

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
(im Walter-Brendel-Zentrum
für experimentelle Medizin, Wbex)
der Ludwigs-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. U. Pohl

**Quantitative nicht-invasive Analyse des Gewebesauerstoffpartialdruckes im
amelanotischen Melanom A-MEL-3 mittels in-vivo Phosphoreszenz-Quenching
Technik**

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Alexander Passon
aus München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. Marc Dellian
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Thomas Herzinger Priv. Doz. Dr. Ulrich C. Schaller
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Martin Eichhorn
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	30.04.2009

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Kontext	1
1.2 Tumoroxygenierung	3
1.3. Fragestellung und Zielsetzung	6
2. Material und Methoden	7
2.1. Grundlagen des Phosphorescence Quenching	7
2.1.1 Begriffsklärung	7
2.1.2 Phosphoreszenz	9
2.1.3 Phosphoreszenz Quenching	10
2.1.4 Stern-Volmer-Gleichung	12
2.1.5 pO_2 – Messung mittels Phosphorescence Quenching	14
2.1.6 Pd(II)meso-tetra(4-carboxyphenyl)Porphyrin	15
2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung	15
2.3 Das Modell der transparenten Rückenhautkammer des syrischen Goldhamsters	16
2.4 Tumoren	19
2.4.1 Kultur der Tumorzellen	19
2.4.2 Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation	19
2.4.3 Implantation der Tumorzellen in die Rückenhautkammer	20
2.5 Implantation von Verweilkathetern	21
2.6 Wiegen der Tiere	21
2.7 Aufbau und Versuchsdurchführung des Optical Imaging sowie des Phosphorescence Quenchings	21
2.7.1 Erhebung und Auswertung der mikrohäodynamischen Parameter	25
2.7.2 Steuerung und Stromversorgung des Photomultipliers	25
2.7.3 Steuerung des Stroboskops	27
2.7.4 Steuerungssoftware	27
2.7.5 Aquisitionsssoftware	28
2.7.6 Validierung des Messsystems	29
2.7.7 Versuchsprotokoll zur Messung der Mikrozirkulation	30
2.8 Datenverarbeitung und Statistik	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Validierung des Messsystems	32
3.1.1 Korrelation mit einem Blutgasanalysegerät	32
3.1.2 Zeitsynchrone vergleichende Messung mit einer polarographischen Sonde	33
3.2 Vorversuche im Gewebe	34

3.2.1 Messung im Tumorgewebe ohne Injektion von Palladiumporphyrin	34
3.2.2 Konzentrationsfindung	35
3.2.3 Messungen in vivo: Normoxie, temporäre Hyperoxie, Hypoxie.	35
3.3 Sauerstoffpartialdruck im A-Mel-3 Tumor	37
3.4 Einfluss der Mikrozirkulation auf den Sauerstoffpartialdruck	43
3.4.1 Periphere und zentrale Tumorareale	49
3.4.2 Unterschiede in den Wachstumsgruppen	54
4. Diskussion	59
4.1 Moderne Verfahren zur Messung des Sauerstoffs	59
4.1.1 Polarographische Methoden	59
4.1.2 Hypoxiemarker	60
4.1.3 Messung der strahlenbiologisch-hypoxischen Fraktion	60
4.1.4 Kryospektrophotometrie	61
4.1.5 Near-Infrared-Spektroskopie	61
4.1.6 Sauerstoff Messung im MRT	62
4.1.7 Phosphorescence Quenching	62
4.2 Diskussion der Methodik	63
4.2.1 Phosphoreszenz Quenching	63
4.2.2 Interpretation des monoexponentiellen Fits	64
4.2.3 Die räumliche und zeitliche Unschärfe der Messung	67
4.2.4 Das Modell der transparenten Rückenhautkammer	67
4.2.5 Das amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3	68
4.2.6 Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie	69
4.3 Diskussion der Messergebnisse	71
4.3.1 Definition der Hypoxie	71
4.3.2 Sauerstoffpartialdruck im A-Mel-3 Tumor	73
4.3.3 Zusammenhang zwischen Tumormikrozirkulation und Oxygenierung	73
5. Zusammenfassung	76
6. Literaturverzeichnis	78
7. Lebenslauf	93

Verzeichnis der Abkürzungen

2,3-DPG	2,3-Bisphosphoglycerat
Abb.	Abbildung
A-mel	amelanotisches Melanom
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	arbitrary units (willkürliche Einheiten)
BSA	bovines Serumalbumin
CCD	charged coupled device (optischer Sensor)
DA	digital analog
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
G	Erdbeschleunigung
Hb	Hämoglobin
HIF	hypoxia inducible factor
I.E.	internationale Einheiten
KG	Körpergewicht
kD	Kilo Dalton
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
OER	oxygen enhancement ratio
pCO	Partialdruck Kohlenmonoxid
pCO ₂	Partialdruck Kohlendioxid
Pd	Palladium
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
ROI	region of interest (Region des Interesses)
RPMI	Zellkulturmedium benannt nach dem Roswell Park Memorial Insitut
SEM	Standardfehler des Mittelwertes

s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
TTL Pulse	Positiver elektrischer Rechteckimpuls
VEGF	vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Kontext

Nach wie vor ist Krebs, also die maligne Entartung von körpereigenen Zellen, die zweithäufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern nach den Erkrankungen des Herzkreislaufsystems. Das Robert-Koch-Institut beschreibt in seiner Broschüre „Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends 2004“ einen weiteren Anstieg der Neuerkrankungen in Deutschland auf 394680 pro Jahr.

Im Trend zeigt sich ein leicht zunehmender bis gleich bleibender Verlauf. Dabei treten die meisten Krebsfälle im Alter von über 60 Jahren auf. Doch auch im Bereich der unter sechzigjährigen nimmt die Inzidenz zu. Dabei fällt jedoch besonders auf, dass gerade bei den Tabak assoziierten Krebsarten (Lungen, Mund, Rachen) eine Angleichung des Niveaus von Mann und Frau stattfindet. Man darf davon ausgehen, dass für diese Entwicklung das veränderte Rauchverhalten der Frauen in den letzten Jahrzehnten verantwortlich ist. Ein Bulletin vom 06.04.2005 über die Gesundheitsberichterstattung des Robert-Koch-Instituts zeigt die sich angleichenden Kurven in der 25- bis 69-jährigen Bevölkerung. (Abb.1)

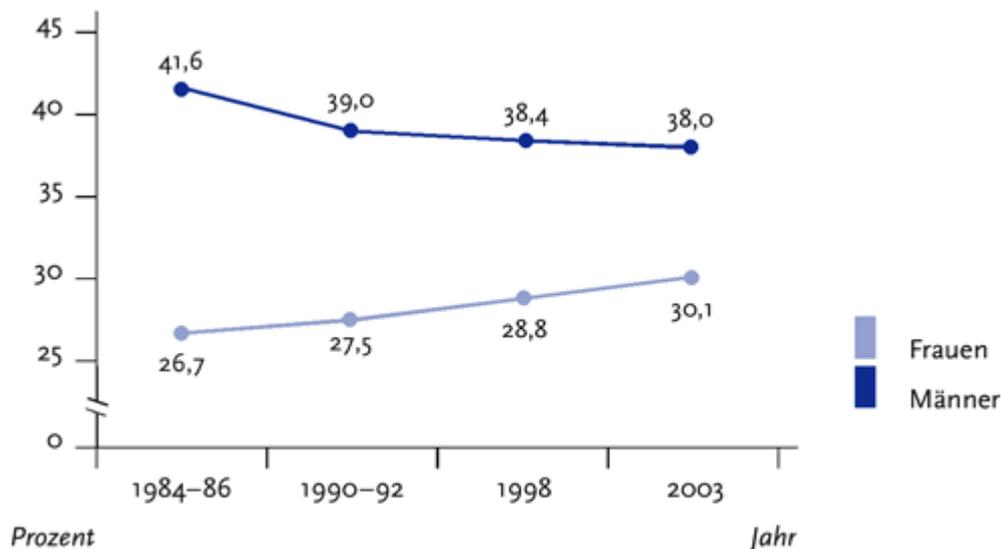


Abbildung 1

Entwicklung des Anteils der Raucher in der 25- bis 69-jährigen Bevölkerung (1984-86: nur alte Bundesländer)

In den USA wird die Situation anhand der existierenden Krebsregister noch dramatischer eingeschätzt; auch dort nimmt die Zahl der Neuerkrankungen weiter zu. Im Vergleich dazu ist die Zahl der Herz- Kreislauferkrankungen eher rückläufig. Die Gründe für diese Tendenz liegen möglicherweise in einer verbesserten Aufklärung und Vorsorge. So sehen einige Autoren sogar einen möglichen Wechsel an der Spitze der häufigsten Todesursachen. (Doll R 1992; Dinse GE et al. 1999; Weißbach L 2000)

Diese Entwicklung und natürlich die alleinige Zahl der Todesfälle hat die Forschung angetrieben immer mehr über diese Krankheit zu erfahren und ihr entgegenzutreten. Dabei steht die Behandlung weiterhin hauptsächlich auf den drei klassischen Säulen der Onkologie: Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie. Jedoch auch immer mehr „experimentelle“ Therapieformen haben ihre Wirksamkeit unter Beweis gestellt und gelangen zunehmend in den klinischen Alltag. So werden immer häufiger „Chemotherapie Cocktails“ verabreicht, die neben den üblichen Chemotherapeutika zusätzlich auf immunmodulatorische oder antiangiogenetische Strategien setzen. Zudem werden bei unzureichenden Ergebnissen oder Kontraindikationen alternative Therapieformen wie zum Beispiel die photodynamische Therapie oder die lokale Hyperthermie eingesetzt. So steht dem Onkologen in den heutigen Tagen ein breit gefächertes Instrumentarium zu Verfügung.

Dass diese immer diversifiziertere Behandlung der Tumorkrankheit Früchte trägt, lässt sich ebenfalls aus den Daten des Robert-Koch-Instituts herauslesen. Obwohl, wie oben beschrieben, die Inzidenz weiter zunimmt bzw. auf hohem Niveau stabil bleibt, nimmt die Mortalität ab.

Interessanterweise spielt bei den meisten Behandlungsformen der Status des Sauerstoffpartialdruckes im Tumor eine große Rolle. So sieht man nicht nur bei der Bestrahlung, deren zytotoxische Wirkung hauptsächlich auf der Bildung von Sauerstoffradikalen beruht, was bereits im Jahre 1953 beschrieben wurde (Gray LH et al. 1953), sondern auch bei der Chemotherapie (Teicher BA et al. 1990), der Immuno- sowie photodynamischen Therapie und der lokalen Hyperthermie (Vaupel P 1997) einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Tumoroxygenierung und der Effektivität der entsprechenden Behandlungsform. Diese Wechselbeziehung geht so weit, dass der Sauerstoffpartialdruck im Tumor zu einem prognostischen Faktor geworden ist und mit den Überlebensraten der Patienten korreliert (Gatenby RA et al. 1988; Hoeckel M et al. 1993;1998; Nordmark M et al 1996).

1.2 Tumoroxygenierung

So steht am Anfang einer jeden Krebserkrankung die Entartung einer körpereigenen Zelle, die sich außerhalb der Kontrollmechanismen des menschlichen Körpers ungehindert teilt. Um ein solches, theoretisch exponentielles Wachstum, zu ermöglichen, benötigt der Tumor sowohl eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, als auch einen suffizienten Abtransport der entstandenen Metabolite. Diese Versorgung und den Abtransport leistet die Mikrozirkulation. Der genaue Mechanismus der Sauerstoffverteilung an das Gewebe aber ist immer noch nicht komplett verstanden. In der klassischen Theorie die von Krogh bereits im Jahre 1918 aufgestellt wurde, funktioniert diese analog zum hydraulischen Modell des Blutdruckes (Krogh A 1918). In einem das zentrale Gefäß umgebenden Zylinder kann der Sauerstoff durch einen Gradienten in das umliegende Gewebe diffundieren und versorgt so die Zellen. Folglich nimmt der Sauerstoffpartialdruck über die zu überwindende Strecke ab, es wird eine gewisse Mindestanzahl von Gefäßen pro Gewebevolumen zur ausreichenden Versorgung benötigt. Rechnerisch kann der Radius des Zylinders eine Länge von 200µm haben um den Zellen ein ausreichendes Auskommen zu gewährleisten (Krogh A 1919). In den letzten Jahren mehren sich allerdings die Hinweise, dass man das hydraulische Modell nicht einfach für die Sauerstoffverteilung übertragen kann. Im Speziellen gilt dies, im Gegensatz zur Lungenstrombahn, für den großen Kreislauf mit seinem geringen Oberflächen – zu – Volumen – Verhältnis. So haben unterschiedliche Arbeitsgruppen einen starken Sauerstoffverlust bereits in den Arteriolen festgestellt. In den Kapillaren, den Venolen und kleinen Venen konnte nur noch ein kleiner Sauerstoffgradient von 3-4 mmHg gemessen werden (Boegehold MA 1988; Bohlen HG 1995; Intaglietta M 1996). Außerdem scheint die Gefäßwand eine tragende Rolle in der Verteilung und Regulierung des Sauerstoffes zu spielen, die es bewerkstelligt eine fast homogene Sauerstoffverteilung im Gewebe zu erreichen (Tsai AG 2006). Zusammenfassend gilt, dass sich die empirisch erhobenen Daten der letzten Jahre nicht oder nur mit Änderungen mit dem Modell von Krogh vereinbaren lassen.

Um die Mikrozirkulation zu beschreiben werden die Gefäßdichte, der Gefäßdurchmesser, die Fließgeschwindigkeit und der Blutvolumenfluss quantifiziert. Insbesondere die dynamischen Parameter wie die Fließgeschwindigkeit und der

Volumenfluss haben sich als wirkungsvolle Messgrößen herausgestellt (Jain RK 1988; Intaglietta M 1974).

Eine Mikrozirkulation und in diesem Sinne ein Gefäßnetzwerk benötigt der wachsende Tumor, denn durch Diffusion allein bleibt ein solider Tumor auf eine Größe von 1-2 mm² beschränkt. Wie bereits im Jahre 1945 von Algire und Chalkley gefolgert, benötigt er, um weiter an Größe zunehmen zu können, ein eigenes Gefäßnetzwerk (Algire GH et al. 1945). Das Wachstum tumoreigener Blutgefäße wird über die Balance zwischen pro- und antiangiogenetischen Molekülen gesteuert. Man geht davon aus, dass durch chronische Hypoxie sowie eine pH-Wert-Verschiebung in den sauren Bereich die Transkription verschiedener proangiogenetischer Substanzen wie zum Beispiel dem vascular endothelial growth factor (VEGF) oder dem hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α), induziert wird (Bergers G et Benjamin LE 2003). Dies geschieht meist nach einer so genannten „tumor dormancy“ also einer Art Schlafstadium, das Jahre andauern kann (Folkman J et Kalluri R 2004). Beginnt sich nach diesem Schlafstadium ein Gefäßnetzwerk auszubilden, spricht man vom „angiogenic switch“. Ist dieser Schritt erst einmal getan, beeinflussen viele Faktoren die weitere Tumoroxygenierung (Abb.2)

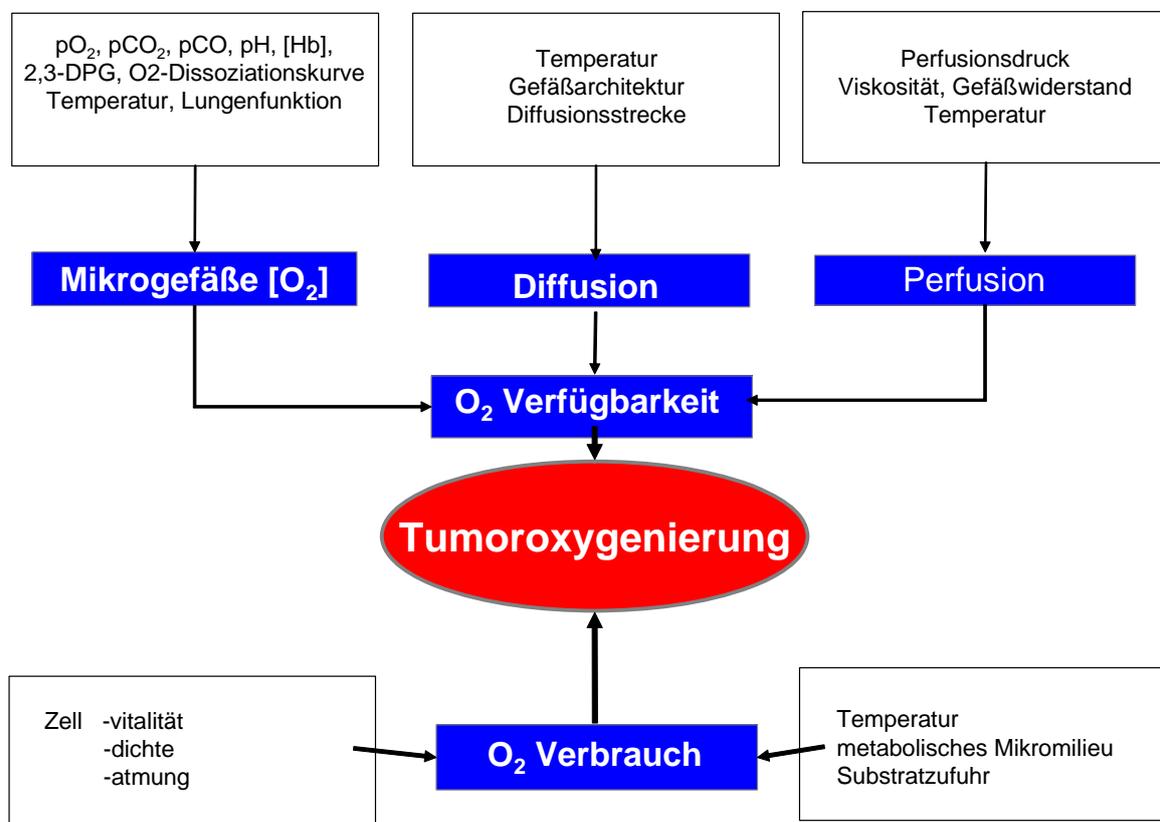


Abbildung 2: Einflussgrößen der Tumoroxygenierung

In mehreren Studien an soliden Tumoren hat sich gezeigt, dass die Oxygenierung solider Tumoren niedriger ist als die von normalem Gewebe (Vaupel P 1993; 1996; 1998). Sowohl der Sauerstoffverbrauch in sich immer wieder teilenden Zellen mit einer hohen Zellaktivität, als auch die Verfügbarkeit des Sauerstoffs, der durch ein chaotisches Gefäßnetzwerk mit Kalibersprüngen, Spiralbildungen und Pendel- sowie Shuntflüssen gewährleistet wird, haben eine geringe Tumoroxygenierung zur Folge (Goldman E 1907). Doch Hypoxie ist nicht allein die Folge des Tumorwachstums, sie kann auch Ursache und Motor der Tumorprogression sein (Höckel M 1999; Young SD 1988; Rice GC 1986; Reynolds TY 1996; Russo CA 1995). Dabei führt Hypoxie durch Punktmutationen, Gen – Amplifikationen und chromosomalen Rearrangements zu einer Instabilität im Genom und zu einer Enthüllung zuvor versteckter aber vorhandener Genvarianten. Des Weiteren wird durch die verschlechterten Bedingungen der Selektionsdruck auf die Zelle erhöht. Diejenigen Zellen, die mit einem besonders geringen Potential zur Apoptose und einem besonders hohen Potential zur Angiogenese ausgestattet sind, werden in der klonalen Selektion bevorzugt überleben. Diese Tumorzellen allerdings stellen, wie bereits beschrieben, für die Therapie ein ganz besonders Problem dar. Außerdem erhöhen sie durch eben jene Eigenschaften, die ein noch dichteres Zellwachstum ermöglichen und die Mikroarchitektur noch chaotischer werden lassen, den Selektionsdruck mittels Hypoxie auf die Zellen. Der *circulus vitiosus* schließt sich. Das Ausmaß und die Bedeutung dieser hypoxievermittelten klonalen Selektion wurden sowohl experimentell als auch klinisch bewiesen (Höckel M 1999; Graeber TG 1996; Kim CY 1997).

Doch auch Behandlungsformen setzen direkt bei der Versorgung (auch mit Sauerstoff), die durch ein Gefäßnetzwerk gewährleistet wird, an. Die antivaskuläre Therapie versucht entweder die Neueinsprossung der Gefäße zu verhindern (Antiangiogenese) (Folkman J 1971), oder mit dem „vascular targeting“ bereits vorhandene Gefäßstrukturen zu zerstören (Denekamp J 1984). So soll der Tumor ausgehungert und erstickt werden. Mit dem Angriff auf die nicht maligne entarteten genetisch stabilen Endothelzellen der Tumorgefäße, sollen weit mehr Tumorzellen getötet werden als dies mit einem direkten Angriff auf dieselbigen möglich wäre (Denekamp J 1984).

Genau der andere Weg wird beschritten, wenn vor einer geplanten Bestrahlung versucht wird die Sauerstoffkonzentration im Tumor zu erhöhen um so die Effektivität

der Therapie zu erhöhen. In Zellkulturen wurde der Sauerstoffverstärkungsfaktor (OER, Oxygen Enhancement Ratio) ermittelt, der mit dem Faktor 2,8 eine fast 3-fache Radiosensibilität beschreibt. Hier kommen von einer hyperbaren Sauerstoffbeatmung bis zu blutbildenden Stoffen, und damit einer Erhöhung der Sauerstofftransportkapazität, eine Vielzahl von Möglichkeiten in Betracht.

1.3. Fragestellung und Zielsetzung

Wie beschrieben stellt der Sauerstoffpartialdruck eine zentrale Größe in der Tumorprogression und Therapieeffizienz dar. Nach wie vor ist der Zusammenhang zwischen Tumormikrozirkulation und Tumoroxygenierung nur unzureichend untersucht. Die Tumoroxygenierung quantitativ in vivo in Abhängigkeit der Tumormikrozirkulation zu messen, war Ziel der vorliegenden Arbeit. Zum Erreichen dieses Zieles musste ein neues Messverfahren, die nicht invasive Sauerstoffmessung mittels Phosphoreszenz Quenching etabliert und mit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der Mikrozirkulation kombiniert werden.

Als Zielsetzung galt:

1. Etablierung und Validierung der Sauerstoffmessung mittels Phosphoreszenz Quenching.
2. Quantifizierung der Gewebeoxygenierung in A-Mel-3 Tumoren in vivo.
3. Analyse des Einflusses der Tumormikrozirkulation auf die Gewebeoxygenierung.

2. Material und Methoden

2.1. Grundlagen des Phosphorescence Quenching

2.1.1 Begriffsklärung

Zunächst sollen die für das Verständnis der physikalischen Grundlagen der hier verwendeten Methode des Phosphorescence Quenching wichtigen physikalischen Begriffe erläutert werden. Dies geschieht nach der Vorlage des Lehrstuhls für Ökophysiologie der Pflanzen an der Universität Erlangen Nürnberg (http://www.biologie.uni-erlangen.de/botanik1/html/photobiologie/kapitel_2.htm). Die Reihenfolge wurde dabei so gewählt, dass die Erläuterungen der Begriffe aufeinander aufbauen können.

Quantenausbeute: Die Quantenausbeute (Φ) eines photophysikalischen Prozesses ist definiert als Verhältnis aus Anzahl der Umwandlungen (n_u) zur Anzahl der absorbierten Photonen (n_p).

Spin: Jedes Elektron eines Atoms besitzt einen Eigendrehimpuls, der Spin genannt wird. Mit diesem Eigendrehimpuls ist ein Magnetisches Moment verbunden.

Spinquantenzahl: Man unterscheidet zwei Arten des Spins (anschaulich: Drehrichtungen des Elektrons), die Elektronen erhalten so die Spinquantenzahl $+ \frac{1}{2}$ oder $- \frac{1}{2}$. Die Spinquantenzahl aller Elektronen addieren sich zur Gesamtspinquantenzahl S , meist ist S gleich 0 (gleichviele Elektronen mit $S = + \frac{1}{2}$ und $S = - \frac{1}{2}$), existiert ein ungepaartes Elektron so ist $S = \frac{1}{2}$ (selten, da solche Elemente meist Verbindungen eingehen und die Elektronen anschließend gepaart vorliegen), manchmal liegen zwei Elektronen mehr mit dem Spin $+ \frac{1}{2}$ vor als Elektronen mit dem Spin $- \frac{1}{2}$ (z.B. beim O_2), dann ist $S = 1$.

Multiplizität: Die Multiplizität M des elektronischen Zustandes eines Moleküls oder Atoms ergibt sich aus $M = 2 \times S + 1$ (S ist die Spinquantenzahl).

Singulett-Zustand: Im Singulett-Zustand eines Atoms oder Moleküls ist die totale Elektronenspin-Quantenzahl $S=0$ (also $M=1$, daher Singulett-Zustand).

Triplett-Zustand: Im Triplett-Zustand eines Atoms oder Moleküls ist die totale Elektronenspin-Quantenzahl $S=1$ (also $M=3$, daher der Name Triplett-Zustand).

Spinauswahlregel: (Multiplizitätsauswahlregel) Diese Regel verbietet Energieübergänge innerhalb eines Atoms oder Moleküls, bei denen sich die totale Elektronenspin-Quantenzahl ändert. Spinverboten sind also Übergänge vom Triplett- in den Singulett-Zustand und umgekehrt. Das bedeutet, dass solche Übergänge sehr unwahrscheinlich sind, oder, anders formuliert, dass die Halbwertszeiten dieser Übergänge sehr groß sind.

Internal Conversion: (innere Umwandlung) Als Internal Conversion bezeichnet man die strahlungslose Umwandlung eines elektronischen Zustands eines Moleküls in einen anderen.

Intersystem Crossing: Beim Intersystem Crossing erfolgt ein eigentlich spinverbotener (nach der Spinauswahlregel) Übergang zwischen Zuständen unterschiedlicher Multiplizität (also vom Singulett- in einen Triplett-Zustand oder umgekehrt). Dass der Übergang spinverboten ist, bedeutet, dass die Lebensdauer des Ausgangszustandes besonders lang ist.

Jablonski-Diagramm: Das Jablonski-Diagramm stellt die elektronischen Zustände eines Moleküls sowie die Umwandlung dieser Zustände dar.

