

5. DISKUSSION

5.1. Diskussion der Methode

5.1.1. Tiermodell

Die klinische Anwendung der photodynamischen Therapie soll in erster Linie beim Menschen durchgeführt werden. Vor dem klinischen Einsatz dieser Therapie müssen jedoch verschiedene Untersuchungen stattfinden, die über das Ausmaß von Zellkulturen hinausgehen. Aus diesen Gründen wurde ein Tiermodell gewählt, um die photodynamischen Effekte auf große Gefäße darzustellen. Das Kaninchen ist aufgrund seiner Größe unter den kleineren Labortieren die hierfür geeignetste Tierspezies. Zudem gestaltet sich die Haltung noch relativ einfach und preiswert. Auch die chirurgischen Methoden sind gut durchführbar und standardisierbar. Zwar weisen die großen Gefäße von Kaninchen deutlich geringere Durchmesser im Vergleich zu denen der Menschen auf, jedoch sind sie größer als die der häufigsten Labortiere Maus, Hamster oder Ratte.

Die Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen gestaltet sich in diesem Fall aber nicht nur durch die unterschiedlichen Größenverhältnisse schwierig, sondern ist auch durch z.T. erhebliche pharmakokinetische Unterschiede (Tier vs. Mensch) eingeschränkt (vgl. Abschnitt 2.2.3.1.3.2., S.15). Besonders auffällig stellt sich die Varianz der Plasmakonzentration des Photosensibilisators dar, die 6 Tage nach der intravenösen Injektion von 0,3 mg/kg mTHPC beim Menschen ca. 300 ng/g war, bei Hund, Kaninchen und Ratte hingegen zwischen 7 und 14 ng/g lag (RONN et al., 1997). Ob und inwiefern diese Diskrepanz einen Einfluß auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hat, müsste in weiteren Untersuchungen geprüft werden.

5.1.2. Diskussion der Methodik

Der erste Versuch I/1 beinhaltete ein breites Spektrum an Parametern (vier verschiedene Behandlungsintervalle, zwei Lichtintensitäten und sieben unterschiedliche Überlebenszeiten). Basierend auf den Ergebnissen konnten die Parameter in den weiteren Versuchen reduziert werden. Die Dosierung des Photosensibilisators wurde von vornherein auf 0,3 mg/kg KG festgelegt. Mit dieser Dosis wird im Tiermodell beim Kaninchen (LOFGREN, 1994), der Maus (RIS et al., 1993a) sowie beim Minipig (RIS et al., 1997) eine hohe Effektivität gegen Tumoren

gewährleistet. RIS et al. (1991) verwendeten diese Dosis auch für die am Menschen durchgeführte photodynamische Tumorthherapie nach ihrer Aussage mit Erfolg.

Die postoperative Überlebenszeit der Tiere hatte nach unseren Erkenntnissen aus dem Versuch I/1 keine Auswirkungen auf die histologisch aufgefundenen photodynamischen Effekte. Aufgrund dieser Tatsache wurden die Überlebenszeiten der Kaninchen für den Versuch I/2 und II auf eine Zeitspanne von 12 Tagen begrenzt. Es zeigten sich bei verschiedenen Tötungszeitpunkten lediglich unterschiedliche Stadien der Reaktion des Gewebes auf die Therapie. Dies war an Muskulatur und Bindegewebe besonders deutlich zu erkennen. Bereits frühzeitig nach der Therapie (2 Tage) lagen ausgeprägte Nekrosen vor, die mit der Zeit durch entzündliche und mesenchymale Reaktionen vom Organismus abgebaut und organisiert wurden. Dieser Ablauf ist physiologisch und ohne funktionelle Auswirkungen im Sinne der photodynamischen Therapie.

Die verwendete Wellenlänge 652 nm wurde aufgrund der hohen Eindringtiefe roten Lichts und des hohen Absorptionskoeffizienten von mTHPC gewählt (vgl. Abschnitt 2.2.3.1.2., S.13).

Beim Vorhaben, mikroskopische Residualzellen im Anschluss an die chirurgische Resektion des Tumors zu zerstören, sollte jedoch der Dicke und Ausdehnung der noch zu zerstörenden Tumorbereiche Rechnung getragen werden und statt Bestrahlung mit rotem Licht gegebenenfalls auf das weniger tief eindringende grüne Licht ausgewichen werden. Bei 514 nm ist der Absorptionskoeffizient von mTHPC wesentlich höher und damit auch die Effizienz der photodynamischen Therapie (MA et al., 1994). Aufgrund des höheren Absorptionskoeffizienten könnte die Photosensibilisator-Dosis verringert werden. So setzten DAVIS et al. (1990) die intraoperative PDT nach chirurgischer Exzision von Neuroblastomen bei Mäusen vergleichend bei 514 und 630 nm ein (Photosensibilisator hier Photofrin[®]) und fanden eine deutlich höhere Tumortoxizität und Tumorheilungsrate bei Verwendung der kürzeren Wellenlänge.

Mit Verwendung der kürzeren Wellenlänge ist zwar die Eindringtiefe des Lichts vermindert, aber entsprechend den Verhältnissen (Bestrahlung des Tumorbetts) ist es sicherlich nicht immer nötig und manchmal sogar bedenklich, eine bis zu 1 cm tiefe Nekrose des gesunden Gewebes hervorzurufen.

Auf Untersuchungen zur Toxizität des mTHPC ohne Lichtbestrahlung bzw. zur Wirkung des Laserlichts allein auf das Gewebe wurde entsprechend dem Tierschutzgesetz verzichtet, weil derartige Studien bereits durchgeführt wurden. mTHPC hat in typischerweise verwandten Dosierungen im Dunkeln sowohl *in vitro* (FIEDLER et al., 1997; HORNING et al., 1997) als auch *in vivo* (RIS et al., 1993 b) keinerlei Wirkung auf die Zellintegrität und -vitalität. Auch die

Bestrahlung von Zellen allein mit rotem Licht der Wellenlänge 652 nm äußerte sich *in vitro* nicht in einer Abnahme der Zellzahl (HORNUNG et al., 1997) und führte *in vivo* zu keiner Gewebereaktion (RIS et al., 1993 b).

Temperaturmessungen während der Laserbestrahlung, die zu zusätzlichen Verletzungen des Gewebes geführt hätten, wurden in unseren Versuchen nicht durchgeführt, da bereits REZZOUG et al. (1999) zeigten, dass es zu keiner thermischen Schädigung durch die Laserbestrahlung kommt. Die Temperaturänderung während der Bestrahlung betrug lokal maximal +3°C auf der Oberfläche und +2°C in den tieferen Schichten.

Die photodynamische Therapie mit mTHPC wurde analog dem Versuchsaufbau von KÜBLER (1999 a) in Zusammenarbeit mit der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Universität zu Köln (Herrn Prof. Dr. Dr. Kübler und Frau Dr. Dr. Meul) durchgeführt. Die Operation wurde entsprechend dem chirurgischen Procedere zum Freilegen von Gefäßen durchgeführt.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde aufgezeigt, dass große Gefäße und Nerven sowie die Muskulatur durch die intraoperative photodynamische Therapie mit dem Photosensibilisator mTHPC geschädigt werden. Das Ausmaß der Schädigungen war abhängig von den Behandlungsparametern. Wie im Ergebnisteil beschrieben, führten eine Erhöhung der Lichtintensität und eine Verkürzung des Behandlungsintervalls in der Regel zu einer stärkeren Schädigung der untersuchten Strukturen.

Die A. carotis comm. und die A. femoralis sowie die V. jugularis int. und die V. femoralis wurden hierbei stellvertretend für alle größeren Gefäße untersucht. Als Folge der photodynamischen Therapie unterlagen die Arterienwände hauptsächlich Proliferation und Strukturveränderungen der Gefäßwandzellen, die Venenwände wiesen überwiegend Fältelung und Endothelablösung auf. In sieben der 148 untersuchten Proben wurden Gefäßverschlüsse durch Thromben oder Obliteration beobachtet. Weiterhin wurden der N. vagus und der N. saphenus stellvertretend für alle großen Nerven untersucht und bewertet. Hier führte die PDT makroskopisch zum Verlust der Myelinscheiden.

Die Auswertung der Ergebnisse gestaltete sich wegen der Komplexität der photodynamischen Therapie besonders im Versuch I/1 schwierig. Eigentlich muss jeder Parameter für sich untersucht werden, während alle anderen Parameter konstant gehalten werden. Wegen zu kleiner

Untergruppen mit verschiedenen Zeitintervallen konnten die Ergebnisse aus dem Versuch I/1 nicht statistisch ausgewertet werden.

5.2.1. Schädigung in Abhängigkeit von den Behandlungsparametern

5.2.1.1. Schädigung in Abhängigkeit von der Lichtintensität

Es wurde im Versuch I/1 gezeigt, dass die zytotoxischen Effekte auf die großen Gefäße und Nerven bei einer Lichtintensität von 10 J/cm² im Mittel geringer ausgeprägt sind, als bei einer Lichtintensität von 20 J/cm². Diese Tendenz lässt sich ableiten, wenn die anderen Behandlungsparameter (Behandlungsintervall, Überlebenszeit) konstant gesetzt werden (vgl. Abschnitt 4.2.1.1.4.1., Abb. 32, S. 64). Die umliegenden Gewebe zeigten jedoch sowohl bei 10 als auch 20 J/cm² fast immer maximale Schädigungen (Tab. 5, S. 59). Im Gegensatz zu den großen Gefäßen wiesen die kleinen Gefäße bei 10 J/cm² sogar relativ häufiger mittelgradige oder starke Schädigungen auf, als bei 20 J/cm² (vgl. Abb. 33, S.64).

