

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Historische Entwicklung der photodynamischen Therapie

Schon im antiken Rom wurde das Sonnenlicht zur Behandlung von Hautkrankheiten eingesetzt, und im alten Ägypten, in China und Indien wurden Pflanzenextrakte auf die Haut aufgetragen, um dann in Kombination mit Sonnenlichtexposition z.B. Vitiligo zu behandeln. Damit wurde zum ersten Mal die photochemische Therapie im eigentlichen Sinne angewandt. Die Nutzung von Licht zur Therapie von Krankheiten geht somit auf eine lange Historie zurück (SPIKES, 1985; zitiert aus KÜBLER, 1999a).

Direkte photodynamische Effekte wurden zum erstenmal von RAAB im Jahr 1900 nachgewiesen. Er zeigte, dass *Paramecium caudatum* (Pantoffeltierchen) absterben, wenn sie sich in einer acridin-haltigen Lösung befinden und dem Licht ausgesetzt werden. Weder der Farbstoff Acridin noch das Licht allein hatte solch eine Wirkung auf die Einzeller (zitiert aus BONNETT, 1999). VON TAPPHEIMER und JESIONEK beschrieben 1903 die Tumorbehandlung mittels lokal appliziertem Eosin, was nach Licht-Exposition zu einem Tumorrückgang führte (zitiert aus BONNETT, 1999).

1913 wies MEYER-BETZ im Selbstversuch die photodynamischen Effekte des endogenen Farbstoffs Hämatoporphyrin im Körper des Menschen nach, indem er sich selbst 200 mg des Farbstoffes spritzte und sich danach bewusst dem Sonnenlicht aussetzte, was zu einer schweren aber reversiblen Schädigung der Haut an Händen und im Gesicht führte (zitiert aus BONNETT, 1999).

Anfang des 20. Jahrhunderts erkannte POLICARD (1924), dass Tumorgewebe mit endogenen Pigmenten (vor allem Porphyrine) angereichert sind, die das Sonnenlicht absorbieren und daraufhin fluoreszieren. Damit war erstmals ein Zusammenhang zwischen fluoreszierenden Porphyrinen und Tumorgewebe nachgewiesen. In einigen Fällen konnte in Folge der Lichtabsorption sogar ein Rückgang der Tumorerkrankung beobachtet werden (zitiert aus BONNETT, 1999).

Im Jahre 1942 beschrieben AULER und BANZER neben Tumorfluoreszenz auch Tumornekrose in tierexperimentellen Studien mit natürlichen Porphyrinen unter UV-Licht-Einwirkung. Zu dieser Zeit wurde die fluoreszierende Wirkung aber hauptsächlich zur Tumordetektion und -lokalisierung genutzt (zitiert aus BONNETT, 1999). FIGGE et al. (1948) berichteten ebenfalls über die selektive Anreicherung und Fluoreszenz von Porphyrinen in neoplastischen, aber auch embryonalen, lymphatischen und traumatisierten Geweben.

LIPSON et al. synthetisierten im Jahr 1961 erstmals Hämatoporphyrin - Derivat (HpD) aus natürlichen Hämatoporphyrinen und dokumentierten, dass dieser künstliche Farbstoff sich gezielt in Tumoren anreichert und auf Grund seiner fluoreszierenden Eigenschaften zur Tumorlokalisierung geeignet ist. Lipson war auch derjenige, der 1967 zum erstmalig diese Farbstoffe in einem klinischen Experiment bei einer Patientin mit Brustkrebsrezidiv im Sinne einer photodynamischen Therapie einsetzte, leider wurde aber nicht über das Ergebnis berichtet (zitiert aus KÜBLER, 1999a).

Nach dieser Vorarbeit von Lipson stellten DIAMOND et al. (1972) sowie KELLY und SNELL (1975) anstatt der Tumorlokalisierung die therapeutische Tumorbehandlung in den Vordergrund und prägten damit den Begriff der photodynamischen Therapie. Mit Hämatoporphyrinen sensibilisierte experimentell erzeugte Tumorzellen in Ratten konnten durch Einwirkung von Licht im Sinne einer photodynamischen Therapie zerstört werden.

Weitere Experimente an Ratten und Mäusen mit Tumoren mit dem Photosensibilisator Hämatoporphyrin führten DOUGHERTY et al. (1975) durch und berichteten über eine bevorzugte Anreicherung des Farbstoffes im Tumor und eine selektive Tumorzerstörung.

1975 führten KELLY und SNELL die ersten photodynamischen Experimente an Mäusen mit xenotransplantierten humanen Blasenkarzinomen mit Erfolg durch. Dabei wurden die Tumore zerstört, das gesunde Gewebe jedoch nur wenig oder gar nicht angegriffen.

Die erste großangelegte Studie zum klinischen Einsatz der photodynamischen Therapie wurde von DOUGHERTY et al. im Jahr 1978 veröffentlicht. Mit dieser Arbeit schafften sie die Grundlage für die weitere Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet der photodynamischen Therapie sowie der Weiterentwicklung der Photosensibilisatoren.

Es dauerte allerdings noch bis in das Jahr 1993, bis Photofrin[®] als erster Photosensibilisator für die photodynamische Therapie zur Behandlung von Blasenkrebs offiziell in Kanada zugelassen wurde. Kurze Zeit später wurde die Zulassung auch auf die Behandlung verschiedener anderer Tumoren in vielen europäischen Ländern, Japan und die USA ausgedehnt.

Verschiedene Substanzen sind seitdem entwickelt worden, um die Probleme der frühen Photosensibilisatoren auszugleichen. Die verbesserten Wirkstoffe sind die sogenannten Photosensibilisatoren der zweiten Generation. Dazu zählen Chlorine (meso-Tetra(hydroxyphenyl)chlorin, mTHPC; Aspartyl - ein Derivat vom Chlorin e6, NPe6), Purpurine (Etiopurpurin, SnET2), Benzoporphyrine (Benzoporphyrin Derivate, BpD), Phthalocyanine, Texapyrine und Aminolaevulinsäure (ALA), die eine Vorstufe des endogenen Photosensibilisators Protoporphyrin IX ist.

2.2. Photodynamische Therapie und Photosensibilisatoren

Die photodynamische Therapie (PDT) ist ein Teilgebiet der Phototherapie, die allgemein auf der Heilwirkung von Licht basiert. Ebenfalls übergeordnet ist die Photochemotherapie, bei der die Verabreichung eines Wirkstoffs und die Verabreichung von Licht kombiniert werden.

Für die photodynamische Therapie wird zusätzlich zu Licht und der photosensibilisierenden Substanz essentiell Sauerstoff im Gewebe benötigt (MA et al., 1994).

Die Lichtirridation des Photosensibilisators führt auf verschiedenen biochemischen Wegen zur Schädigung von Zellbestandteilen und letztendlich zum Zelltod. Der Photosensibilisator wird dabei intravenös, lokal oder oral appliziert und nach einem bestimmten Zeitintervall während dessen sich der Photosensibilisator im Organismus verteilt, wird der zu therapierende Gewebeanteil mit Licht einer definierten Wellenlänge bestrahlt. Im behandelten Gewebe läuft eine photochemische Reaktion ab, die zur Zellschädigung führt. Dabei wird die Tumorerstörung sowohl durch direkte Schädigung der Tumorzellen als auch durch ischämische Nekrose, also eine „Aushungerung des Tumors“ infolge Verlegung oder Obliteration der tumorversorgenden Blutgefäße diskutiert.

Das Prinzip der photodynamischen Tumorthherapie beruht auf einer selektiven Akkumulation und Retention im Tumorgewebe in Kombination mit einer gezielten Bestrahlung des Zielgewebes. Dadurch kann das Tumorgewebe selektiv zerstört und systemische und lokale Nebenwirkungen minimiert werden (RIS et al., 1991).

Ein weiterer Vorteil dieser Therapie besteht darin, dass die Toxizität nicht kumuliert. Die photodynamische Therapie kann also ohne zusätzliches Risiko für den Patienten wiederholt angewendet werden (FAN et al., 1997; DILKES et al., 1995).

Da die photodynamische Therapie ein sehr komplexer Vorgang ist, beeinflussen viele Faktoren die tumortoxischen Effekte. Diese sind zum einen vorgegeben, zum anderen kann durch die Auswahl der geeigneten Behandlungsparameter der Erfolg optimiert werden. Wichtig ist die Auswahl des geeigneten Photosensibilisators, der auf den zu behandelnden Tumor und das Behandlungsgebiet abgestimmt ist.

Die applizierte Dosis des Photosensibilisators ist neben der Applikationsart ebenso wie die applizierte Lichtenergiedosis ein wichtiger Faktor der photodynamischen Therapie. Weiterhin sind die Lichtleistungsdichte und die Wellenlänge des Lichts von essentieller Bedeutung für einen selektiven phototoxischen Effekt, also eine völlige Tumordestruktion ohne Schädigung des Gesamtorganismus und des Tumorbetts.