Intermolekularer Energietransfer: Nähern sich Moleküle oder Atome bis auf einen sehr geringen Abstand aneinander an, so besteht die Möglichkeit, dass die Energie des einen, zuvor angeregten (z.B. durch Lichtabsorbktion), Atoms oder Moleküls an das andere abgegeben wird:



D,A: zwei verschiedene Teilchen

$h\nu$: Lichtquant, das vom Teilchen D absorbiert wird

D^* , A^* : angeregter Zustand der Teilchen

Absorbtion von Licht: Atome und Moleküle sind in der Lage Licht zu absorbieren. Dabei wird das Atom oder Molekül in einen angeregten Zustand versetzt, indem es die mit dem Lichtquant aufgenommene Energie dazu benutzt, einen höheren elektronischen Zustand einzunehmen. Dieser angeregte Zustand ist instabil, das Teilchen hat nun verschiedene Möglichkeiten, in den Grundzustand zurückzukehren:

1. Die Energie kann in Schwingungsenergie des Teilchens umgewandelt werden (internal conversion (s.o.))
2. Die Energie kann an ein anderes Teilchen abgegeben werden: intermolekularer Energietransfer (s.o.)
3. Die Energie kann in Form von Strahlung wieder abgegeben werden. Geht das Teilchen dabei von einem angeregten Singulett-Zustand in einen Singulett-Grundzustand oder von einem angeregten Triplett-Zustand in einen Triplett-Grundzustand über, so spricht man von Fluoreszenz. Dieser Übergang ist spinerlaubt nach der Spinauswahlregel (die Gesamtspinquantenzahl ändert sich nicht) und hat daher eine sehr kurze Lebensdauer (im Bereich von 10^{-8} bis 10^{-9} s). Zur Phosphoreszenz siehe unten.
4. Die Energie kann für chemische Reaktionen genutzt werden. Man unterscheidet primäre und sekundäre photochemische Reaktionen: Zu den primären photochemischen Reaktionen zählen: Die Spaltung in freie Radikale, die Dissoziation der Moleküle, die Umlagerung, Isomerisierung, die Abspaltung eines Wassertoffatoms, die Dimerisierung und die Wirkung als Sensibilisator (s.u.). Ist das Produkt eines photochemischen Primärprozesses instabil, so folgt ein Sekundärprozess.

2.1.2 Phosphoreszenz

Phosphoreszenz entsteht durch die Absorbtion eines Photons durch ein Teilchen (Atom oder Molekül). Dabei geht es durch Intersystem Crossing (s.o.) vom Singulett-

in den Triplettzustand über (oder umgekehrt) und kann seinen Grundzustand wieder über die Abgabe eines Lichtquants erreichen. Dann spricht man von Phosphoreszenz. Bei der Phosphoreszenz ändert das Teilchen also im Gegensatz zur Fluoreszenz bei der Emission des Lichtquants seine Multiplizität. Da dieser Übergang zwischen Zuständen unterschiedlicher Multiplizität eigentlich nach der Spinauswahlregel verboten ist, ist die Lebensdauer dieses Prozesses wesentlich größer als bei der Fluoreszenz.

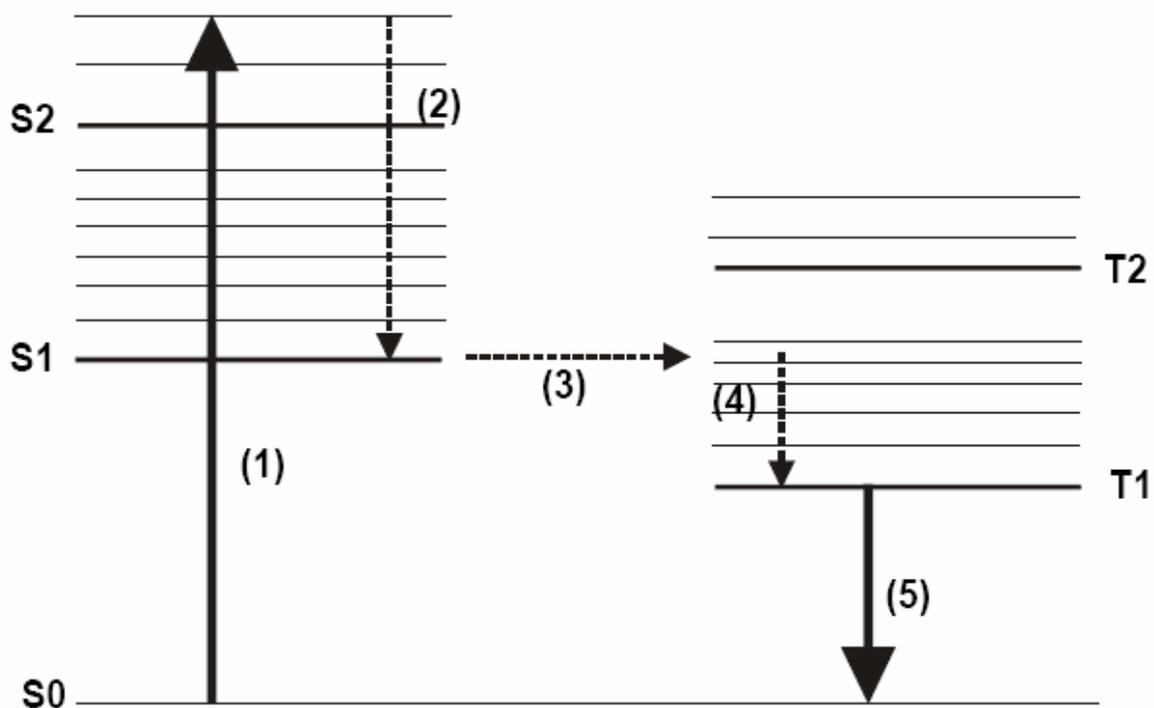


Abbildung 3: Jablonski-Diagramm der Teilprozesse bei der Phosphoreszenz

Hier Dargestellt die Absorption eines Photons (1), welches das aufnehmende Molekül vom Singulettgrundzustand S₀ in einen angeregten Singulettzustand anhebt (hier S₂). Durch Internal Conversion (2) (strahlungslos) relaxiert das Molekül in den angeregten Singulettzustand S₁. Durch Intersystem Crossing (3) und Internal Conversion (4) geht es in den ersten angeregten Triplettzustand T₁ über. Der Übergang von hier aus in den Singulettgrundzustand S₀ ist eigentlich spinverboten und hat deshalb eine lange Lebensdauer, diesen Übergang bezeichnet man als Phosphoreszenz (5), hierbei wird ein Photon emittiert.

2.1.3 Phosphoreszenz Quenching

Spezielle phosphoreszierende Substanzen können die mit einem Lichtquant aufgenommene Energie, welche sie zunächst selbst in den Triplettzustand versetzt, an andere Moleküle abgeben: So geht das aufnehmende Molekül in einen

angeregten Zustand über, das abgebende in den Grundzustand (man bezeichnet diesen Prozess als intermolekularen Energietransfer (s.o.)). Zwischen bestimmten Porphyrinen und Sauerstoff ist dieser intermolekulare Energietransfer möglich. Dabei gibt das durch Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge in den Triplettzustand versetzte Porphyrin die Energie bei einer Kollision mit einem Sauerstoffmolekül an dieses ab und geht dabei strahlungslos selbst wieder in den Grundzustand über. Der Sauerstoff geht vom Triplett- in den Singulettzustand über (Intersystem Crossing) und hat nun erneut unterschiedliche Möglichkeiten, die aufgenommenen Energie abzugeben. In Betracht kommen Internal Conversion, Phosphoreszenz (dies geschieht mit sehr geringer Quantenausbeute) oder chemische Reaktionen (Photosensibilisierung).

Für das angeregte Porphyrin gibt es also im Wesentlichen zwei Möglichkeiten seine aufgenommene Energie wieder abzugeben.

1. Phosphoreszenz
2. Intermolekularer Energietransfer mit dem Sauerstoffmolekül. Da bei der Übertragung der Energie auf den Sauerstoff normalerweise kein Licht emittiert wird (es sei denn, der Sauerstoff geht durch Phosphoreszenz in den Grundzustand über, was aber mit sehr geringer Quantenausbeute geschieht), spricht man bei diesem Vorgang von „Phosphoreszenz Quenching“: Löschung der Phosphoreszenz.

Die Lebensdauer der Phosphoreszenz des Porphyrins (phosphorescence lifetime) ändert sich dabei in Abhängigkeit von der Anzahl der Kollisionen des Porphyrins mit dem Sauerstoff. Diese Zahl ist wiederum abhängig von der Temperatur (je höher die Temperatur desto mehr Kollisionen), der Konzentration des Sauerstoffs, der Albuminkonzentration im Blut und der Bindungsaffinität des Porphyrins zu Albumin (Albumingebunden ist das Porphyrin teilweise vor der Kollision mit Sauerstoff geschützt). Diese Affinität wiederum ist von der NaCl-Konzentration und dem pH-Wert beeinflusst. Von der Konzentration des Porphyrins ist die Lebensdauer der Phosphoreszenz nicht abhängig. Mit der Porphyrinkonzentration ändert sich lediglich die Intensität des emittierten Lichts, die Lebensdauer der Emission bleibt konstant (Vanderkooi JM et al. 1987; Lo LW et al. 1996). Die genannten Abhängigkeiten

werden durch die Stern-Volmer-Gleichung mathematisch beschrieben.

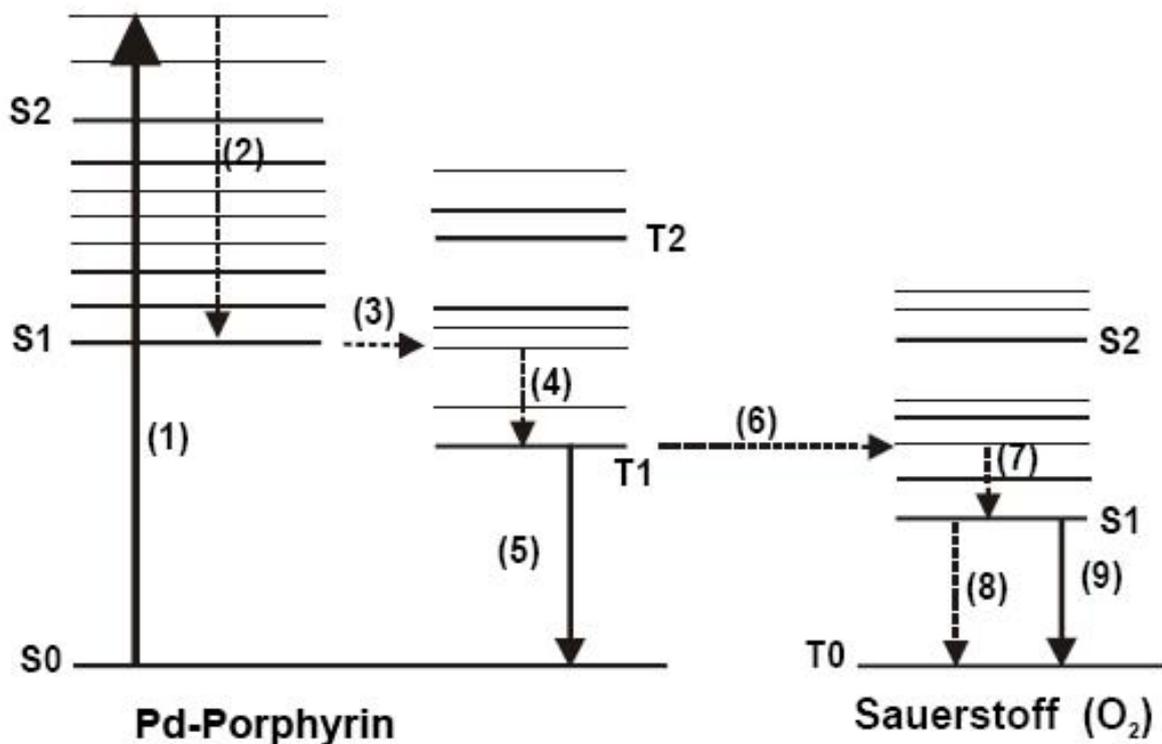


Abbildung 4: Jablonski-Diagramm der Teilprozesse des Phosphorescence Quenching

Zunächst laufen beim Phosphorescence Quenching die gleichen Prozesse wie bei der Phosphoreszenz ab: Nach Absorption des Photons (1) und Internal Conversion (2, 4 und 7) sowie Intersystem Crossing (3) befindet sich das Molekül (hier der für die Versuche verwendete Farbstoff Palladiumporphyrin) im angeregten Triplett-Zustand. Von hier aus sind nun zwei Prozesse möglich: Phosphoreszenz des Farbstoffs (5) oder intermolekularer Energietransfer auf den Sauerstoff (6). Sauerstoff hat einen Triplett-Zustand als Grundzustand (zwei ungepaarte Elektronen mit dem Spin $+\frac{1}{2}$, folglich die Gesamtspinquantenzahl $S=1$, damit die Multiplizität $M=3$), geht daher bei diesem Energietransfer, der während einer Kollision der Moleküle stattfindet (und dessen Häufigkeit damit von der Sauerstoffkonzentration abhängt), in einen angeregten Singulett-Zustand über. Von hier aus hat wiederum das angeregte Sauerstoffmolekül mehrere Möglichkeiten: Rückkehr in den Grundzustand (über strahlungsloses Intersystem Crossing (8)), Phosphoreszenz, oder Eingehen einer chemischen Reaktion (Photosensibilisierung, s.u.)

2.1.4 Stern-Volmer-Gleichung

Die Stern-Volmer-Gleichung bietet die Möglichkeit, durch Bestimmung der Lebensdauer der Phosphoreszenz bestimmter Substanzen den Sauerstoffpartialdruck in ihrer unmittelbaren Umgebung zu errechnen. Ursprünglich

stammt diese Gleichung aus einer Zusammenarbeit der Physikochemiker Otto Stern und Max Volmer, die im Jahre 1919 einen Artikel „Über die Abklingungszeit der Fluoreszenz“ in der physikalischen Zeitschrift veröffentlichten (Stern O et Volmer M 1919). In ihrer klassischen Form lautet sie wie folgt:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q]$$

dabei ist

F_0 die Fluoreszenzintensität des fluoreszierenden Farbstoffes in Abwesenheit des Quenchers,

F die Fluoreszenzintensität desselben in Anwesenheit des Quenchers,

$[Q]$ die Konzentration des Quenchers und K_{SV} die Stern-Volmer-Konstante.

Angepasst kann diese Gleichung die Zusammenhänge des Phosphoreszenz Quenching beschreiben und ermöglicht die Berechnung des Sauerstoffpartialdruckes. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis der Lebensdauer bei $pO_2 = 0$ mmHg (T_0) und einer substanzspezifischen Konstanten k_q , die Konzentration der Substanz selbst hingegen muss nicht bekannt sein (sie hat keinen Einfluss auf die pO_2 -Berechnung). Die experimentelle Bestimmung von $T(pO_2)$ wurde in einem luftdichten System unter Zugabe von Sauerstoffverbrauchenden Enzymen (siehe 2.7) ermittelt. T_0 und k_q müssen dazu nicht bestimmt werden, sondern können der Literatur entnommen werden. Um die Gleichung nach der letzten Unbekannten, dem Sauerstoffpartialdruck, aufzulösen muss die Lebensdauer der Phosphoreszenz des zu bestimmenden Mediums ermittelt werden (s.u.). Dies geschieht über die Logarithmierung der gemessenen exponentiell abfallenden Phosphoreszenzkurve.

$$\frac{T_0}{T(pO_2)} = 1 + k_q T_0 pO_2$$

dabei ist:

T_0 die Lebensdauer der Phosphoreszenz bei $pO_2 = 0$ mmHg

$T(pO_2)$ die Lebensdauer der Phosphoreszenz bei gegebenem pO_2

k_q eine Konstante, die Temperatur, pH, sowie Eigenschaft der phosphoreszierenden Substanz zusammenfasst

pO_2 der gegebene Sauerstoffpartialdruck.

2.1.5 pO_2 – Messung mittels Phosphorescence Quenching

Steht eine geeignete Substanz zur Verfügung, für die die Stern-Volmer-Gleichung zutrifft, so bietet die Messung der Lebensdauer der Phosphoreszenz dieser Substanz eine attraktive Möglichkeit für die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration (die dann über die Stern-Volmer-Gleichung errechnet werden kann). Der Vorteil dieser Methode für Messungen des pO_2 in Geweben besteht insbesondere darin, dass sie nichtinvasiv ist (abgesehen von der Injektion der Substanz), folglich insbesondere für Messungen in vivo und in empfindlichen Geweben eine wichtige Alternative darstellt. Zudem bietet sie eine exzellente Zeitauflösung (im Bereich von mehreren Millisekunden). Die Elemente, auf denen die Phosphoreszenz basiert, sind Metalloporphyrine, die im Normalzustand hydrophob sind. Um diese Substanzen applizieren zu können, musste man sie chemisch verändern. Vinogradov und Wilson, haben über die Jahre unterschiedlichste Substanzen entwickelt (Vinogradov SA et Wilson DF et al. 1996, 1998, 2002). Dabei spielen Hydrophilie, Absorptionsspektren, Emissionsspektren, Molekülgröße sowie ganz profan der Preis eine Rolle. Aufgrund der chemischen Eigenschaften wurde in der vorliegenden Arbeit die Substanz Pd(II)meso-tetra(4-carboxyphenyl)Porphyrin gewählt.

2.1.6 Pd(II)meso-tetra(4-carboxyphenyl)Porphyrin

Diese unter den Metalloporphyrinen eher einfache phosphoreszierende Substanz muss an Albumin gebunden werden um im Blut in Lösung zu gehen. Palladiumporphyrin wurde gemäß den Vorgaben von Saltzmann und Johnson gelöst (Saltzmann DJ et Johnson PC 2003). Dabei wurden 240mg Palladiumporphyrin in 23ml 0,9% NaCl Lösung mit 1380mg bovinem Serumalbumin (BSA Sigma) (60mg/ml = 6% BSA) gelöst. Im Anschluss wurde die Lösung mit Trometamol auf einen pH von 7,4 gepuffert (pH Meter Mettler Delta 350). Sie entspricht chemisch einer der ersten Generationen der zum Quenchen geeigneten Substanzen und ist deshalb einer der günstigeren Vertreter ihrer Art.

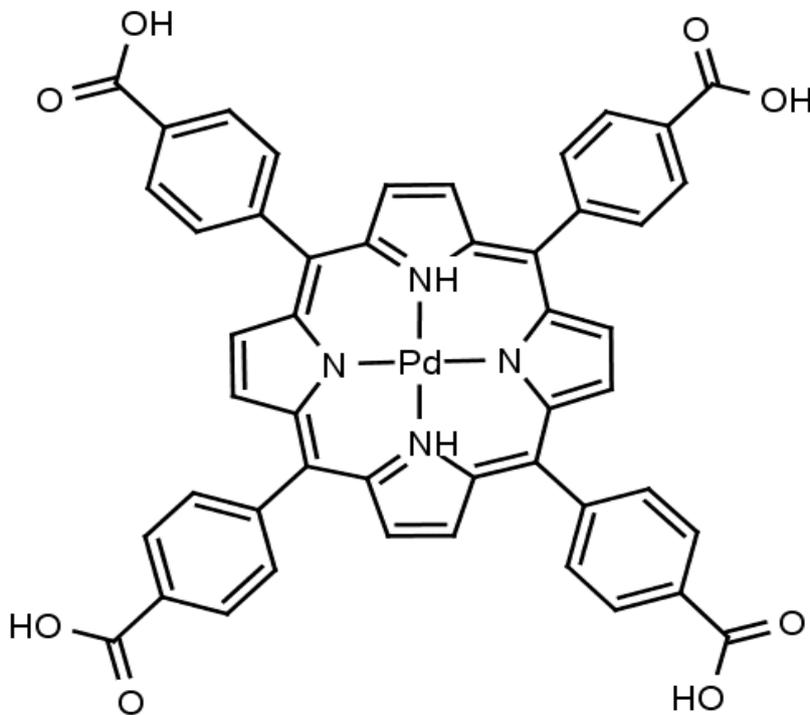


Abbildung 5: Palladiumporphyrin $C_{48}H_{28}N_4O_8Pd$, Molekülmasse in Dalton: 895.20.

2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Die im Folgenden dargestellten tierexperimentellen Untersuchungen wurden in der Zeit von März 2004 bis März 2005 am Walter Brendel Zentrum München der Ludwig-

Maximilians-Universität München durchgeführt. Eine entsprechende Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern lag vor Beginn der Versuche vor.

Als Versuchstiere dienten sechs bis acht Wochen alte männliche syrische Goldhamster (*Mesocricetus aureatus*) mit einem mittleren Körpergewicht von 60 g (50 - 70g). Die Tiere stammten aus dem Inzuchtstamm der Firma Charles River (Sulzfeld) und wurden, im Tierstall des Walter Brendel Zentrum München bei freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug 24° C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50%. Es bestand ein 12 - stündig wechselnder Licht – Dunkel - Rhythmus. Den Tieren wurden zur Gewöhnung an die später durchzuführenden Versuche transparente Plexiglasröhren in die Käfige gelegt. Goldhamster, welche die Röhren konstant mieden, wurden nicht in die Versuche einbezogen.

2.3 Das Modell der transparenten Rückenhautkammer des syrischen Goldhamsters

Als tierexperimentelles Modell zur Beobachtung der Tumormikrozirkulation diente die transparente Rückenhautkammer, welche am Walter Brendel Zentrum München (ehemals Institut für Chirurgische Forschung) entwickelt wurde (Endrich B 1980; Asaishi K 1981). Die Technik dieses Modells wurde bereits vielfach angewendet und ist international hinsichtlich mikrozirkulatorischer Untersuchungen etabliert. Für detaillierte Informationen sei auf die Einleitung und im speziellen auf die Dissertationsarbeit von A. Goetz bzw. nachfolgende Publikationen der Arbeitsgruppen verwiesen (Endrich B 1982; Goetz A 1987; Dellian M 1995).

Die Versuchstiere wurden zunächst mit einer intraperitonealen Injektion von Narkose: 35% Ketavet 100mg/ml Pharmacia GmbH / Rompun 2% Bayer / 30% Isotonische Natriumchlorid-Lösung Delta Select GmbH mit einer Dosierung von 200mg/kg Körpergewicht narkotisiert. Nach Bedarf wurde die Narkose durch zusätzliche Gaben von Narkosemitteln (10mg/kg KG) aufrechterhalten. Mit einem Langhaarrasierer (Aesculap) wurde der Rücken der Tiere rasiert und anschließend chemisch depiliert (Pilcamed, Schwarzkopf). Die Rückenhaut wurde feucht gereinigt und mit 70%-igem Alkohol desinfiziert. Diaphanoskopisch ließ sich nun die Struktur und der Verlauf der subkutanen Arteriolen und Venolen beurteilen. Danach folgte die Implantation der transparenten Rückenhautkammer (Werkstatt, Walter Brendel Zentrum München),

welche aus zwei konvexen, spiegelbildlich gleich großen Titanplatten besteht. Vor der Implantation wurden Rückenhautkammer und Instrumente sterilisiert. Nach Markierung der Mittellinie wurde durch Transillumination die Gefäßversorgung in der Rückenhaut lokalisiert und das Präparationsareal festgelegt. Anschließend wurde eine Kammerhälfte am Oberrand der Hamsterrückenhaut über der Mittellinie mit zwei Haltefäden fixiert. Die weitere Präparation erfolgte in Seitenlage, so dass die jetzt noch freie Hauthälfte dem Präparator zugewandt war. In dem kreisrunden Hautareal, über welchem das Beobachtungsfenster der anderen Kammerhälfte zu liegen kommen sollte, wurden das kutane als auch das subkutane Gewebe der zugewandten Hautseite mikrochirurgisch abpräpariert und damit die intakte Schicht der gegenüberliegenden Epidermis mit subkutanem Gewebe, versorgenden Gefäßen und dem Hautmuskel zur Darstellung gebracht. Dabei wurde eine Schicht nach der Anderen abgetragen, bis die zweite Hälfte der Kammer Einsicht auf den Hautmuskel der Gegenseite ermöglicht (siehe Abb.6, Abb.7).

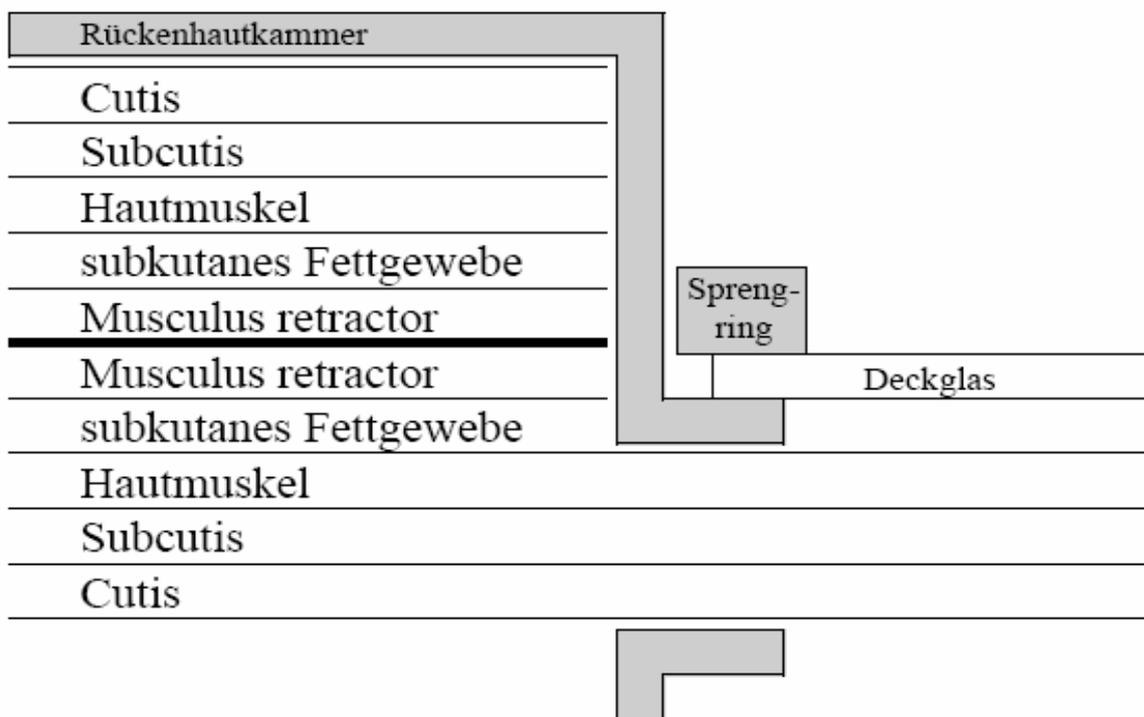


Abbildung 6: Hautschichten des syrischen Goldhamsters im Bereich des Beobachtungsfensters und Fixierung des Deckgläschens im Kammerring durch einen Sprengring.