In der Literatur wird überwiegend postuliert, dass eine Erhöhung der Lichtintensität bei sonst konstanten Bedingungen in der Regel zu einer stärkeren Schädigung von gesunden Geweben z.B. Muskulatur und Haut sowie von Tumoren führt (u.a. Glanzmann et al., 2000; Lofgren et al., 1994; Post et al., 1995). Speziell zur Schädigung von Gefäßen und Nerven in Abhängigkeit von der verwendeten Lichtintensität gibt es jedoch bisher keine Veröffentlichungen.

HORNUNG et al. (1997) stellten an normalen und neoplastischen Zelllinien *in vitro* dar, dass eine Erhöhung der Lichtintensität eine verstärkte Zytotoxizität sowohl auf gesunde als auch auf neoplastische Zellen zur Folge hat. Hier wurden Fibroblasten aus Lungen chinesischer Hamster (V-79 Zell-Linien) und Brustkrebs-Zellen des Menschen (MCF-7 Zell-Linien) 24 Stunden mit mTHPC inkubiert und anschließend mit rotem Licht bestrahlt. Die gesunden Fibroblasten zeigten eine etwas stärkere Resistenz gegen die Erhöhung der Lichtintensität als die neoplastischen Zellen, jedoch führte eine Erhöhung der Lichtintensität in jedem Fall zu einer Abnahme der überlebenden Zellfraktion.

RIS et al. (1993 b) beschrieben die unterschiedliche Wirkung der mTHPC-PDT mit 10 J/cm² verglichen mit 20 J/cm² auf Tumoren und gesunde Gewebe bei Mäusen mit xenotransplantierten malignen Mesotheliomen. Die Bestrahlung von Tumorgewebe mit 10 J/cm² führte zu einer nur etwa halb so großen Nekrose wie die PDT mit 20 J/cm². Die Reaktion des gesunden Gewebes, es

handelte sich hier um Haut und Muskulatur des Hinterbeines, war jedoch weniger stark abhängig von der Lichtintensität. Hier war die Schädigung insgesamt geringer und nahm bei Verdopplung der Lichtintensität nur minimal zu.

Auch LOFGREN et al. (1994) zeigten mit ihrer Studie auf, dass die phototoxischen Effekte einer PDT mit zunehmender Lichtintensität größer werden. Sie untersuchten die Reaktion der gesunden Haut auf die photodynamische Therapie bei Kaninchen in Abhängigkeit von verschiedenen Behandlungsparametern. Dabei wurden Lichtintensitäten zwischen 5 und 80 J/cm² gewählt. Die Photosensibilisatorosis betrug wie in der vorliegenden Arbeit 0,3 mg/kg KG mTHPC. Die Hautreaktionen bei 5 J/cm² waren nur leicht, bei 10 als auch 20 J/cm² traten jedoch direkt sehr schwere Hautschädigungen auf. Erst ab einem verlängerten BI von 96 Stunden führte eine Lichtintensität von 10 J/cm² zu geringfügig geringeren Hautreaktionen gegenüber 20 J/cm².

Ähnlich starke Gewebeschäden bei 10 und 20 J/cm², wie sie in der vorliegenden Untersuchung auftraten, fanden also auch andere Autoren. Dies ließe sich folgendermaßen erklären: die Eindringtiefe von rotem Licht beträgt etwa 10 mm (vgl. Abschnitt 2.2.3.1.2., S.13). Da das Ausmaß der Nekrose begrenzt ist durch die Lichteindringtiefe und mit 10 J/cm² in unseren Versuchen dem Anschein nach bereits eine maximale Nekrose ausgelöst wurde, konnte auch durch eine Erhöhung der Lichtintensität auf 20 J/cm² die Nekrose offenbar nicht gesteigert werden. So zeigten auch RIS et al. (1991), dass mit einer Lichtintensität von 10 J/cm² (0,3 mg/kg mTHPC, BI 24 Std.) bereits eine 10 mm tiefe Nekrose hervorgerufen wird, die durch Erhöhung auf bis zu 40 J/cm² nicht gesteigert werden konnte.

Die kleinen Gefäße reagierten jedoch abweichend auf eine Erhöhung der Lichtintensität. 10 J/cm² riefen zu 66% mittelgradige bis starke Schäden der Mikrozirkulation hervor, bei 20 J/cm² wurden die kleinen Gefäße jedoch in weniger Fällen (38%) mittelgradig oder stark geschädigt. RIS et al. beschrieben in der oben genannten Studie (1991), die die ersten klinischen Ergebnisse der mTHPC-PDT beim Menschen wiedergibt, einen möglichen Einfluss der Lichtintensität auf die Art der Zerstörung von Geweben. Anhand der histologischen Schnittbilder wurde vermutet, dass eine niedrige Lichtintensität (hier wurden allerdings 2 J/cm² verwendet) hauptsächlich direkte Tumor-Zytotoxizität nach sich zieht, bei höheren Lichtintensitäten jedoch (hier 10 J/cm²) die indirekte Wirkung über Thrombose und Obliteration der tumorversorgenden Gefäße zum Tragen kommt. Höhere Lichtintensitäten wurden in dieser Studie jedoch nicht getestet.

5.2.1.2. Schädigung in Abhängigkeit vom Behandlungsintervall

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Schädigung der großen Gefäße und der Nerven in Abhängigkeit vom Behandlungsintervall darzustellen.

5.2.1.2.1. Behandlungsintervalle 24 bis 96 Stunden

Wie in den Abschnitten 4.2. und 4.3. (S. 57 ff) ausführlich dargelegt, zeigten die großen Arterien, Venen und Nerven sowie die kleinen Gefäße bei Behandlungsintervallen von 24 und 48 Stunden im Mittel stärkere Schädigungen als bei BI von 72 und 96 Stunden (Abb. 34-37, S. 65-67).

Das kürzere Behandlungsintervalle zu stärkeren Reaktionen führen, korreliert mit den Erfahrungen anderer Autoren. RIS et al. (1997) untersuchten diesbezüglich die A. carotis comm., die V. cava, den N. vagus und den N. phrenicus von gesunden Minipigs auf Alterationen nach PDT mit verschiedenen Behandlungsintervallen (12 Std. – 6 Tage) und einer Lichtintensität von 20 J/cm². Die mTHPC-Dosis betrug 0,1 mg/kg KG. Die photodynamische Therapie rief unterschiedlich starke Veränderungen an den Gefäßen und Nerven hervor, die stärksten Reaktionen wurden auch in dieser Untersuchung bei einem Intervall von 12 bzw. 24 Stunden beobachtet. Die A. carotis comm. zeigte bei einem Intervall von 24 Stunden und länger nur geringfügige Veränderungen wie Kopfsteinpflasterendothel und subendotheliale Ödeme. Nur ein Behandlungsintervall von 12 Stunden führte zu schweren Schädigungen in Form von Thrombosierung, Nekrose der Tunica media und Desquamation des Endothels. Die V. cava reagierte auf ein Behandlungsintervall von 12 und 24 Stunden mit Endothelschwellung oder Kopfsteinpflasterendothel sowie Thrombosierungen der Vasa vasorum, zeigte jedoch keinerlei Gefäßwandnekrosen oder Thrombosierung des Hauptgefäßes. Längere Behandlungsintervalle führten in dieser Untersuchung zu keiner Schädigung der Venenwand. Analog verursachte ein Behandlungsintervall von mehr als 24 Stunden keine Alterationen der großen Nerven, bei einem Behandlungsintervall von 12 und 24 Stunden kam es laut RIS et al. (1997) jedoch zu interstitieller Ödembildung und Thrombosierung der perineuralen Gefäße.

Diese Schädigungen waren verglichen mit denen in unserer Untersuchung bei einem BI von 24 Stunden gefundenen, schwächer und traten ab einem Intervall von 48 Stunden nicht mehr auf. Eine Ursache dafür könnte die wesentlich geringere mTHPC-Dosis sein. Warum RIS et al. (1997) jedoch nicht das bei uns sehr häufig gefundene Phänomen der hochgradigen

Endothelhyperplasie beschrieben, bleibt offen. Diese trat mehr oder weniger in unseren eigenen Versuchen bei jedem Behandlungsintervall von 24 bis 96 Stunden auf. Weiterhin stellten sie die Ödematisierung der Nerven in den Vordergrund, wir jedoch fanden als Hauptveränderung eine Demyelinisierung.

Eine weitere mögliche Erklärung für die eindeutig schwächere Reaktion der Gefäße und Nerven in der Studie von RIS et al. könnte auch die unterschiedliche Gefäßgröße sein. Die Hauptgefäße von Minipigs haben ein größeres Kaliber und eine stärkere Wand als die von Kaninchen und reagierten deshalb eventuell schwächer. Auch ein abweichendes Anreicherungsmuster könnte die Ursache der schwächeren Wirkung auf die Strukturen der Minipigs sein. Die Pharmakokinetik ist spezies- und dosisabhängig (vgl. Abschnitt 2.2.3.1.3.2., S. 15).