Einer der wichtigsten frei wählbaren Parameter, der auch in engem Zusammenhang mit den oben genannten Faktoren steht, ist das Intervall zwischen der Applikation des Photosensibilisators und der Bestrahlung. Jeder Photosensibilisator unterliegt im Organismus einem bestimmten zeitabhängigen Verteilungsmuster, daher ist es ausschlaggebend für den Erfolg der Therapie sowie für unerwünschte Nebenwirkungen, wann die Bestrahlung vorgenommen wird.

Das Ziel ist es, eine möglichst hohe Dosis an photosensibilisierender Substanz im Tumorgewebe bei gleichzeitig möglichst niedrigem Wirkspiegel im umgebenden Normalgewebe zu erzielen. Somit wird eine selektive Zerstörung des Tumorgewebes bei gleichzeitiger Schonung des umgebenden Normalgewebes möglich.

2.2.1. Mechanismus und Wirkungsweise der photodynamischen Therapie

Der Mechanismus des photodynamischen Effekts wurde seit seiner Entdeckung von vielen Autoren untersucht und ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Die notwendigen Komponenten sind eine Substanz, die photosensibilisiert werden kann, Licht zur Aktivierung des Photosensibilisators sowie Sauerstoff und natürlich der Photosensibilisator selbst (MA et al., 1994).

Es muss beachtet werden, dass die sichtbare Wirkung ein komplexes Zusammenspiel der Effekte auf der elementaren Ebene der Moleküle (Eiweiße, Fette, Enzyme etc.) auf der übergeordneten Ebene der einzelnen Zellen (Membranen, Kompartimente, Zellbestandteile, Zellkern) sowie auf der obersten Ebene des gesamten Organs bzw. Gewebes ist, in der zusätzliche Einflüsse wie Art des Gewebes, Entartungsgrad der Zellen, Gefäßversorgung, Struktur und Größe eine wichtige Rolle spielen.

2.2.1.1. Mechanismus auf molekularer Ebene

Die Basis aller photodynamischen Effekte sind photooxygenierende Prozesse durch Typ I und Typ II Reaktionen. In Anwesenheit von Sauerstoff laufen beide Reaktionen nebeneinander ab. FOOTE (1991) definierte die oxygenierenden Prozesse folgendermaßen: Der Photosensibilisator wird zuerst grundsätzlich durch die Absorption von Licht ($h\nu$) von seinem Ruhezustand auf ein energetisch höheres Niveau gehoben. Der energetisch angereicherte Photosensibilisator überträgt die Energie auf das Substrat (Typ I Reaktion) oder ein Sauerstoff-Molekül (Typ II Reaktion).

In der Typ I Reaktion reagiert das angeregte Photosensibilisator-Molekül direkt mit Molekülen in seiner Umgebung (Substrat) und bildet durch Elektronentransfer Radikale. Diese Radikale können direkt mit den Zellkomponenten reagieren (oxidiertes Substrat). Die meisten dieser Radikale reagieren jedoch mit Sauerstoff und bilden Sauerstoff-Radikale, die ihrerseits das Substrat oxidieren. Die Typ II Reaktion führt durch die Energieübertragung vom angeregten Photosensibilisator auf ein Sauerstoff-Molekül zur Bildung von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$; im anglistischen Sprachraum „singlet oxygen“). Dieses kurzfristig energetisch angereicherte Sauerstoffmolekül reagiert seinerseits mit den Zellbestandteilen und oxidiert diese. Als Typ II Reaktion gilt laut FOOTE (1991) auch die Oxidation des Substrats unter Bildung von Superoxidradikalen (O_2^-). Beide Intermediärformen des Sauerstoffs sind hochtoxische Zelloxidantien.

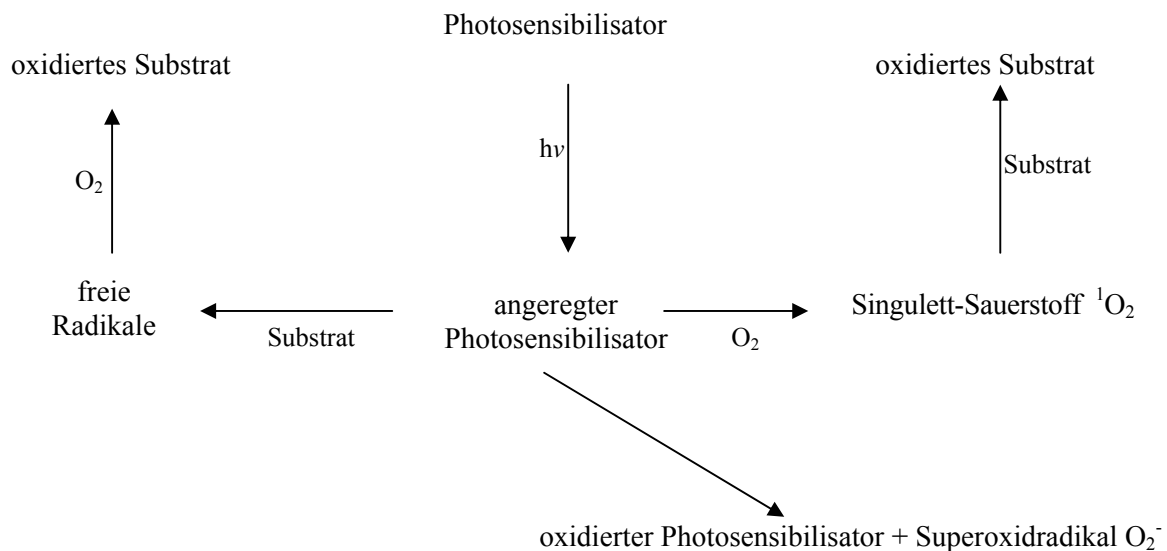


Abb. 1 Aktivierung des Photosensibilisators und Photooxidation durch Typ I und Typ II Reaktionen
aus: FOOTE (1991)

Welche Reaktion vorwiegend abläuft, ist laut SPIKES (1988) abhängig vom Sauerstoff-Angebot im Gewebe, aber auch der Photosensibilisator-Typ spielt eine Rolle.

Die photodynamischen Effekte, die durch die Oxidation der Substrate ausgelöst werden, hängen von der Art des jeweiligen oxidierten Biomoleküls ab. Vor allem Aminosäuren und ungesättigte Fette aber auch Nukleinsäuren, Alkohole und Zucker verlieren durch die Oxidation ihren biochemischen Charakter, ihre Funktion und ihren Zusammenhalt in organischen Strukturen. Enzyme verlieren ihre katalytischen Fähigkeiten, Membranen, die aus Proteinen und

Phospholipiden zusammengesetzt sind, ändern ihre Permeabilität oder rupturieren, selbst DNA-Strangbrüche werden ausgelöst (SPIKES, 1988).

Singulett-Sauerstoff und Sauerstoffradikale haben eine sehr kurze Lebensdauer, ihre mögliche Diffusionsstrecke ist deshalb begrenzt auf maximal 0,7 µm (MOAN, 1990). Zellmembranen können aufgrund ihrer geringen Dicke ohne weiteres penetriert werden, der Durchmesser eines eukaryontischen Zellkerns beträgt jedoch in der Regel etwa 5 µm. Die Schädigung der Zelle erfolgt also hauptsächlich dort, wo der Photosensibilisator im Gewebe in hoher Konzentration vorliegt, ausreichend Sauerstoff zu Verfügung steht und die lichtenergetische Aktivierung gewährleistet ist. Durch Kettenreaktionen können aber auch andere Oxidationsprozesse ausgelöst werden, die nicht in direktem Zusammenhang mit der PDT stehen.

2.2.1.2. Wirkung auf zellulärer Ebene

Wie oben beschrieben, führt die Aktivierung des Photosensibilisators über die Bildung von Singulett-Sauerstoff und Superoxidradikalen zu einer Oxidation verschiedener Zellbestandteile, wodurch vor allem Membranen, Enzymsysteme, Chromosomen sowie Zellorganellen wie Mikrosomen, Lysosomen oder Mikrotubuli verändert oder zerstört werden, was zur Schädigung der gesamten Zelle und letztlich zum Zelltod führt.

Die Aufnahme eines Photosensibilisators in die Zellen erfolgt laut MILANESI (1990) via Rezeptor-gekoppelter Endozytose. Wie stark die Zellen den Photosensibilisator anreichern, hängt von ihrer Größe, ihrem Stadium im Zellzyklus und ihrem Rezeptorangebot für Lipoproteine ab. Der Differenzierungsgrad einer Zelle hat jedoch keine Auswirkungen auf deren Sensibilität gegenüber der photodynamischen Therapie (WEST, 1992).

Der bevorzugte Ort der Anreicherung eines Photosensibilisators ist abhängig von seiner chemischen Struktur. So lagern sich *lipophile* Photosensibilisatoren hauptsächlich in Membranen an und führen nach der Aktivierung über die Oxidation der Phospholipide und Proteine zu einer Depolarisation, Rezeptorschädigung und Veränderung der Permeabilität bis hin zur finalen Ruptur jeglicher Zellmembranen. Aktivierte *Hydrophile* Photosensibilisatoren hingegen zerstören vornehmlich Lysosomenmembranen. Durch die lysosomalen Enzyme, die infolgedessen ins Zytoplasma ausströmen, kommt es zur Zytolyse. *Kationische* Photosensibilisatoren reichern sich vor allem intramitochondrial an und hemmen mitochondriale Enzyme und die Atmungskette, wodurch die Sauerstoffversorgung der Zelle gestört ist (KÜBLER, 1999).