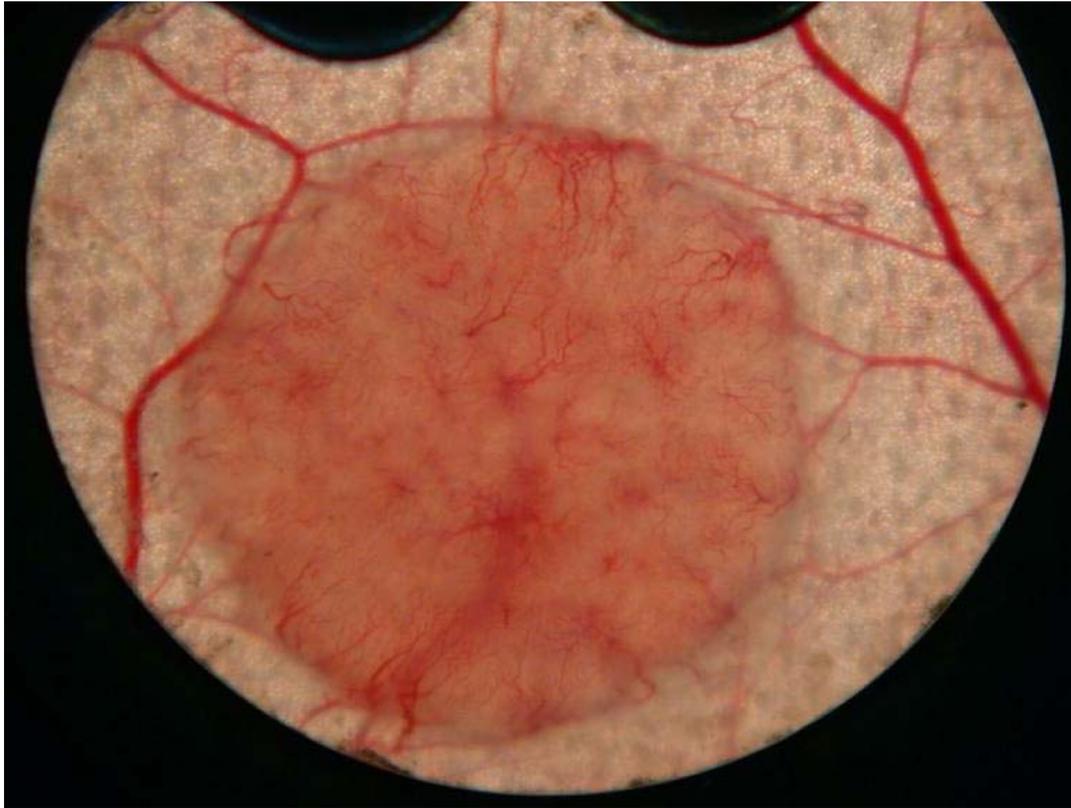


Abbildung 7: Das Foto zeigt eine videomakroskopische Aufnahme der transparenten Rückenhautkammer mit Tumor, die den Anforderungen einer intakten Mikrozirkulation genügt. Man sieht durch das Deckglas auf das subkutane Gewebe mit implantiertem A-Mel-3 Tumor der Hamsterrückenhaut. Bei den durchziehenden Gefäßen erkennt man Arterien und Venen. Es finden sich innerhalb der Präparation keine Anzeichen einer Entzündung. Der Durchmesser des Beobachtungsfensters beträgt etwa 11mm.

Nach Abschluß der chirurgischen Präparation wurde die kontralaterale Kammerhälfte aufgesetzt und mit drei Muttern an den drei Schrauben der gegenüberliegenden Platte befestigt. Der Abstand der beiden Platten voneinander betrug 450 µm und wurde durch entsprechende Unterlegscheiben als Platzhalter gewährleistet. Die subkutane Schicht der Gegenseite schmiegte sich durch Adhäsionskräfte an das Sichtfenster an. Die Hautfalte wurde durch weitere vier Haltefäden (Ethibond, 5-0, Fa. Ethikon, Norderstedt) in den vorgesehenen Bohrungen am Kammerrand fixiert. Das Fenster der Kammer war mit einem sterilen Deckglas (ø 11,7 mm, Fa. Menzel, Braunschweig) und einem Sprengring verschlossen. Dadurch konnten die anliegenden Gefäße des Musculus cutaneus maximus ständig makroskopisch als auch mikroskopisch beobachtet werden.

2.4 Tumoren

Als Tumormodell diente das am Walter Brendel Zentrum München als Zelllinie kultivierte amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3 (Fortner JG 1961). Für alle Versuche wurden Tumorzellen der Kulturpassagen 20 verwendet, um gut vergleichbare Tumoren zu erhalten. Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden die Tumorzellen des A-Mel-3 dazu in einer kontinuierlich laufender Zellkultur gehalten, um jeweils alle drei Tage „geerntet“ werden zu können.

2.4.1 Kultur der Tumorzellen

Für Kultur- und Einfriermedium wurde einem Liter Waschmedium (RPMI (PAN Biotech, Aichenbach)) 10 ml einer 1%-igen Lösung von Penicillin und Streptomycin zugesetzt, entsprechend 10^5 I.E. Penicillin und 10^5 I.E. Streptomycin (beide Biochrom KG, Berlin). Dem Kulturmedium wurden weiterhin 10% fetales Kälberserum (FKS; GIBCO-BRL, Eggenstein) zugegeben, dem Einfriermedium 20% FKS und 20% Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva, Heidelberg).

Zur Passage in vitro wurden die Zellen in Kulturmedium suspendiert und in Zellkulturflaschen (Cellstar, Frickenhausen) ausgesät. In einem Brutschrank (CO₂-Auto-Zero Typ B 5061 EK-02; Heraeus, Hanau) wurden sie bei 37° C, 90% Luftfeuchtigkeit und mit 5% CO₂-angereicherter Luft gezüchtet. Durch Ablösen mit Trypsin-EDTA (Boehringer, Mannheim) konnten die Zellen alle drei Tage geerntet werden und entweder eingefroren, weiter gezüchtet oder entsprechend dem in 2.4.3. beschriebenen Vorgehen für den Versuch implantiert werden.

2.4.2 Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation

Die bebrüteten Zellkulturschalen wurden zunächst unter dem Mikroskop hinsichtlich der Dichte des Zellrasens beurteilt. Drei Tage nach dem Aussäen bildeten die Zellen in der Regel einen dichten Zellrasen, so dass sie geerntet werden konnten. Das Kulturmedium wurde zunächst abgegossen. Pro benötigte Zellkulturschale wurden zum Ablösen der Zellen jeweils 10 ml Trypsin-EDTA (Boehringer, Mannheim) in die Schalen gegeben. Nach einer kurzen Inkubationszeit von fünf Minuten wurden 15 ml RPMI zugegeben und nun der gesamte Inhalt der Schale in ein Zentrifugenröhrchen

pipettiert. Nach Zentrifugation mit 450 G wurde der Überstand abgegossen und das Röhrchen erneut mit RPMI aufgefüllt, die Zellen darin suspendiert und anschließend wieder zentrifugiert. Diese Prozedur wurde dreimal durchgeführt. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und die verbleibende Zellsuspension mit einer 1 ml Tuberkulinspritze aspiriert.

2.4.3 Implantation der Tumorzellen in die Rückenhautkammer

Am zweiten Tag nach der Präparation der Rückenhautkammer wurden die Tiere in Plexiglasröhren immobilisiert und auf einem Plastiktisch fixiert. Sprengring und Deckglas wurden nach vorhergehender Befeuchtung des Areal entfernt. In das zentral gelegene Areal der Kammerpräparation wurde ein Mikroliter (ca. $2-5 \times 10^5$ Tumorzellen) der Tumorzell-Suspension aufgebracht. Anschließend wurde das Fenster mit einem neuen, sterilen Deckglas und dem Sprengring verschlossen. Danach wurde das Tier in einem Intensivpflege-Inkubator (Modell 7510; Dräger-Werk AG; Lübeck) untergebracht um die Anwachsrate der Tumoren zu erhöhen und möglichst stabile Umweltbedingungen für Tier und Tumor zu gewährleisten.

2.5 Implantation von Verweilkathetern

Zwei Tage vor dem Meßzeitpunkt wurden die Tiere narkotisiert (siehe 2.2) und die rechte Regio jugularis mit der Vena jugularis interna chirurgisch dargestellt. Unter dem Operationsmikroskop wurde ein mit Kochsalz gefüllter, 20 cm langer Polyethylenkatheter (0,28mm ID, 0,61mm OD; SIMS Portex, U.K.) in die rechte Vena jugularis eingeführt und ca. 10 mm bis kurz vor das rechte Herz vorgeschoben. Der Katheter wurde mit Seide (Perma-Handseide 6-0; Ethicon GmbH Norderstedt) an der Vena jugularis fixiert und an das subkutane Gewebe angenäht. Die Ausleitung des Katheters über einen subkutanen Hauttunnel in den Rücken der Tiere gewährleistete einen langfristigen Schutz vor mechanischer Manipulation und Entzündungen. Vor dem Erwachen der Tiere und nach einzelnen Versuchsvorgängen wurden die Katheter am distalen Ende verknotet und an der Rückenhautkammer mit Leukosilk fixiert, wodurch die Tiere an einer Entfernung des Katheters gehindert waren.

2.6 Wiegen der Tiere

Die Tiere wurden auf einer Kleintierwaage (Mettler, Schweiz) vor jedem Eingriff oder Versuch gewogen.

2.7 Aufbau und Versuchsdurchführung des Optical Imaging sowie des Phosphorescence Quenchings

Ziel war es eine annähernd zeitgleiche sowie ortskonstante Messung durchzuführen. In diesem Sinne wurde ein Versuchsaufbau realisiert, der es gestattet, sowohl die mikrohämodynamischen Parameter als auch die Sauerstoffkonzentration im Tumorgewebe zu quantifizieren. Einen Überblick erlaubt Abbildung 8. Man kann bei dem Versuchsaufbau zwei große Messeinheiten unterscheiden. Zum einen zur Messung des Sauerstoffpartialdruckes zum anderen zur Messung der Mikrozirkulationsparameter. Beide Systeme können durch Umlenkung des Strahlenganges mit Hilfe eines Teilerspiegels eingesetzt werden. Der Teilerspiegel im System erlaubt lediglich die Umlenkung des Strahlengangs auf nur ein optisches Aufnahmesystem. Zudem macht die Intensität der Beleuchtung, die zum optical imaging benötigt wird, eine synchrone Messung des Phosphorescence Quenching

unmöglich. Kurz aufeinander folgende Messungen sind also nötig. Um hier Ortskonstanz zu garantieren wurden mit dem computergesteuerten XY-Schrittisch (Märzhäuser MT mot 200 x 100) die zu untersuchenden Regionen abgefahren und die Koordinaten abgespeichert.

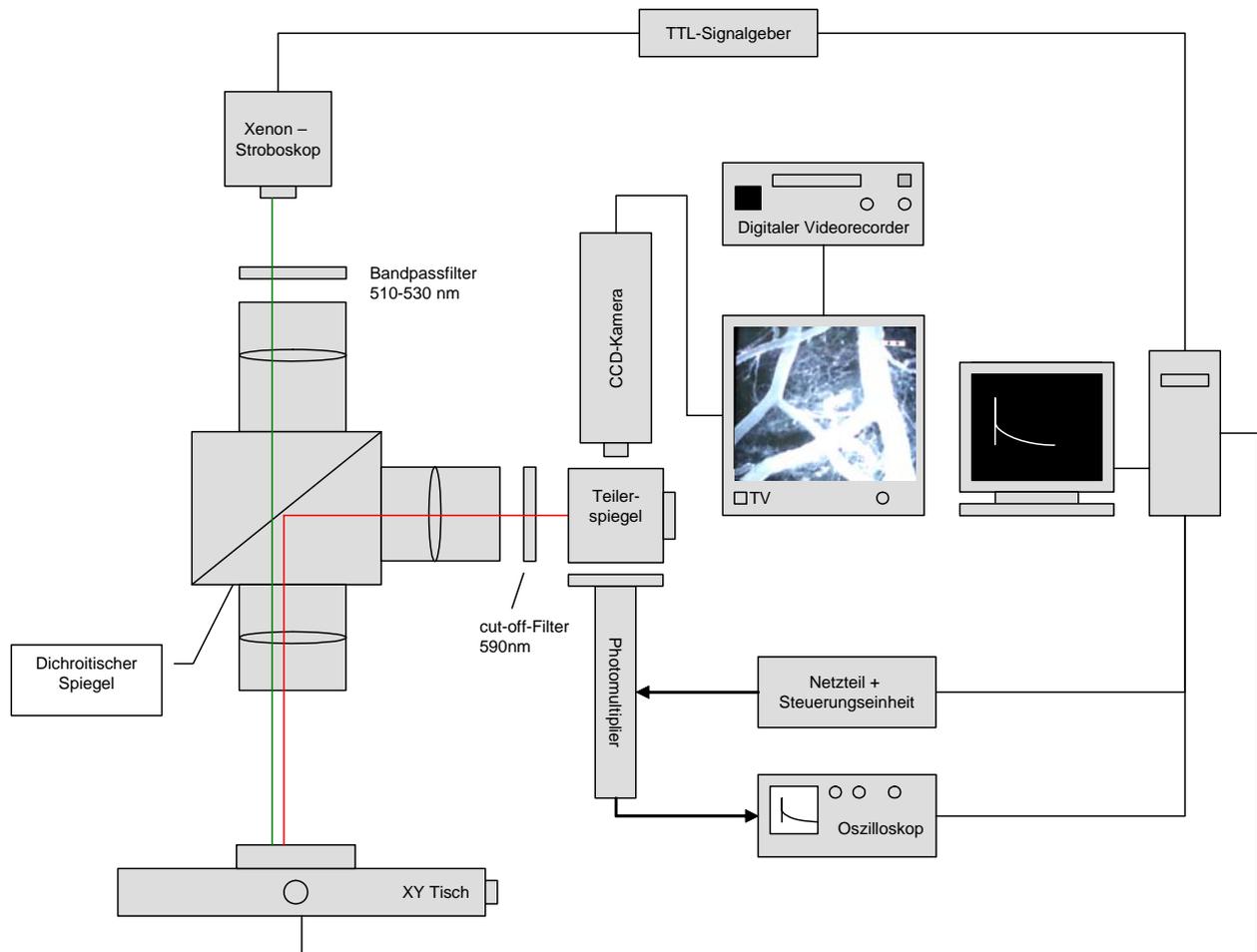


Abbildung 8: Aufbau des Optical Imaging sowie des Phosphorescence Quenchings

Schematischer Aufbau zur Messung der Sauerstoffkonzentration sowie der hämodynamischen Parameter.

Im gleichen Schritt wurden über einen Zeitraum von etwa dreißig Sekunden die Gefäßdichte, die Gefäßdurchmesser, die Fließgeschwindigkeit und der Blutvolumenfluss, also die Mikrozirkulationsparameter der einzelnen ROIs (Region Of Interest) über eine CCD-Kamera (C2400-08, Hamamatsu, Herrsching) und einen digitalen Videorecorder (Sony Digital Videokassette Recorder DSR-45P) aufgenommen und konnten so zu einem späteren Zeitpunkt ausgewertet werden (siehe 2.8.1). Danach konnten die ROIs erneut aufgesucht und nach intravenöser Gabe des Palladiumporphyrins die Sauerstoffkonzentrationen ermittelt werden. Zur Anregung des injizierten Palladiumporphyrins wurde die zuvor ausgewählte Region

mit einem Xenon Stroboskop (Perkin Elmer X-Strobe X 1200) bestrahlt. Um die einfallende Streustrahlung zu minimieren, wurde ein Bandpassfilter (510-530nm) vorgeschaltet. Das durchgelassene Spektrum entspricht dem Absorptionsmaximum des Palladiumporphyrins und befindet sich im Detektionsbereich des Photomultipliers

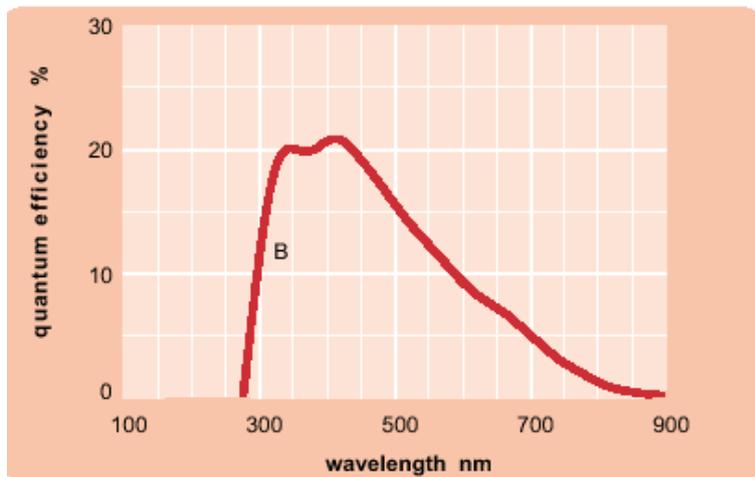


Abbildung 9: Absorptionspektrum des Photomultipliers P30A-11

(Elektrontubes P30A-11). Die Frequenz der Lichtblitze des Stroboskops kann softwaregesteuert in einem Bereich zwischen 5 – 45Hz variiert werden. Für unsere Versuche wurde stets eine Frequenz von 30Hz gewählt. Das nötige TTL-Signal zum Triggern des Stroboskopes wird im Computer mit einer Messkarte (National Instruments PCI-6014) und einem DA - Wandler (Geitmann Messtechnik SICONN MC) erzeugt. Nach Passage des dichroitischen Spiegels im Mikroskop (Zeiss Axio Tek vario mit Leitz Objektiv 20x) trifft das Licht auf die fokussierte Fläche der Probe. Das dort entstandene Phosphoreszenzsignal wird daraufhin nach erneuter Passage eines Cut-Off-Filters (590nm) im Photomultiplier verstärkt und an ein Speicheroszilloskop (Tektronix TDS 1012) weitergegeben. Hier können bis zu 128 einzelne Phosphoreszenzkurven gemittelt und im Anschluss an den Computer übertragen werden. Dort müssen die Einzelwerte die aufgetragen einer exponentiell negativ steigenden Kurve entsprechen in eine Gleichung umgewandelt werden, aus der man die Phosphoreszenzdauer entnehmen kann.

Dazu wird der Marquardt-Levenberg least squares fit verwendet (Sigma Plot, SPSS Inc.)

$$I_{(t)} = I_{(0)} \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B$$

Zur weiteren Berechnung kann definitionsgemäß die Lifetime $\tau = I_{(0)} \cdot \frac{1}{e}$ in die Gleichung eingesetzt werden.

$$I_{(0)} \cdot \frac{1}{e} = I_{(0)} \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B$$

$$t = \log^{e^{-\alpha}} \frac{\frac{I_{(0)}}{e} - B}{I_{(0)}}$$

Wird nach dem gesuchten t aufgelöst, erhalten wir den Wert der in die Stern-Volmer-Gleichung zur Berechnung des pO₂ für das jeweilige Areal eingesetzt werden muss.

2.7.1 Erhebung und Auswertung der mikrohämodynamischen Parameter

Um mikrohämodynamische Parameter zu erheben, wurden die, wie im Punkt zuvor beschrieben gewonnenen Videosequenzen, off-line ausgewertet. Dazu verwendeten wir ein bereits seit längerer Zeit am Institut verwendetes und bewährtes System. Hierbei handelt es sich um das Programm CapImage 6.01 (Dr. Zeintl) (Klyscz T 1997), welches es dem Benutzer ermöglicht sowohl die funktionelle Gefäßdichte in cm/cm², die Erythrozytenfließgeschwindigkeit in mm/s, den durchschnittlichen Gefäßdurchmesser in µm zu messen. Der Blutvolumenfluss wird indirekt über spezielle Umrechnungen (Baker M et Wayland H 1974; Lipowsky HH et Zweifach BW 1978) ermittelt.

2.7.2 Steuerung und Stromversorgung des Photomultipliers

Der Photomultiplier P30A-11 von Elektrontubes wurde ohne Netzteil oder Steuerungseinheit geliefert und musste zusätzlich mit folgenden Komponenten ausgestattet werden.

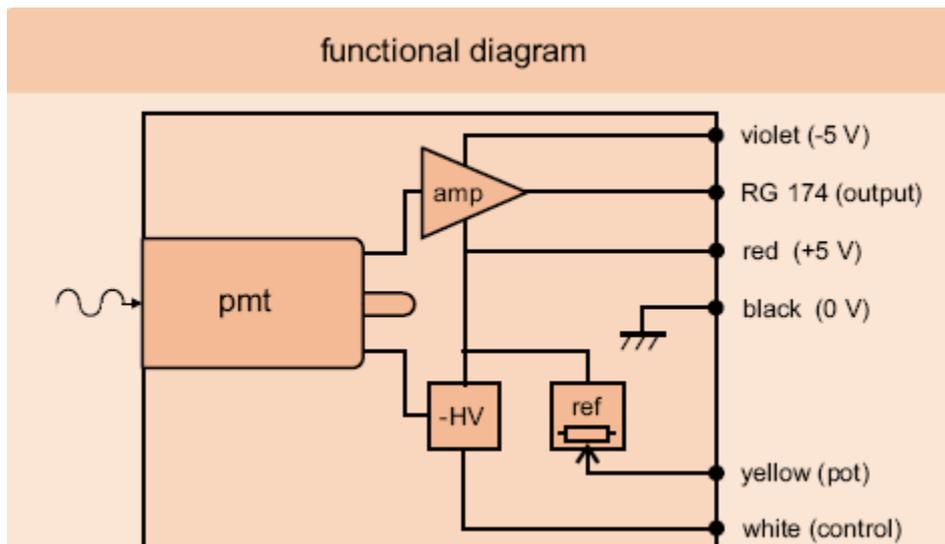


Abbildung 10: Funktionsdiagramm des Photomultipliers P30A-11

Zum einen musste ein Gleichstrom von +/- fünf Volt und eine Nullleitung bereitgestellt werden, die zur Stromversorgung benötigt wird. Außerdem verfügt der Photomultiplier über eine Sensitivitätseinstellung (gain control), die jedoch im Lieferzustand lediglich direkt über eine kleine Versenkschraube am hinteren Teil des Gerätes verstellt werden kann. Durch das Anlegen einer Regelspannung zwischen 0,3 – 1,8 Volt kann diese Sensitivitätseinstellung aber auch extern geregelt werden. Nachdem das Gerät fest an das Mikroskopgehäuse angebaut wurde, erschien es sinnvoll letztere der beiden Möglichkeiten zu verwirklichen. Aus Kostengründen und wegen der geringen technischen Anforderungen an das Netzteil wurde dieses mit zwei Bausätzen der Firma Conrad (Artikel-Nr.: 116661 – 49) gefertigt. Zur korrekten Versorgung des Photomultipliers müssen die beiden Geräte auf fünf Volt eingestellt und danach beide Minuspole durchgeschliffen werden. Der Nullleiter wurde direkt mit dem Nullleiter des Netzstromes im Labor und dem Gehäuse des Netzteils verbunden.

Die Sensitivitätskontrolle konnte direkt über die Messkarte (National Instruments PCI-6014) und den Messverstärker (Geitmann Messtechnik SICONN MC) mit ausreichender Spannung versorgt und somit gesteuert werden. Die Regelung erfolgt softwaregesteuert über DaisyLab 8 (National Instruments Ireland Resources Limited) (siehe 2.7.4).

2.7.3 Steuerung des Stroboskops

Auch das Xenon Stroboskop (Perkin Elmer; X-Strobe X1200) wurde ohne Steuerungseinheit geliefert. Um eine möglichst einfache Regelung zu gewährleisten wurde sie in die Steuerungssoftware des Photomultipliers implementiert. Hier kann über verschiedene Buttons die gewünschte Blitzfrequenz eingestellt werden (siehe 2.7.4). Zum Triggern der Blitzfrequenz benötigt das X-Strobe ein +5 V TTL Puls mit 20 mA und einer Pulslänge von 10 – 100 μ sec. Diese Spezifikationen wurden mit der Messkarte (National Instruments PCI-6014) und einem DA Wandler (Geitmann Messtechnik SICONN MC) erreicht. Die Übertragung an das Gerät selbst erfolgte über eine Serielle-Schnittstelle an der Rückseite des Stroboskops.

2.7.4 Steuerungssoftware

Wie in den letzten Absätzen bereits erwähnt, wurde zur Steuerung der Geräte die Software Daisy Lab 8 (National Instruments, Ireland Resources Limited) verwendet. Es handelt sich hierbei um ein Computerprogramm, das mittels einer graphischen Benutzeroberfläche ermöglicht, einfache Regelmechanismen oder Auswerteeinheiten selbst zu programmieren und zu bearbeiten. Von der Software werden verschiedene Bauteile zur Verfügung gestellt, die dann je nach Aufgabenbereich vom Benutzer zusammengestellt werden können. Mit einer kompatiblen Messkarte lassen sich diese Schaltbilder an die Hardware übertragen. In unserem Fall sollten hiermit zwei Funktionen erfüllt werden. Zum einen wurde die Frequenz zur Stroboskoptriggung über einen Funktionsgenerator mit vorgeschaltetem Positionsschalter mit fünf Positionen (10Hz, 20Hz, 30Hz, 40Hz, Aus) realisiert, zum anderen wurde die Empfindlichkeit der Photomultipliers über einen Voltregler zwischen 0,3Volt und 1,8Volt gesteuert.

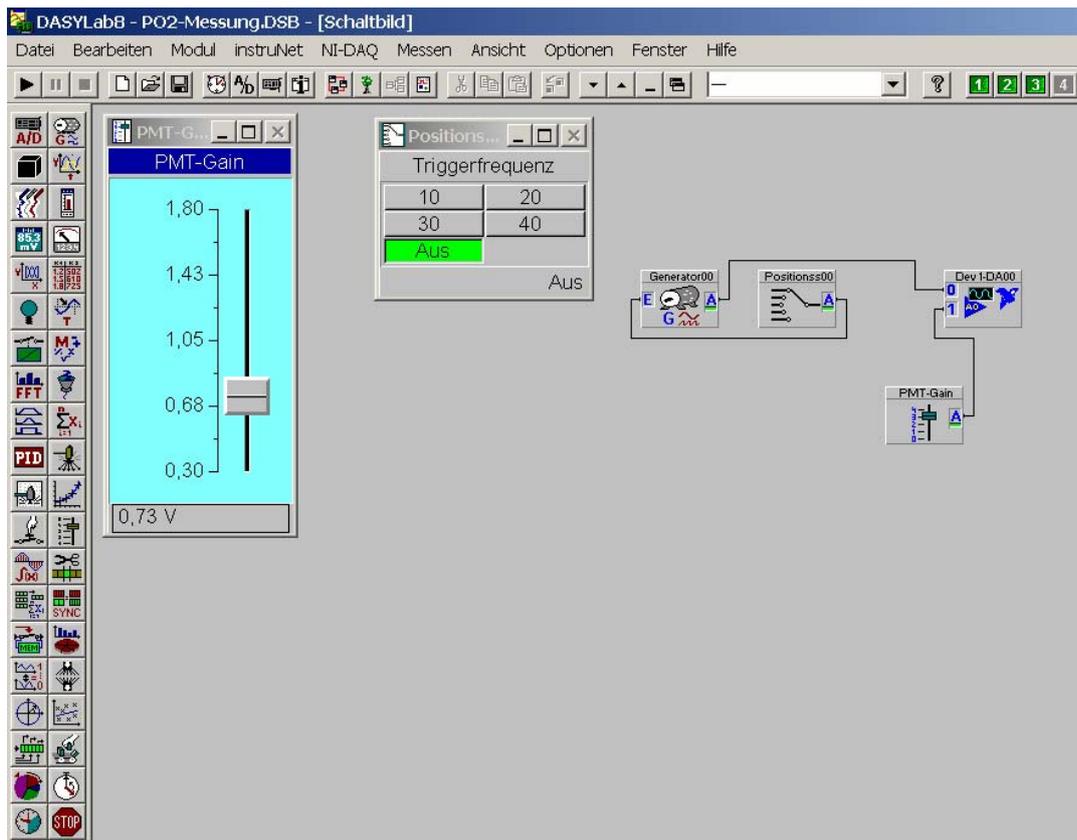


Abbildung 11: Screenshot aus der Steuerungssoftware DaisyLab 8.0

Über die in den Computer eingebaute kompatible Messkarte (National Instruments PCI-6014) wurden die Steuerungsimpulse an die Endgeräte weitergegeben.

