	69
4.2.2.1.2.	Kleine GefäÙe.....	70
4.2.2.1.3.	Muskulatur, Binde- und Fettgewebe	71
4.2.2.2.	Nebenwirkungen	71
4.3.	Zweiter Versuchsteil	71
4.3.1.	Histopathologische Ergebnisse.....	71
4.3.1.1.	Gruppe II a (BI 3 Minuten).....	72
4.3.1.2.	Gruppe II b (BI 24 Stunden)	74
4.3.1.3.	Zusammenfassung des Versuch II	76
4.3.2.	Nebenwirkungen	76
4.3.2.1.	Gruppe II a	76
4.3.2.2.	Gruppe II b	77
4.4.	Fluoreszenzmikroskopie.....	77
5.	DISKUSSION.....	82
5.1.	Diskussion der Methode	82
5.1.1.	Tiermodell	82
5.1.2.	Diskussion der Methodik	82

5.2.	Diskussion der Ergebnisse	84
5.2.1.	Schädigung in Abhängigkeit von den Behandlungsparametern	85
5.2.1.1.	Schädigung in Abhängigkeit von der Lichtintensität	85
5.2.1.2.	Schädigung in Abhängigkeit vom Behandlungsintervall	86
5.2.1.2.1.	Behandlungsintervalle 24 bis 96 Stunden	87
5.2.1.2.2.	Behandlungsintervalle 6 Stunden und 3 Minuten	91
5.2.2.	Auswirkungen der PDT auf die untersuchten Strukturen	95
5.2.2.1.	Auswirkungen auf große Gefäße und Nerven	95
5.2.2.2.	Auswirkungen auf die Mikrozirkulation	99
5.2.2.3.	Schädigung der Skelettmuskulatur	100
5.2.3.	Diskussion der Nebenwirkungen	101
5.2.4.	Diskussion der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen	103
6.	ZUSAMMENFASSUNG	106
7.	SUMMARY	109
8.	LITERATURVERZEICHNIS	111
9.	ANHANG	122

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Aktivierung des Photosensibilisators und Photooxidation durch Typ I und Typ II Reaktionen.....	7
Abb. 2 mTHPC (Foscan®).....	13
Abb. 3 Absorptionsspektrum von mTHPC	14
Abb. 4 Formaler Ablauf der photodynamischen Therapie.....	28
Abb. 5 Hintergliedmaße des Kaninchens, anatomische Gegebenheiten, mediale Ansicht.....	35
Abb. 6 Hals und Brust des Kaninchens, laterale Ansicht.....	35
Abb. 7 Hals des Kaninchens, ventrale Ansicht	35
Abb. 8 OP-Situs.....	37
Abb. 9 Bestrahlung des Operationsfeldes	37
Abb. 10 Entnahme der Gewebeprobe aus der Femoralismuskulatur	40
Abb. 11 Gewebeprobe Aufsicht	40
Abb. 12 Arterie, Scorewert 0.....	47
Abb. 13 Arterie, Scorewert 1.....	47
Abb. 14 Arterie, Scorewert 2.....	47
Abb. 15 Arterie, Ausschnitt aus Abb. 14.....	47
Abb. 16 Arterie, Scorewert 3.....	48
Abb. 17 Arterie, Scorewert 3.....	48
Abb. 18 Arterie, Scorewert 3.....	48
Abb. 19 Vene, Scorewert 0.....	49
Abb. 20 Vene, Scorewert 1.....	49
Abb. 21 Vene, Scorewert 3.....	49
Abb. 22 Vene, Scorewert 3.....	50
Abb. 23 Nerv, Scorewert 0	51
Abb. 24 Nerv, Scorewert 1	51
Abb. 25 Nerv, Scorewert 2	51
Abb. 26 Nerv, Scorewert 3	51
Abb. 27 Muskelnekrose, Scorewert 1.....	52
Abb. 28 Muskelnekrose, Scorewert 3.....	52
Abb. 29 mesenchymale Reaktion.....	52

Abb. 30 Obliterierter Seitenast einer unveränderten Arterie.....	53
Abb. 31 Muskelnekrose mit unveränderten Arteriolen	53
Abb. 32 Schädigung der großen Gefäße und Nerven in Abhängigkeit von der Lichtintensität (Versuch I/1)	64
Abb. 33 Schädigung der kleinen Gefäße in Abhängigkeit von der Lichtintensität (Versuch I/1)	65
Abb. 34 Schädigung der Arterien in Abhängigkeit von den Behandlungsparametern Behandlungsintervall und Lichtintensität (Versuch I/1).....	66
Abb. 35 Schädigung der Venen in Abhängigkeit von den Behandlungsparametern Behandlungsintervall und Lichtintensität (Versuch I/1).....	66
Abb. 36 Schädigung der Nerven in Abhängigkeit von den Behandlungsparametern Behandlungsintervall und Lichtintensität (Versuch I/1).....	67
Abb. 37 Schädigung der kleinen Gefäße in Abhängigkeit von den Behandlungsparametern Behandlungsintervall und Lichtintensität (Versuch I/1).....	67
Abb. 38 Schädigung der großen Gefäße und Nerven bei einem BI von 3 Minuten und 6 Stunden (Versuch I/2)	70
Abb. 39 Schädigung der großen Gefäße und Nerven bei einem BI von 3 Minuten (Versuch II)	73
Abb. 40 Schädigung der großen Gefäße und Nerven bei einem BI von 24 Stunden (Versuch II)	75
Abb. 41 Fluoreszenzmikroskopie 6 Minuten nach der Injektion; Gefäßwand.....	79
Abb. 42 Fluoreszenzmikroskopie 6 Minuten nach der Injektion; Skelettmuskulatur	79
Abb. 43 Fluoreszenzmikroskopie 24 Stunden nach der Injektion; Gefäßwand	80
Abb. 44 Fluoreszenzmikroskopie 24 Stunden nach der Injektion; Skelettmuskulatur	80
Abb. 45 Fluoreszenzmikroskopie 72 Stunden nach der Injektion; Gefäßwand	81
Abb. 46 Fluoreszenzmikroskopie 72 Stunden nach der Injektion; Skelettmuskulatur	81

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
AC	A. carotis
AF	A. femoralis
BI	Behandlungsintervall
dext.	dexter
DHE	Dihämatoporphyrinester
ext.	externa
FM	Femoralismuskulatur
HDL	High Density Lipoprotein
HM	Halsmuskulatur
HpD	Hämatoporphyrinderivat
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
int.	interna
KG	Körpergewicht
KIHG	Kleine Halsgefäße
KIFG	Kleine Femoralisgefäße
LDL	Low Density Lipoprotein
LIF	Licht-induzierte Fluoreszenzmikroskopie
M.	Musculus
mTHPC	meso-(tetrahydroxyphenyl)Chlorin
N.	Nervus
NF	N. femoralis
NV	N. vagus
PDT	Photodynamische Therapie
p.i.	post injectionem
PS	Photosensibilisator
S	Schädigungsgrad / Scorewert
sin.	sinister
Std.	Stunde
V.	Vena