Einige spärliche Angaben über die Wirkung einer intraoperativen PDT mit mTHPC auf große Gefäße beim Menschen beschrieben ebenfalls RIS et al. (1991). Sie führten erstmalig eine intraoperative PDT an vier Patienten mit malignen Mesotheliomen mit 0,3 mg/kg mTHPC, einem BI von 48 Stunden und einer Lichtintensität von 10 J/cm² durch. In einem Fall verstarb der Patient kurz nach der Therapie und die behandelten Strukturen konnten pathohistologisch untersucht werden. Die Autoren beschrieben ausgeprägte Tumornekrosen, aber keinerlei Nekrosen der angrenzenden Gewebe. Die Aorta wies thrombosierte Vasa vasorum und veränderte glatte Gefäßwandmuskelzellen auf. Nach unserer Meinung ist auf den abgebildeten histologischen Fotos eine Endothelhyperplasie deutlich zu erkennen, die aber nicht beschrieben wird. Leider gibt es in dieser Studie insgesamt wenig Angaben und Erläuterungen bezüglich der Wirkung der PDT auf die Gefäßzellen. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die intraoperative PDT mit adäquaten Behandlungsparametern beim Menschen keine Gefäßruptur oder schwere Thrombosierung zur Folge haben dürfte, wie es auch in unseren Versuchen im Kaninchenmodell dargestellt wurde.

Die ausgeprägte Reaktion vor allem der Endothelzellen auf eine mTHPC-PDT mit einem BI von 24 und 48 Stunden korreliert auch mit den Angaben von ANDREJEVIC-BLANT et al. (1997 und 2001), dass in Blutgefäßwänden bis 48 Stunden post injectionem die höchsten Konzentrationen mTHPC vorliegen (vgl. Abschnitt 2.2.3.1.3.4.1., S. 18). Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten jedoch ein anderes Bild, darüber wird in Abschnitt 5.2.4. (ab S. 103) ausführlicher diskutiert.

Wie in den Ergebnissen dargestellt, unterliegen die mitbestrahlte Muskulatur und das Bindegewebe nach einer intraoperativen PDT mit Behandlungsintervallen von 24 bis 96 Stunden fast immer der maximal ausgeprägten Nekrose.

Die geringer ausgedehnten Nekrosen (S2 statt S3) im Versuch I/1 traten ausschließlich bei dem Behandlungsintervall 96 Stunden und der Lichtintensität 10 J/cm^2 auf. Diese geringfügig schwächeren Reaktionen könnten ein Hinweis darauf sein, dass auch die Skelettmuskulatur und das Bindegewebe bei kürzeren Intervallen stärker angegriffen werden, wie es für die Gefäße und Nerven der Fall ist. Offenbar ist die PDT mit 10 J/cm^2 und einem Behandlungsintervall von 96 Stunden in den meisten Fällen jedoch so wirkungsvoll, dass die Nekrose bereits maximal ausgeprägt ist und auch durch eine Verkürzung des Behandlungsintervalls nicht wesentlich gesteigert werden kann (vgl. 5.2.1.1., S. 85).

Ähnliche Untersuchungen anderer Autoren an Mäusen und Hamstern ergaben hingegen eine deutlich geringere Potenz einer PDT mit einem verlängerten Behandlungsintervall. Bei RIS et al. (1993 b) wurden Mäuse mit xenotransplantierten Mesotheliomen des Menschen mit unterschiedlichen Behandlungsparametern photodynamisch behandelt. Das Ausmaß der Nekrose des gesunden Gewebes (es wurde ein gleichgroßer Bereich des Hinterbeines bestrahlt wie das Mesotheliom; bei dem Gewebe handelte es sich um Muskulatur mit aufliegender Haut) war bei einem BI von 24 Stunden etwa doppelt so groß wie bei einem BI von 48 Stunden. Eine Verlängerung des Behandlungsintervalls auf 72 (3 Tage), 96 (4 Tage), 110 (4,6 Tage) und 134 Stunden (5,6 Tage) führte zu einer weiteren Abnahme der Nekrosentiefe. Bei einem BI von 96 Stunden war die Nekrose nur noch halb so groß wie bei einem BI von 48 Stunden.

LOFGREN et al. (1994) berichteten über die Wirkung der PDT mit $0,3 \text{ mg/kg}$ mTHPC aber verschiedenen Lichtintensitäten und Behandlungsintervallen auf die Haut von Kaninchen. Bei ihnen zeigte sich ebenfalls eine Abhängigkeit der Schädigung vom Behandlungsintervall (6 Stunden, 3, 4, 5, und 6 Tage), jedoch war die Hautreaktion bei einem BI von 6 Stunden, 3 Tagen und 4 Tagen immer maximal ausgeprägt. Erst ab einem sehr langen BI von 5 Tagen wurde eine Abnahme der Hautreaktion beschrieben. In jener Studie wurden synchron auch verschiedene Lichtintensitäten getestet (vgl. Abschnitt 5.2.1.1., S.85). Leider wurden die Behandlungsintervalle 24 und 48 Stunden nicht eingesetzt, dementsprechend lassen sich die Ergebnisse nur ansatzweise mit den Vorliegenden vergleichen. LOFGREN et al. (1994) zeigten in dieser Arbeit weiterhin, dass bei niedrigen Lichtintensitäten (5 J/cm^2 und 10 J/cm^2) bereits ab einem BI von 4 Tagen signifikant geringere Hautschädigungen gegenüber einem Intervall von 3 Tagen auftraten, jedoch konnten diese nicht bei höheren Lichtintensitäten beobachtet werden. Ab

einer Lichtintensität von 20 J/cm² wurden geringere Hautreaktionen erst ab einem BI von 5 Tagen erfasst.

Behandlungsintervalle von mehr als 96 Stunden (4 Tage) wurden in der vorliegenden Arbeit nicht getestet, dennoch wurde festgestellt, dass die Schädigung der Muskulatur bei verlängertem Behandlungsintervall nur in wenigen Fällen abnahm. Ein Behandlungsintervall von 96 Stunden hatte sowohl bei 10 als auch bei 20 J/cm² immer noch ausgedehnte Muskelnekrosen zur Folge. Dies steht im also Gegensatz zu den Erfahrungen der anderen Autoren über die Schädigung gesunder Gewebe und entspricht eher der Anreicherungskinetik von mTHPC in der Muskulatur (vgl. Abschnitt 2.2.3.1.3.4.2., S.18). Die Konzentration von mTHPC in der Skelettmuskulatur ist insgesamt sehr niedrig und erst etwa am Tag 7 post injectionem maximal (ANDREJEVIC et al., 1996). Anhand dieser Kinetik scheint es nachvollziehbar, warum die Schädigung der Muskulatur mit einer Verlängerung des BI von 24 Stunden auf 96 Stunden nicht deutlich abnimmt, sondern in etwa gleich bleibt. Eigentlich sollte sie sogar zunehmen, denn die Gewebekonzentration nimmt bis zum 7. Tag p.o. langsam zu. Neben der direkten Schädigung in Abhängigkeit von der Gewebekonzentration scheint jedoch die Ischämie durch Verlegung der Versorgungsgefäße zur Nekrose des bestrahlten Gewebes eine Rolle zu spielen. In unseren Untersuchungen waren die Reaktionen der kleinen Gefäße im Gegensatz zur Muskulatur deutlich abhängig vom Behandlungsintervall. Die Behandlungsintervalle 24 und 48 Stunden zogen stärkere Schädigungen nach sich als längere Intervalle. Damit ließe sich begründen, warum es neben der in etwa gleich bleibenden direkten Schädigung der Muskelzellen bei BI von 24 bis 96 Stunden einen kleinen Trend zur stärkeren Schädigung der Muskulatur bei den kürzeren Behandlungsintervallen, nämlich infolge Ischämie durch Verlegung der Mikrozirkulation gibt. Diese These bestätigt die Ergebnisse von ANDREJEVIC-BLANT et al. (1997), nach dessen Studie die ischämische Nekrose durch Verlegung der Mikrozirkulation im Bestrahlungsgebiet besonders bei frühen Behandlungsintervallen (24 und 48 Stunden) entsteht. Zu diesem Zeitpunkt ist auch die Plasmakonzentration an mTHPC höher (vgl. die Abschnitte 2.2.3.1.3.2., S.15 und 2.2.3.1.3.4.1., S. 18).

Aus diesen Erkenntnissen lässt sich der Schluss ziehen, dass in der vorliegenden Untersuchung die massive Muskelnekrose bei Behandlungsintervallen von 24 und 48 Stunden hauptsächlich durch indirekte Schädigung infolge Ischämie bedingt war. Trotz relativ geringen Konzentrationen in der Skelettmuskulatur 24 bis 48 Stunden nach der Injektion entstanden so ausgedehnte Schäden. Bei längeren Behandlungsintervallen (72 resp. 96 Stunden) führten die höheren Photosensibilisator-Konzentrationen direkt im Muskelgewebe zu den ausgedehnten Skelettmuskelnekrosen.