Die Membranschädigung beginnt bereits während der Bestrahlung. Anfänglich erfahren die betroffenen Membranen eine Depolarisation, die zu einer Änderung der Permeabilität und der Ionen-Kanäle und Pumpen führt. SPECHT und RODGERS (1990) wiesen einen charakteristischen schnellen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration in den ersten Minuten nach der Bestrahlung nach. Als Ausdruck der fortschreitenden Membran-Schädigung folgen weitere Schwankungen der Elektrolyt – Konzentrationen (Natrium, Kalium, Wasserstoff u.a.).

Der hier verwendete Photosensibilisator mTHPC reichert sich intrazellulär bevorzugt in Lysosomen und Mitochondrien an (LEUNG et al., 2002; DOBLER et al., 1995). In den Mitochondrien führt die Aktivierung des Photosensibilisators zu einer Hemmung der mitochondrialen Enzyme der Atmungskette und Destabilisierung der Membran. Letzteres betrifft ebenfalls die Lysosomen, wobei die ausströmenden lysosomalen Enzyme zur Zytolyse führen.

Alle Prozesse laufen gleichzeitig ab und führen in ihrer Gesamtheit zum Zelltod. Den morphologischen Ablauf beschreiben MILANESI et al. (1990) für den Photosensibilisator Zn(II)-Phthalocyanin. Beginnend mit der Aufhellung der Mitochondrien, Schwellung und Vakuolisierung der Zellen führen die photodynamischen Effekte im weiteren Verlauf zu einer Mitochondrienauflösung, Aufrauhung des Endoplasmatischen Retikulums und sichtbaren Membranzerstörung. Dieser Prozess endet in einer völligen Nekrose und Desintegration der Zellen. Solche Kettenreaktionen können auch auf andere Zellen oder Zellsysteme Auswirkungen haben, die nicht direkt geschädigt wurden.

2.2.1.3. Wirkung auf Gewebeebene

Bezüglich der Wirkung der photodynamischen Therapie muss zwischen *in vitro* und *in vivo* unterschieden werden.

Ein wichtiger Unterschied zwischen den *in vitro* und den *in vivo* beobachteten photodynamischen Effekten ist der Einfluss auf die Gefäßversorgung des Tumors bzw. des Zielgebietes. *In vivo* greift die photodynamische Therapie nicht nur direkt die Tumorzellen an, sondern auch den gesamten Tumor durch eine „Aushungerung“ des Tumors infolge Hemmung der Blutversorgung (STAR et al., 1986; FINGAR, 1996).

Die photodynamische Tumorthherapie ist als synergistischer Komplex aus beiden Angriffspunkten zu sehen. Zum einen werden die Zellen unmittelbar photosensibilisiert und infolge Lichtapplikation zerstört (direkte Zytotoxizität), zum anderen bewirkt die PDT einen

Shut-down der Mikrozirkulation (indirekte Zytotoxizität). Die vaskulären Effekte setzen sich zusammen aus den Folgen der direkten Schädigung von Gefäßwandzellen und physiologischen Entzündungsreaktionen auf Gewebeerstörung (RIS et al., 1991; FINGAR et al., 2000). Die Folge ist eine schnelle Hypoxie im Endorgan mit anschließendem Zelltod (ischämische Nekrose).

Vor allem die Mikrozirkulation des Tumors unterliegt den vaskulären Effekten (FINGAR, 1996; STAR, 1986). Das Gefäßsystem von Tumoren ist funktionell und strukturell abweichend von gesunden Gefäßen (KRAMMER, 2001). Die Endothelzellen der Tumorgefäße sind nachgewiesenermaßen eine der ersten Ziele der PDT (BERENBAUM et al., 1986; STAR et al., 1986; NELSON et al., 1990; DOUGHTERY, 1992). Die direkte Schädigung dieser Zellen und anderer Zellen (z.B. geschädigte Tumorzellen) führen zur Freisetzung von vasoaktiven Mediatoren und der Aktivierung physiologischer Kettenreaktionen mit Vasokonstriktion, Plättchenaggregation und Blutstase (FINGAR, 1996; KRAMMER, 2001; DOUGHTERY, 1992). SELMAN et al. (1984) wiesen als erste nach, dass die Perfusion im Tumor schon in den ersten Minuten nach der Bestrahlung fast komplett aussetzt. Dadurch kommt es zu einer ausgeprägten Hypoxie im Tumorgewebe, die bis zu 24 Stunden anhalten kann. Infolgedessen unterliegen die Zellen einer ischämischen Nekrose und gehen zugrunde. Da vor allem Tumorgewebe aufgrund ihrer hohen Wachstumsrate einen hohen Sauerstoff- und Nährstoffbedarf haben, sind solche Gewebe besonders empfindlich gegenüber Mangel durchblutung.

Inwieweit beide Mechanismen direkte Zytotoxizität und ischämische Nekrose im speziellen Therapiefall zusammenspielen, ist in jedem individuellen Fall unterschiedlich und kann nie vollständig differenziert werden. Es stellt sich eine starke Abhängigkeit vor allem von der Art, Größe und Struktur des bestrahlten Gewebes bzw. Tumors dar, wobei das Hauptaugenmerk auf den Kapillarreichtum gelegt werden muss. Aber auch Stadium und Lage des Tumors sowie das Behandlungsprotokoll sind von entscheidender Bedeutung (RIS et al., 1998; BRAICHOTTE et al., 1995).

2.2.1.4. Immunologische Effekte

In verschiedenen Untersuchungen wurde außerdem eine Beeinflussung des Immunsystems durch die photodynamische Behandlung nachgewiesen. Ob diese Immunmodulation auf der direkten Photosensibilisierung des Immunsystems basiert oder durch geschädigte Tumorzellen bedingt ist, die auf das Immunsystem wirken, ist nicht sicher geklärt. Diese Effekte können sowohl positive als auch negative Reaktionen des Immunsystems zur Folge haben. Nach YAMAMOTO et al. (1992) werden z.B. Makrophagen infolge photodynamischer Behandlung zur verstärkten Phagozytose angeregt. Andererseits beschreibt BLOM et al. (1997) eine Verminderung der Immunantwort durch eine verringerte Bildung von antitumoralen Antikörpern. Weiterhin wird die Immunantwort durch die vermehrte Produktion von Zytokinen beeinflusst, sowohl von gesunden Zellen als auch von Tumorzellen (GOLLNICK et al., 1997).

2.2.2. Photodynamische Therapie mit Porphyrinen

Hämatoporphyrin-Derivat (HpD) und Dihämatoporphyrin-Ether (DHE) waren die ersten Photosensibilisatoren, die, abgeleitet von ihrem Einsatz zur Tumorlokalisierung und -detektion, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zur photodynamischen Therapie eingesetzt und untersucht wurden. Photofrin[®], eine von HpD abgeleitete Substanz, wurde als erster Photosensibilisator offiziell zur PDT zugelassen. Die Nachteile der sogenannten Photosensibilisatoren der ersten Generation sind jedoch auffällig:

- (1) Sie zeigen nur eine geringe Selektivität für den Tumor gegenüber dem gesunden Normalgewebe. Das therapeutische Fenster ist also sehr eng, was die Behandlung kritisch macht (BERENBAUM et al., 1986).
- (2) Im langwelligen Bereich des Absorptionsspektrums weisen sie nur einen relativ kleinen Peak um 630 nm auf. Die optimale Absorption dieser Photosensibilisatoren liegt im Bereich niedriger Wellenlängen (405 – 420 nm), hier ist jedoch die Eindringtiefe von Licht in Gewebe nur minimal. Selbst Licht der Wellenlänge 630 nm dringt nur etwa 5 mm ins Gewebe ein, so dass nur Tumore bis zu einer maximalen Dicke von 5 mm erfolgreich behandelt werden können. Der Peak im niedrigen Absorptionsbereich hat zudem sehr lange Bestrahlungszeiten von bis zu 20 Minuten je Tumor zur Folge.
- (3) Die frühen Photosensibilisatoren sind komplexe und variable Gemische, die die aktiven Komponenten beinhalten. Sie unterliegen einem komplizierten Metabolismus, so dass es

schwierig ist, die aktiven Bestandteile genau zu bestimmen und die Substanz zu resynthetisieren (BERENBAUM et al., 1993; DOUGHERTY et al., 1987 a, b).

(4) Um befriedigende Effekte zu erzielen, sind hohe Wirkstoffdosen und lange Bestrahlungszeiten wegen der oben erwähnten Eigenschaften nötig. Dies führt zu starken unerwünschten Nebenwirkungen wie einer verlängerten Photosensibilisierung der Haut für Photofrin[®] bis zu 2 Monate nach der photodynamischen Therapie. Während dieser Zeit dürfen die Patienten sich weder der direkten noch der indirekten Sonneneinstrahlung aussetzen, um einen schweren Sonnenbrand zu vermeiden (DOUGHERTY et al., 1992).