2.7.5 Aquisitionsoftware

Zur Berechnung des Sauerstoffpartialdruckes müssen die Daten auf den Computer übertragen und im Anschluss die unter 2.1.4 vorgestellten Berechnungen durchgeführt werden. Dazu werden die Daten aus dem Speicheroszilloskop (TDS 1012) über die Messkarte (National Instruments PCI-6014) mit Hilfe einer speziellen Software (Tektronix OpenChoice Software Release Notes TekVISA V2.01) an Excel (Microsoft Office 2003) übertragen und dort in eine selbst erstellte Schablone eingefügt. Nun können die zur Berechnung notwendigen Datensätze mit programmierten Makros markiert, kopiert und an SigmaPlot 9.0 (SPSS Inc.) übertragen werden. Anschließend erfolgt die Berechnung des pO_2 Wertes wie unter 2.1.4 beschrieben.

2.7.6 Validierung des Messsystems

Validiert wurde das Messsystem zum einen über den simultanen Vergleich mit einem Blutgasanalysegerät (Chiron Diagnostics 860) zum anderen über den mit einer polarographischen Sonde der Firma Licox (pO₂ Integra Licox cmp). Bei ersterem wurde menschliches Vollblut auf 38°C temperiert und in einem 20ml Gefäß mit Sauerstoff oder Stickstoff unterschiedlich lange begast, danach wurden aus dieser Probe zeitgleich zwei Glaskapillaren befüllt und mit Knetmasse abgedichtet. Im Anschluss daran wurde der Sauerstoffpartialdruck der einen Probe mit unserem Messsystem, der der anderen mit dem Blutgasanalysegerät gemessen. Die Temperatur der Probe wurde vorher mit einem Thermometer gemessen. Diese wurde bei den Messungen berücksichtigt. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt.

Zum Vergleich des Phosphoreszenz Quenching mit der polarographischen Sauerstoffpartialdruckmessung (pO₂ Integra Licox cmp) wurde im Eigenbau ein abgeschlossenes System hergestellt. Dazu wurde ein Glaszylinder (r= 2cm, h=3cm), gefüllt mit NaCl und Palladiumporphyrin ([0,01 mg/ml]), mit einem kleinen Rührfisch auf einen beheizbaren Magnetrührer gestellt. So konnte das Gefäß samt Inhalt bis zur gewünschten Temperatur aufgeheizt werden. Ein Thermometer mit Fühlsensor war zum Überprüfen der Temperatur die ganze Zeit in das Gefäß eingetaucht. Der nach oben hin offene Zylinder wurde mit einem Objekträger luftdicht abgeschlossen. Als Dichtung der Fugen wurde handelsübliche Knetmasse verwendet. In die Knetmasse wurden der Thermometerfühler sowie eine Spritzenkanüle eingelassen. Mithilfe der Kanüle war es möglich Substanzen in das Versuchsbehältnis zu applizieren. Der beim Einspritzen entstehende Druck konnte über eine weitere Kanüle entweichen. So wurde ein temperiertes, luftdichtes System mit optischem Fenster und Injektionsmöglichkeit geschaffen. Um den Sauerstoffpartialdruck im System zu verändern wurden die Proben mit reinem Sauerstoff begast. Anschließend wurde Glukose und Enzyme, die diese unter Sauerstoffverbrauch umsetzen, zugesetzt (nach Dellian M 1997; β-Glucose (0.3%), Glucoseoxidase 75µg/ml, Catalase 12,5 µg/ml (Sigma)). So konnten mit zeitlich versetzten Messungen und entsprechend niedrigen Dosierungen der Enzyme abfallende Sauerstoffpartialdruckkurven zeitsynchron gemessen werden.

2.7.7 Versuchsprotokoll zur Messung der Mikrozirkulation

Zielsetzung der Versuche war es, den Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe mit verschiedenen Mikrozirkulationsparametern zu korrelieren. Dazu wurden wie bereits beschrieben Tumorzellen in die Rückenhaut männlicher syrischer Goldhamster implantiert und die sich entwickelten Gefäßstrukturen und deren Mikrohämodynamik untersucht. Die Implantation entsprach im Protokoll dem Tag null, zwei Tage vorher war die Kammerimplantation erfolgt. Jeweils einen Tag vor der Untersuchung wurde wie unter 2.4.3 ein Zentralvenöser Katheter implantiert. Über diesen intravenösen Zugang wurde sowohl der für die Videoaufnahmen benötigte Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiozyanat-Dextran (FITC-Dextran; Sigma, Deisenhofen 500 kD, 0,05-0,1 ml einer 5% Lösung in 0,9% NaCl), als auch das zur Sauerstoffmessung benötigte Palladiumporphyrin (15 mg/kg Körpergewicht) injiziert. Untersucht wurden zwei verschiedene Gruppen mit je sieben Tieren zu zwei Zeitpunkten. Die erste Gruppe wurde am Tag fünf (D5) die zweite am Tag acht (D8) nach Tumorimplantation gemessen.

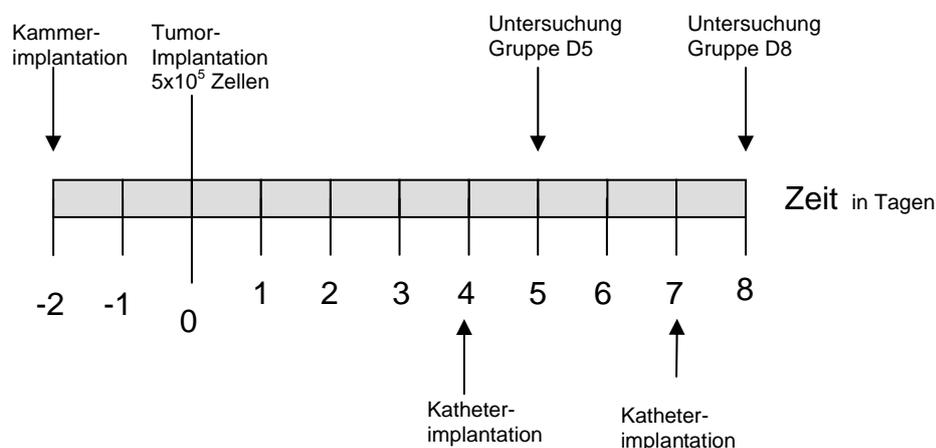


Abbildung 12: Experimentelles Protokoll zur Korrelation zwischen Sauerstoffpartialdruck und Mikrozirkulationsparametern. Mittels Intravitalmikroskopie und Phosphoreszenz Quenching wurden die beiden Gruppen entweder am Tag 5 oder am Tag 8 auf Mikrozirkulation und Sauerstoffpartialdruck untersucht. Am Vortag (d4, d7) wurde jeweils der Jugulariskatheter implantiert.

Dabei wurde das Untersuchungsgebiet jeweils untergliedert in zentrale und periphere Bereiche, in denen je fünf Einzelmessungen stattfanden. Nach Injektion des

Fluoreszenzfarbstoffes wurden alle zehn (5 zentrale, 5 periphere) Areale untergliedert und deren Position gespeichert. Zudem wurden die mikrohämodynamischen Parameter als Videosequenz gespeichert. Anschließend wurde nach Gabe des Palladiumporphyrins erneut die gespeicherten Regionen aufgesucht und der Sauerstoffpartialdruck in diesen Bereichen gemessen.

2.8 Datenverarbeitung und Statistik

Die Parameter der Tumorzirkulation wurden mittels digitalem Bildverarbeitungssystem (Cap-Image) quantifiziert und interaktiv in Datenblätter des Tabellenkalkulationsprogramms MS-Excel (Microsoft Corporation, Redmond) übertragen. Die wie in Abschnitt 2.1.4 berechneten Sauerstoffpartialdrücke wurden ebenfalls in entsprechende Excel-Tabellen übertragen. Zur graphischen Darstellung wurde das Computerprogramm Sigmaplot (SPSS Inc.) verwendet.

Die statistische Auswertung der gemessenen und berechneten Parameter erfolgte am Personalcomputer mittels des Statistikprogrammes Sigmastat (SPSS Inc.). Aufgrund der geringen Fallzahl pro Versuchsgruppe wurde auf die Annahme bzw. Überprüfung einer zugrunde liegenden Normalverteilung verzichtet und ausschließlich nicht parametrische Tests verwendet.

Gruppenunterschiede wurden mittels Mann-Whitney Rank Sum Test auf statistische Unterschiede getestet. Innerhalb einer Gruppe erfolgte der statistische Vergleich von gemessenen Parametern mittels Wilcoxon-Signed Rank Test. Eine mögliche Korrelation zwischen Sauerstoffpartialdruck und Parametern der Tumorzirkulation wurde mittels Korrelationstest nach Spearman auf Signifikanz überprüft.

Signifikanz wurde jeweils bei einer Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art unter 5% angenommen ($p < 0,05$). Falls nicht anders angegeben, sind alle Werte als Mittelwert \pm SEM angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Validierung des Messsystems

3.1.1 Korrelation mit einem Blutgasanalysegerät

Hierzu wurde humanes Vollblut gewonnen, auf 38°C temperiert, mit Palladiumporphyrin versetzt und mit Sauerstoff bzw. Stickstoff äquilibriert. Nach einer gewissen Zeit wurden zeitgleich zwei Proben aus dem Gefäß entnommen verschlossen, und sowohl mit dem Blutgasanalysegerät (Chiron Diagnostics 860) als auch mit unserem Setup gemessen. Abbildung 13 zeigt die Messergebnisse des Sauerstoffpartialdruckes in humanem Vollblut. Auf der X-Achse sind die Ergebnisse mittels Phosphoreszenz Quenching, auf der Y-Achse die Ergebnisse des Blutgasanalysegerätes aufgetragen. Zwischen beiden Messverfahren besteht eine signifikante Korrelation ($r^2 = 0,99$, $p < 0,001$).

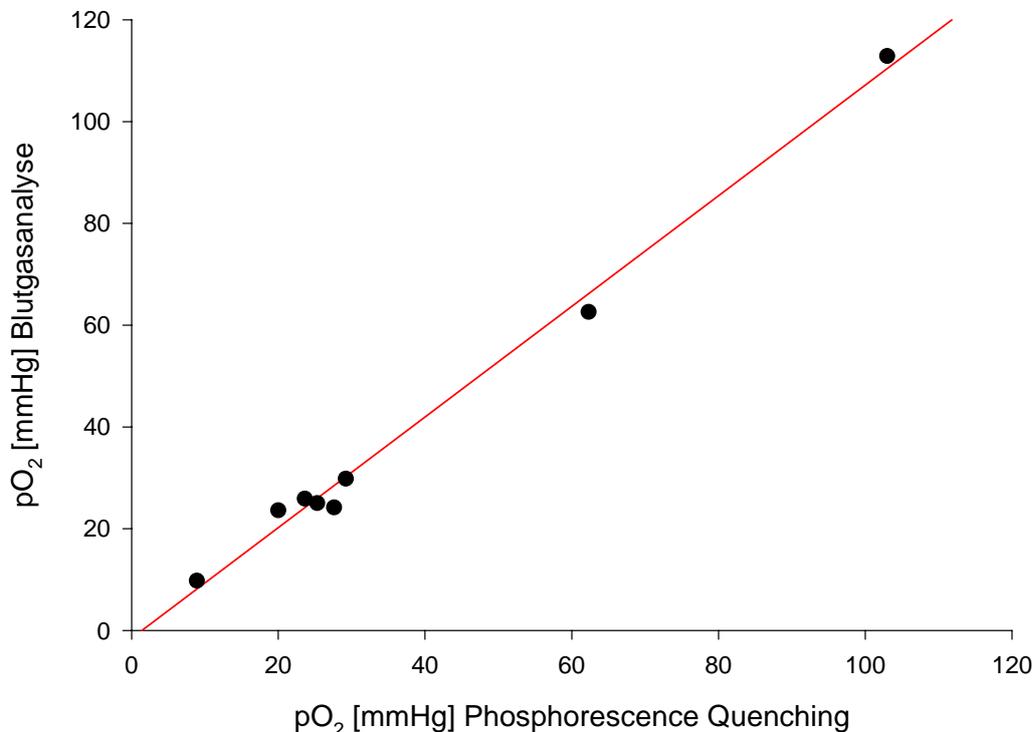


Abbildung 13: Vergleichende Messung des Sauerstoffpartialdruckes in humanem Vollblut mehrerer Probenpärchen nach identischer Begasungszeit ($r^2=0,99$).

3.1.2 Zeitsynchrone vergleichende Messung mit einer polarographischen Sonde

Um eine zeitgleiche Messung zu ermöglichen und den Sauerstoffpartialdruck im identischen Medium zu messen, wurden in dem unter 2.7 beschriebenen Setup vergleichende Messungen durchgeführt. Ein großer Vorteil dieser Versuche war der direkte Vergleich ein und desselben Mediums. Hier handelte es sich um physiologische Natriumchloridlösung nach Zusatz des Palladiumporphyrins. Im Anschluss an die Zugabe der Enzyme konnten immer wieder Messungen zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt werden. Dabei findet man in folgenden Diagrammen die kumulativen Ergebnisse von drei hintereinander durchgeführten Messreihen. Deutlich ist die gute Korrelation besonders in den Bereichen mit niedrigeren Sauerstoffpartialdrücken zu erkennen. Statistisch ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang. ($r^2 = 0,99$ $p < 0,0001$)

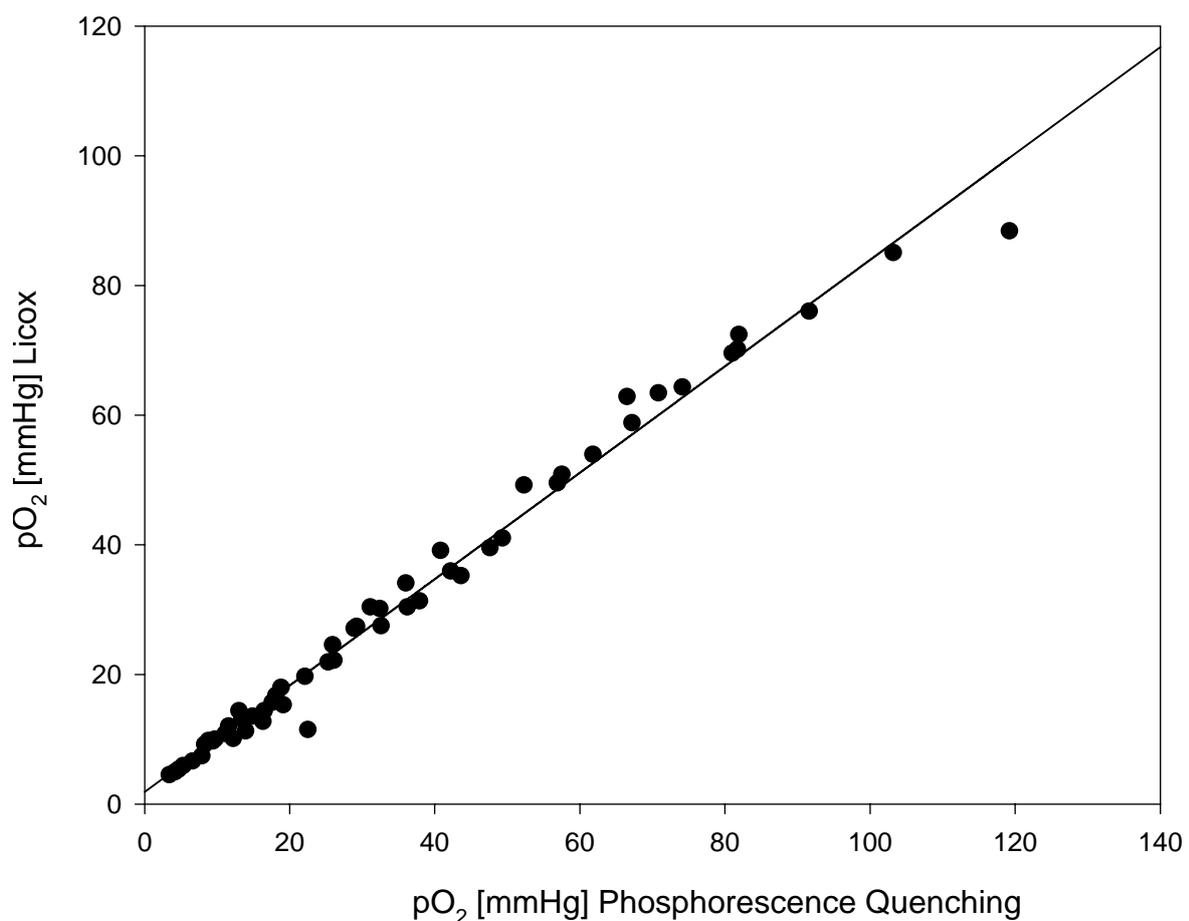


Abbildung 14: Vergleichende Messung des Sauerstoffpartialdrucks mittels Phosphorescence Quenching und einer polarographischen Sonde (Licox) mit jeweils 55 Messpunkten. Die Werte sind gegeneinander aufgetragen. ($r^2 = 0,99$)

3.2 Vorversuche im Gewebe

3.2.1 Messung im Tumorgewebe ohne Injektion von Palladiumporphyrin

Nach Validierung des Messsystems wurden zur Unterscheidung eines Phosphoreszenzsignals und entstandener Streustrahlung zuerst einige Messreihen ohne die Zugabe von Palladiumporphyrin durchgeführt. Mit den eingebauten Bandpass- und cut-off Filtern wurde versucht diese Streustrahlen möglichst klein zu halten. Wie in der Abbildung 15 zu sehen ist, ist dennoch ein deutlicher Anstieg der Lichtintensität zu beobachten.

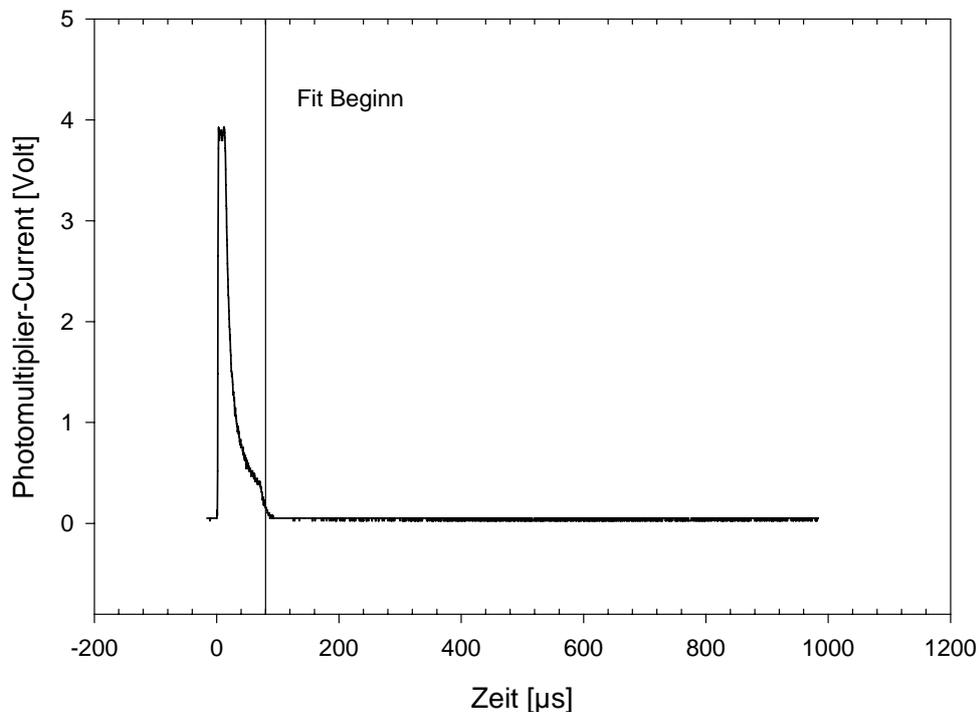


Abbildung 15: Messung der Phosphoreszenz/Fluoreszenz im Tumorgewebe ohne die Injektion von Palladiumporphyrin nach Anregung mit dem Lichtblitz des Stroboskops. (Photomultiplier-Current entspricht der Lichtintensität)

Dieser Anstieg entspricht der Autofluoreszenz des Gewebes. Allerdings ist zu beachten, dass die Dauer dieses Intensitätsanstieges nur im Bereich von etwa 50 µs liegt. Nachdem sich die Berechnung der Phosphoreszenzdauer und somit der Sauerstoffpartialdruck aus einer abfallenden logarithmischen Kurve errechnet, die

zwischen 100 μ s und 650 μ s lang ist, kann mit einem Anpassen des Fit – Bereiches hinter die 100 μ s ein Ausblenden der Streustrahlung aus dem Berechnungsfenster erreicht werden.

3.2.2 Konzentrationsfindung

Obwohl in jeglicher Literatur, in der das Phosphoreszenz Quenching zur Messung des Sauerstoffpartialdrucks eine Dosisangabe des injizierten Palladiumporphyrins zu finden ist und die Messungen wie bereits beschrieben dosisunabhängig sind, wollten wir für unser Setup die geeignete Dosis finden (z.B. Torres de Filho IP et Intaglietta M 1993; Sinaasappel M et Ince C 1996). Dabei war unsere Zielsetzung folgende: Es sollte so wenig Farbstoff wie möglich injiziert werden, um die Tiere so gut wie möglich vor Toxizität und Nebenwirkungen zu schützen. Dennoch musste die verabreichte Menge selbstverständlich ausreichen um im Photomultiplier ein gut verwertbares Signal zu erzeugen. In mehreren Versuchsreihen wurden unterschiedliche Konzentrationen getestet. Dabei wurden auch in vivo und im Tumorgewebe gearbeitet, um so möglichst nahe an den später folgenden Versuchen zu liegen. Zu beachten ist natürlich, dass die Empfindlichkeit des Photomultipliers verändert werden kann. So kann mit einer höheren Empfindlichkeit eine geringere Dosis möglich gemacht werden. Allerdings kann dies nicht beliebig weit getrieben werden, da sich mit einer steigenden Empfindlichkeit des Gerätes auch das Signal/Rauschverhältnis verschlechtert. Treibt man die Detektionsempfindlichkeit auf die Spitze, wird fast jegliches Signal übersteuert, man erhält ein einziges Störsignal. Auch wenn man diese Streustrahlen aus der Gleichung herausrechnen kann, ist ein gewisses Maß an Trennschärfe unabdingbar. Als sinnvoll stellte sich eine mittlere Empfindlichkeitsstufe (Gain) (0,73 Volt) bei moderater Palladiumporphyrindosis (15 mg/kg Körpergewicht in vivo / 0,01 mg/ml in vitro) heraus.

3.2.3 Messungen in vivo: Normoxie, temporäre Hyperoxie, Hypoxie.

Nachdem es uns in mehreren Versuchen in vitro gelungen ist, Sauerstoffpartialdruckänderungen, die mit Begasung oder Zugabe von Enzymen herbeigeführt wurden, mit Hilfe des Sauerstoff Quenchings zu messen, folgten die

ersten in vivo Versuche. Dazu wurden einem männlichen syrischen Goldhamster eine Rückenhautkammer sowie ein Jugulariskatheter implantiert (siehe 2). Um Änderungen im Bereich des Sauerstoffpartialdrucks zu erzeugen wurde das Tier mit unterschiedlich sauerstoffhaltigem Atemgas beatmet. Messungen wurden unter Normoxie, Hyperoxie und Hypoxie durchgeführt. Um einen möglichst zeitnahen Effekt zu erzielen wurde mit dem Mikroskop eine gut durchblutete etwa 20µm große Venole fokussiert. Wie in Abbildung 16 zu sehen, spiegeln sich die unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen im venösen Sauerstoffpartialdruck wieder. Dabei ändert sich der gemessene Partialdruck um 100%.

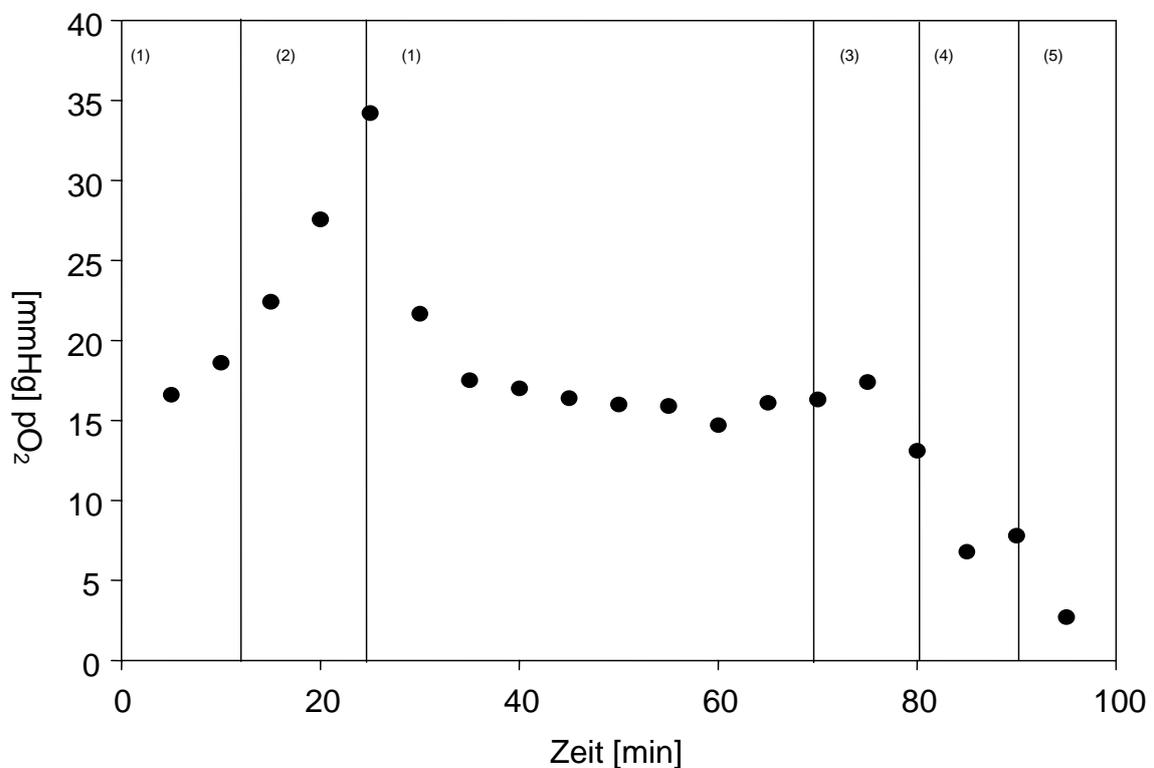


Abbildung 16: Messung des Sauerstoffpartialdrucks über einer etwa 20µm großen Venole in der Rückenhautkammer eines männlichen syrischen Goldhamsters. Über die Zeit ist der Sauerstoffpartialdruck in mmHg aufgetragen. In den einzelnen Abschnitten wurde das Tier mit (1) Raumluft 21% Sauerstoff, (2) 100% Sauerstoff, (3) 10% Sauerstoff, (4) 5% Sauerstoff, (5) 0% Sauerstoff beatmet.