Für den Einsatz der PDT zur Tumorbehandlung werden in der Literatur die Behandlungsintervalle 48 und 72 Stunden als die potentesten, effizientesten und selektivsten angesehen. Die Tumornekrose soll laut RIS et al. (1993 a und b) bei einem Intervall von 48 Stunden nur geringfügig niedriger sein, als bei einem Intervall von 24 Stunden, die Nekrose der gesunden Gewebe jedoch stark zurückgehen. Das bedeutet, dass die Selektivität zugunsten der gesunden Gewebe mit verlängertem BI zunimmt. Ein längeres Behandlungsintervall von 96 Stunden hatte laut RIS et al. (1993 a und b) nur eine geringe tumortoxische Potenz, die trotz einer nur noch minimalen Alteration des gesunden Gewebes nicht für eine erfolgreiche PDT ausreichen soll. Diese Erkenntnis von RIS et al. kann nach den Ergebnissen dieser Arbeit nicht uneingeschränkt gestützt werden, deshalb sollte im klinischen Einsatz in jedem Fall individuell beurteilt werden, ob ein kurzes oder ein längeres Behandlungsintervall gewählt wird, in Abhängigkeit davon, welche Strukturen Ziel der Bestrahlung sind.

5.2.1.2.2. Behandlungsintervalle 6 Stunden und 3 Minuten

Eine Verkürzung des Behandlungsintervalls auf 6 Stunden hatte in der vorliegenden Untersuchung im Mittel eine etwas schwächere Wirkung auf die großen Gefäße und Nerven als ein BI von 24 Stunden, jedoch stärker ist als ein BI von 96 Stunden (Abschnitt 4.2.2., Abb. 38; S. 70).

Die Wirkung von Behandlungsintervallen unter 24 Stunden sind von verschiedenen Autoren untersucht worden. RIS et al. (1997) beschrieben in der oben bereits besprochenen Studie stärkere Schädigungen von Gefäßwänden und Nerven bei einem BI von 12 Stunden gegenüber längeren Intervallen (vgl. Abschnitt 5.2.1.2.1., S.87). Es wurde bereits dargestellt, dass die Veränderungen in unseren Untersuchungen insgesamt stärker ausfielen als in der Studie von RIS et al. Sowohl in unseren, als auch in ihren Untersuchungen wurde jedoch aufgezeigt, dass eine PDT mit einem Intervall unter 24 Stunden schwere Schäden verursacht, die teilweise stärker sein können, als bei einem BI von 24 Stunden.

Betrachtet man die Anreicherungskinetik von mTHPC in Gefäßwänden (vgl. Abschnitt 2.2.3.1.3.4.1., S.18), so erscheinen die ausgeprägten Reaktionen bei einem BI von 6 bzw. 12 Stunden schlüssig. RIS et al. (1997) führten die PDT mit dem Behandlungsintervall 12 Stunden durch, zu diesem Zeitpunkt liegt in etwa das Konzentrationsmaximum an mTHPC in den Gefäßwänden vor (10. Stunde p.i. laut ANDREJEVIC-BLANT et al., 1996) und die photodynamischen Effekte sind dementsprechend am ausgeprägtesten. Davor und danach ist die Konzentration der photosensibilisierenden Substanz geringer, und dementsprechend sind die

Effekte geringer. Ob die PDT mit einem Intervall von 6 Stunden wirklich schwächer ist, als mit einem Intervall von 24 Stunden, lässt sich aufgrund unserer geringen Gruppengröße bei diesem BI nicht sicher bestätigen. Analog der Anreicherungskinetik für die Blutgefäße wäre sogar eine stärkere Wirkung einer PDT mit einem BI von 6 Stunden gegenüber 24 Stunden denkbar. Die Schädigung der Skelettmuskulatur bei einem BI von 6 Stunden war in der vorliegenden Untersuchung in jedem Fall maximal (S3) (vgl. 4.2.2.1.3., S. 71). In der Literatur wird von einer verstärkten Wirkung eines Behandlungsintervalls kürzer als 24 Stunden auf gesunde Gewebe allgemein berichtet. In der oben bereits angeführten Studie von LOFGREN et al (1994) traten bei einem BI von 6 Stunden schwerste Hautschädigungen auf, selbst bei einer Lichtintensität von nur 5 J/cm^2 war die Haut maximal geschädigt. Weitere Angaben über die Schädigung gesunder Gewebe bei Behandlungsintervallen unter 24 Stunden gibt es wiederum bei RIS et al. (1993 a und b). Bei einem BI von 4 Stunden war das Nekroseausmaß der gesunden Muskulatur und Haut der Hintergliedmaße von Mäusen etwas geringer als bei einem BI von 24 Stunden, aber stärker als bei einem BI von 48 Stunden. Die antitumoröse Wirkung einer PDT mit einem BI von 4 Stunden war jedoch annähernd Null, der Therapieeffekt zu diesem Zeitpunkt ist dementsprechend ungünstig. Ein BI von 12 Stunden hingegen zog eine ausgeprägte Nekrose der gesunden Gewebe nach sich, die noch etwas größer war als bei einem BI von 24 Stunden. Gleichzeitig rief 12 Stunden Behandlungsintervall die maximale Tumornekrose hervor, auch hier war jedoch die Selektivität nicht gewährleistet, weil die Tiefe der Alterationen des gesunden Gewebes nur geringfügig kleiner war als die Tumornekrose. Auch VEENHUIZEN et al. (1997a) beschrieben Behandlungsintervalle unter 24 Stunden. In ihrer Untersuchung an RIF I-Tumoren bei Mäusen mit $0,3 \text{ mg/kg}$ mTHPC wurde die größte antitumoröse Potenz bei einem BI von einer Stunde beobachtet. Als etwas geringer wirksam, jedoch mehr als bei 24 Stunden, zeigte sich das Behandlungsintervall von 6 Stunden (entgegen der Aussage von RIS et al. 1993 a und b). Über die Wirkung auf gesunde Gewebe wurde in dieser Studie nicht berichtet.

Das Ziel der photodynamischen Therapie muss es jedoch sein, das unterliegende Gewebe so gut als möglich zu schonen. Da in unseren Untersuchungen die Muskelnekrose bei dem Behandlungsintervall von 6 Stunden immer maximal war, ist es nach unseren Erkenntnissen nicht angebracht, 6 Stunden als Behandlungsintervall zu wählen.

Die unterschiedlichen Angaben über Effektivität und Selektivität einer PDT mit einem kurzen Behandlungsintervall sind wahrscheinlich bedingt durch Speziesabhängigkeit, Dosisabhängigkeit und vor allem Art und Stadium des Tumors bzw. der behandelten Gewebe.

VEENHUIZEN et al. (1997 a) erklärten die hohe antitumoröse Potenz einer PDT mit einem kurzen Behandlungsintervall anhand der Konzentrationskinetik von mTHPC im Blut (vgl.

Abschnitt 2.2.3.1.3.3., S.17). Die Plasmakonzentration beim Tier ist kurz nach der Injektion des Photosensibilisators am höchsten und nimmt danach exponentiell ab. Dementsprechend wären die stärksten indirekten zytotoxischen Effekte via Mikrozirkulation frühzeitig nach der Injektion zu erwarten. Da die Konzentration in diversen Zielgeweben zu diesem Zeitpunkt jedoch noch gering ist, scheint die starke antitumoröse Wirkung hauptsächlich durch die Verlegung der versorgenden Gefäße bedingt zu sein.

Die photodynamische Therapie mit einem **Behandlungsintervall von 3 Minuten** wurde durchgeführt, um zu zeigen, ob und welche Schädigungen entstehen, wenn der Photosensibilisator größtenteils im Blutgefäßsystem zirkuliert. Die Wirkung einer PDT mit diesem Behandlungsintervall speziell auf gesunde Gefäße und Nerven ist nach unserem Kenntnisstand noch nicht untersucht worden. Überraschenderweise fanden sich mehrfach Veränderungen, wovon vor allem die Venen betroffen waren (Abb. 39, S.73). Auch die kleinen Gefäße zeigten Reaktionen. Die Nekrose der Skelettmuskulatur war auf eine flache Zone beschränkt, die höchstens 2 mm in die Tiefe reichte (S1 bis 2) (vgl. Abschnitt 4.2.2. und 4.3.1.1.). Mit Behandlungsintervallen von 3 Minuten behandelte Arterien, Venen und Nerven zeigten jedoch insgesamt die geringsten Schädigungen im Vergleich mit allen anderen aus dieser Studie (Abschnitt 4.2.2., Abb. 38; S.70 und Abschnitt 4.3.1.1, Abb. 39; S. 73).

Ein vergleichbar kurzes Behandlungsintervall beschrieben nur VEENHUIZEN et al. (1997 a). In ihrer Untersuchung hatte ein Behandlungsintervall von 5 Minuten eine geringe antitumoröse Wirkung auf chemisch induzierte RIF I-Tumore bei Mäusen. Die behandelten Tumore wurden für kurze Zeit in ihrem Wachstum gehemmt, jedoch nicht zerstört. Aussagen über Wirkungen auf Gefäße oder Nerven bzw. pathohistologische Untersuchungen wurden hier jedoch nicht vorgenommen.

In der Literatur finden sich auch kaum Angaben zur Verteilung von Photosensibilisatoren wenige Minuten nach der Injektion. VEENHUIZEN et al. (1997 a) beschrieben für das Versuchstier Maus die maximale mTHPC Konzentration im Blut direkt nach der Injektion mit nachfolgendem exponentiellem Abfall ($T_{1/2}$ 1,01 und 14 h). Die exakten Messzeitpunkte wurden leider nicht angegeben. Diese Daten basierten auf der radioaktiven Markierung des Photosensibilisators. Für andere Medien oder Gewebe außer Blut wurden keine Angaben gemacht.