2.2.3. Photodynamische Therapie mit mTHPC

2.2.3.1. mTHPC als Photosensibilisator

Um die genannten Nachteile auszugleichen, suchten viele Wissenschaftler nach neuen Substanzen, die teilweise von den Photosensibilisatoren der ersten Generation abgeleitet waren. Bonnett und Berenbaum entwickelten 1986 meso-(tetrahydroxyphenyl)Chlorin (mTHPC), ein Hydroporphyrin des meso(tetrahydroxyphenyl)Porphyrins (mTHPP) und entdeckten damit einen vielversprechenden neuen Photosensibilisator der 2. Generation, der wesentliche Vorteile gegenüber den früheren PS aufweist (BONNETT et al., 1989; MOAN, 1990). Der mit 98 %iger Reinheit verfügbare Wirkstoff mTHPC (Handelsname Foscan[®]) wird ausschließlich für die photodynamische Therapie hergestellt und vertrieben. Sein Absorptionskoeffizient im Bereich höherer Wellenlängen ist aufgrund der Chlorinstruktur wesentlich größer als der früherer Photosensibilisatoren (22400 l/mol*cm bei 650 nm gegenüber 1170 l/mol*cm für Photofrin[®] bei 630 nm), woraus eine höhere Phototoxizität folgt. Dies macht eine bis zu 10fache Reduzierung der Dosis gegenüber den PS der ersten Generation möglich (MA et al., 1994). Auch die Photosensibilisierungstendenz der Haut ist geringer als für Photofrin[®]. In den ersten präklinischen und klinischen Studien konnte dazu eine weit größere photodynamische Potenz und phototherapeutische Selektivität im Vergleich zu Photofrin[®] oder HPD festgestellt werden (BONNETT et al., 1989; BERENBAUM et al., 1993).

2.2.3.1.1. Biochemische Eigenschaften von mTHPC

Der Photosensibilisator meso-Tetrahydroxyphenylechlorin (mTHPC) ist ein Farbstoff aus der Gruppe der Chlorine. Die chemische Strukturformel lautet $C_{44}H_{32}N_4O_4$. Das Molekulargewicht beträgt 680,76 Dalton.

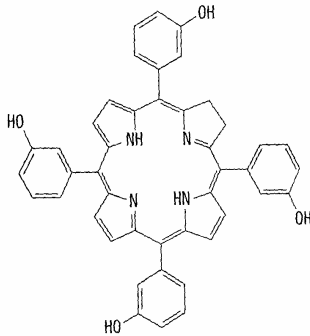


Abb. 2 mTHPC (Foscan[®])

7,8-Dihydro-5,10,15,20-tetrakis-(3-hydroxyphenyl)-21,23 (H)porphyrin

mTHPC ist ein lipophiler Einzelstoff. Aufgrund der starken Hydrophobie des kristallinen bräunlichen Pulvers muss die Substanz zur Applikation in Ethanol 96%, Polyethylenglycol und aqua ad injectabile gelöst werden.

2.2.3.1.2. Photochemische Eigenschaften von mTHPC

mTHPC (Foscan[®]) ist ein fluoreszierender Farbstoff, dessen charakteristisches Exzitations-Spektrum ein absolutes Maximum bei 415 nm aufweist, sowie weitere Peaks bei 284, 516, 520 nm und 652 nm.

Angeregt durch Licht einer dieser Wellenlängen stahlt das mTHPC Licht mit der Wellenlänge 652 und, schwächer, 714 nm aus (MORLET et al., 1995).

Um den Photosensibilisator zu aktivieren, muss ihm Licht seiner spezifischen Absorptionswellenlänge zugeführt werden. Das Absorptionsspektrum (Abb. 3) ist durch ein absolutes Maximum ebenfalls bei 415 nm gekennzeichnet, kleinere Peaks befinden sich bei 284, 306, 516, 543 und 591 nm und ein weiterer hoher Peak befindet sich bei 652 nm (BONNETT et al., 1989 und MA et al., 1994).

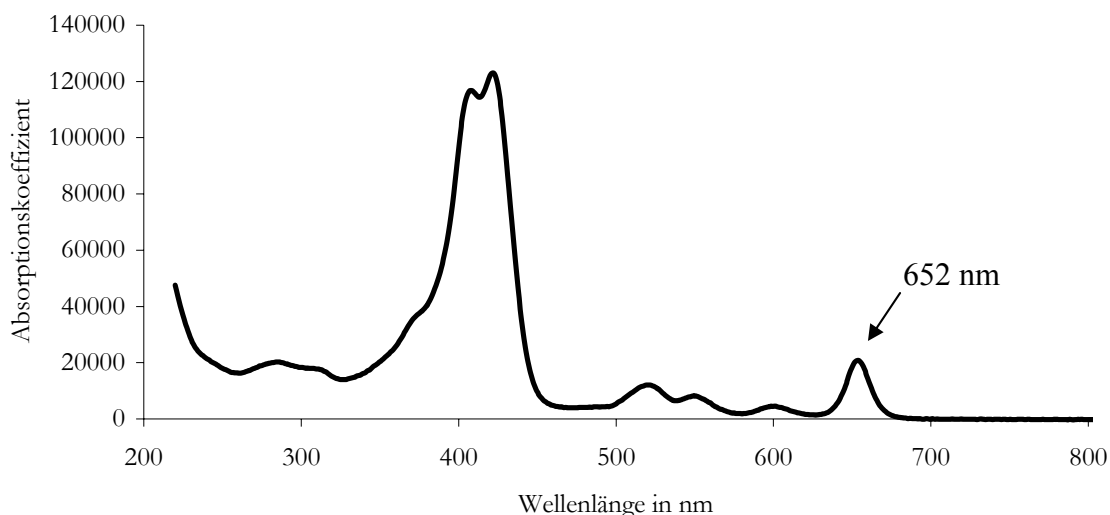


Abb. 3 Absorptionsspektrum von mTHPC

Im Bereich des blauen Lichts (420 nm) weist mTHPC die größte Absorption auf. Die Eindringtiefe von Licht in diesem Wellenlängenbereich ist jedoch annähernd Null. Je größer die Wellenlänge, desto tiefer dringt Licht ins Gewebe ein (WAN et al., 1981). Im Bereich des roten Lichts (600-650 nm) ist der Absorptionskoeffizient zwar niedriger (vgl. 2.2.3.1., S.12), es werden aber tiefere Gewebsschichten erreicht. Deshalb wird diese Wellenlänge (652 nm) hauptsächlich für die photodynamische Therapie mit mTHPC genutzt. Es können damit mehr als 10 mm tiefe Nekrosen erreicht werden (RIS et al., 1991).

2.2.3.1.3. Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von mTHPC

2.2.3.1.3.1. Metabolismus

CAI et al. (1999) untersuchten den Metabolismus von mTHPC *in vivo* und *in vitro* mittels High Pressure Liquid Chromatographie. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass nichtaktiviertes mTHPC ohne Metabolisierung vollständig via Galle über den Darm ausgeschieden wird. Sowohl in der Gallenflüssigkeit als auch in den Faeces war nur unverändertes mTHPC nachweisbar, dagegen konnten im Urin weder mTHPC noch Metaboliten des Photosensibilisators nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse erscheinen plausibel, da mTHPC hydrophob und wasserunlöslich ist. Ebenfalls wurde im Plasma zu keinem Zeitpunkt nach der Injektion ein Metabolit des Photosensibilisators gefunden.

Der normalerweise bei Pharmaka stattfindende Metabolismus läuft in den Mikrosomen der Leberzellen ab und wird durch Cytochrome P450 Isoenzyme katalysiert. Auch unter Verwendung eines *in vitro* Versuchsaufbaus konnten CAI et al. (1999) sowohl in mikrosomalen Leberzellstrukturen des Menschen als auch in Rattenleberzellen keine Metabolisierung unter Katalyse von Cytochrome P450 Isoenzymen beobachten.

Unter Licht- und Sauerstoffeinfluss entstehen durch photochemische Reaktionen sogenannte „Metaboliten“. Dies sind hydroxylierte Derivate des mTHPC (u.a. β -hydroxy-m-THPC) und das korrespondierende Porphyrin meso(tetrahydroxyphenyl)Porphyrin (mTHPP) (JONES et al., 1996). Diese photochemisch oxidierten „Metaboliten“ werden ebenfalls via Galle über die Leber ausgeschieden.

2.2.3.1.3.2. Aufnahme, Bioverteilung und Ausscheidung

Die zytotoxische Wirkung der photodynamischen Therapie ist lokal begrenzt. Sie tritt nur an dem Ort ein, wo ausreichende Mengen mTHPC vorliegen und durch die lokale Applikation des Lichts die Aktivierung gewährleistet ist. Deshalb ist es unabdingbar, die Anreicherungskinetik zu kennen, um mögliche Schäden auszuschließen oder erwünschte Effekte zu verstärken.