3.3 Sauerstoffpartialdruck im A-Mel-3 Tumor

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Sauerstoffpartialdruckänderungen mit unserem Setup valide gemäß dem unter 2.7.7 dargestelltem Versuchsprotokoll gemessen werden können, wurde die Sauerstoffpartialdruckverteilung im Tumor in vivo ermittelt. In der unten stehenden Tabelle werden die Werte in der Gesamtheit beschrieben, das heißt ohne in periphere und zentrale Areale, oder Anwachsdauer (Tag 5 und Tag 8) zu untergliedern.

Sauerstoffpartialdruck im A-MEL-3 Tumor [mmHg]: Deskriptive Statistik gesamt	
Mittelwert	10,2
Standardfehler	1,3
Median	9,6
Minimum	1,4
Maximum	22,7
Skewness	0,4
Kurtosis	-0,9

Tabelle 1: Sauerstoffpartialdruckwerte im A-Mel-3 Tumor aus n=14 Tieren mit jeweils 10 ROIs

Dabei wurden ähnliche Werte gemessen (Tabelle 1), wie sie bereits in der Literatur beschrieben wurden (Endrich B 1982; Babilas P 2005). Um eine Verteilung der Daten zu veranschaulichen, wurden diese in einem Histogramm aufgetragen, welches die Sauerstoffpartialdrücke in unterschiedlichen Klassen darstellt.

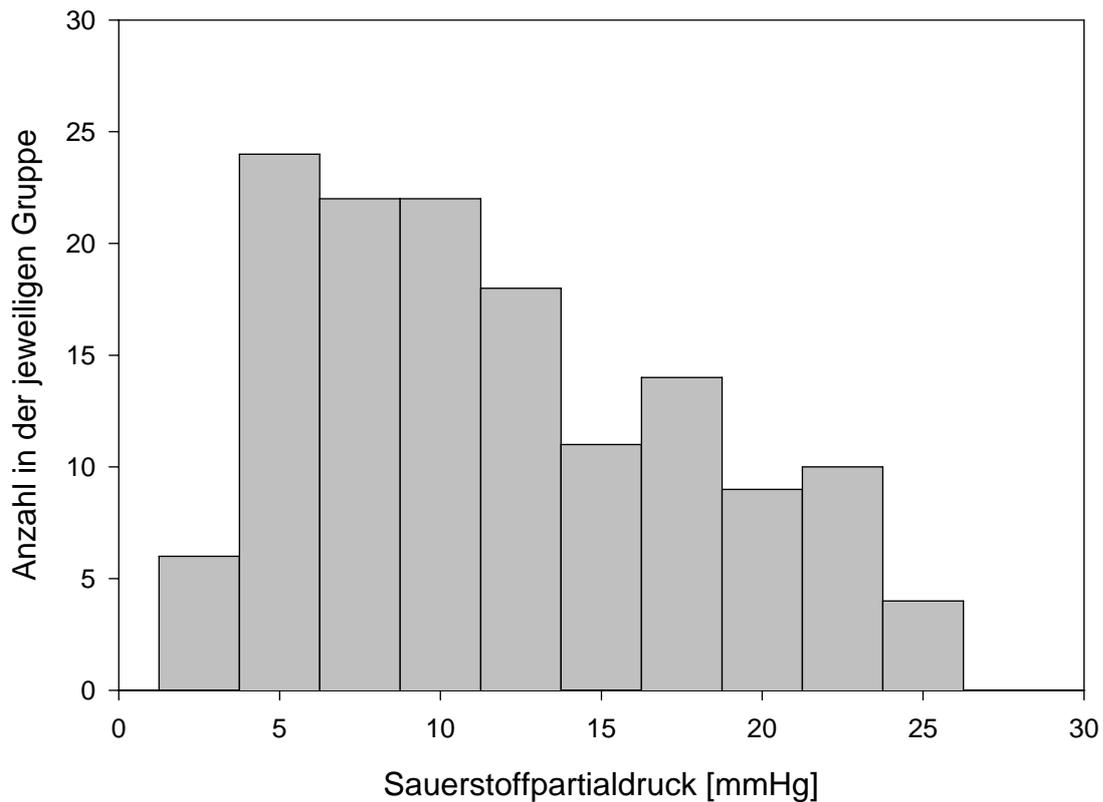


Abbildung 17: Histogramm zur Darstellung des Sauerstoffpartialdrucks aller Daten, aufgeteilt in Klassen (eine Klasse entspricht 2,5 mmHg). N=14 Tiere mit jeweils 10 ROIs.

In der Häufigkeitsverteilung der Sauerstoffpartialdrücke zeigt sich eine rechtsschiefe Verteilung mit einer Häufung im niedrigen pO_2 -Bereich mit einem Häufigkeitsmaximum im Bereich zwischen 5 und 10 mmHg.

Im Folgenden werden die Daten weiter untergliedert. Beginnend mit den Tieren deren Tumoren 5 Tage angewachsen waren. Es werden einmal die gesamten Daten, sowie unterteilt in periphere und zentrale Areale beschrieben (Tabelle 2) und im Histogramm aufgetragen.

Sauerstoffpartialdruck im A-MEL-3 Tumor [mmHg]: Deskriptive Statistik Tag 5			
	<i>gesamt</i>	<i>zentral</i>	<i>peripher</i>
Mittelwert	8,8	8,3	9,4
Standardfehler	1,1	1,1	1,3
Median	8,6	7,7	9,6
Minimum	1,4	1,4	2,9
Maximum	17,8	17,1	17,8
Schiefe	0,4	0,7	0,1
Kurtosis	-0,3	0,8	-0,7

Tabelle 2: Sauerstoffpartialdruckwerte im A-Mel-3 Tumor am Tag 5, gesamt, peripher, zentral aus n=7 Tieren mit jeweils 10 ROIs

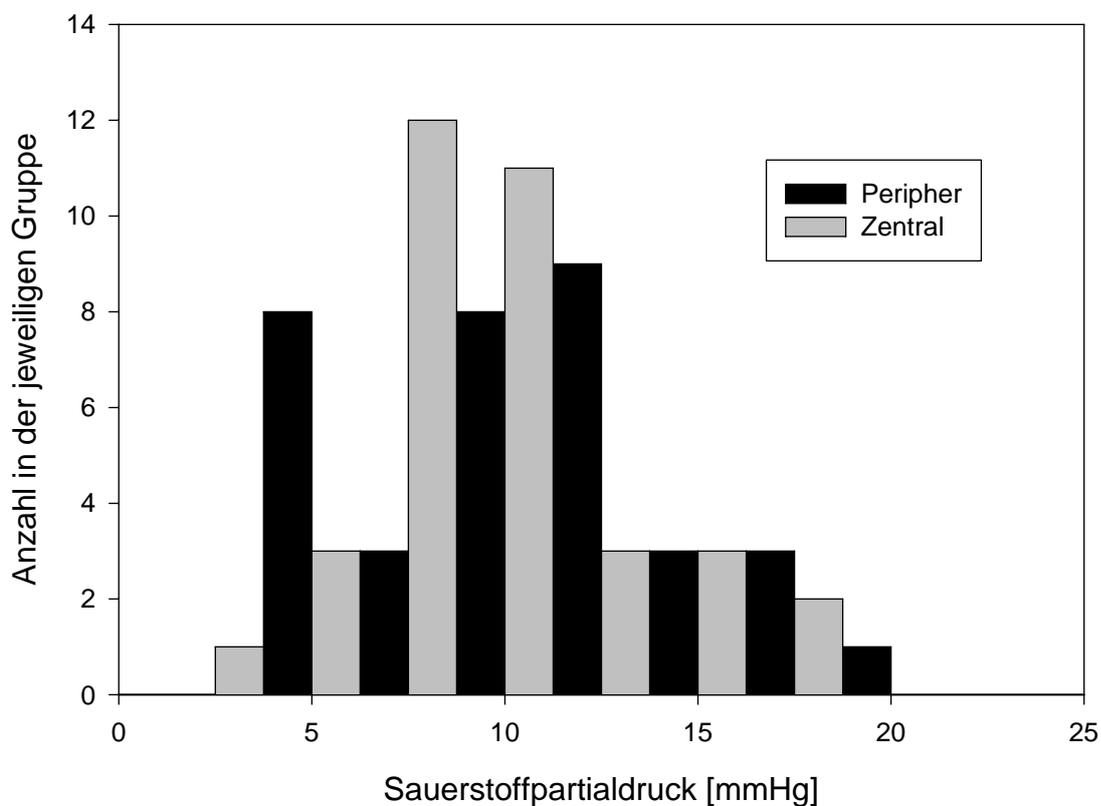


Abbildung 18: Histogramm zur Darstellung des Sauerstoffpartialdrucks am Tag 5, unterteilt in periphere und zentrale Areale, in einzelnen pO₂-Wertgruppen (eine Klasse entspricht 2,5 mmHg). n=7 Tiere mit jeweils 10 ROIs

Die Sauerstoffpartialdrücke liegen im Mittel bei 8,8 mmHg, in der Peripherie tendenziell höher als Zentral. Die Verteilung ist peripher flacher als zentral, die Schiefe ist reduziert. Folgend entsprechend zu Tag 5 dargestellt, die Daten von Tag 8 (Tabelle 3).

Sauerstoffpartialdruck im A-MEL-3 Tumor [mmHg]: Deskriptive Statistik Tag 8			
	<i>gesamt</i>	<i>zentral</i>	<i>peripher</i>
Mittelwert	12,4	10,7	14,1
Standardfehler	2,2	2,3	2,6
Median	13,3	11,0	17,1
Minimum	2,0	2,0	2,2
Maximum	22,7	22,6	22,7
Schiefe	-0,1	0,2	-0,5
Kurtosis	-1,5	-1,3	-1,5

Tabelle 3: Sauerstoffpartialdruckwerte im A-Mel-3 Tumor am Tag 8, gesamt, peripher, zentral aus n=7 Tieren mit jeweils 10 ROIs

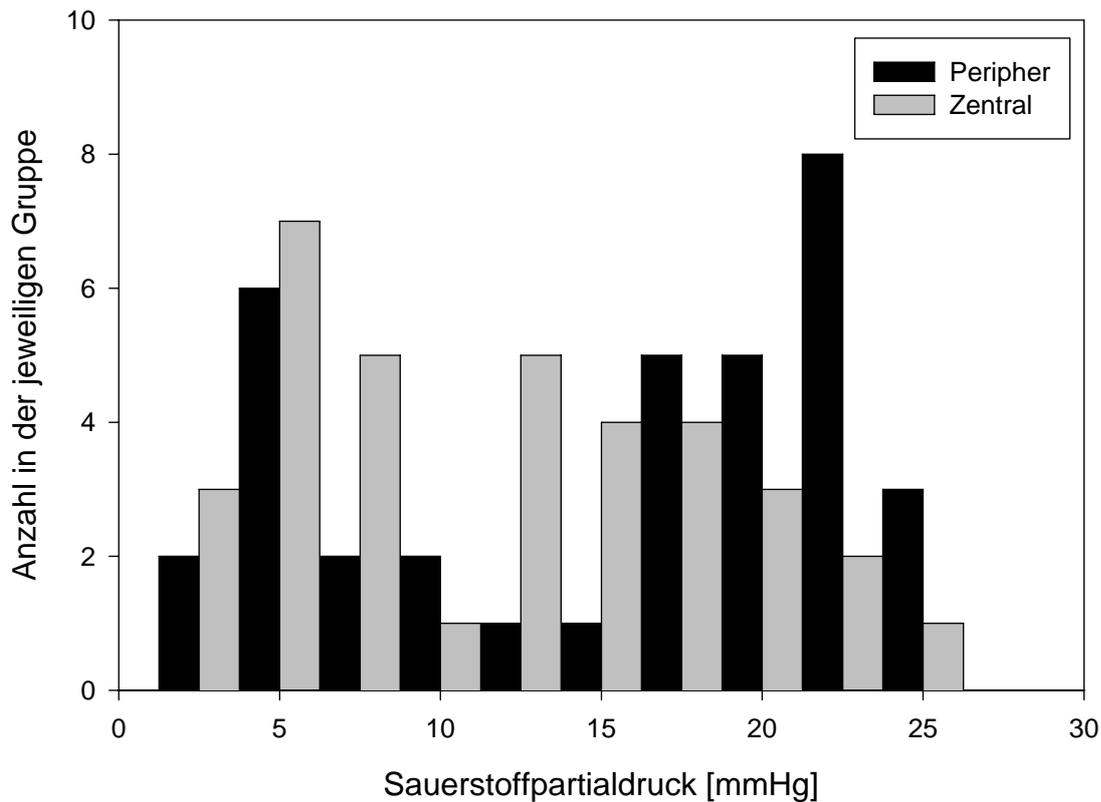


Abbildung 19: Histogramm zur Darstellung des Sauerstoffpartialdrucks am Tag 8, unterteilt in periphere und zentrale Areale, in einzelnen pO_2 -Wertgruppen (eine Klasse entspricht 2,5 mmHg). $n=7$ Tiere mit jeweils 10 ROIs

Insgesamt liegen die pO_2 -Werte hier höher, insbesondere in den peripheren Bereichen. Diese im Histogramm aufgetragen zeigen eine zweigipflige Kurve mit Maxima bei 5 mmHg und bei 22,5 mmHg. An Tag 8 zeigt die Häufigkeitsverteilung in der Peripherie eine linksschiefe Verteilung. Zentral ist dieser Verlauf nicht so deutlich ausgeprägt. Es folgen die vergleichenden Daten von Tag 5 und 8 (Tabelle 4) ohne Untergliederung in zentrale und periphere Areale.

Sauerstoffpartialdruck im A-MEL-3 Tumor [mmHg]: Deskriptive Statistik Tag 5 und 8		
	<i>D5</i>	<i>D8</i>
Mittelwert	8,8	12,4
Standardfehler	1,1	2,2
Median	8,6	13,3
Minimum	1,4	2,0
Maximum	17,8	22,7
Schiefe	0,4	-0,1
Kurtosis	-0,3	-1,5

Tabelle 4: Sauerstoffpartialdruckwerte im A-Mel-3 Tumor am Tag 5 und 8, aus n=14 Tieren mit jeweils 10 ROIs

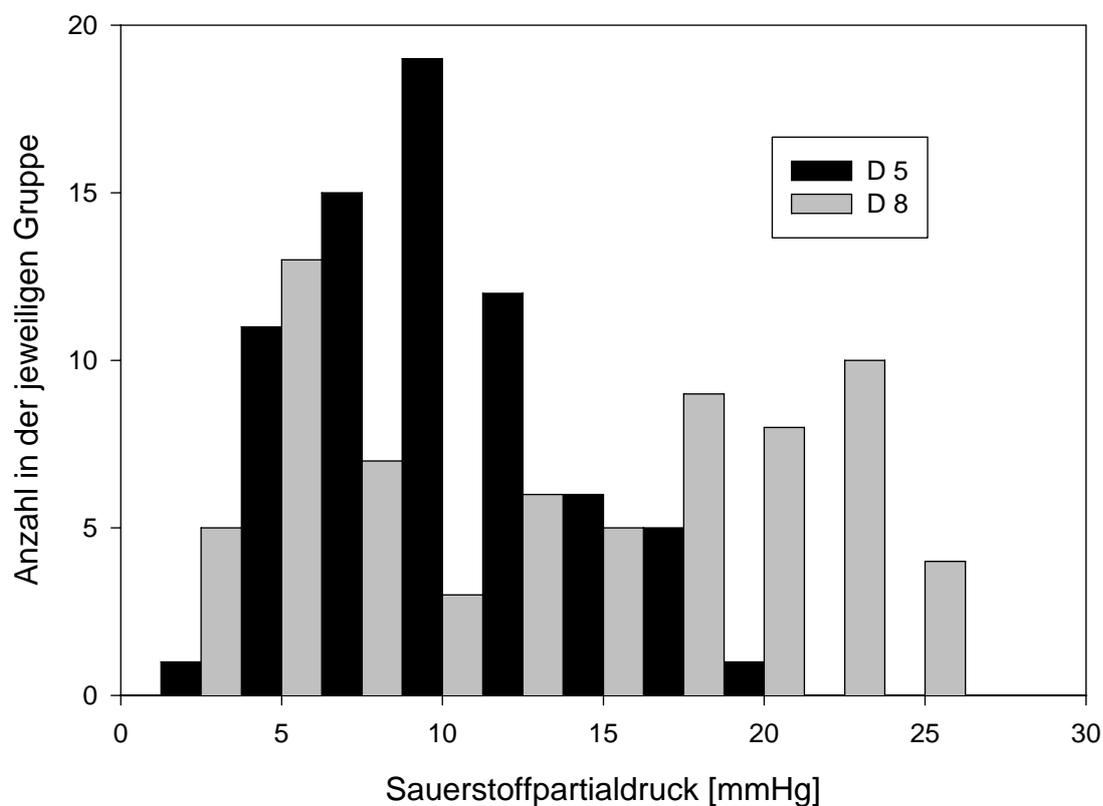


Abbildung 20: Histogramm zur Darstellung des Sauerstoffpartialdrucks am Tag 5 und 8, aufgeteilt in einzelne pO₂-Wertgruppen (eine Klasse entspricht 2,5 mmHg). n=14 Tiere mit jeweils 10 ROIs.

Im Mittel finden sich am Tag 8 höhere Sauerstoffpartialdrücke, wobei die breite Verteilung im Histogramm einen zweigipfligen Verlauf mit Maxima um 5 mmHg und 22,5 mmHg zeigt. Am Tag 5 findet man eher eine eingipflige Verteilung mit einem Häufigkeitsmaximum um 10 mmHg.

Zuletzt, eine Tabelle, welche die einzelnen Werte in periphere und zentrale Bereiche, sowie 5 und 8 Tage Anwachsdauer zusammenfasst.

Sauerstoffpartialdruck im A-MEL-3 Tumor [mmHg]: Deskriptive Statistik Tag 5 und 8				
	<i>zentral</i>	<i>peripher</i>	<i>D 5</i>	<i>D 8</i>
Mittelwert	9,5	11,8	8,8	12,4
Standardfehler	0,8	0,9	1,1	2,2
Median	8,3	11,1	8,6	13,3
Minimum	1,4	2,2	1,4	2,0
Maximum	22,6	22,7	17,8	22,7
Skewness	0,7	0,2	0,4	-0,1
Kurtosis	-0,4	-1,2	-0,3	-1,5

Tabelle 5: Sauerstoffpartialdruckwerte im A-Mel-3 Tumor, gegliedert nach peripher / zentral und Messzeitpunkten Tag 5 / Tag 8. n=14 Tiere mit jeweils 10 ROIs

Hier zeigt sich, dass der Sauerstoffpartialdruck in den zentralen Bereichen im Mittel niedriger liegt als in den peripheren Randbereichen, dabei liegt die Streuung der Daten relativ hoch. Bei ebenfalls hoher Streuung ist der Mittelwert der am Tag acht gemessenen Gruppe höher als der am Tag fünf gemessenen. Es konnte in keinem Datensatz Signifikanzniveau erreicht werden.

3.4 Einfluss der Mikrozirkulation auf den Sauerstoffpartialdruck

Im Folgenden sollen Zusammenhänge der Gewebeoxygenierung mit denen der mikrohämodynamischen Parameter beschrieben werden. In den folgenden Tabellen (Tabelle 6/7) und der Abbildung 21 wird ein Überblick über die Parameter gegeben. Dabei zeigt sich, dass ein hoher Blutvolumenfluss tendenziell mit einem höheren Sauerstoffpartialdruck assoziiert ist, und in den zentralen Bereichen sowie der

früheren Messgruppe geringere Blutvolumenflüsse gemessen wurden. Die Durchmesser sind mit höheren Sauerstoffpartialdrücken, peripheren Bereichen sowie älteren Tumoren ebenfalls tendenziell größer. Auch die Fließgeschwindigkeit zeigt solch ein Verhalten in der Tendenz. Sie ist mit höheren pO₂ Werten, peripheren Bereichen und der Messgruppe Tag 8 erhöht. Die Gefäßdichte liegt im peripheren Bereich sowie in der jüngeren Gruppe höher und zeigt somit nicht die oben beschriebene Tendenz. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert ± SEM. Kein Datensatz erreicht Signifikanzniveau.

Mikrozirkulationsparameter und Sauerstoffpartialdruck Tag 5			
	<i>gesamt</i>	<i>zentral</i>	<i>peripher</i>
pO ₂ [mmHg]	8,8 ± 1,1	8,3 ± 1,1	9,4 ± 1,3
Fließgeschwindigkeit [mm/s]	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,13 ± 0,03
Durchmesser [µm]	13,2 ± 0,3	12,8 ± 0,5	13,6 ± 0,3
Funktionelle Gefäßdichte [cm/cm ²]	220,6 ± 15,1	212,0 ± 17,7	229,3 ± 13,2
Blutvolumenfluss [pl/s]	6,2 ± 1,4	10,7 ± 2,6	16,6 ± 0,4

Tabelle 6: Sauerstoffpartialdruckwerte und Mikrozirkulationsparameter im A-Mel-3 Tumor, gegliedert nach gesamt / peripher / zentral am Tag 5. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert ± SEM. n=7 Tiere mit jeweils 10 ROIs

Mikrozirkulationsparameter und Sauerstoffpartialdruck Tag 8			
	<i>gesamt</i>	<i>zentral</i>	<i>peripher</i>
pO ₂ [mmHg]	12,4 ± 2,2	10,7 ± 2,3	14,1 ± 2,6
Fließgeschwindigkeit [mm/s]	0,17 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,22 ± 0,03
Durchmesser [µm]	16,0 ± 2,0	15,0 ± 1,6	23,0 ± 4,9
Funktionelle Gefäßdichte [cm/cm ²]	169,9 ± 12,2	165,9 ± 10,5	185,7 ± 16,5
Blutvolumenfluss [pl/s]	33,6 ± 13,8	21,6 ± 6,0	119,1 ± 72,8

Tabelle 7: Sauerstoffpartialdruckwerte und Mikrozirkulationsparameter im A-Mel-3 Tumor, gegliedert nach gesamt / peripher / zentral am Tag 8. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert ± SEM. n=7 Tiere mit jeweils 10 ROIs

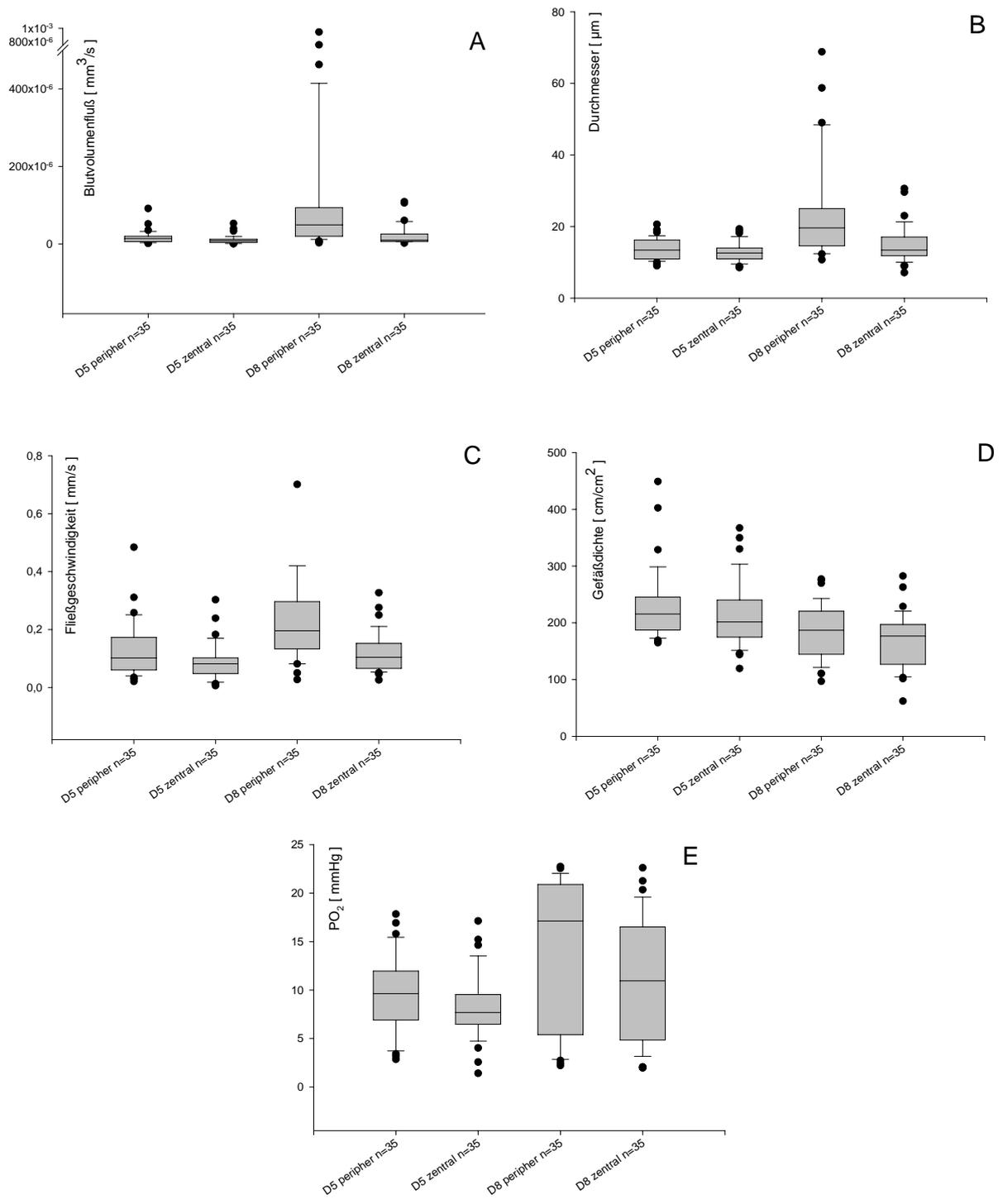


Abbildung 21: Darstellung des Sauerstoffpartialdrucks sowie der einzelnen Mikrozirkulationsparameter im Vergleich mit den unterschiedlichen Wachstumszeiten der Tumoren (Tag 5 und Tag 8) sowie der räumlichen Trennung zwischen peripheren und zentralen Arealen. Insgesamt wurden n=140 ROIs in 14 Versuchstieren analysiert. A: Blutvolumenfluss B: Gefäßdurchmesser C: Fließgeschwindigkeit D: Gefäßdichte E: Sauerstoffpartialdruck am.