Bei MENEZES DA SILVA und NEWMAN (1995) wird dagegen ebenfalls für das Versuchstier Maus beschrieben, dass das Konzentrationsmaximum im Serum erst ca. 3 Stunden nach der Injektion erreicht wird und danach die Konzentration langsam stetig sinkt. Diese Daten basierten

auf der Fluoreszenzmessung. Direkt nach der Injektion wurden jedoch keine Fluoreszenzmessungen vorgenommen, die erste definitive Angabe erfolgte eine Stunde post injectionem. Auch hier finden sich keine weiteren Aussagen zur Verteilung in anderen Geweben. Da die beiden Untersuchungen auf unterschiedlichen Konzentrationsbestimmungen basieren und die Angaben zur Konzentration direkt nach der Injektion nicht exakt sind, können die Werte letztlich nicht verglichen werden.

Mit einer Herzfrequenz von 220-325 pro Minute und einem Herzminutenvolumen von 100-300 ml ist anzunehmen, dass die Substanz bei einem Gesamtblutvolumen von ca. 300 ml (physiologische Werte eines Kaninchens mit einem Gewicht von ca. 3 kg; SCHALL, 1995; pers. Mitteilung Dr. Sager, Universität Düsseldorf) drei Minuten nach der Injektion im gesamten Organismus verteilt ist. In einigen Organen reichert sich mTHPC nachgewiesenermaßen sehr zeitig an, der Hauptanteil dürfte sich aber noch im Blutkreislauf befinden. Die Aufnahme von mTHPC in Zellen vollzieht sich langsam und ist erst 24 Stunden nach der Injektion abgeschlossen (vgl. Abschnitt 2.2.3.1.3.3., S.17). Die intrazelluläre Aufnahme beginnt zweifellos in Zellen, die dem Blutfluss direkt anliegen sowie in Zellen des retikuloendothelialen Systems. Die Endothelzellen liegen dem Blutfluss direkt an. In unseren fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte fluoreszierendes mTHPC auf Höhe der Endothelzellen der großen Gefäße dargestellt werden (vgl. Abschnitt 4.4., S. 77 und Abb. 41, S. 78). Diese könnten demnach bereits ersten direkten zytotoxischen Effekten unterliegen. Es gibt aber auch Anhaltspunkte dafür, dass extrazelluläre Substanzen modifiziert werden und Wirkungen auf die Endothelzellen ausüben (s.u. Abschnitt 5.2.2.1.).

Die Nekrose der Muskulatur erstreckte sich bei diesem Behandlungsintervall nur auf eine oberflächliche Zone. Da keine echten Gefäßverschlüsse (Thrombose und/oder Obliteration) der Gefäße gefunden wurden, könnten als auslösender Faktor für den Gewebsuntergang temporäre Gefäßverschlüsse (Vasokonstriktion) angesehen werden. Diese führen allein oder in Verbindung mit lumeneinengenden Zellproliferationen zu Minderdurchblutung im Gewebe. Die nur oberflächliche Schädigung der Muskulatur könnte jedoch auch für direkte Zytotoxizität sprechen: Die zweifellos geringen Mengen mTHPC in allen Zellen zu diesem Zeitpunkt erklären die mangelhafte Wirkung der photodynamischen Therapie zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach der Injektion. Die flache oberflächliche Muskelnekrose könnte darauf basieren, dass die direkt auftreffende Lichtenergie gerade noch ausreicht, um die minimalen intrazellulären Konzentrationen ausreichend zu aktivieren und den Zelltod hervorzurufen. In tieferen

Muskelschichten jedoch wird auch die Lichtenergie schwächer, und es liegt nicht mehr genügend Energie vor, um die geringen Wirkstoffkonzentrationen in den Zellen zu aktivieren.

Somit lässt sich feststellen, dass zwar die Schädigung der Muskulatur bei diesem sehr kurzen Behandlungsinterall nur sehr gering ist, aber nach VEENHUIZEN et. al. (1997a) haben derart kurze Behandlungsintervalle auch keine hohe antitumoröse Wirkung (s.o.) und somit kaum klinische Relevanz.

5.2.2. Auswirkungen der PDT auf die untersuchten Strukturen

5.2.2.1. Auswirkungen auf große Gefäße und Nerven

Im Folgenden sollen die Veränderungen an den großen Gefäßen und Nerven unabhängig von den Behandlungsparametern erläutert werden.

In unseren eigenen Untersuchungen standen bei den Arterien Abrundung der Endothelzellen (vgl. Abb. 13, S.47) und Endothelhyperplasie (vgl. Abb. 14 und 15, S.47) in Kombination mit Mediaverdickung im Vordergrund. Die Venenwände wiesen abweichend neben Wandfältelungen (vgl. Abb. 20, S. 49) vielfach auch Ablösung des Endothels (vgl. Abb. 21, S. 49) und in einigen Fällen Nekrose der Tunica muscularis auf. Sowohl Arterien als auch Venen zeigten Thrombenbildung und Obliteration der Gefäße. Die in Abb. 21 (S. 48) zu sehenden Ablösungen des Endothels stellen einen typischen Befund dar, der nur bei bestrahlten Gefäßen auftrat. Bei den nicht bestrahlten Gefäßen in den Kontrolluntersuchungen fanden sich im histologischen Bild solche Veränderungen nie. Die breite fokale Endothelablösung muss jedoch nicht bereits zwingend *in vivo* bestanden haben. Sie ist zwar auf jeden Fall Ausdruck einer Gefäßwandschädigung, kann aber in dem in der Abbildung zu sehenden Ausmaß sowohl bereits *in vivo* als auch bei der histologischen Aufarbeitung entstanden sein.

Die Ursachen und Mechanismen der Gefäßwandveränderungen infolge der PDT sind vielfach noch nicht geklärt, die meisten Erkenntnisse stammen zudem von Untersuchungen zu Photosensibilisatoren der ersten Generation (Photofrin[®] und Haematoporphyrinderivat) (STAR et al., 1986; SELMAN et al., 1984) und anderen Photosensibilisatoren der zweiten Generation (KRAMMER, 2001; FINGAR et al., 2000). Für den hier verwendeten Photosensibilisator mTHPC gibt es kaum Untersuchungen über die Mechanismen und Hintergründe der Gefäßveränderungen.

Die Abrundung der einzelnen Endothelzellen zum sogenannten Kopfsteinpflasterendothel (vgl. Abb. 13, S. 48) kann als direkter phototoxischer Effekt angesehen werden. Diese

Strukturveränderung der Endothelzellen wurde auch von anderen Autoren beobachtet (RIS et al., 1997). Ausgelöst wird die Abrundung durch Veränderungen im Zytoskelett der Endothelzellen. Diese basieren auf der Depolymerisation der Mikrotubuli infolge Oxidation durch Sauerstoff-Intermediärprodukte, wie FINGAR (1996) und WIEMAN et al. (1991) durch *in vitro*-Versuche mit anderen Photosensibilisatoren aufgezeigt haben. Laut SPORN und FOSTER (1992) führen subletale Lichtintensitäten (nach Applikation von Photofrin) zu einer Depolymerisation der Mikrotubuli. Die Endothelzellen liegen dann der Basalmembran nicht mehr flach auf, sondern sitzen mit schmaler Basis und großen interzellulären Lücken auf der Basalmembran. Durch Lösung der tight-junctions und dem Verlust der Zell-zu-Zell-Kommunikation liegt die Basalmembran frei und ist allen im Blutstrom befindlichen Zellen zugänglich. Dies wirkt sich wie eine Verletzung des Endothels aus. Bei Berührung der Basalmembran werden Thrombozyten und andere Blutzellen aktiviert, die sich anheften, aggregieren und vasoaktive Substanzen freisetzen (KRAMMER, 2001; PENG et al., 1995). Dies führt normalerweise zu Thrombenbildung und/oder Vasokonstriktion (RIS et al., 1997; SELMAN et al., 1984).

Erstaunlicherweise wiesen jedoch in unseren Untersuchungen sowohl die arteriellen Gefäßwände mit Kopfsteinpflasterendothelbildung (vgl. Abb. 13, S. 47), als auch Venen mit Nekrose bzw. Ablösung des Endothels (vgl. Abb. 21, S. 48) keine lokal adhärenenten Thromben auf. Es wurden nur das ganze Gefäßkaliber ausfüllende Thromben gefunden. Das Fehlen der lokalen Thromben auch an Stellen mit starker Endothelschädigung kann dadurch erklärt werden, dass die Thromben *in vivo* wieder abgelöst wurden. Häufig kommt es zur Autolyse des Thrombus-Materials und nachfolgender Abschwemmung, was durch die Gefahr von Thrombo-Embolien belegt wird. Darüber hinaus kann auch eine Ablösung der Thromben im Rahmen der postmortalen Perfusion zur Fixation die Ursache sein, bei der die zu untersuchenden Gefäße mit hohem Druck perfundiert wurden (vgl. Abschnitt 3.4.3.1., S.39). Die massiven Thromben waren vermutlich so fest mit dem Endothel verbunden, dass ein Abtransport nicht möglich war.