Nach intravenöser Injektion wird der Photosensibilisator aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften im Blut an Transportproteine gekoppelt und so durch den gesamten Organismus transportiert. Im Blut des Menschen bindet mTHPC vor allem an die Blutproteine HDL, Albumin und LDL (WESTERMANN et al., 1998; KESSEL, 1999). Die Konzentration von mTHPC im Plasma des Menschen unterliegt starken dosisabhängigen Schwankungen und unterscheidet sich von der Verlaufskurve im Tiermodell. Im Körper des Menschen wird nach dem heutigen Erkenntnisstand der Wirkstoff in der ersten Stunde nach der Injektion vor allem in Leber, aber auch in Milz, Niere und Lunge angereichert und aus diesen Organen verzögert wieder ins Blut abgegeben. Dadurch kommt es zu einem schnellen Abfall der Serumkonzentration. 45 Minuten nach der Injektion liegt mTHPC im Serum im Minimum vor und erst dann erfolgt ein langsamer Konzentrationsanstieg im Plasma. Erst etwa 10 Stunden nach der intravenösen Injektion ist im Plasma die maximale Konzentration des Photosensibilisators vorhanden. Danach unterliegt die Substanz einer First-Order-Kinetik und die Konzentration fällt exponentiell ab (GLANZMANN et al., 1998, bestimmt mittels Fluoreszenz-Spektroskopie). Die Halbwertszeit von mTHPC im Plasma des Menschen ist dosisabhängig und bewegt sich um 50 Stunden (RONN et al., 1996).

Dagegen unterliegt der Photosensibilisator mTHPC nach LOFGREN et al. (1994) im Plasma von Kaninchen einer First-Order-Kinetik mit einer doppelt-exponentiellen Ausscheidungskurve (bestimmt mittels Fluoreszenz-Spektroskopie). Die Halbwertszeiten betragen 26 Stunden für den anfänglichen steilen Abfall und 186 Stunden für die verzögerte Ausscheidung ab dem 2. Tag. Die Kinetik im Blut von Mäusen unterliegt ebenfalls einer doppelt-exponentiellen Ausscheidungskurve mit Halbwertszeiten von 1 resp. 14 Stunden (VEENHUIZEN et al., 1997; bestimmt mittels radioaktiver Markierung).

In allen bisher untersuchten Spezies zeigte mTHPC eine hohe Affinität zu Organen des retikuloendothelialen Systems (RONN et al., 1997; ALIAN et al., 1994). Unabhängig von der momentanen Blutfülle wiesen die gut perfundierten Organe wie Leber, Lunge, Milz und Niere die höchsten Konzentrationen auf. In weniger durchbluteten Organen wie Blase, Trachea und Skelettmuskulatur fanden sich geringere mTHPC-Konzentrationen. In Knochen, Knorpel und Gehirn war der Photosensibilisator nicht nachweisbar (RONN et al., 1997).

mTHPC unterliegt in den Geweben mit einer hohen Anreicherung auch einer schnellen Clearance. In Leber, Milz und Niere sind 24 bis 48 Stunden nach der Injektion die Konzentrationsmaxima zu messen, danach beginnt die Umverteilung in Schleimhäute, Muskulatur und Haut. In der Haut liegt die Substanz nach etwa 70 bis 90 Stunden im Maximum vor und ist bis zu 6 Wochen nachweisbar. Die Absolut-Werte für Haut-, Schleimhaut- und Muskelkonzentrationen sind jedoch zu jedem Zeitpunkt niedriger als für Leber, Milz oder Lunge (ANDREJEVIC – BLANT et al., 2000).

In der oben erwähnten Studie untersuchten RONN et al. (1997) die Bioverteilung von mTHPC speziesabhängig 6 Tage (144 Stunden) nach der Injektion. Trotz einem nahezu einheitlichen Verteilungsmuster bei Hund, Kaninchen, Ratte und Mensch wurde eine generelle speziesabhängige sowie individuelle Varianz der Bioverteilung des Photosensibilisators beobachtet. Auffällig stellte sich der große Unterschied zwischen Mensch und Tier bezüglich der Plasma-Konzentration dar, die in dieser Untersuchung beim Menschen etwa 17-fach höher als bei den Tierspezies war.

MORLET et al. (1995) beschrieben weiterhin, dass die Konzentrationen von mTHPC in den einzelnen Organen und Geweben in Abhängigkeit von der applizierten Dosis geringen Schwankungen unterworfen sind.

Gegenüber anderen Photosensibilisatoren zeichnet sich mTHPC insgesamt durch eine raschere Clearance aus dem gesunden Gewebe aus. Insbesondere aus der Haut wird es im Vergleich zu dem Photosensibilisator Photofrin[®] wesentlich schneller ausgeschieden, was zu einer stark verkürzten Photosensibilisierungszeit der Haut führt (WAGNIERES et al., 1998).

Wie bereits ausgeführt, erfolgt die Ausscheidung aus dem Körper via Galle mit den Faeces. Laut WHELPTON et al. (1996) werden etwa 40% der applizierten mTHPC Dosis innerhalb der ersten 24 Stunden aus dem Körper eliminiert. Nach 20 Tagen sind über 80% des Photosensibilisators über die Faeces ausgeschieden worden.

2.2.3.1.3.3. Intrazelluläre Aufnahme und Verteilung

Die Aufnahme des Photosensibilisators in Zellen vollzieht sich laut KESSEL (1999) über Stunden und ist erst nach 24 – 30 Stunden abgeschlossen. In toten Zellen hingegen ist der Wirkstoff bereits nach 15 Minuten maximal angereichert. Dies spricht dafür, dass nicht die Bindung an Plasmaproteine, sondern die Barrierewirkung der Plasmamembran gesunder Zellen den limitierenden Faktor für die Aufnahme in die Zellen darstellt.

MA et al. (1994) untersuchten in einer *in vitro*-Studie ebenfalls die Wirkstoffaufnahme der Zellen sowie die intrazelluläre Verteilung und Retention von mTHPC im Vergleich mit Photofrin[®] und mTHPP (meso(tetrahydroxyphenyl)Porphyrin). Die Aufnahme von mTHPC erfolgt linear und ist aufgrund des höheren Anteils lipophiler Komponenten im Gegensatz zu Photofrin[®] einfacher und somit schneller als die zelluläre Aufnahme der früheren Photosensibilisatoren. Ausserdem weist mTHPC höhere intrazelluläre Absolut-Werte und eine dreifach längere Retention als Photofrin[®] und mTHPP auf. Intrazellulär verteilt sich mTHPC diffus im Zytoplasma ohne die Kernmembran zu penetrieren und in den Zellkern einzudringen (MA et al., 1994; DOUGHTERY, 1987a). Dabei reichert sich mTHPC jedoch rund um den Nukleus (HORNUNG et al., 1997) vor allem in Lysosomen (LEUNG et al., 2002) und Mitochondrien (DOBLER et al., 1995) vermehrt an. Die direkten photodynamischen Effekte, die mTHPC auslöst, sind nach KESSELs *in vitro*-Studie (1999) hauptsächlich auf Apoptose infolge einer vermehrten Ausschüttung des mitochondrialen Enzyms Cytochrome C ins Zytoplasma zurückzuführen. Dieses Enzym führt im Zytoplasma zur Freisetzung eines anderen, apoptogenen Enzyms. Die Zellmembran wird durch die photodynamische Therapie mit mTHPC allenfalls geringfügig geschädigt (KESSEL, 1999). Eine photodynamische Wirkung über die Schädigung der DNA wird aufgrund dieser Erkenntnisse ausgeschlossen, da die aktiven Sauerstoffintermediärprodukte (freie Sauerstoffradikale und Singulett-Sauerstoff) durch ihre kurze Lebensdauer nicht in den Zellkern eindringen können (vgl. 2.2.1.1., S.6).

2.2.3.1.3.4. Anreicherung in speziellen Geweben

2.2.3.1.3.4.1. Anreicherung in Gefäßwänden

ANDREJEVIC et al. (1996) beschrieben die Anreicherung von mTHPC in Gefäßwänden (von Hamstern). Ab der vierten bis zur 48. Stunde nach der Injektion von 0,5 mg/kg KG mTHPC wurden die höchsten Konzentrationen in Blutgefäßwänden gefunden (Maximum etwa 12. Stunde post injectionem). Danach nimmt die Konzentration linear ab. 96 Stunden nach der Injektion beträgt die Konzentration noch etwa ein Drittel der Maximalkonzentration. In anderen Studien beschrieben ANDREJEVIC-BLANT et al. (1997 und 2001), dass fluoreszierendes mTHPC vornehmlich in den Endothelzellen erscheint. Auch andere Autoren beschreiben hohe Konzentrationen des Photosensibilisators in Gefäßwänden, jedoch fehlen weitere Angaben, welche Zellen mit mTHPC angereichert sind. In glatten Muskelzellen des Atmungs- und Verdauungstraktes ist die Konzentration laut ANDREJEVIC et al. (1996) zwischen dem zweiten und fünften Tag post injectionem sehr hoch, ob dies jedoch auch für glatte Muskelzellen der Gefäßwände gilt, wird nicht beschrieben.