3.4. Korrelation zwischen Sauerstoffpartialdruck und Tumorzirkulation in beiden Gruppen

Hier und in den nächsten Punkten sollen die Ergebnisse des vergleichenden Versuches, Sauerstoffpartialdruck gegen die Mikrozirkulationsparameter dargestellt werden. Zunächst wurden beide Gruppen zusammengenommen und die gesamten Daten untersucht. Das bedeutet, es wurde ausgewertet, ohne auf Unterschiede in zentralen oder peripheren Arealen oder auf Unterschiede in fünf oder acht Tage lang angewachsene Tumoren einzugehen. Es wurden also 14 Tiere mit jeweils zehn ROIs betrachtet. Verglichen wurde der Sauerstoffpartialdruck mit den Gefäßdurchmessern, dem Blutvolumenfluss, der Fließgeschwindigkeit und der Gefäßdicke. Zielsetzung war es einen Zusammenhang zwischen Sauerstoffpartialdruck und den Mikrozirkulationsparametern zu untersuchen. Die Ergebnisse werden in acht Scatter-Plot Diagrammen in ihrer Gesamtheit sowie als gemittelte Werte in Abbildung 22 und 23 dargestellt. In keinem der hier untersuchten Datensätze konnte eine signifikante Korrelation gefunden werden. Lediglich beim Betrachten der Fließgeschwindigkeit lässt sich eine gewisse Tendenz zur Abhängigkeit der Variablen erkennen. Dabei würden höhere Fließgeschwindigkeiten mit höheren Sauerstoffwerten assoziiert sein. Der Blutvolumenfluss zeigt fast ausschließlich einheitlich geringe Werte (6,2 – 119,1 pl/s) bei unterschiedlich hohen Sauerstoffpartialdrücken. Auch die einzelnen Durchmesser bewegen sich relativ konform in einem Bereich zwischen 5 und 25 μm ohne den pO_2 zu beeinflussen. Die Gefäßdicke streut in einem Bereich zwischen 50 – 450 cm/cm^2 . Aufgetragen gegen den Partialdruck des Sauerstoffes lässt sich ebenfalls kein Zusammenhang dieser Parameter erkennen. Jetzt wie auch im gesamten folgenden Ergebnissteil soll nicht auf eventuelle Begründungen eingegangen werden, dies geschieht in der angeschlossenen Diskussion.

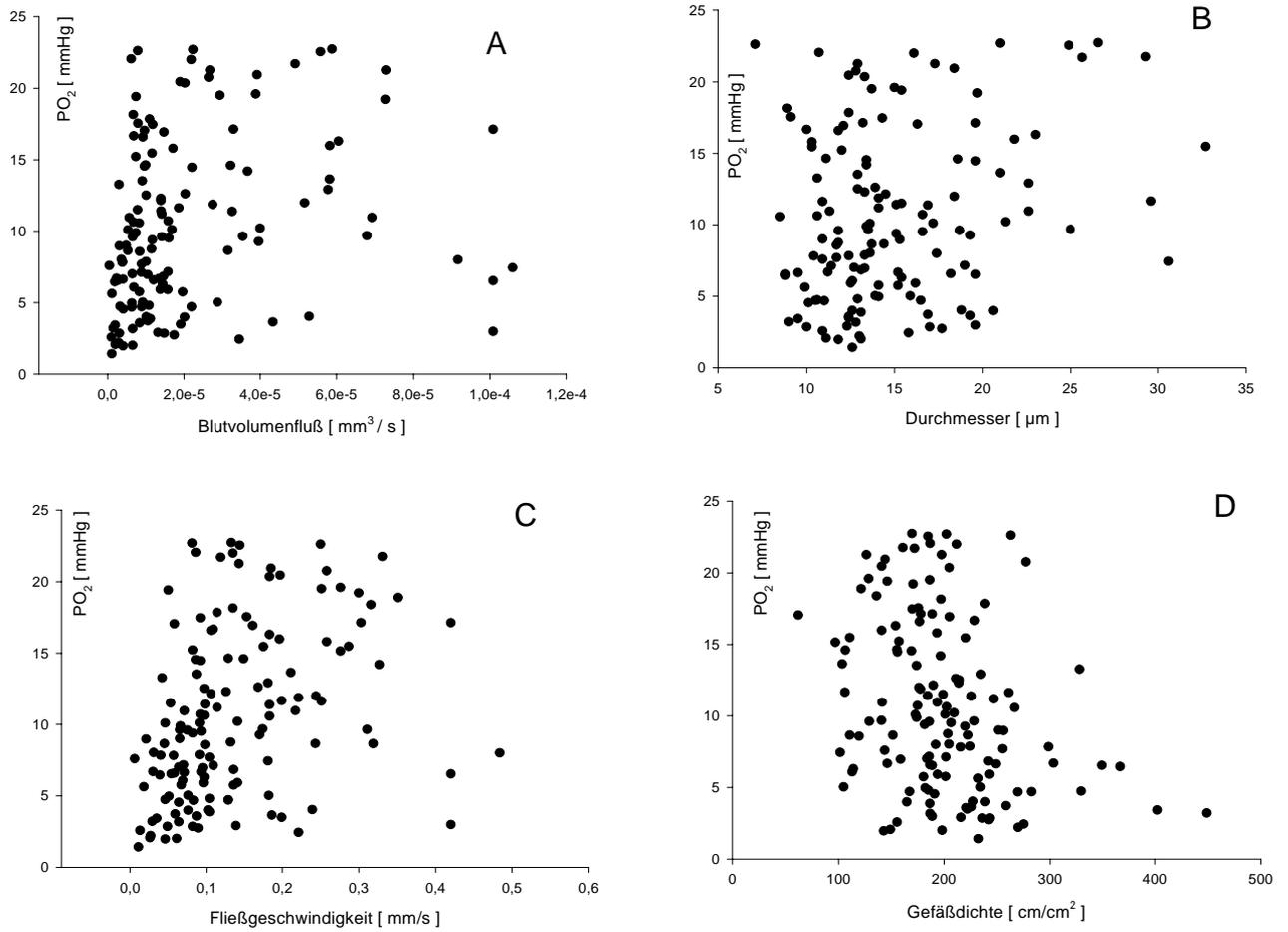


Abbildung 22: Zusammenhang zwischen Tumoroxygenierung und Parametern der Mikrozirkulation. Insgesamt wurden n=140 ROIs in 14 Versuchstieren analysiert. A: Tumor pO₂ vs. Blutvolumenfluss, B: Tumor pO₂ vs. Durchmesser, C: Tumor pO₂ vs. Fließgeschwindigkeit, D: Tumor pO₂ vs. Gefäßdichte. Es wurde kein statistisch signifikanter Zusammenhang ermittelt.

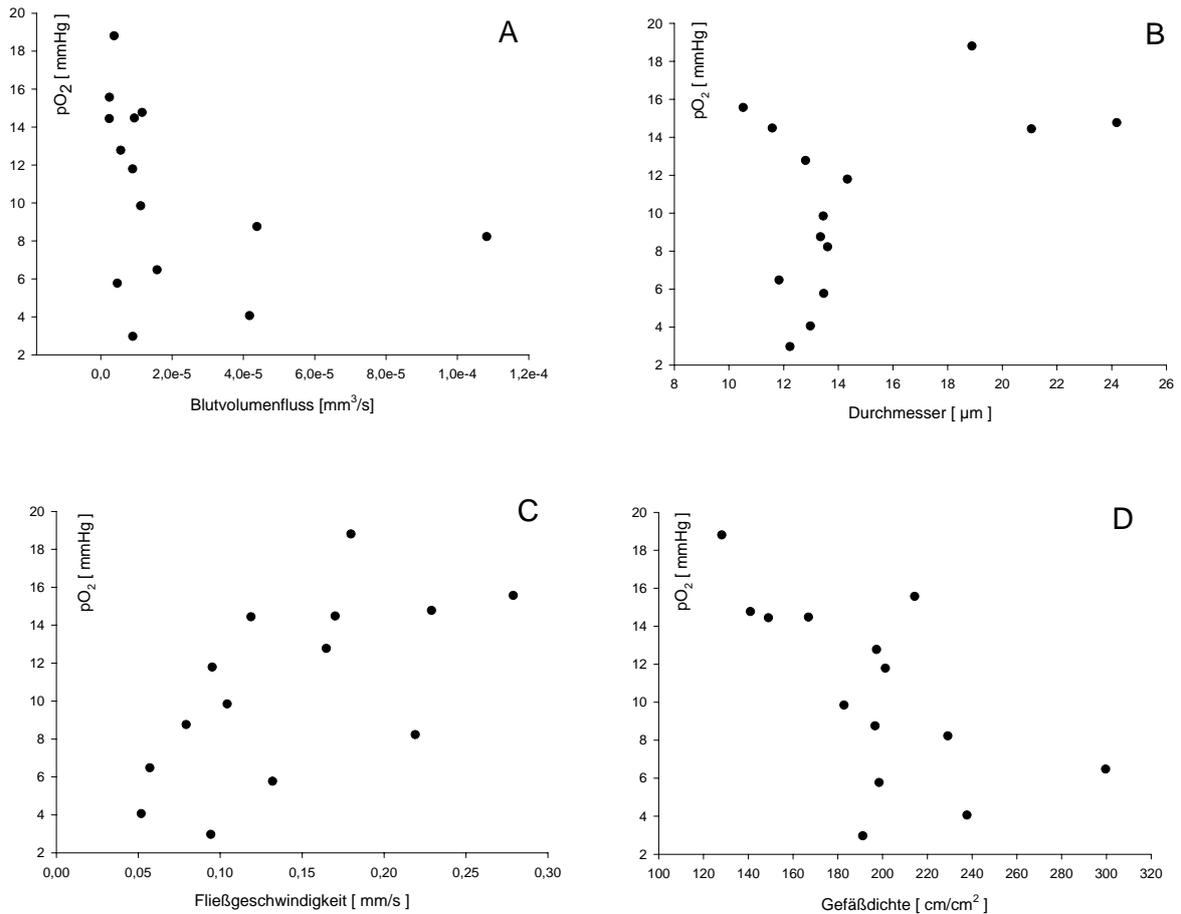


Abbildung 23: Zusammenhang zwischen Tumoroxygenierung und Parametern der Mikrozirkulation. Insgesamt wurden $n=140$ ROIs in 14 Versuchstieren gemittelt und aufgetragen. A: Tumor pO_2 vs. Blutvolumenfluss, B: Tumor pO_2 vs. Durchmesser, C: Tumor pO_2 vs. Fließgeschwindigkeit, D: Tumor pO_2 vs. Gefäßdichte. Es wurde kein statistisch signifikanter Zusammenhang ermittelt.

3.4.1 Periphere und zentrale Tumorareale

Um regionale Unterschiede in der Gefäßarchitektur und dem Sauerstoffpartialdruck festzustellen wurden die Tumoren in zentrale und periphere Regionen unterteilt. So ist das Tumorwachstum dafür bekannt, zentrale Nekrosen zu bilden, eine Folge der Hypoxie? Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurden jeweils fünf ROIs im entsprechenden Bereich untersucht. Nachdem unsere Gruppen zudem unterschiedlich lange Tumoranwuchszeiten haben, ergeben sich vier Datenreihen (D5 = 7 Tiere a 10 ROIs, je 5 zentral/peripher; D8 = 7 Tiere a 10 ROIs, je 5 zentral/peripher) die miteinander verglichen werden können. Es wurden alle Daten, die aus zentralen bzw. peripheren Bereichen gewonnen wurden,

zusammengenommen und sowohl miteinander verglichen (Abb. 24) als auch gegen die Mikrozirkulationsparameter (Abb. 25 für periphere und Abb. 26 für zentrale Bereiche). Bei ersteren zeigten sich beim Blutvolumenfluss nahezu identisch niedrige Werte zwischen 0,00001 und 0,0002 mm/s, wobei in den peripheren Arealen mehrere Ausreißer in höhere Flussgeschwindigkeiten beobachtet werden kann. Die durchschnittlichen Durchmesser liegen in der peripheren Gruppe leicht über denen im zentralen Bereich. Auch in diesem Datensatz finden sich erneut mehr Ausreißer nach oben. Statistisch signifikante Unterschiede lassen sich allerdings nicht nachweisen. Ähnlich verhält es bei der Fließgeschwindigkeit, auch hier liegt der Median bei etwas höheren Geschwindigkeiten und auch hier gibt es mehr Ausreißer nach oben. Wie bei den anderen Parametern, so zeigt auch die Gefäßdichte keine signifikanten Unterschiede, jedoch zeigen sich auch hier tendenziell dichtere Werte für die peripheren Bereiche. Zuletzt zeigen auch die Sauerstoffpartialdrücke das gleiche Bild. Der Median liegt im peripheren Bereich leicht über zehn bei zirka zwölf, im zentralen Bereich leicht darunter bei zirka acht. Auch die obere und untere Quartile liegt jeweils über den Vergleichswerten der zentralen Bereiche. Ebenfalls kann kein Signifikanzniveau erreicht werden. Tendenzen zeigten sich allerdings entsprechend der oben formulierten Frage. Es zeigten sich tendenziell geringere Sauerstoffpartialdrücke im zentralen Bereich des Tumors als im peripheren. Außerdem nahm auch die Gefäßdichte und alle anderen Mikrozirkulationsparameter von der Tendenz her im zentralen Bereich eher ab. Im Vergleich mit den Mikrozirkulationsparametern konnte eine Aufschlüsselung in periphere und zentrale Bereiche ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zeigen (Abb. 25 und 26). Eine Abhängigkeit der Parameter lässt sich praktisch nicht herleiten. Der Blutvolumenfluss zeigt sich in beiden Arealen gleich bleibend niedrig und kann nur im zentralen Bereich einen eventuellen Zusammenhang im Sinne eines ansteigenden pO_2 bei zunehmendem Fluss erahnen lassen. Auch die Fließgeschwindigkeit zeigt hier am ehesten solche Tendenzen. Die übrigen Parameter liegen fast gleichmäßig verteilt vor.

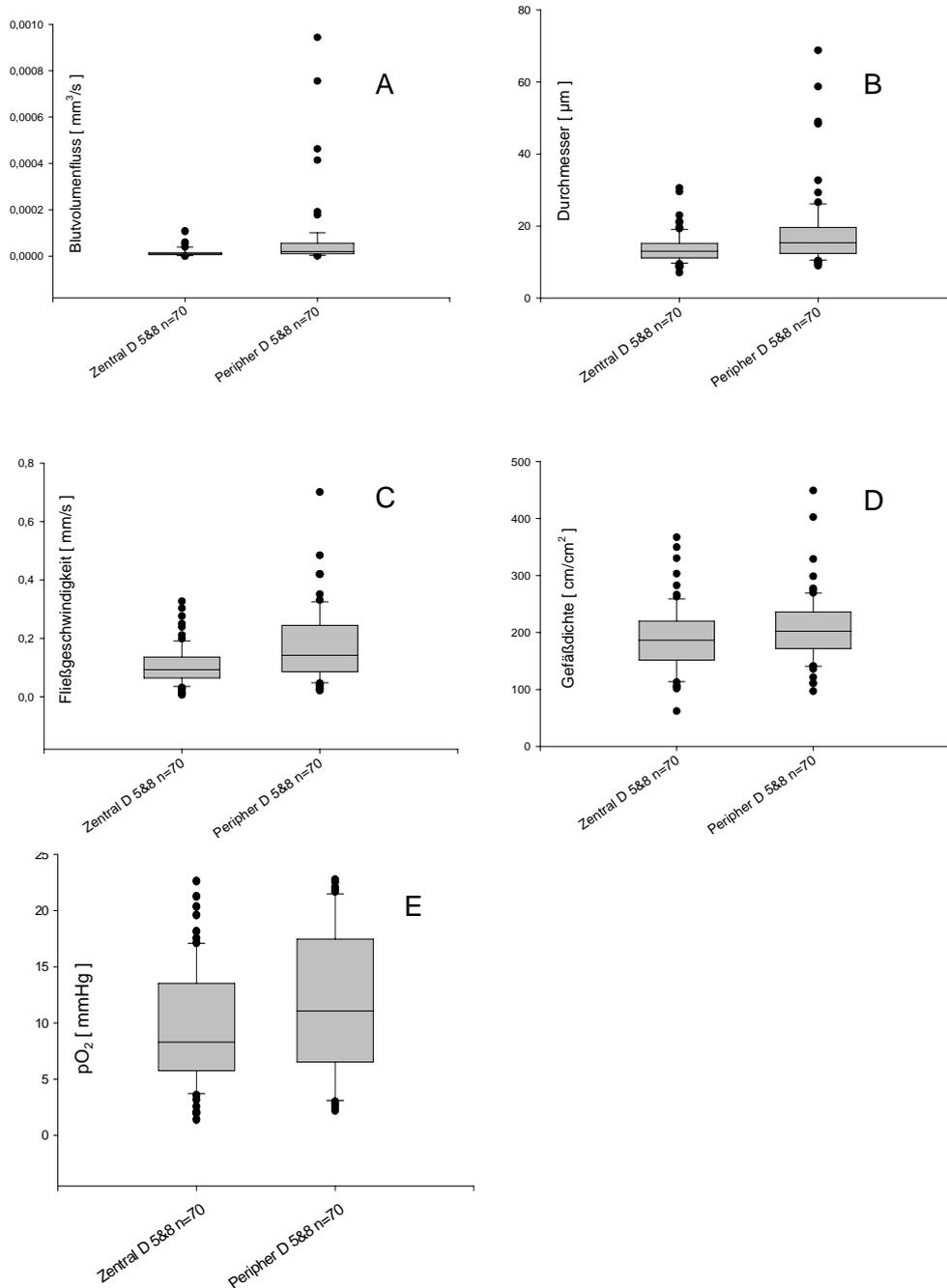


Abbildung 24: Darstellung des Sauerstoffpartialdrucks und der Mikrozirkulationsparameter im zentralen sowie im peripheren Bereich des Tumors. Dabei wurden die Daten beider Anwachsguppen (D5 und D8) zusammengekommen. Insgesamt wurden n=140 ROIs in 14 Versuchstieren (je 10 ROIs) analysiert. A: Zentraler vs. peripher Blutvolumenfluss, B: Zentraler vs. peripher Durchmesser, C: Zentraler vs. peripher Fließgeschwindigkeit, D: Zentraler vs. peripher Gefäßdichte, E: Zentraler vs. peripher Sauerstoffpartialdruck. Es kann kein signifikanter Zusammenhang beschrieben werden.

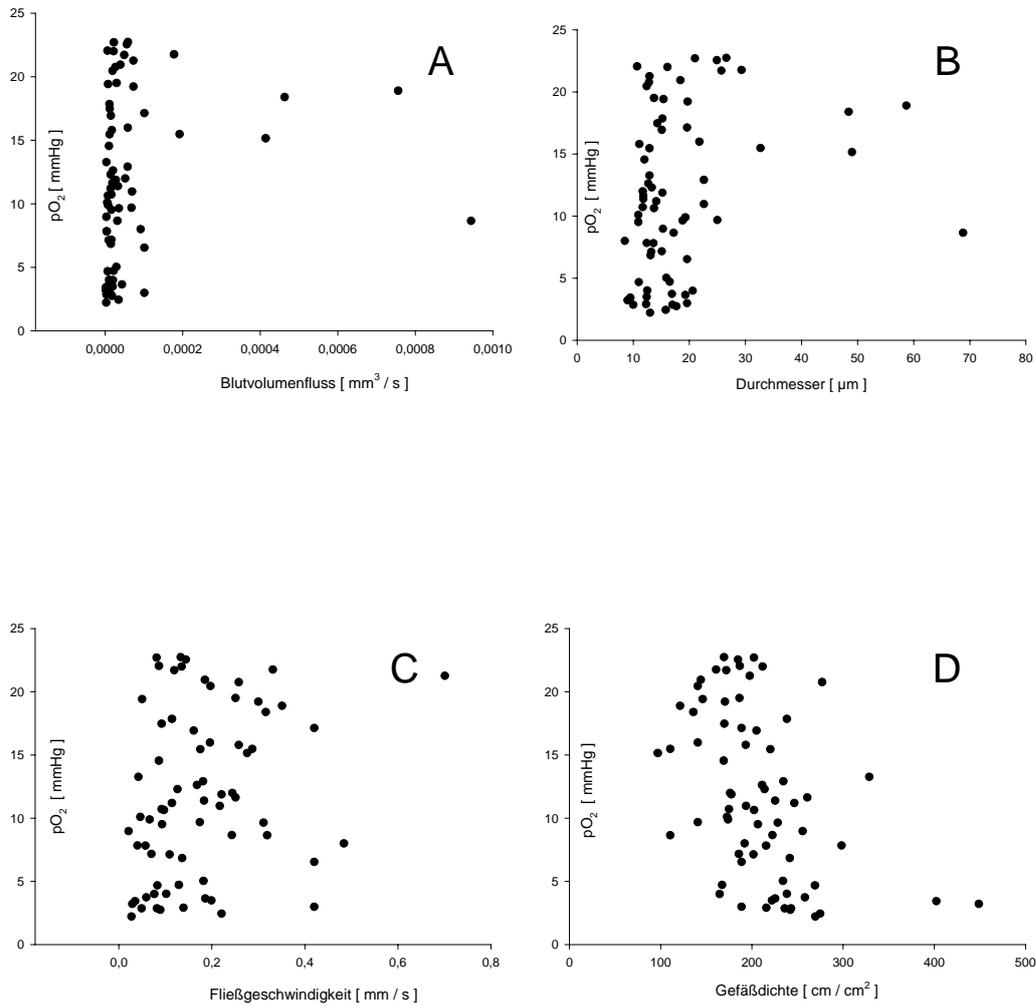


Abbildung 25: Darstellung der Mikrozirkulationsparameter im Scatterplot im peripheren Bereich des Tumors, dafür werden die Daten sowohl der fünf als auch der achttagigen Gruppe zusammengenommen. Insgesamt wurden jeweils n=70 ROIs aus 14 Versuchstieren analysiert. A: Tumor pO₂ vs. Blutvolumenfluss, B: Tumor pO₂ vs. Durchmesser, C: Tumor pO₂ vs. Fließgeschwindigkeit, D: Tumor pO₂ vs. Gefäßdichte. Es kann kein signifikanter Zusammenhang beschrieben werden.

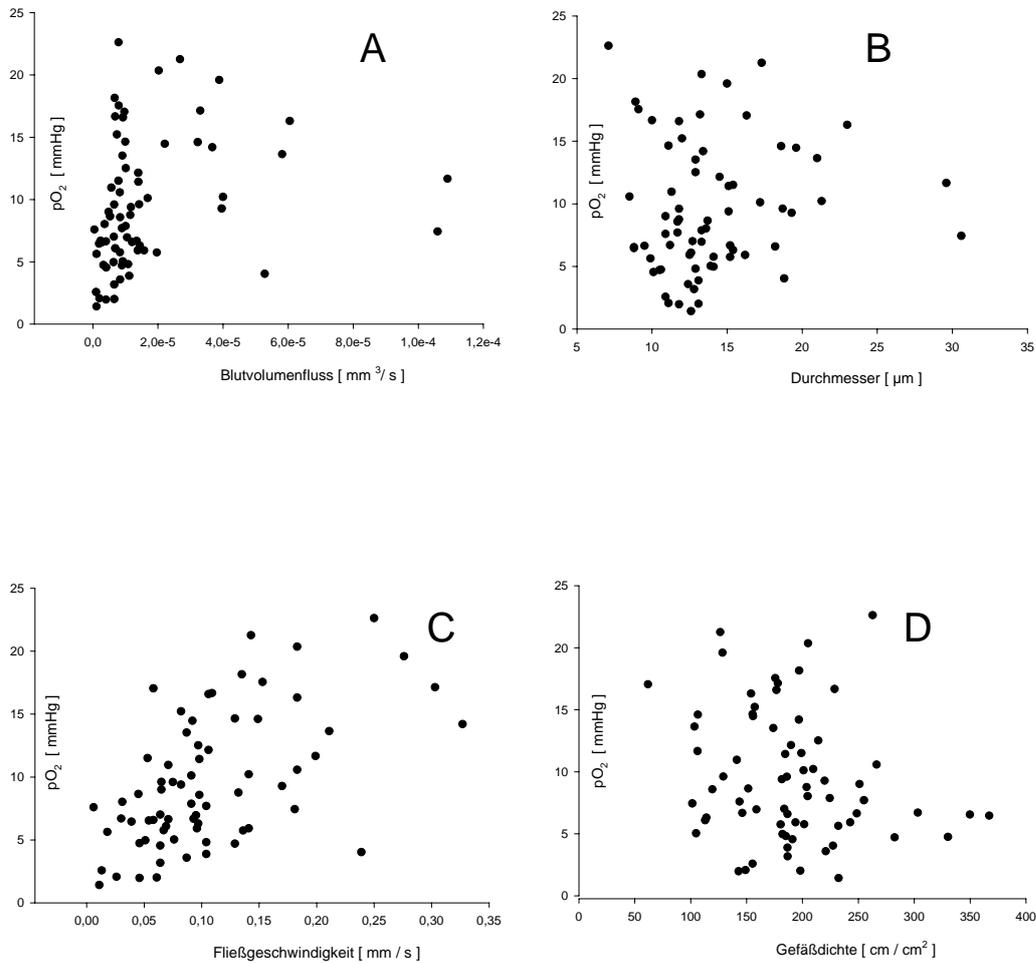


Abbildung 26: Darstellung der Mikrozirkulationsparameter im Scatterplot im zentralen Bereich des Tumors, dafür werden die Daten sowohl der fünf als auch der acht Tages Gruppe zusammengenommen. Insgesamt wurden jeweils $n=70$ ROIs aus 14 Versuchstieren analysiert. A: Tumor pO_2 vs. Blutvolumenfluss, B: Tumor pO_2 vs. Durchmesser, C: Tumor pO_2 vs. Fließgeschwindigkeit, D: Tumor pO_2 vs. Gefäßdichte. Es kann kein signifikanter Zusammenhang beschrieben werden.

3.4.2 Unterschiede in den Wachstumsgruppen

Ein weiterer Aspekt, der beleuchtet wurde, ist die abweichende Anwachsdauer der Tumoren. Bereits in der Einleitung wurde betont, dass das Gefäßnetzwerk ein komplexes System ist, welches unter Wirkung vieler Mediatoren entsteht. Nachdem für ein solches Zusammenwirken Zeit benötigt wird, erscheint es interessant, inwieweit sich der Sauerstoffpartialdruck und die Mikrozirkulation mit weiterem Ausreifen des Tumors verändert. Dabei wurden wie bereits analog in Punkt 3.4.2 geschehen alle Daten von je einer Gruppe miteinander verglichen (Abb.27).