Die Fältelung der Venenwand, die sehr häufig vor allem bei niedrigeren PDT-Intensitäten auftrat, und in den Kontrolluntersuchungen nicht beobachtet wurde, basiert wahrscheinlich auf einer Reduktion der Stabilität der Gefäßwand infolge der oben beschriebenen Strukturveränderungen der Endothelzellen.

Die Hyperplasie des arteriellen Endothels (vgl. Abb. 14 und 15, S. 47) als zweites vorherrschendes Ereignis findet anscheinend unabhängig von den intrazellulären Strukturveränderungen statt. Diese Proliferation von Endothelzellen entspricht nicht dem erwarteten phototoxischen Effekt auf Zellen. Es ist auch ungewöhnlich, dass das arterielle

Endothel hauptsächlich davon betroffen war, sich das venöse Endothel dagegen nur in seltenen Fällen hyperplastisch darstellte.

Diese Veränderung ist auch in der Literatur bisher noch nicht explizit beschrieben worden. Bei RIS et al. (1991 und 1996) finden wir allerdings die Abbildung einer Aorta eines photodynamisch behandelten Menschen, die eine deutliche Endothelhyperplasie zeigt. Dieser Patient litt unter einem Mesotheliom in der Brusthöhle und wurde intraoperativ nach chirurgischer Entfernung des Tumors einer PDT unterzogen (0,3 mg/kg mTHPC; 10 J/cm²; BI 48 Stunden). Die PDT führte zur Zerstörung des Tumors, ohne jedoch die von dem Tumor infiltrierte Aortenwand anzugreifen. Die Fotos nach der PDT zeigten lediglich ein hyperplastisches Endothel und alterierte glatte Muskelzellen. Erstaunlicherweise wurde die Endothelproliferation jedoch nicht beschrieben oder diskutiert.

Eine mögliche Erklärung für die Endothelzellproliferation könnte die Hemmung eines Wachstumsfaktors infolge der PDT sein, die STATIUS VAN EPS et al. (1997) in ihrer Untersuchung mit dem Photosensibilisator Zn-Phthalocyanine beschrieben. TGF- β (transforming growth factor-beta), ein Wachstumsfaktor aus der Extrazellulärmatrix inhibiert normalerweise die Proliferation gesunder Endothelien über eine Zellige hinaus. STATIUS VAN EPS et al. zeigten, dass die photodynamische Bestrahlung von Endothelien die Freisetzung von TGF- β hemmt und somit eine überschüssige Proliferation der Endothelzellen nicht länger gebremst wird. Bisher gibt es noch keine Untersuchungen über die Wirkung einer PDT mit mTHPC bezüglich der TGF- β -Inhibition. Die genauen Ursachen für die Ausbildung der Endothelhyperplasie wären in weiteren Studien zu untersuchen.

Die Zerstörung von Gefäßwandzellen bzw. Gefäßwänden wurde in unseren Versuchen nur bei wenigen Venen beobachtet. In nur einem Fall trat eine Nekrose der gesamten Venenwand mit nachfolgender Einblutung ins umliegende Gewebe auf. Häufiger war eine fokale Nekrose einzelner Gefäßwandschichten bzw. der ganzen Gefäßwand zu beobachten. Auch die breite fokale Endothelablösung könnte in Zusammenhang mit Zellnekrosen stehen. Inwieweit die Ablösung bereits in vivo bestand, lässt sich mit unseren Mitteln nicht evaluieren. Jedoch traten in den Kontrolluntersuchungen derartige Veränderungen nicht auf. Dies lässt darauf schließen, dass die PDT zumindest zu einer Schädigung des Endothels geführt haben muß, die eine Ablösung in vivo nach sich zog, resp. die Ablösung im Zuge der Fixation und Weiterverarbeitung begünstigt hat.

Als direkter zytotoxischer Effekt wäre eine Nekrose der Gefäßwandzellen, vor allem auch der arteriellen, eigentlich zu erwarten gewesen. RIS et al. (1997) beschrieben Nekrose der Tunica

media der *A. carotis communis* sogar bei einer erheblich geringeren Photosensibilisator-dosis (0,1 mg/kg), allerdings nur bei einem Behandlungsintervall von 12 Stunden. Die Wände der *V. cava* zeigten in ihrer Untersuchung an Minipigs indes keine Nekrose. Als Ursache für diese Differenzen könnten die unterschiedlichen Behandlungsparameter sowie die unterschiedlichen Spezies in Betracht kommen.

Aufgrund unserer Untersuchungen kann man zu der Schlussfolgerung kommen, dass die PDT mit den verwendeten mTHPC- und Licht-Dosen nicht zur Verringerung der Dicke von Arterienwänden führt, sondern im Gegenteil zur Dickenzunahme bis hin zur Obliteration. Diese Veränderungen, die Proliferation, wie auch die Endothelzellabrundung mit ggf. nachfolgender Thrombenbildung können weitreichende Folgen haben und wirken sich je funktioneller aus, je kleiner das Lumen des Gefäßes ist. Die Venenwände unterliegen demgegenüber häufiger einer Endothelnekrose und -ablösung. Trotz dieser Nekrose und/oder Ablösung des Endothels wurden keine Abscheidungsthromben beobachtet und auch nur in einem Fall eine Einblutung in das umliegende Gewebe.

Das von RIS et al. (1996) beschriebene sogenannte Wasserscheidenphänomen trat auch in der vorliegenden Untersuchung bei einigen großen wie auch kleineren Arterien auf. Dies deutet darauf hin, dass zumindest in diesen Fällen vermutlich zuerst der Blutfluss gestört wurde und dadurch die dem Hauptgefäß am weitesten entfernt gelegenen Muskel- oder Bindegewebszellen abstarben, weil das Sauerstoff- und Nahrungsangebot dort als erstes unzureichend war. Die Zellen, welche dicht am Gefäß lagen, blieben vital, weil hier noch genügend Sauerstoff und Nährstoffe zur Verfügung standen. Das Wasserscheidenphänomen ist also ein deutliches Anzeichen für eine Mitbeteiligung des Gefäßsystems am Untergang der Muskelzellen. RIS et al. beschrieben es bei einer mTHPC-Dosis von 0,075 mg/kg.

Die Schädigung der Nerven belief sich in unseren Untersuchungen mutmaßlich nur auf den Verlust der Myelinscheiden (vgl. Abb. 23 bis 26, S.51). Die Axone schienen lichtmikroskopisch intakt. Klinische Störungen wie Lahmheiten oder Automutilation der Pfoten (als Ausdruck von Missempfindungen beispielsweise) traten erstaunlicherweise nicht auf. Die Tiere wurden im Stall beobachtet, es wurden jedoch keine neurologischen Untersuchungen vorgenommen. Um die Auswirkungen auf die Nerven genauer zu bestimmen, müssten z.B. Messung der elektrischen Nervenströme unternommen werden.

Die bei RIS et al. (1997) beschriebenen interstitiellen Ödeme bei Behandlungsintervallen von 12 und 24 Stunden wurden in den vorliegenden Untersuchungen nicht beobachtet. Auch Thrombosierung perineuraler Gefäße trat nicht auf. Die Schädigung der Schwannschen Zellen, die sich in einer Abnahme der Myelinscheiden äußert, scheint indes wiederum ein direkter zytotoxischer Effekt zu sein. Diese Demyelinisierung kann jedoch – im Gegensatz zur chirurgischen Schädigung eines Nerven – reversibel sein.

5.2.2.2. Auswirkungen auf die Mikrozirkulation

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die PDT mit dem Photosensibilisator mTHPC auch auf die Mikrozirkulation auswirkt. Auch bei kleinen Gefäßen führt sie zu Zellproliferation und Kopfsteinpflasterendothelbildung. Die Endothelhyperplasie wirkte sich im Unterschied zu den großen Gefäßen jedoch bereits bei einer Zunahme um wenige Endothelzellschichten gefäßobliterierend aus. Analog dazu konnten deutlich häufiger Thrombosierungen der kleinen Gefäße beobachtet werden (vgl. Abb. 28, S. 52).

Die Reaktionen der Mikrozirkulation auf die photodynamische Therapie entsprechen damit weitestgehend den im vorhergehenden Abschnitt für die großen Gefäße beschriebenen. Je kleiner jedoch die Gefäße, desto eher führen die Veränderungen zu Gefäßverschlüssen mit funktionellen Auswirkungen auf das Gewebe, welches sie versorgen.

In einigen Fällen konnte im zweiten Versuchsteil bei einem Behandlungsintervall von 24 Stunden eine totale Nekrose kleiner Gefäße beobachtet werden (vgl. Abschnitt 4.3.1.2., S. 74). Hier waren keine Zellen mehr differenzierbar, das Gefäß stellte sich als eosinophiler Ring dar. Dies war jedoch nur bei einigen, in nekrotisches Fettgewebe eingebetteten Gefäßen der Fall. Geht man davon aus, dass subletale Lichtintensitäten zu Strukturveränderungen der Endothelzellen führen (s.o.), so wäre die totale Nekrose der gesamten Gefäßwand demzufolge durch letale Intensitäten ausgelöst worden. Es bleibt jedoch offen, warum diese Schädigung nur in seltenen Fällen auftrat, obwohl identische Fettgewebsnekrosen häufiger beobachtet wurden. Trotz unserer Bemühungen, die Bestrahlungsbedingungen konstant zu halten, scheinen einige Tiere individuell verstärkt auf die PDT zu reagieren.