Die Anreicherung in Gefäßwänden führt zu einer Verlegung der Mikrozirkulation und somit zur ischämischen Nekrose des Zielgewebes (vgl. 2.2.1.3., S.9). Diese ischämische Nekrose ist hauptsächlich zu beobachten, wenn das Intervall zwischen Injektion und Bestrahlung weniger als 48 Stunden beträgt (ANDREJEVIC-BLANT et al., 1997).

2.2.3.1.3.4.2. Anreicherung in Muskelgeweben

Wie bereits oben beschrieben (vgl. 2.2.3.1.3.2., S. 15) ist die Anreicherung von mTHPC in der Skelettmuskulatur bei allen Spezies nur gering ausgeprägt (RONN et al., 1997). ANDREJEVIC et al. (1996) beschreibt eine minimal ansteigende Plateauphase in der quergestreiften Muskulatur des oberen Verdauungstraktes bei Hamstern. Diese beginnt einige Stunden nach der Injektion und gipfelt am 7. Tag, um danach bis zum 10. Tag steil bis auf Null abzufallen. Die Maximalkonzentration in der quergestreiften Muskulatur beträgt nur etwa 20% derjenigen in der glatten Muskulatur des Verdauungstraktes.

2.2.3.1.3.4.3. Anreicherung in Tumorgeweben

Die mehr oder weniger selektive intratumorale Anreicherung im Organismus von Tieren und Menschen ist von vielen Autoren untersucht worden. Für eine erfolgreiche PDT sollte sich der

Photosensibilisator bevorzugt im Tumorgewebe anreichern bzw. länger als anderswo hier gespeichert bleiben, damit das benachbarte gesunde Gewebe nicht bzw. nur minimal geschädigt wird. Die selektive Kumulation des Photosensibilisators mTHPC im Tumor bzw. in den Tumorzellen verhält sich wiederum nicht konstant, sondern hängt ebenfalls von verschiedenen variablen Faktoren ab. Die Art, die Struktur, das Stadium und die Größe des Tumors sind die relevanten Parameter bezüglich der Anreicherungskinetik von mTHPC. Laut KESSEL (1999) läßt sich die verstärkte Akkumulation in neoplastischen Geweben durch die Bindung an Plasmaproteine erklären. Er erklärt dies mit der hohen Anzahl aktiver HDL- und LDL-Rezeptoren von Tumorzellen (im Übrigen auch der Zellen des retikuloendothelialen Systems, der Kupfer-Sternzellen in der Leber und proliferierender Zellen im Allgemeinen). Aufgrund der hohen Neubildungsrate dieser Zellen werden für die Membransynthese große Mengen Cholesterol benötigt, das ebenfalls über Lipoprotein-Rezeptoren eingeschleust wird (DOUGHTERY, 1987a). Aber nicht nur die verstärkte Aufnahme, sondern auch eine verzögerte Abgabe des Photosensibilisators aus Tumorzellen ist für den Konzentrationsunterschied verantwortlich (LOFGREN et al., 1995).

Das Verhältnis von Konzentration im Tumor zur Konzentration im gesunden Gewebe als Ausdruck der selektiven Anreicherung wurde sowohl im Tiermodell als auch für den Menschen in vielfältigen Studien untersucht. RIS et al. (1991) beschrieben in einer klinischen Studie eine bis zu 14 fach höhere Konzentration im Tumor verglichen mit dem gesunden Gewebe (in diesem Fall der Haut). Beim Kaninchen stellten LOFGREN et al. (1995) eine bis zu 10 fach höhere Konzentration von mTHPC in Tumorzellen gegenüber gesundem Gewebe (Haut) aufgrund einer verzögerten Abgabe fest. Nicht nur die selektive Anreicherung, sondern auch das Verteilungsmuster im Tumor ist ausschlaggebend für einen positiven photodynamischen Effekt. PENG et al. (1995) verglichen mTHPC mit seinem korrespondierenden Porphyrin (mTHPP), welches viele gleiche Eigenschaften, aber nicht dasselbe Verteilungsmuster im Tumor hat. mTHPC ist in den neoplastischen Zellen und im gefäßführenden Interstitium des Tumors anzutreffen. mTHPP hingegen konnte nur im Stroma des Tumors gefunden werden. Die photodynamische Therapie mit mTHPC war aufgrund der abweichenden intratumorösen Verteilung wesentlich erfolgreicher als die mit mTHPP, obwohl letzteres fünffach höher dosiert wurde. JORI (1989) beschrieb dazu, dass die verschiedenen Photosensibilisatoren an unterschiedliche Plasmaproteine binden. Lipophile Photosensibilisatoren binden hauptsächlich an lipophile Plasmaproteine (HDL, LDL, HDL), die ihrerseits direkt in neoplastische Zellen aufgenommen werden. Hydrophile Photosensibilisatoren hingegen binden vornehmlich an Albumin und Globulin und werden hauptsächlich in das Stroma der Tumore eingelagert.

mTHPC ist der ersten Gruppe zuzuordnen, womit sich die stärkere antitumoröse Wirkung erklärt.

2.2.4. Aktivierung des Photosensibilisators durch Lichtexposition

Die Aktivierung der Photosensibilisatoren geschieht durch Licht einer spezifischen Wellenlänge. Die Erzeugung der substanz- und indikationsspezifischen Wellenlänge mit ausreichender Energie geschieht herkömmlicherweise durch Laser. Laser erzeugen ein monochromatisches Lichtstrahlenbündel mit hoher Energiedichte und exakt definierter Wellenlänge. Die gesamte Lichtleistung kann auf eine Fläche von weniger als 400 μm Durchmesser gebündelt und durch ein Glasfaserkabel auf die zu therapierende Stelle geleitet werden.

2.2.4.1. Lasersysteme

Die früher ausschließlich verwendeten Kupferdampf- oder Argon-Farbstofflaser sind sehr teuer, groß und nur mit einem hohen technischen Aufwand zu bedienen. Deshalb werden sie immer häufiger von den neuen, kleineren Diodenlasern ersetzt, die zudem handlich und preiswert sowie bedienungsfreundlich sind. Das einzige Defizit dieser Systeme besteht darin, dass sie nur eine bestimmte Wellenlänge liefern, wohingegen die Farbstoff-Laser durch die variabel einstellbaren Wellenlängen auch zur Tumordiagnostik durch Licht-induzierte Fluoreszenzmikroskopie (LIF) genutzt werden können.

DE JODE et al. (1997) verglichen verschiedene Lichtsysteme bezüglich ihrer Effektivität, den zur PDT benötigten Photosensibilisator zu aktivieren. Dabei wurden zwei durch Kupfer-Dampf angeregte Farbstoff-Laser, ein speziell für die PDT mit mTHPC hergestellter Dioden-Laser, ein LED-array und eine gefilterte Quecksilberdampf-Lampe verwendet. Jedes Lasersystem hat ein spezifisches Emissionsspektrum, wobei die Aktivierungswellenlänge auf $652 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ begrenzt wurde. Dabei ist festzuhalten, dass jedes System eine unterschiedliche Bandbreite von bis zu 40 nm (Quecksilberdampf-Lampe) hat. Die Effizienz, den injizierten Photosensibilisator (mTHPC) zu aktivieren, wurde anhand der Nekrosentiefe (Ratten-Leber-Modell) evaluiert. Die Kupferdampf-Farbstofflaser-Systeme zeigten ebenso wie der Dioden-Laser die stärksten Effekte, dahinter rangierte der LED-array und die geringste Nekrosentiefe wies die Verwendung

der Bogenlampe auf. Diese Ergebnisse korrelieren mit der Bandbreite der verwendeten Systeme. Je monochromatischer das ausgestrahlte Licht ist, desto stärker ist die Effizienz.

2.2.4.2. Bestrahlung

Die Bestrahlung geschieht bei superfiziellen Tumoren herkömmlicherweise über ein Glasfaserkabel, das gegebenenfalls mit einer Mikrolinse endet. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit der interstitiellen Bestrahlung solider Tumoren bzw. der intraluminalen Bestrahlung von Hohlorganen.

Die superfizielle Bestrahlung via Glasfaserkabel mit oder ohne Mikrolinsenapplikator erzeugt ein kreisförmiges Lichtfeld. Die Bestrahlungsparameter beziehen sich auf die Bestrahlungsfeldgröße (Kreisfläche), die Energie sowie die Zeit und werden in J/cm^2 ($\text{mW}/\text{cm}^2 \times \text{sec}$) Lichtleistung und mW/cm^2 (Leistungsdichte) angegeben.

2.2.4.3. Aktivierung von mTHPC

Die Aktivierungsenergie, die für eine erfolgreiche photodynamische Therapie mit mTHPC aufgebracht werden muss, ist abhängig von den verschiedenen anderen Behandlungsparametern. Bei niedrigen Wellenlängen wird generell mehr Energie benötigt, um eine photodynamische Schädigung auszulösen. Beim Einsatz von kurzwelligem Licht (514 nm) benötigten ANDREJEVIC-BLANT et al. (1997) eine Energie von $80 \text{ J}/\text{cm}^2$. Nach RIS et al. (1991) genügt bei Verwendung von langwelligem Licht (652 nm) eine Lichtintensität von $10 \text{ J}/\text{cm}^2$ zur Erzeugung einer 10 cm tiefen Nekrose. GLANZMANN et al. (2000) lösten bereits mit $2 \text{ J}/\text{cm}^2$ Gewebereaktionen der Mundschleimhaut des Menschen aus.