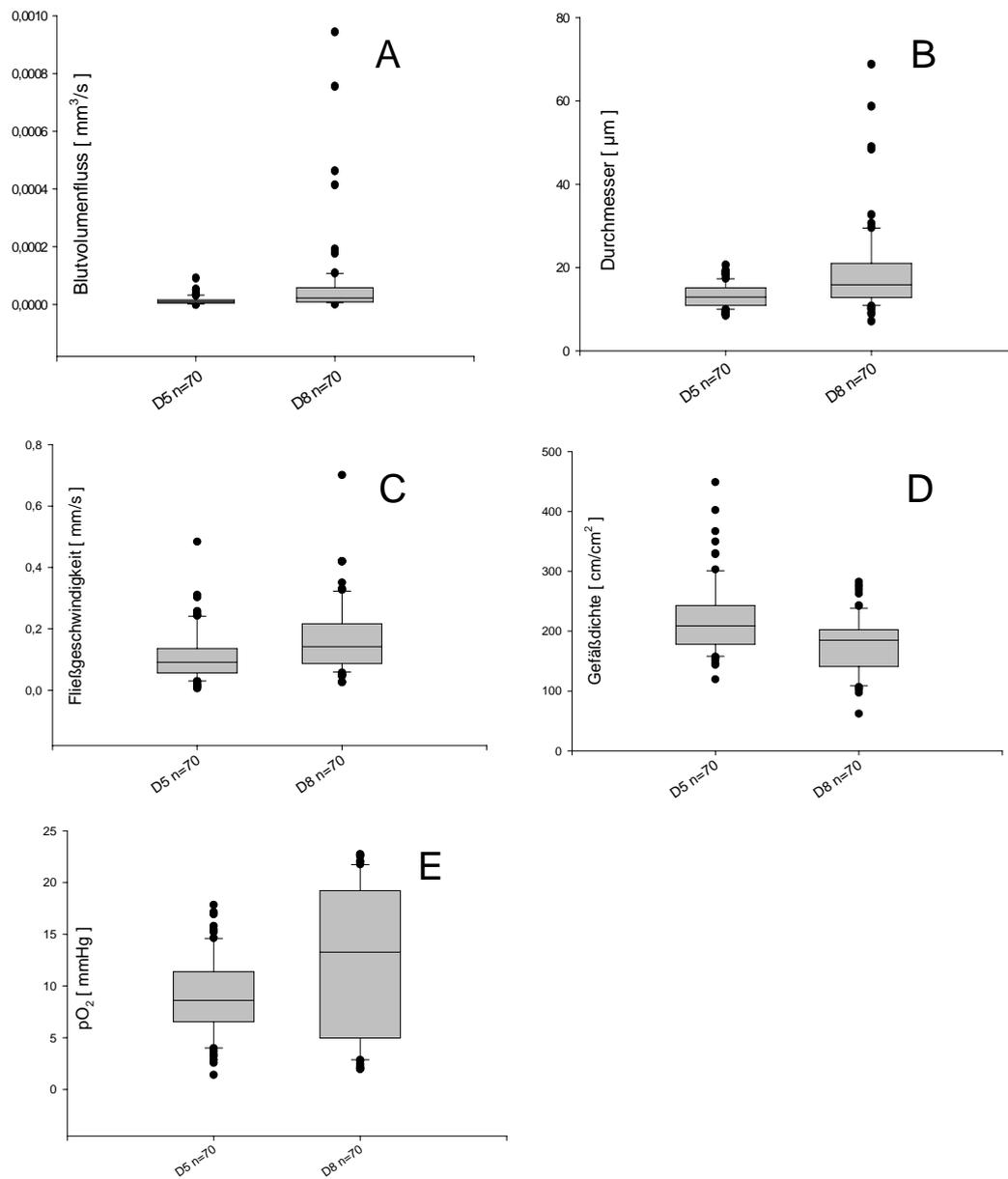


Abbildung 27: Darstellung des Sauerstoffpartialdrucks im Vergleich mit den unterschiedlichen Wachstumszeiten der Tumoren (Tag 5 und Tag 8) im Boxplot. Insgesamt wurden n=140 ROIs in 14 Versuchstieren analysiert. A: Tag 5 vs. Tag 8 Blutvolumenfluss, B: Tag 5 vs. Tag 8 Durchmesser, C: Tag 5 vs. Tag 8 Fließgeschwindigkeit, D: Tag 5 vs. Tag 8 Gefäßdichte, E: Tag 5 vs. Tag 8 Sauerstoffpartialdruck. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang beschrieben werden.

Danach wurden die einzelnen Parameter der Mikrozirkulation der jeweiligen Tage gegen den Sauerstoffpartialdruck aufgetragen (Abb. 28 und 29). Wie in den Punkten zuvor konnte keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Trotzdem zeigten sich erneut Tendenzen. So nahmen beispielsweise der Sauerstoffpartialdruck, die Fließgeschwindigkeit, der Blutvolumenfluss sowie die Durchmesser mit längerem Tumorwachstum eher zu, die Gefäßdichte dagegen eher ab. Weiterhin wurden die Mikrozirkulationsparameter der zwei Gruppen noch einmal in zentrale und periphere Bereiche unterteilt und jeweils getrennt gegen den pO_2 aufgetragen. Wiederum kann keine signifikante Abhängigkeit festgestellt werden, des Weiteren konnten keine aussagekräftigen Unterschiede festgestellt. Am ehesten könnte man bei der Fließgeschwindigkeit eine gewisse Tendenz erkennen, die von höheren Sauerstoffpartialdrücken bei höheren Fließgeschwindigkeiten zeugt. Im Einzelnen kann man keine signifikanten Unterschiede finden. Alles in allem sind die Daten relativ homogen verteilt. Beim Sauerstoffpartialdruck kann man zunehmende Drücke in älteren Tumoren sowie in den Randbereichen beobachten. Auch der Blutvolumenfluss und die Fließgeschwindigkeit verhalten sich in der Tendenz wie diese.

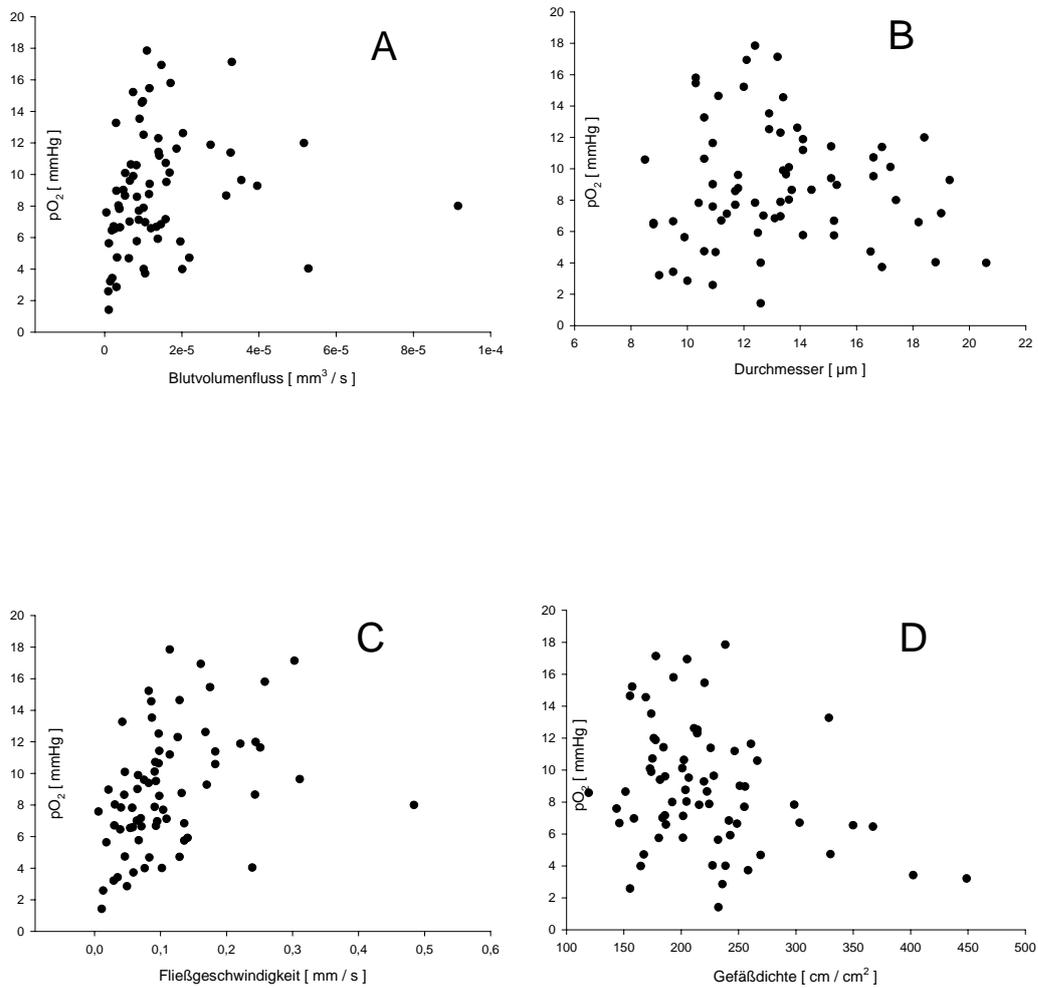


Abbildung 28: Darstellung der Mikrozirkulationsparameter gegen den Sauerstoffpartialdruck der Tumoren am Tag 5 im Scatterplot. Insgesamt wurden n=70 ROIs aus 7 Versuchstieren analysiert. A: Tumor pO₂ vs. Blutvolumenfluss, B: Tumor pO₂ vs. Durchmesser, C: Tumor pO₂ vs. Fließgeschwindigkeit, D: Tumor pO₂ vs. Gefäßdichte. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang beschrieben werden.

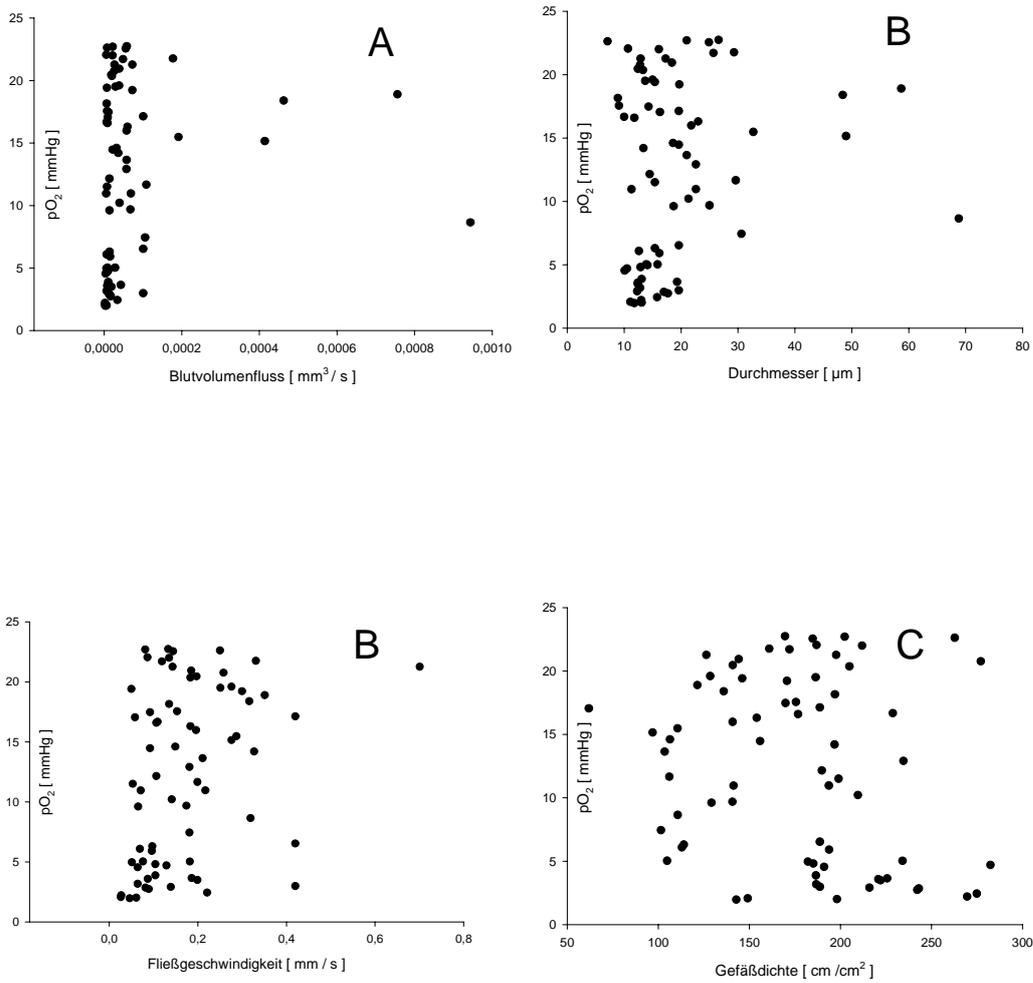


Abbildung 29: Darstellung der Mikrozirkulationsparameter gegen den Sauerstoffpartialdruck der Tumoren am Tag 8 im Scatterplot. Insgesamt wurden n=70 ROIs aus 7 Versuchstieren analysiert. A: Tumor pO₂ vs. Blutvolumenfluss, B: Tumor pO₂ vs. Durchmesser, C: Tumor pO₂ vs. Fließgeschwindigkeit, D: Tumor pO₂ vs. Gefäßdichte. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang beschrieben werden.

4. Diskussion

4.1 Moderne Verfahren zur Messung des Sauerstoffs

Für die Messung des Sauerstoffstatus steht eine Palette von Methoden zu Verfügung, die den O₂-Partialdruck direkt oder indirekt über Messgrößen, die mit dem pO₂ verknüpft sind, messen. Jede Methode hat ihre eigenen spezifischen Vor- und Nachteile, die man für das jeweilige Einsatzgebiet abwägen muss.

4.1.1 Polarographische Methoden

Bei der polarographischen Messung besteht die eigentliche Messelektrode aus einer Gold- bzw. Platinelektrode, die mit einer sauerstoffdurchlässigen Membran überzogen ist (Clark LC 1956). Man legt eine Polarisationsspannung zwischen der Mess- und einer Bezugselektrode an (-0,6 bis -1,0 V). Dadurch wird molekularer Sauerstoff reduziert und es kommt zu einem Stromfluss. Dieser ist proportional zum O₂-Partialdruck am Ort der Messelektrode. Durch unterschiedliche moderne Verfeinerungen, zum Beispiel Elektroden in einem Glasschaft mit einem Durchmesser kleiner 5 µm, kann man hohe räumliche Auflösungen erreichen (Vanderkooi JM 1991). Eine gute zeitliche Auflösung kann man mit einer anderen Spezifikation, einer langzeitstabilen Kathetherelektrode erreichen, die dann allerdings eine hohe Unschärfe im Raum bedingt. Nachteile der polarographischen Messung sind zum einen der Verbrauch von Sauerstoff bei der Messung, sowie zahlreiche Einflussfaktoren, die berücksichtigt werden müssen. So hängt die pO₂-Messung maßgeblich von der Temperatur ab, die für jeden Messvorgang bestimmt und in den Kalibriervorgang mit einbezogen werden muss, wobei für viele membranüberzogene Elektroden der Temperatureinfluss mit 2% bis 4% pro °C angegeben wird (Fatt I 1964). Auch zeigen viele pO₂-Elektroden eine Drift des Messsignals bereits während eines einzelnen Messvorgangs, so dass eine Zwei-Punkt-Kalibrierung der Elektrode vor und nach jeder Messung gefordert werden muss. Darüber hinaus wird die polarographische pO₂-Messung durch andere biologische Substanzen bzw. Arzneistoffe beeinflusst, zum Beispiel halogenierte Inhalationsanaesthetika (Vanderkooi JM 1991), NO und Melanin (Thomas DL et Guichard M 1986) sowie

Lipid- und Fluorocarbonemulsionen (Kallinowski F 1990). Außerdem benötigt diese Methode einen direkten Zugang zum untersuchten Gewebe und ist invasiv.

4.1.2 Hypoxiemarker

Heterozyklische Nitroverbindungen (Nitroimidazole, z.B. Misonidazol) sind Substanzen, die durch intrazelluläre Nitroreduktasen zu Nitroradikal-Anionen reduziert werden (Begg AC 1983) und sich anschließend an Makromoleküle der Zelle binden. Das reduzierte Anion ist allerdings nur in Abwesenheit von Sauerstoff ausreichend lange stabil. So ist Bindung nur in hypoxischen bzw. anoxischen Zellen möglich. Diese Eigenschaft der Nitroimidazole führte zur Verwendung als Indikator der Tumorphoxie (Hypoxiemarker) (Begg AC 1983, Hodgkiss RJ 1995, Lord EM 1993) Die Detektion der Bindung erfolgt auf unterschiedliche Weise. Für experimentelle Studien ist die radioaktive Markierung des Nitroimidazols mit ^3H oder ^{14}C möglich, wobei der Nachweis autoradiographisch im Gewebeschnitt erfolgt. Daneben bestehen auch nicht invasive Detektionsmöglichkeiten, z.B. über Magnetresonanzspektroskopie mit ^{19}F , Positronen-Emissions-Tomographie mit ^{18}F , Szintigraphie mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ oder Single-Photonen-Emissions-Computertomographie mit ^{123}I . Außerdem wurden immunologische Nachweismethoden für Biopsiematerial entwickelt, wobei Antikörper gegen spezifische Derivate des 2-Nitroimidazols gerichtet sind (Lord EM 1993, Raleigh JA 1995). Über die Antikörperbindung ist der Nachweis hypoxischer Zellen mittels Histochemie, ELISA, Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie möglich. Die Bindung der heterozyklischen Nitroverbindungen erfolgt in der Zelle bei einem lokalen pO_2 kleiner 5 bis 10 mmHg (Stone HB 1993, Gross MW 1995). Diese unterschiedlichen Möglichkeiten der Detektion sind sicher ein Vorteil dieser Methodik, jedoch können keine quantitativen Aussagen über den lokalen Sauerstoffpartialdruck gemacht werden. Weitere Einschränkung sind der geringe Messbereich der maximal bei 10 mmHg liegt und die Invasivität.

4.1.3 Messung der strahlenbiologisch-hypoxischen Fraktion

Die strahlenbiologisch-hypoxische Fraktion eines Tumors entspricht dem Anteil der Tumorzellen, der aufgrund der hypoxischen oder anoxischen Bedingungen eine

verminderte Strahlensensibilität besitzt und im Anschluss an eine Bestrahlung erneut proliferieren kann. Zur Messung der hypoxischen Fraktion werden solide Tumoren unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen bestrahlt und eine Dosis-Wirkungs-Beziehung (Anteil der überlebenden Zellen) ermittelt. Aus dem Unterschied des Verlaufs der Dosis-Wirkungs-Beziehung lässt sich der Anteil der Zellen mit herabgesetzter Strahlensensibilität bestimmen. Die Messung dieser Größe entspricht am ehesten der in vivo Situation, bei der ein Tumor aufgrund seiner Hypoxie strahlenresistenter ist. Dieser Assay dient somit nur der Erfassung der O_2 -abhängigen Strahlensensibilität, erlaubt jedoch keine Rückschlüsse auf die aktuelle Oxygenierung des Tumors oder deren räumliche oder zeitliche Auflösung, so dass andere tumorbiologische Aspekte des O_2 Status nicht beurteilt werden können.

4.1.4 Kryospektrophotometrie

Bei der Kryospektrophotometrie wird in einem Gefrierschnitt die intravaskuläre O_2 Sättigung des Hämoglobins einzelner Erythrozyten sowie deren räumliche Verteilung bestimmt (Fenton BM 1995, Mueller-Klieser W 1981). Die photometrische Messung beruht auf dem unterschiedlichen Absorptionsverhalten von oxygeniertem und desoxygeniertem Hämoglobin, wobei sich mit Hilfe der O_2 -Bindungskurve aus der O_2 Sättigung der kapilläre pO_2 abschätzen lässt. Man erhält mit dieser Methode eine sehr genaue mikroregionale Verteilung der Oxygenierung in den Tumorgefäßen, nicht jedoch im Gewebe. Darüber hinaus ist diese Methode technisch sehr aufwendig, da die Gewebeproben während des gesamten Messvorgangs unter $-60^\circ C$ gehalten werden müssen.

4.1.5 Near-Infrared-Spektroskopie

Die Near-Infrared-Spektroskopie beruht auf der photometrischen Bestimmung der O_2 -Sättigung des Hämoglobins, jedoch nur als Mittelwert eines größeren Gewebeareals. Die Lichtquelle sowie der Photodetektor werden auf der Oberfläche des Organs angebracht, so dass bei oberflächlichen Tumoren eine nicht invasive Messung der O_2 Sättigung von der Körperoberfläche möglich ist. Diese Methode liefert jedoch nur einen sehr groben Messwert der Tumoroxygenierung, da die

Eindringtiefe und Streuung des Lichtes und somit die Größe des Messvolumens nicht genau beurteilt werden kann.

4.1.6 Sauerstoff Messung im MRT

Für MRT-Untersuchungen zur Oxygenierung sind Tracer im Einsatz, deren Spin-Relaxationsverhalten sich sauerstoffabhängig ändert. Gut geeignet hierfür sind Perfluorocarbonemulsionen, die entweder direkt in den Tumor injiziert oder intravenös appliziert werden (Mason RP 1996). Mit dieser Methode lassen sich Schnittbilder der räumlichen O_2 -Verteilung erstellen, wobei eine Auflösung (ca. $0,5 \times 0,5 \times 5$ mm) von den im Einzelfall verwendeten MRT-Spulen abhängig ist, die alles in allem immer noch ziemlich grob erscheint. Diese Messungen sind außerdem sehr teuer und zudem wird man beim Versuchssetup vor einige Hindernisse in der Kombination mit der Intravitalmikroskopie gestellt.

4.1.7 Phosphorescence Quenching

Eine weitere Methode, die auf Vorarbeiten von Knopp und Longmuir aus dem Jahre 1972 aufbaut, nützt die Auslöschung (Quenching) eines Phosphoreszenzsignals durch Sauerstoff um den pO_2 zu ermitteln (Knopp JA et Longmuir IS 1972). Während im Jahre 1972 noch mit einem Fluoreszenzsignal gearbeitet wurde, haben Vanderkooi und Wilson 1986 erstmals phosphoreszierende Moleküle verwendet und somit eine Möglichkeit geschaffen Sauerstoffdrücke sehr genau und unkompliziert zu messen (Vanderkooi JM et Wilson DF 1986). Hierbei wird die „phosphorescence lifetime“ (Nachleuchtdauer) bestimmter phosphoreszierender Stoffe gemessen, die zuvor durch einen Lichtblitz angeregt wurden. Je nachdem wie viel Sauerstoff vor Ort zu finden ist, wird die Zeit, in der die Stoffe nachleuchten, verändert. Hohe Sauerstoffpartialdrücke „quenchen“ die Nachleuchtdauer, das heißt sie löschen sie aus bzw. verkürzen diese. Die „lifetime“ des Phosphoreszenzsignals und deren Abhängigkeit zum Sauerstoff lässt sich mit einer leicht umgeformten Stern-Vollmer-Gleichung beschreiben und berechnen. Der Verzicht auf Fluoreszenzfarbstoffe hatte zum einen den Vorteil, dass die geringe Empfindlichkeit dieser Stoffe auf Sauerstoff eliminiert wurde, zum anderen konnte mit Phosphoreszenz in einem breiten Fenster unabhängig von der Konzentration gemessen werden. Das wird dadurch erreicht,

dass nicht länger, wie bei den Fluorochromen, die Intensität des Signals bestimmt wird sondern die Dauer. So interferieren auch Veränderungen in der Absorption und der Trübung nicht länger mit der Messung. Eine weitere Besonderheit dieser Methode ist ihr nicht invasiver optischer Messvorgang. Dadurch ist sie hervorragend geeignet mit dem zuvor näher beschriebenen Kammermodell und der Intravitalmikroskopie kombiniert zu werden. Außerdem wird so eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung ermöglicht. Die Messung an sich benötigt keinen Sauerstoff und ist so beliebig oft wiederholbar. Der Meßbereich deckt den kompletten physiologischen Rahmen ab und wird besonders bei niedrigen Partialdrücken, wie man sie im Tumor vorfindet, immer genauer. Mit dieser Methode wurde uns ein ideales Werkzeug gereicht, direkt unter dem Mikroskop Sauerstoffkonzentrationen zu messen.

4.2 Diskussion der Methodik

4.2.1 Phosphoreszenz Quenching

Die Versuche und Messungen in vitro und in vivo haben gezeigt, dass mit dem Phosphoreszenz Quenching sinnvolle, zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse produziert werden. Der bedeutende Vorteil, nämlich die mögliche Messung ohne Invasivität, ermöglichte uns den direkten Vergleich der Mikrozirkulationsparameter mit dem Sauerstoffpartialdruck. Besonders im Gegensatz zur Messung mit einer polarographischen Messelektrode, die abgesehen davon, dass sie selbst Sauerstoff verbraucht, das Mikromilieu durch Einstechen der Elektrode empfindlich stört, bzw. sogar zerstört. Außerdem bietet uns diese Methode eine hervorragende zeitliche (bis zu 100Hz) sowie örtliche (Setup bedingt) Auflösung.

Allerdings stellt gerade die optische Aquisition der Messdaten ein Problem dar. Nachdem das Palladiumporphyrin im durchlässigen Gefäßnetzwerk in alle Kompartimente extravasiert, werden auch Messdaten aller Kompartimente erfasst. Das bedeutet, dass sich Kurven mit einer kurzen Lebenszeit der Phosphoreszenz (hohe pO_2 Werte) mit denen einer langen Lebenszeit (niedrige pO_2 Werte) überlagern.

4.2.2 Interpretation des monoexponentiellen Fits

In unseren Versuchen wurden die Berechnungen im Wesentlichen so durchgeführt, wie von Vanzetta beschrieben (Vanzetta I 1999). Um Einflüsse des Anregungslichtes zu minimieren wurden die Rohdaten auf den entscheidenden Teil minimiert (Fit Bereich 100 – 480 μ s), anschließend logarithmiert und linear modelliert. Dieser Vorgang entspricht einer monoexponentiellen Analyse der Lebensdauer, der die Gesamtheit der Probe beschreibt. Man geht also von einem homogen verteilten Sauerstoffpartialdruck im Messvolumen aus.

Im Gegensatz zum Tumorgewebe ist dieser in normalem Gewebe stark inhomogen. Ganz allgemein besteht ein Sauerstoffgradient von den Arterien über den gesamten Gefäßbaum verlaufend. In den Lymphgefäßen herrscht der geringste pO_2 der Mikrovaskularisation (Tsai AG 2006; Tsai AG 2004). Dabei zeigen sich mittlere Oxygenierungen zwischen 61,5 mmHg in Arteriolen und 15 mmHg in Venolen (Vovenko E 1999). Diese Werte gelten für gesundes Gewebe und sind für den Tumor mit seinen starken Schwankungen in dem chaotischen Gefäßnetzwerk mit Kalibersprüngen, Spiralbildungen und Pendel- sowie Shuntflüssen nicht zu erwarten. (Goldman E 1907). Im Tumor muss man durch die fehlende Gliederung in Kompartimente von einer sehr viel gleichförmigeren Verteilung des Sauerstoffpartialdrucks ausgehen (Dellian M 1997). So setzt sich die Kurve, die der Berechnung des pO_2 zugrunde liegt, aus vielen einzelnen Kurven zusammen, die jeweils einen unterschiedlichen Sauerstoffpartialdruck besitzen. Dabei addieren sich die Intensitäten der einzelnen Kurven zu einer Gesamtintensität des Messvolumens. Da höhere Partialdrücke einen kürzeren Kurvenverlauf zeigen, kann es sein, dass bei Werten um 100 mmHg nur noch ein geringer Teil der Werte innerhalb des gefitteten Bereichs liegt. Solche Werte würden also nicht mit in die Berechnung eingehen. Paradoxe Weise kann so ein Abfallen der hohen pO_2 Werte in einem solchen gut oxygenierten Kompartiment zu einer Steigerung des berechneten Gesamt- pO_2 führen. Weil nun eine zuvor nicht einbezogene Kurve mitberechnet wird.