Die in der Literatur beschriebene Vasokonstriktion konnte als temporäres Phänomen in unseren Untersuchungen histologisch nicht dargestellt werden. Diese hat laut MENEZES DA SILVA et al. (1995) ihren Höhepunkt zeitlich verzögert von der Durchführung der PDT. Sie scheint demnach vor allem durch vasoaktive Substanzen ausgelöst zu werden, die erst später z.B. aus zerstörten Tumorzellen freigesetzt werden. Letzlich lässt sich aus dem vorliegenden

Untersuchungsergebnissen nicht schlussfolgern, wie sich die PDT auf das Gefäßsystem eines Tumors auswirken würde, da die Endothelzellen und die gesamte Mikrozirkulation aufgrund der schnelleren Proliferation und den damit verbundenen strukturellen und funktionellen Unterschieden sensitiver reagiert (HENDERSON et al., 1992; FINGAR 1996; KRAMMER 2001). Tumoren sind zudem infolge ihres starken Wachstums stärker abhängig von der Durchblutung, so dass auch kurzfristige Mangelversorgung bereits zum Absterben von Tumorzellen führen müsste.

5.2.2.3. Schädigung der Skelettmuskulatur

Die in der Umgebung der Gefäße befindliche Skelettmuskulatur sowie andere Gewebe wurden mitbestrahlt und histologisch untersucht. Diese Strukturen wiesen nahezu immer eine weit ausgedehnte Nekrose auf. Die Nekrose des gesunden Gewebes entsteht sowohl durch direkten Angriff der Sauerstoffintermediärprodukte sowie durch Hypoxie infolge Verlegung der Mikrozirkulation. Beide Mechanismen schienen auch in unseren Versuchen eine Rolle zu spielen. Behandlungsintervalle von 24 und 48 Stunden führten überwiegend zu indirekten Schädigungen. Die kleineren Gefäße waren bei diesen Behandlungsintervallen stark geschädigt und die Muskulatur unterlag einer nicht selektiven ischämischen Nekrose. Ab einem Behandlungsintervall von 72 Stunden traten demgegenüber weniger Gefäßveränderungen auf und die Muskelnekrose entsprach hauptsächlich einer gewebe-spezifischen Koagulationsnekrose durch direkte Zytotoxizität (vgl. Abschnitt 5.2.1.2.1., S. 87 und Abb. 31, S. 53).

Die Skelettmuskulatur ist eines der Gewebe mit den niedrigsten mTHPC-Konzentrationen (vgl. 2.2.3.1.4.2., S. 18). Dennoch war in unseren Untersuchungen bei Behandlungsintervallen zwischen 24 und 72 Stunden die Nekrose in den meisten Fällen ≥ 8 mm in die Tiefe ausgedehnt (vgl. Abb. 28 und 31; S. 52 und 53). Damit war bereits fast die maximal mögliche Nekrosentiefe der mTHPC-PDT (etwa 10 mm; vgl. Abschnitt 2.2.3.1.2., S.13) erreicht.

Dass die quergestreifte Muskulatur durch eine PDT stark geschädigt wird, findet sich überall in der Literatur. RIS et al. (1993 a) und BERENBAUM et al. (1993) beschrieben jedoch immer signifikant größere Tumornekrosen als Skelettmuskelnekrosen bei der Gegenüberstellung von Skelettmuskel- und Tumornekrose unter identischen Behandlungsbedingungen. Bei BERENBAUM et al. wurden Mäuse behandelt (BI 24 Std., 10 J/cm²). Leider wurde die mTHPC-Dosis als 1,56 $\mu\text{M}/\text{kg}$ angegeben, somit lassen sich diese Ergebnisse nicht mit unseren vergleichen. Die größte Tumornekrose betrug hier $>7,3$ mm, die Nekrose der Muskulatur wurde dagegen nicht als Tiefe sondern als Verhältnis zwischen gesunder und geschädigter Muskulatur

ausgedrückt. RIS et al. (1993 a) verwendeten ebenfalls bei Mäusen 0,3 mg/kg mTHPC und 10 J/cm². Die maximale Nekrosentiefe der gesunden Muskulatur trat bei einem BI von 12 Stunden auf und erstreckte sich nur ca. 3,5 mm, die Tumornekrose betrug hier ca. 5 mm (BI 12 und 24 Std.). Bei einem BI von 96 Stunden trat in ihrer Untersuchung keine Nekrose der gesunden Muskulatur mehr auf. Dies steht im Gegensatz zu unseren Erkenntnissen im Kaninchenmodell, wo die PDT bei Behandlungsintervallen von 6 bis 96 Stunden zu massiven Nekrosen des gesunden Gewebes führte. Diese Gewebnekrosen sind nach unserer Ausfassung zwar bei jedem Behandlungsintervall und jedem Parameter vorhanden, jedoch sind sie nur auf einen verhältnismässig kleinen Bereich (dem eigentlichen Bestrahlungsbereich) beschränkt und sie heilen nach den physiologischen Gesetzmäßigkeiten ab.

5.2.3. Diskussion der Nebenwirkungen

In Abschnitt 4.2.1.2. (S. 67) und 4.2.2.2. (S. 71) sowie Abschnitt 4.3.2. (S. 76) wurde ausführlich über die Nebenwirkungen und Folgeerscheinungen, die im Zusammenhang mit der photodynamischen Therapie standen, berichtet (siehe auch Tabelle I bis III; S. 122-123 im Anhang).

Inwieweit die lokal oder systemisch auftretenden Veränderungen und Symptome direkt der PDT zuzuschreiben sind oder durch den chirurgischen Eingriff entstanden, war nicht in jedem Fall festzustellen.

Bei einigen Kaninchen traten schwartig-derbe Schwellungen der Haut und des Unterhautgewebes im Bereich der OP-Felder auf. In einem Fall wurde bei der Probenentnahme eine mit seröser Flüssigkeit gefüllte Blase unter der schwartig verheilten Hautwunde am Hals aufgefunden. Diese nicht reguläre Wundheilung könnte eine direkte Reaktion auf die photochemische Schädigung des Gewebes und nicht auf die mechanische Schädigung durch die Operation sein. In der Kontrolluntersuchung K2 (nur Operation ohne photodynamische Bestrahlung) traten derartige Schwellungen bzw. Serombildungen nicht auf (vgl. 4.1., S. 57). Diese Nebenwirkungen standen nicht in Zusammenhang mit der Intensität der PDT. Lokale Reaktionen sind natürliche Folgen von Gewebeerstörungen. Sie werden in ähnlicher Form auch bei FAN et al. (1997) und KÜBLER et al. (1999 a) nach intraoraler und dermalen PDT beschrieben. Derartige Folgeerscheinungen entsprechen dem systemisch auftretenden Sonnenbrand (Erythem, Ödem und Blasenbildung) und heilen erfahrungsgemäß innerhalb 4 bis 8 Wochen ab (vgl. dazu auch Abschnitt 2.3.3., S.24).

Die Wundheilungsstörungen in Form von Abszessbildungen oder Nahtdehiszenzen infolge Benagen der Wunden waren vermutlich keine direkte Folge der PDT, sondern schienen nur mit dem chirurgischen Eingriff an sich in Verbindung zu stehen. Diese Neigung zur Automutilation wird nach eigener Erfahrung bei vielen Kaninchen in Verbindung mit Wunden oder Nähten gesehen. Um das Benagen zu vermindern, wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen die Nahttechnik und das Nahtmaterial verändert. Jedes Tier musste postoperativ für 7 Tage einen Halskragen tragen. Die Bildung von Abszessen kann auch aufgrund einer Überreaktion auf das Nahtmaterial geschehen.

Sechs Tiere litten postoperativ unter teilweise hochgradigen respiratorischen Symptomen. Diese zeigten sich vor Beginn der Therapie noch nicht, es wurden nur klinisch gesunde Kaninchen photodynamisch behandelt. Die erkrankten Tiere wurden separiert und einer adäquaten antibiotischen bzw. bronchospasmolytischen Behandlung unterzogen. Drei der sechs genannten Tiere verstarben trotz Therapie, eines wurde euthanasiert. Die Infektion war vermutlich bereits latent vorhanden und die intraoperative PDT führte zu einer Umwandlung in eine akute Erkrankung. Sowohl die photodynamische Therapie an sich, als auch die Operation in Verbindung mit der PDT könnten zu einer Herabsetzung der Immunkompetenz des Organismus geführt haben. Die Erkrankungen mit letalem Ende traten nur bei der PDT mit den höchsten Intensitäten auf (20 J/cm² und BI 24 Std.). Todesfälle infolge photodynamischer Therapie bei Mäusen beschrieben VEENHUIZEN et al. (1994) und VAN GEEL et al. (1995). In Abhängigkeit von den Behandlungsparametern traten in diesen Studien bis zu 50% Verluste auf. VAN GEEL et al. (1995) berichteten leider nichts über die Ursachen der hohen Mortalität, die jedoch nur bei hoher Lichtintensität und/oder hoher mTHPC-Dosis und/oder kurzem Behandlungsintervall auftrat (vgl. Abschnitt 2.3.3., S. 24). Auch in der Studie von VEENHUIZEN et al. (1994) wird nicht von respiratorischen Erkrankungen berichtet, vielmehr beziehen sich die Ausfälle auf direkte Folgen der PDT. Die großflächige intraabdominelle Bestrahlung 24 Stunden nach Applikation von 0,2 mg/kg mTHPC hatte Organperforationen und großflächige Nekrosen zur Folge. Diese Tiere wiesen einen Gewichtsverlust von über 25% auf und verstarben innerhalb der ersten 2 Wochen nach der PDT. Diese Studien waren als Toxizitätsstudien angelegt und die Ausfälle sind nicht gleichzusetzen mit denen der vorliegenden Arbeit.