Der Effekt der photodynamischen Therapie ist auch von der Leistungsdichte, mit der das Licht appliziert wird, abhängig (REZZOUG et al., 1998; COUTIER et al., 2002). Die Leistungsdichte hat großen Einfluss auf die Sauerstoffversorgung im bestrahlten Gebiet. Sauerstoff ist essentiell, damit die photochemische Reaktion stattfinden kann. Laut COUTIER et al. (2002) führt eine hohe Lichtleistungsdichte (90 bis $160 \text{ mW}/\text{cm}^2$) zu einer signifikanten Abnahme des Sauerstoff-Partialdrucks im Gewebe während der Bestrahlung. Bei einer niedrigen Dichte (5 bis $30 \text{ mW}/\text{cm}^2$) hingegen ändert sich der Sauerstoff-Partialdruck nicht. Dementsprechend ist die photodynamische Therapie bei Verwendung niedriger Lichtleistungsdichten effektiver, was auch in Studien von REZZOUG et al. (1998 und 1999) praktisch belegt wurde.

2.3. Klinischer Einsatz der photodynamischen Therapie beim Menschen

2.3.1. Kopf-Hals-Tumoren

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie werden vor allem Plattenepithelkarzinome im Bereich des Oropharynx und der Mundhöhle gefunden. Seltener handelt es sich hier auch um Adenokarzinome, Basalzellkarzinome, Sarkome oder Primärmanifestationen von lymphatischen oder hämatopoetischen Neoplasien. Die Plattenepithelkarzinome in der Mundhöhle oder im Rachenraum entstehen häufig auf dem Boden einer geschädigten Mundschleimhaut, nachgewiesenermaßen vor allem nach kontinuierlichem Alkohol- und Tabakkonsum. Aber auch mangelhafte Mundhygiene, Ernährungsfehler, genetische Disposition oder Virusinfektionen können die Entartung der Mund- und Rachenschleimhaut bedingen. Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome stellen die 6.-häufigste Tumorlokalisation überhaupt dar. Dabei treten über 80% dieser Karzinome bei Männern auf. Die radikale chirurgische Resektion, teilweise kombiniert mit Strahlen- und/oder Chemotherapie wurde in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie in der Vergangenheit als das, trotz hoher Morbiditäts- und Mortalitätsrate, erfolgreichste Therapiekonzept angesehen. Die Resektion kann jedoch als nur eingeschränkt wirkungsvoll bewertet werden, da in mehr als 50% der behandelten Fälle lokale oder regionale Rezidive auftreten.

Aufgrund der exponierten Lage ist weiterhin die äußere Haut im Kopf-Hals-Bereich besonders für Neoplasien prädisponiert. Auch hier handelt es sich meist um Plattenepithelkarzinome und Basaliome. Letzere sind semimaligne Tumoren und neigen nicht zum Metastasieren, wachsen aber invasiv und sind daher prädestiniert für die PDT. Gerade bei im Kopf-Hals-Bereich gelegenen Tumoren ist das kosmetische Behandlungsergebnis für die Patienten von großer Bedeutung. Ein zufriedenstellendes Ergebnis konnte jedoch in der Vergangenheit nach chirurgischer Entfernung der oft großflächig oder multilokulär wachsenden Tumoren nicht immer gewährleistet werden (zitiert aus KÜBLER, 1999 a).

Bereits 1985 erkannten SCHULLER et al. das Potential der photodynamischen Therapie als vielversprechende Therapieform insbesondere für Tumoren im Kopf-Hals-Bereich aufgrund der Schonung umliegender gesunder Strukturen. Seitdem wird die PDT für Kopf-Hals-Tumoren intensiv untersucht und genutzt (BIEL, 1995; DILKES et al., 1995 und 1996; FAN et al., 1997; KÜBLER et al., 1999 a und b).

Vor allem der Einsatz der Photosensibilisatoren der zweiten Generation, hier allen voran mTHPC hat der Medizin völlig neue Möglichkeiten bei der Behandlung von Neoplasien in diesem Gebiet eröffnet. Die photodynamische Therapie zeichnet sich gegenüber den

herkömmlichen Methoden durch ihre hohe Effektivität bei minimalen Nebenwirkungen aus. DILKES et al. (1996) beschrieben in einer klinischen Studie die enormen Vorteile für die Patienten, die einer PDT unterzogen wurden. Im Gegensatz zur Chirurgie treten auch bei großflächigen Tumoren nach der photodynamischen Therapie geringere mechanische oder funktionelle Störungen als nach der chirurgischen Exzision auf, ebenso ist die ästhetische Beeinträchtigung nach Abheilung geringer. Die hohe Morbidität nach einer chemotherapeutischen Behandlung oder Bestrahlung mit radioaktiven Substanzen und die Risiken sowohl für systemische als auch lokale Nebenwirkungen z.B. Mukositis, Verlust von Geruch und Geschmack sowie Dysfunktionen von Pharynx und Larynx, werden bei der PDT nicht beobachtet.

2.3.2. Klinischer Einsatz als intraoperative photodynamische Therapie

Auf Grund der Tumorgröße, -ausdehnung oder benachbarten vitalen Strukturen ist es nicht immer möglich, einen Tumor chirurgisch vollständig zu entfernen. Hier erscheint es denkbar, zunächst den Tumor chirurgisch soweit als möglich zu entfernen (R1-Resektion), um anschließend das Tumor- bzw. Operationsbett intraoperativ mittels photodynamischer Therapie nachzubehandeln und somit die in situ verbleibenden Tumoranteile durch die PDT zu zerstören. Damit ist eine deutliche Senkung der Lokalrezidivrate um bis zu 65% möglich (DAVIES et al., 1990).

RIS et al. (1991) beschrieben in ihrer Pilotstudie die ersten Erfahrungen mit mTHPC als Photosensibilisator bei der intraoperativen photodynamischen Therapie als Ergänzung zur chirurgischen Resektion diffuser Pleura-Mesothelioma. Die postchirurgische intraoperative Bestrahlung der gesamten Brusthöhle führte zu einer oberflächlichen Nekrose aller bestrahlten Strukturen sowie zu Alterationen durch Gefäßverschlüsse.

Nichtsdestotrotz wird die intraoperative Anwendung der PDT, auch mit Photofrin® (BIEL, 1995; MERRILL et al., 1996) als sehr effektiv und nebenwirkungsarm durch eine gründlichere Tumorzerstörung unter Schonung gesunder Gewebe beschrieben.

MERRILL et al. (1996) und DILKES et al. (1996) beschrieben herausragende Langzeit - Erfolge bezüglich der Nutzung der intraoperativen photodynamischen Therapie mit mTHPC bei Kopf-Hals-Tumoren als Ergänzung zur chirurgischen Entfernung solider Neoplasien mit hoher Rezidivneigung.

2.3.3. Nebenwirkungen

Ungeachtet der höheren Konzentration des Photosensibilisators im Tumorgewebe ist eine Schädigung der im Bestrahlungsfeld befindlichen gesunden Strukturen nicht auszuschließen. Laut BERENBAUM et al. (1993) ist mTHPC wesentlich selektiver als frühere Photosensibilisatoren und ruft um das 10fache geringere Nekrosetiefen im gesunden Gewebe als im Tumor hervor. Auch RIS et al. (1991) fanden nach der PDT mit mTHPC trotz einer bis zu 10 mm tiefen Tumornekrose nur geringe Muskel- und Schleimhautnekrosen. Diese lokale Schädigung von gesunden Geweben heilt problemlos ab.

Die am häufigsten genannte systemische Nebenwirkung ist die Photosensibilisierung der Haut. Diese kommt zustande durch die geringfügige Anreicherung der photosensibilisierenden Substanz in der Haut. Da das Lichtspektrum der Sonnenstrahlung auch die Aktivierungsfrequenzen der jeweiligen Photosensibilisatoren beinhaltet, kommt es nach Sonneneinstrahlung auf die Haut zu phototoxischen Effekten in Form von Erythemen, Ödemen, Hautausschlag mit Blasenbildung bis hin zu oberflächlichen Hautnekrosen. Um diese Reaktionen zu vermeiden, werden die Patienten angehalten, die direkte und indirekte Sonnenlichtexposition über einen gewissen Zeitraum zu meiden (DILKES et al., 1996, KÜBLER, 1999 a). Die Dauer der Hautphotosensibilisierungszeit ist abhängig vom Photosensibilisator selbst sowie von der applizierten Dosis. Für mTHPC sind nach zwei Wochen laut BERENBAUM et al. (1993) fast keine Photosensibilisierungseffekte mehr nachweisbar. WAGNIERES et al. (1998) hingegen postulieren jedoch auch für mTHPC dosisabhängige geringe Hautreaktionen bis zu 6 Wochen nach der Injektion des Photosensibilisators. Trotz der kürzeren Hautphotosensibilisierungszeit für mTHPC in Gegensatz zu den früheren Photosensibilisatoren (für Photofrin[®] zwischen 4 und 14 Wochen (WAGNIERES et al., 1998)), was die klinische Anwendung ungemein erleichtert, muss der Photosensibilisierung Rechnung getragen werden und die Sonneneinstrahlung in der ersten Zeit vermieden werden. Es wurde jedoch trotz der Einschränkung für den Patienten unbedingt festgestellt, dass die Hautphotosensibilisierung als unerwünschte Nebenwirkung gegenüber den Nebenwirkungen anderer Therapiemethoden zur Tumorbekämpfung wie die der Radiotherapie und Chemotherapie (z.B. Haarausfall und Knochenmarktoxizität) zu vernachlässigen ist.

Als weitere häufige Nebenwirkung wird für mTHPC ein Brennen im Verlauf der Injektionsvene während und kurz nach der Injektion beschrieben (KÜBLER, 1999 a). Dies ist zurückzuführen auf das Lösungsmittel 96 %igen Ethanol, in dem mTHPC aufgrund seiner Lipophilie vor der Applikation gelöst werden muss und welches die Venenwände stark reizt.

In Abhängigkeit von der Photosensibilisator- und der Lichtdosis, sowie der verwendeten Wellenlänge werden außerdem folgende Nebenwirkungen beschrieben: Leichte Schmerzen/Kribbeln während der Bestrahlung, wenn diese ohne Anästhesie vorgenommen wird (äußere Haut, Mundhöhle etc.) (KÜBLER, 1999 a), sowie Schmerzen während der Nekrosebildung und Abstoßung der nekrotischen Bereiche für maximal 1 bis 2 Wochen (DILKES et al., 1996; KÜBLER, 1999 a). Diese zweifellos geringeren Nebenwirkungen verglichen mit den schweren Allgemeinstörungen, die Patienten nach einer Chemo- oder Radiotherapie zu erleiden haben, können durch Analgetika weiterhin reduziert werden.

In von KÜBLER (1999 a) und FAN et al. (1997) nach intraoraler superfizieller PDT mit mTHPC durchgeführten Kontrollen verschiedener Blutparameter zeigten lediglich geringe Veränderungen (u.a. Leukozytose, Anstieg C-reaktives Protein), die kurzfristig waren und auf die induzierten Nekrosen zurückzuführen waren.

Zu deutlich stärkeren Nebenwirkungen führte laut GROSJEAN et al. (1996) die photodynamische Behandlung des oberen Verdauungstraktes. Aufgrund der geringen Dicke der Strukturen traten Ösophagus-Fisteln, Ösophagus-Perforationen sowie Bronchial-Stenosen auf. Das ließ die Autoren zu dem Schluss kommen, dass es, abhängig von der Dicke des Tumorbetts, bisweilen sinnvoll erscheint, die kürzere Wellenlänge im grünen Bereich zur Bestrahlung zu nutzen, da hierbei nur mit einer geringen Lichteindringtiefe und damit einer geringeren Nekrosentiefe zu rechnen ist.

Problematisch stellen sich auch sehr großflächige photodynamische Therapien dar. Die von RIS et al. (1991 und 1996) gegen maligne Mesotheliome beim Menschen intrathorakal eingesetzten Behandlungen führten zu Allgemeinstörungen mit Fieber, Appetitlosigkeit, Unwohlsein und starken Flüssigkeitsverlusten durch Extravasation mit ausgeprägter Ödembildung bzw. Pleuraerguss.

Auch im Tiermodell beim experimentellen Einsatz der photodynamischen Therapie traten Nebenwirkungen auf (LOFGREN et al., 1994; GLANZMANN et al., 2000; RIS et al., 1993). Photosensibilisierung der Haut wird im Allgemeinen bei Tieren vermieden, indem sie über längere Zeit in abgedunkelten Räumen gehalten werden (RIS et al., 1993). Die von VEENHUIZEN et al. (1994) durchgeführte Studie zur Toxizität des Photosensibilisators mTHPC bei gesunden Ratten führte in Abhängigkeit von den einzelnen Behandlungsparametern zu bis zu 100% Letalität. Auch hier wurden große intraperitoneale Flächen bestrahlt. Als entscheidend für die Art der letalen Schädigungen wurde jedoch nicht die mTHPC-Dosis, sondern die Lichtintensität analysiert. Bei eher niedrigen Intensitäten (8-12 J/cm² 72 Std. nach i.v. Injektion von 0,2 mg/kg mTHPC) führten Nekrosen und Perforationen der Eingeweide zum

Tod der Tiere in den ersten zwei Wochen nach der Behandlung. Höhere Lichtintensitäten verursachten Schocksymptome und Rhabdomyolyse. Diese Tiere verstarben bereits in den ersten zwanzig Stunden nach der Therapie. VAN GEEL et al. (1995) führten ebenfalls Untersuchungen zum therapeutischen Fenster der PDT mit mTHPC, jedoch an Mäusen durch. Hier wurden eingepflanzte RIF1-Tumoren interstitiell bestrahlt, und vor allem die Kombination von hoher Photosensibilisator dosis (0,6 mg/kg), hohen Lichtintensitäten (ab 60 J/cm²) sowie kurze Behandlungsintervalle (1 Stunde bzw. 24 Stunden) hatten Letalitätsraten bis 87% zur Folge.

2.4. Fluoreszenzmikroskopie

Der Photosensibilisator mTHPC fluoresziert nach Anregung durch violettes Licht (415 ±10 nm) rot (vgl. 2.2.3.1.2., S. 13). Diese Fluoreszenz kann zum Nachweis von mTHPC im Plasma oder Gewebe genutzt werden. Laut ANDREJEVIC et al. (1996) ist die Fluoreszenzmessung nur zur semiquantitativen Bestimmung von mTHPC im Gewebe geeignet. Methoden zur exakten Bestimmung der Konzentration sind z.B. Fluoreszenz-Spektroskopie (RONN et al., 1997), High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) (MORLET et al., 1995; RIS et al., 1998; WANG et al., 1994), chemische Extraktion des Wirkstoffes oder radioaktive Markierung (VEENHUIZEN et al., 1997a). Keine dieser Methoden machen jedoch so detaillierte qualitative Aussagen möglich, wie die Fluoreszenzmikroskopie.

Prinzipiell sind auch quantitative Fluoreszenzmessungen möglich. ANDREJEVIC-BLANT et al. (1997) maßen die Gesamtfluoreszenz und subtrahierten die Autofluoreszenz des Gewebes. Die Angabe erfolgt üblicherweise in relativen Fluoreszenz-Einheiten. Diese Methode ist jedoch sehr ungenau aufgrund der variablen Fluoreszenz von mTHPC, die durch die physiologisch-chemischen Eigenschaften des Gewebes beeinflusst werden.

Die Fluoreszenz des Photosensibilisators hängt einerseits vom Aggregatzustand des mTHPC ab, der sich aufgrund der Lipophilie der Substanz je nach Medium ändert. Liegt der Photosensibilisator als Monomer (z.B. in Methanol) vor, ist eine starke Fluoreszenz zu beobachten. In wässrigen Lösungen jedoch lagern sich mTHPC-Moleküle zu nichtfluoreszenten Aggregaten zusammen. CHEN et al. (2000) fanden heraus, dass sich einige der nichtfluoreszenten Aggregate nach Zugabe von Serum wieder auflösten und danach die mTHPC-Moleküle als fluoreszierende Monomere vorlagen. Im Körper sind also sowohl stark fluoreszierende Monomere als auch nicht fluoreszierende Aggregate vorhanden. Die sichtbare

Fluoreszenz sagt also hauptsächlich etwas über das Verhältnis aus beiden und nicht über die absolute Konzentration des Photosensibilisators im Gewebe aus.

HOPKINSON et al. (1999) stellten zudem fest, dass die Fluoreszenz sowohl *in vitro* als auch *in vivo* von der Bindung an bestimmte Plasmaproteine abhängt. Laut dieser Studie gibt es eine bisher unidentifizierte Plasmaproteinfraktion, an die mTHPC kurz nach der Injektion bindet. Dieser Photosensibilisator-Protein-Komplex fluoresziert nicht, wahrscheinlich weil die mTHPC-Moleküle nur im aggregierten Zustand an diese Plasmaproteine binden.

Die Konzentrationsmessung kann auch durch High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) vorgenommen werden (RIS et al., 1993; WANG et al., 1993; MA et al., 1994). Diese Methode ist nach Meinung von MORLET et al. (1995) sicherer. Zwischen beiden Bestimmungsmethoden (HPLC und Fluoreszenz) besteht eine nicht proportionale Korrelation (GLANZMANN et al., 2000).

Die Bestimmung der Plasma-Konzentration des Photosensibilisators vor jeder durchzuführenden photodynamischen Therapie wird von vielen Autoren gefordert um speziesabhängige und individuelle Abweichungen auszuschalten und für jede Behandlung ein adäquates Behandlungsprotokoll erstellen zu können.