In unseren Untersuchungen wurde bei insgesamt 34 Tieren der Gewichtsverlauf untersucht (siehe Tabellen IV, V und VI im Anhang S. 124ff). Im Versuch I/1 konnte kein Zusammenhang zwischen den Behandlungsparametern und der Gewichtsentwicklung festgestellt werden. Einige Tiere nahmen initial in der ersten Woche nach der OP ab (bis max. 10 %), andere jedoch bis zu

10 % zu, unabhängig von den Behandlungsintensitäten. Auch der weitere Gewichtsverlauf bis zur Tötung der Tiere gestaltete sich variabel, teilweise regenerierten sich die Tiere, andere nahmen weiter ab (bis max. 21 %). In den Versuchen I/2 und II konnte dagegen schon eher eine Tendenz festgestellt werden, dass die Tiere initial an Gewicht verlieren (bis zu max. 20%), sich jedoch in den meisten Fällen regenerieren. Die Regeneration erfolgte bei den mit einem BI von nur 3 Minuten photodynamisch behandelten Tieren jedoch schneller. Vermutlich sind die initialen Gewichtsverluste nicht auf die PDT selbst sondern auf die Operation zurückzuführen, jedoch sind die mit „leichteren“ Behandlungsbedingungen therapierten Tiere vermutlich regenerationsfähiger. Behandlungsparameter-abhängige Inappetenz und Flüssigkeitsverluste wurden auch von RIS et al. (1997) bei den photodynamisch behandelten Minipigs beschrieben, auch diese waren nur vorübergehend.

5.2.4. Diskussion der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen

Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde aufgezeigt, dass 6 Minuten nach der Injektion die meiste Fluoreszenz zu beobachten ist. Die Proben, die 24 Stunden nach der Injektion entnommen wurden, wiesen deutlich weniger Fluoreszenz auf und in den 72 Stunden post injectionem entnommenen Proben war kaum noch Fluoreszenz zu erkennen. In allen Fällen war hauptsächlich intraluminal und perivaskulär sowie perimysial Fluoreszenz zu identifizieren (vgl. Abschnitt 4.4., S.77ff). Diese Ergebnisse entsprechen nicht in jeder Beziehung den Angaben anderer Autoren. Die meisten Autoren, die fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchführten, waren allerdings in der Lage, die Fluoreszenz zu messen. Häufig wird sie in relativen Einheiten angegeben (ALIAN et al., 1994; ANDREJEVIC et al., 1996).

Es gibt in der Literatur keine Untersuchungen über die Fluoreszenz 6 Minuten nach der Injektion. Wie bereits in Abschnitt 5.2.1.2.2. (S. 92ff) besprochen wurde, ist zu vermuten, dass der Photosensibilisator 6 Minuten nach der Injektion im gesamten Organismus verteilt, jedoch noch hauptsächlich im Blutkreislauf zirkuliert. Dies erklärt die starke intraluminale Fluoreszenz zu diesem Zeitpunkt. Intraluminale Fluoreszenz zeigen auch die Fotografien bei ANDREJEVIC et al. (1996). 8 Stunden nach der Injektion waren in deren Studie alle Blutgefäße deutlich mit der fluoreszierenden Substanz gefüllt, 96 Stunden p.i. war noch eine geringe Fluoreszenz in den Gefäßwänden vorhanden. Eine komplette Füllung, wie sie ANDREJEVIC et al. (1996) beschrieben, konnte in unseren Untersuchungen jedoch nicht festgestellt werden, der fluoreszierende Photosensibilisator lag eher diffus verteilt im Lumen vor.

Wie beschrieben war in der vorliegenden Untersuchung 6 Minuten p.i. an einigen Stellen eine fluoreszierende Schicht dicht an der Gefäßwand auf Höhe der Endothelzellen zu beobachten. Leider war es uns jedoch nicht möglich, im Fluoreszenzmikroskop einzelne Zellen zu identifizieren bzw. exakt festzustellen, ob die Endothelzellen mit der fluoreszierenden Substanz angereichert waren. ANDREJEVIC-BLANT et al. (2001) beschrieben die Fluoreszenz in den Endothelzellen normaler Blutgefäße des Menschen über die Zeit als langsam abnehmende exponentielle Kurve. Die höchste Fluoreszenz wurde 4 Stunden nach der Injektion von mTHPC bestimmt, dies war der früheste Messzeitpunkt. Die Fluoreszenz 24 Stunden nach der Injektion betrug hier etwa 80% des Maximums. 72 Stunden nach der Injektion wurde noch etwa die Hälfte der initialen Fluoreszenzintensität gemessen. Fluoreszenzmikroskopische Fotografien bei ANDREJEVIC-BLANT et al. (1997 und 2000) zeigten 12 Stunden nach der Injektion von mTHPC eine starke Fluoreszenz in den Gefäßwänden, nicht jedoch im Lumen der Gefäße. Hierbei handelte es sich um kleinere Gefäße aus der Lamina propria der Backenschleimhaut von gesunden Hamstern. In der vorliegenden Studie konnte eine derartige Fluoreszenz der Gefäßwände zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. ANDREJEVIC-BLANT et al. (1997 und 2000) beschrieben in den Untersuchungen grafisch ebenfalls eine Abnahme der relativen Fluoreszenzintensitäts-Einheiten in den Gefäßwänden über die Zeit. Die Kurve beschrieb hier annähernd eine Glockenkurve mit einem Maximum bei etwa 10 Stunden p.i. und einem exponentiellen Abfall. 24 Stunden nach der Injektion wurden noch über 90% relative Fluoreszenzintensitäts-Einheiten gemessen, 72 Stunden p.i. waren es noch ca. 50% und 96 Stunden p.i. noch ca. 30%. Die fluoreszenzmikroskopische Fotografien zeigen im Gegensatz zu dieser Angabe im Diagramm 96 Stunden p.i. keine Fluoreszenz in den Gefäßwänden mehr.

Demgegenüber wurden in unseren fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen maximale Fluoreszenzintensitäten kurz nach der Injektion und nicht erst 12 bzw. 24 Stunden nach der Injektion bestimmt.

PENG et al. (1995) bildeten fluoreszenzmikroskopische Fotografien von CaD2 Mammakarzinomen bei Mäusen ab. Hier war 1 Stunde nach der Injektion von mTHPC (1mg/kg) eine deutliche Fluoreszenz in den Gefäßwänden des Tumors zu verzeichnen, die auch 24 Stunden p.i. noch in geringerem Ausmaß vorhanden war. Hier wurde der Photosensibilisator jedoch nicht i.v. sondern intraperitoneal appliziert.

Anhand dieser Ergebnisse erscheint es plausibel, dass die Fluoreszenz mit der Zeit zurückgeht, jedoch scheinen die Untersuchungsergebnisse noch von verschiedenen anderen Faktoren beeinflusst zu werden. So konnten wir in unseren eigenen Untersuchungen keine Anreicherung in

den Gefäßwänden aufzeigen, wie es die anderen Autoren beschrieben und auch fotografisch belegten.

Die geringe Fluoreszenz, die in der Skelettmuskulatur zu verzeichnen war, entspricht den Angaben in der Literatur. Nach fluoreszenzmikroskopischen Messungen von ANDREJEVIC et al. (1996) finden sich dort allgemein nur geringe Mengen des Photosensibilisators, mit einem schwachen Maximum 7 Tage nach Injektion (vgl. Abschnitt 2.2.3.1.3.4.2., S.18). In den oben erwähnten Studien von PENG et al. (1995) und ANDREJEVIC-BLANT et al. (1996, 1997 und 2000) zeigten auch fluoreszenzmikroskopische Fotografien, dass in der Skelettmuskulatur weder nach einer Stunde noch nach 12, 96 oder 192 Stunden Fluoreszenz der Skelettmuskulatur zu beobachten war. Lediglich in der bei ANDREJEVIC-BLANT et al. (2001) sind Fotografien abgebildet, die Spuren perimysialer Fluoreszenz 96 Stunden post injectionem zeigen.

In Zusammenhang mit den vorliegenden histopathologischen Ergebnissen, stellt sich die Frage, warum 24 Stunden und 72 Stunden nach der Injektion nur geringe Fluoreszenz zu beobachten war, nach den analogen Behandlungsintervallen jedoch bis maximale Schädigungen auftraten. Umgekehrt stellt sich ein Behandlungsintervall von 3 Minuten nur als minimal schädigend dar, die Fluoreszenz nach solch kurzen Zeiträumen ist aber stark. Hierfür könnte das sogenannte Bleaching, das Ausbleichen der Fluoreszenz einer Substanz mit der Zeit (BONNET and MARTINEZ, 2001) verantwortlich sein.