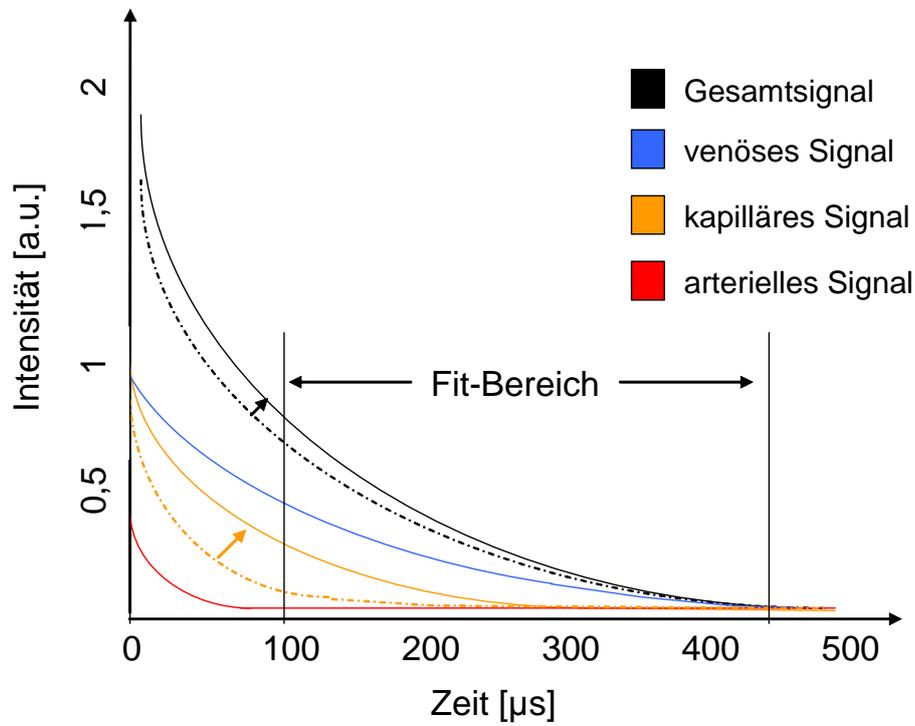


Abbildung 30: Beispielhafte Darstellung unterschiedlicher Quenchingkurven einzelner Kompartimente und die Auswirkungen auf das Gesamtsignal bei Veränderungen derselbigen.

Die Rechnung gewichtet die niedrigen Partialdrücke überproportional. Im Normalfall sind das die venösen oder lymphatischen Kompartimente oder die Bereiche des Gewebes, die hypoxisch und gut genug perfundiert werden, so dass das Palladiumporphyrin in diese gelangt. Wie jedoch auch die in vivo Vorversuche gezeigt haben, stellen die Signale durchaus verwertbare Veränderungen im Gewebe dar, die eine gute Übereinstimmung mit den Daten zeigen, die zum Beispiel mit einer polarographischen Sonde gemessen wurden (Endrich B 1982).

Um bei weiteren Versuchen mit speziellen Fragestellungen wie zum Beispiel Messungen im gesunden Gewebe, differenzierte Aussagen treffen zu können stehen unterschiedliche Möglichkeiten offen. So könnte man über ein weiteres mathematisches Verfahren die einzelnen Kurven auseinander dividieren. Statt eines monoexponentiellen Fit's müsste man das Ergebnis multiexponentiell berechnen.

Dabei könnte man beliebig viele Kurven annehmen und diese einzeln betrachten. Würde man beispielsweise von 100 Kurven ausgehen, hätte man sicherlich einen ausreichenden Eindruck der pO_2 -Verteilung. Durch diese rein mathematische Lösung fehlt natürlich die räumliche Auflösung dieser Datenmenge. Über die Herkunft der unterschiedlichen Werte müssten wieder Annahmen gemacht werden. Außerdem erfordert die praktische Umsetzung dieses Lösungsansatzes ein hervorragendes Signal – Rausch – Verhältnis.

Will man in Arealen mit großen Sauerstoffpartialdruckschwankungen auf sehr kleinem Raum, zum Beispiel am Gefäßrand, höchauflösende Messergebnisse erhalten, scheint es mir sinnvoller den Messbereich weiter einzuschränken, um so das Messfeld in einen Bereich zu versetzen, in dem man ohne größere Einschränkungen von einem nahezu homogenen Areal ausgehen kann. Es wäre möglich mit einer Blende vor dem Photomultiplier ein Gebiet zu definieren und ausschließlich in diesem zu messen. Ebenfalls könnte mit einem entsprechenden Objektiv eine Vergrößerung erreicht werden, in der man von einem Kompartiment im Sinne eines Sauerstoffpartialdruckbereichs ausgehen kann. Einleuchtenderweise kann man so sehr einfach „sehen“, um welches Gewebe oder welche Struktur es sich handelt. Um den Überblick über eine gesamte Region zu erhalten, müssten mehrere Stichproben gemittelt werden. Bei diesem Ansatz würde sich lediglich die Signalintensität verringern, das Signal – Rausch – Verhältnis könnte weiterhin gleich bleiben. Das Verstärken des Signals ist auch praktisch deutlich leichter zu bewerkstelligen. Erste Versuche mit einer Lochblende haben bereits gezeigt, dass mit unserem Setup solche Messungen möglich sind.

Eine sehr elegante jedoch auch aufwendiger Möglichkeit wäre die Verwendung eines konfokalen Mikroskops (Mik EG 2004). Ein Laserstrahl der die Probe fokussiert beleuchtet wird gerastert über diese gefahren, das Bild wird im Rechner zusammengesetzt. Besonders interessant ist hierbei, dass durch eine weitere Blende in der Zwischenbildebene des Strahlengangs eine bestimmte Ebene innerhalb der Probe fokussiert wird. So wird ein extrem kleines Areal isoliert betrachtet.

Um, wie in dieser Arbeit geschehen, die Mikrozirkulation mit der Gewebeoxygenierung zu untersuchen, musste ein Sauerstoffpartialdruck mit der Gefäßarchitektur korreliert werden. Dies erfordert zwangsweise ein größeres Messareal. Vorversuche haben gezeigt, dass das Gesamtsignal dem interstitiellen

Signal entspricht, die Messungen mit der monoexponentiellen Berechnung im Tumor mit dem verwandten Setup valide sind.

4.2.3 Die räumliche und zeitliche Unschärfe der Messung

Über die Jahre hat sich gezeigt, dass die Sauerstoffverteilung im Tumor extrem heterogen ist. Außerdem sind mit diesem Setup noch keine Daten geliefert worden, die die Sauerstoffverteilung auf der mikrozirkulatorischen Ebene in allen vier Dimensionen (Raum und Zeit) auflösen. So birgt jede Messung ein gewisses Maß an Unsicherheit in Bezug darauf, wie repräsentativ die Messung für den Tumor als Ganzes ist. Darüber hinaus zeigt sich die Tumoroxygenierung auf mikroregionaler Ebene als sehr instabil. Tumorregionen zeigten in Untersuchungen deutliche Instabilitäten des Sauerstoffpartialdrucks über die Zeit. Sich wiederholende Episoden von Hypoxie und Reoxygenierung wechseln sich mit einer Periodik von fünf bis sieben Malen pro Stunde ab (Braun R 1999; Dewhirst MW 1998). Hier wird allerdings das Problem welches im Punkt 4.2 beschrieben wurde, zum Vorteil. Durch ein relativ großes Messareal können sich die Mikroregionen, die ständig in Veränderung begriffen sind, gegenseitig ausgleichen. Das gleiche Prinzip verfolgt das Sammeln einer möglichst großen Anzahl verschiedener Messpunkte. Gegenseitige Veränderungen, die im Tumor entstehen, mitteln sich so aus dem Ergebnis.

4.2.4 Das Modell der transparenten Rückenhautkammer

Bereits im Jahre 1980 wurde das Modell der transparenten Rückenhautkammer des syrischen Goldhamsters am Walter Brendel Zentrum München (ehemals Institut für Chirurgische Forschung) von Endrich und Mitarbeitern entwickelt (Endrich B 1980; Asaishi K 1981; Goetz A 1987). Über die Jahre hat sich dieses syngene Modell in der internationalen Mikrozirkulationsforschung etabliert und bewährt. So wurden mit diesem Modell vielfältige Untersuchungen sowohl im normalen als auch im Tumorgewebe durchgeführt. Beispielsweise Untersuchungen über vasoaktive Substanzen (Funk W 1983; Goetz A 1987), Anästhetika (Franke N 1982; Franke N et Endrich B 1983), Hämodilution (Oda T 1984; Nolte D 2000), Hypo- und Hyperthermie (Reinhold HS et Endrich B 1986; Dellian M 1993; 1994), Stoßwellen und photodynamische Therapie (Dellian M 1993; 1994; 1995; 1996; Gamarra F 1993;

Leunig M 1994). Meist wurden diese Untersuchungen durch Intravitalmikroskopie am wachen Tier gewonnen, welches eine kontinuierliche Beobachtung des Tumors oder des Normalgewebes über einen längeren Zeitraum ermöglicht. Ein weiterer Vorteil, den die Beobachtung am wachen Tier darstellt, ist die Tatsache, dass weder Inhalationsnarkotika noch Injektionsnarkotika verwendet werden müssen. So kann man elegant die kontroverse Diskussion über die Beeinträchtigung von Narkosemitteln auf Durchblutung, Oxygenierung, Energiestoffwechsel etc. umgehen (Zanelli GD 1975; Franke N 1982; Okunieff P 1988; Menke H et Vaupel P 1988). Gegenstand dieser Arbeit war es, eventuelle Zusammenhänge der Tumoroxygenierung mit der Gefäßarchitektur darzustellen. Für eine direkte Beobachtung der Mikrozirkulation und einer gleichzeitigen nicht invasiven optischen Sauerstoffpartialdruckmessung erscheint das Modell der transparenten Rückenhautkammer als gut geeignet.

4.2.5 Das amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3

Fortner et al. beschrieb im Jahre 1961 erstmals das spontan entstandene amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3, welches in diesen Versuchen verwendet wurde. Es zeichnet sich durch eine Angehrate von 100% aus und zeigt ein rasches Wachstum sowie eine frühzeitige Metastasierung. Diese verläuft primär lymphogen entlang der axillären und inguinalen Lymphknotenstationen. Pelvine oder thorakale Lymphknotenmetastasen sowie Organmetastasen in Lunge, Niere und Leber finden sich nach Implantation erst im fortgeschrittenen Stadium. Bisher wurden keine spontanen Regressionen beobachtet (Fortner JG 1961). Dennoch hat dieser Tumor so wie jeder andere, der bisher in einem Kammermodell verwendet wurde, eine limitierte Aussagekraft. Es handelt sich hierbei immer um transplantierbare Zelllinien oder verpflanzte Tumorproben. Deshalb könnte es sein, dass der Tumor und dessen Gefäßarchitektur sich anders auf Behandlungsregime oder injizierte Substanzen verhält, als ein Tumor, der primär entstanden ist (Falk P 1982; Field SB 1991). Außerdem spielt beim Betrachten der Mikrozirkulation natürlich das Alter der Tumoren eine Rolle. Der in mehrere Schritte untergliederte Prozess der Angiogenese umfasst im Groben drei Phasen. Zuerst eine avaskuläre Phase, in der aus den Wirtsgefäßen bereits die Tumorangio-genese beginnt, der Tumor aber noch nicht an Größe gewinnt. Darauf die frühe Phase der Tumovaskularisation, in der die

Tumormikrozirkulation ausgebildet wird, und der Tumor zu wachsen beginnt. Als Drittes die fortgeschrittene Phase der Tumolvaskularisation mit auf hohem Niveau anhaltender neoangiogenetischer Aktivität und Umbauprozessen im reifen weiter wachsenden Tumor (Vajkoczy P 1998). In diesen Versuchen wurden unterschiedliche Zeitpunkte zur Datenerhebung gewählt, mit dem Ziel, eine Gruppe in der zweiten, die andere in der dritten Phase zu messen. Im amelanotischen Hamstermelanom ist die zweite Phase zeitlich allerdings relativ kurz ausgeprägt, was zu geringen Unterschieden in den Gruppen geführt hat. Auch die genaue Zuordnung zu den einzelnen Phasen kann makroskopisch schlecht erfolgen und wurde hier über die verschieden langen Anwachsdauern erreicht. So kann man statistisch davon ausgehen, dass sich die meisten der untersuchten Tumore in der entsprechenden Phase befinden.

Um einer weiteren möglichen Fehlerquelle zu begegnen, wurden die Tiere einer täglichen visuellen Kontrolle mit dem Photomakroskop unterzogen. So konnten die Präparation der Kammer und das Tumorstadium stetig überwacht und kontrolliert werden, um so die Einschlusskriterien einer intakten Mikrozirkulation zu erfüllen. Besonders wurde hierbei auf eventuelle Eiteransammlungen, Blutungen, Anzeichen einer Entzündung oder traumainduzierte Neovaskularisationen geachtet. Zudem wurden Ödembildungen oder eine ausgeprägte Stase in den Gefäßen des Kammerareals ausgeschlossen. Um eine repräsentative Tumorperfusion zu beobachten, müssen diese Kriterien, die sowohl den Tumor selbst als auch das umliegende Wirtsgewebe betreffen, beachtet werden (Zweifach BW 1973; Asaishi K 1981; Goetz A 1987).

4.2.6 Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie

Zur quantitativen Analyse der Tumorzirkulation, die der Messung des Sauerstoffpartialdruckes gegenübergestellt wurde, wurde die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie verwendet. Als Basis der Messung dienen hierbei eine Lichtquelle für Epi- und/oder Transillumination, ein Mikroskop, eine hochempfindliche Kamera und entsprechende Fluoreszenzfarbstoffe.

Hiermit kann die Quantifizierung der Tumormikrozirkulation im A-mel-3 durchgeführt werden. Näher betrachtet werden die funktionelle Gefäßdichte, die Erythrozythenfließgeschwindigkeit, die Gefäßdurchmesser und der Blutvolumenfluss.

So kann die Mikrozirkulation des Tumors relativ scharf eingegrenzt und beschrieben werden. Dennoch muss betont werden, dass im lebenden Organismus eine beachtliche Zahl an weiteren Einflussgrößen wie zum Beispiel der Hämatokrit, die Viskosität, die Zellstabilität und deren Adhäsionskräfte eine wichtige Rolle spielen (Jain RK 1988; Intaglietta M et Zweifach BW 1974).

Außerdem stellen auch Fluoreszenzfarbstoffe, wie nahezu jeder iatrogen zugeführte Stoff, unter bestimmten Umständen ein Problem dar. Sie können in der Zelle akkumulieren und nach intensiver Beleuchtung zu phototoxischen Reaktionen in den Zellen und zu deren Zelltod führen (Miller FN 1992; Saetzler RK 1997; Steinbauer M 2000). Dies wird in unterschiedlichen Studien als therapeutischer Ansatz genutzt, ist aber in diesem Fall nicht erwünscht. Um phototoxische Effekte zu vermeiden wurde, die von Steinbauer et al. empfohlene, Beleuchtungsintensität von einem Milliwatt pro Quadratcentimeter je Bildaufnahme nicht überschritten. Untersuchungen zur Photodynamischen Therapie haben gezeigt, dass bei dem hier verwendeten experimentellen Setup keine photodynamischen Effekte zu erwarten sind (Leunig M 1994; Dellian M 1995). Allerdings wurde in keiner dieser Untersuchungen ein weiterer Farbstoff eingesetzt. Auch in der Fachliteratur wurden bisher keine Untersuchungen zu eventuellen synergetischen Effekten von Palladiumporphyrin und dem hier verwendeten FITC – Dextran publiziert. Vielleicht muss man hier in Zukunft mit besonderer Vorsicht arbeiten. Eventuell können und müssen in diesem Bereich exaktere Filter oder andere Versuchsaufbauten toxische oder verändernde Effekte verhindern.

Über die Güte dieser Methode und deren Aussagekraft wurden am Walter Brendel Zentrum München (ehemals Institut für Chirurgische Forschung) in verschiedenen Arbeitsgruppen wie Endrich, Goetz, Nolte, Leunig bereits ausgiebige und detaillierte Arbeiten (Asaishi K 1981; Endrich B 1982; 1988; Leunig M 1992; 1994; Nolte D 1997) und Dissertationen (Goetz 1987; Fritsch 1996; Sinitsina 2000) veröffentlicht. Zur Beantwortung weiterer Fragen bezüglich dieses Themas sein auf diese verwiesen.

4.3 Diskussion der Messergebnisse

4.3.1 Definition der Hypoxie

Um die Ergebnisse zu interpretieren wird zunächst der Ausdruck Tumorphypoxie definiert. In einer zunehmenden Zahl von Arbeiten wird von Hypoxie in unterschiedlichen Zusammenhängen und mit unterschiedlichen Bedeutungen gesprochen. Gerade wenn mehrere Fachrichtungen wie die Biologie, die Physiologie und die klinische Forschung dieses Gebiet beleuchten, kommt es fast zwangsläufig immer wieder zu Missverständnissen.

Gewebehypoxie entsteht durch eine unzureichende Versorgung mit Sauerstoff, die das Aufrechterhalten der biologischen Funktionen gefährdet (West JB 1999). Nun gibt es verschiedene Ursachen, die ein Gewebe hypoxisch werden lassen:

Erstens ein niedriger arterieller Sauerstoffpartialdruck, zum Beispiel auf Grund einer Lungen- oder Herzerkrankung oder eines niedrigen Partialdruckes in der Atemluft wie es beim Aufenthalt in großen Höhen der Fall ist (hypoxämische Hypoxie); Zweitens eine verminderte Fähigkeit des Blutes Sauerstoff zu transportieren im Sinne einer Anämie, Methhämoglobinbildung oder einer Kohlenstoffmonoxidvergiftung (anämische Hypoxie); Drittens eine erniedrigte Gewebesperfusion, sei es generell oder lokal begrenzt (zirkulatorische oder ischämische Hypoxie); Viertens Entartung der Diffusionsgeometrie mit einer Vergrößerung der Diffusionsstrecke oder gleichlaufende, verglichen mit gegenlaufenden Blutströmen im Mikrozirkulationssystem (Diffusionshypoxie); Fünftens Unfähigkeit der Zellen, den antransportierten Sauerstoff zu nutzen, beispielsweise durch Intoxikation mit Cyanid (histotoxische oder zytotoxische Hypoxie). Auf Grund eines komplexen und fein abgestimmten Regulationsmechanismus werden im Normalfall erhöhte Erfordernisse zum Beispiel mit einem erhöhten Blutvolumenfluss ausgeglichen und führen bis zu deren Versagen nicht zu einer Gewebshypoxie.

Biochemiker definieren Hypoxie für gewöhnlich als sauerstofflimitierten Elektronentransport (Boyer PD 1977). Physiologen und klinische Forscher dagegen definieren Hypoxie als eine reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit oder niedrige Sauerstoffpartialdrücke, die zu einer Funktionseinschränkung von Organen, Geweben oder Zellen führen (Honig CR 1988; Zander R 1985;). Anoxie wird übereinstimmend als Sauerstoffpartialdruck von null mmHg beschrieben.

Problematischerweise wird im Tumor durch seine chaotische Diffusionsgeometrie und seine strukturellen Abnormitäten ein ständiger Funktionsverlust festgestellt. Anämie und Methhämoglobinbildung tun ein Übriges zu diesem. Es entstehen Gebiete mit sehr niedrigen Sauerstoffpartialdrücken, die gleich neben gut versorgten Arealen liegen. Hier kann Hypoxie also nicht über funktionelle Defizite definiert werden. Eine Definition für Tumorgewebe geben Höckel und Vaupel mit der metabolischen Hypoxie (Höckel M 2001). Dabei hilft die Tatsache, dass bei ausreichend vorhandenem Sauerstoff die Adenosintriphosphatproduktion (ATP) im Tumorgewebe mit derjenigen im Normalgewebe vergleichbar ist. Diese Produktion wird zum Energiegewinn der Zelle und zur Aufrechterhaltung der Ionengradienten benötigt und findet trotz der chaotischen Verhältnisse im Tumor statt. Definitionsgemäß kommt es zu einer Hypoxie, wenn der mitochondriale Sauerstoffverbrauch abnimmt und die Produktion von ATP sich verringert. Messungen im Tumorgewebe haben gezeigt, dass der Bereich in dem die ATP Konzentration von ihrem konstanten Ausgangswert absinkt, bei etwa acht bis zehn mmHg liegt (Vaupel P 1994; Schaefer C 1992). Exakt in diesem Bereich liegen zahlreiche unserer Messwerte. Mittelt man die Sauerstoffpartialdrücke in den einzelnen Messbereichen und Messzeitpunkten erhält man Werte zwischen 8,3 mmHg im zentralen Bereich an Tag fünf und 14,1 mmHg im peripheren Bereich an Tag 8. In einer älteren Studie unserer Arbeitsgruppe, in der in derselben Tumorzelllinie, jedoch mit einer polarographischen Sonde Sauerstoffpartialdrücke gemessen wurden, wurden Ergebnisse erzielt die sich mit unseren Werten decken (Babilas P 2005; Endrich B 1982). In diesen Bereichen kann die oxidative Phosphorylierung bis zu einem Sauerstoffpartialdruck von bis zu 0,5 mmHg weitergehen (Marshall RS 1986; Starlinger H 1972; Froese G 1962; Robiolio M 1989). Diese ist allerdings von der Zelllinie und deren respiratorischen Kapazität abhängig. Beispielsweise kam es im Fibrosarkom der Maus solange nicht zu einem Abfall der ATP Konzentration, solange der durchschnittliche Sauerstoffpartialdruck über 10 mmHg gehalten wurde (Vaupel P 1994). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in Untersuchungen an Tumoren der Ratte (Kruger W 1991, Vaupel P 1992). Außerdem spielen viele weitere Faktoren wie Temperatur, pH etc. eine Rolle. Obwohl einem mit dieser Definition ein auf den ersten Blick relativ handfester Rahmen gegeben wird, betonen die Autoren ganz besonders, dass in biologischen

Systemen kein exakter Grenzwert genannt werden kann, ab dem ein geringer Sauerstoffpartialdruck zum Problem wird.

4.3.2 Sauerstoffpartialdruck im A-Mel-3 Tumor

Die Sauerstoffpartialdruckwerte unserer Messungen liegen zwischen 0 und 25 mmHg, also in den Bereichen, welche in der Literatur für das amelanotische Melanom beschrieben werden (Endrich B 1982; Babilas P 2005). Im Mittel findet sich ein Wert um 10 mmHg. Im Vergleich mit einer polarographischen Methode zeigt sich, dass es sich um vergleichbare reproduzierbare Messungen handelt. Diese Werte, die teilweise sehr nah an oder in den unter 4.3.1 beschriebenen hypoxischen Bereichen (ab 8-10 mmHg) liegen, können schwerlich als definitiv hypoxisch bezeichnet werden. Dennoch ist es leicht vorstellbar, dass sich gerade in den zentralen Abschnitten der älteren Gruppe, in denen sich auch teilweise Nekrosen gebildet hatten, hypoxische Bereiche befanden.

4.3.3 Zusammenhang zwischen Tumormikrozirkulation und Oxygenierung

Überraschenderweise konnten keine signifikanten mikroarchitektonischen Veränderungen mit einem Abfallen des Sauerstoffpartialdrucks korreliert werden. Zwar sind Tendenzen in den Parametern der Mikrozirkulation zu erkennen, die man bei veränderten pO_2 – Werten erwarten würde, wie zum Beispiel eine leicht erhöhte Fließgeschwindigkeit in den peripheren Zonen oder eine leicht höhere Gefäßdichte bei leicht höheren pO_2 Werten im Vergleich zu den zentralen Bereichen. Außerdem findet man beispielsweise tendenziell höhere Sauerstoffpartialdrücke bei höherem Blutvolumenfluss. Wenn man den Sauerstoffpartialdruck der Gruppen untereinander vergleicht wird deutlich, dass tendenziell höhere Werte in den peripheren Randbereichen und in der älteren Messgruppe (D8) zu finden sind. Doch kann man sich, wenn man von einer bzw. den maßgeblichen Einflussgrößen für den Sauerstoffpartialdruck ausgeht, dem fehlenden Zusammenhang dieser Größen nicht verschließen. Auch die Korrelationen fielen in diesem Sinne negativ aus. Es konnte keine Signifikanz zwischen den einzelnen Parametern und dem pO_2 gefunden werden. Natürlich gibt es einige in den vorherigen Punkten beschriebene

Unsicherheiten, die keine definitiven Aussagen zulassen. Dennoch kann man anhand dieser Ergebnisse folgern, dass in den untersuchten Tumoren (A-Mel-3) zu den beschriebenen Zeitpunkten der Sauerstoffpartialdruck nicht mit den klassischen Mikrozirkulationsparametern wie der Gefäßdichte, dem Blutvolumenfluss, der Fließgeschwindigkeit und den Durchmessern in direktem Zusammenhang steht. Die Struktur der Mikrozirkulation im Tumor, welche durch eine Vielzahl von verschiedenen proangiogenetischen Stoffen, die unsystematisch von den entarteten Zellen ausgeschüttet werden, wird aus einem chaotischen Gefäßnetzwerk mit Kalibersprüngen, Spiralbildungen und Pendel- sowie Shuntflüssen gebildet (Goldman E 1907). Man kann sich durchaus vorstellen, dass diese Gefäßarchitektur keine sinnvollen funktionierenden Regelmechanismen bereitstellt, die den Sauerstoffpartialdruck in seinen Regelgrenzen hält. Die Versuche des ständig wachsenden Tumorgewebes die schlechte Versorgungslage zu überwinden, indem massiv proangiogenetische Substanzen ausgeschüttet werden, führen allerdings nicht zu einem effektiv funktionierenden vaskulären System, sondern zu einem „Machwerk“. Dieses bewegt sich durch das ständige Zellwachstum auf der einen und die ständig neu entstehenden Blutwege auf der anderen Seite immer im Randbereich der Hypoxie. Eine Reserve, wie sie im normalen Gewebe vorhanden ist, scheint nicht vorhanden. Sie kann deshalb auch nicht reguliert werden. Zu Beginn der Arbeit steht das Schema der Tumoroxygenierung (Abb. 2), welches die Einflussgrößen der Tumoroxygenierung beschreibt. Überträgt man nun den fehlenden Zusammenhang der Sauerstoffverfügbarkeit, welcher maßgeblich von den Mikrozirkulation bestimmt wird, auf dieses Schema, liegt der Schluss nahe, dass die Tumoroxygenierung nicht über die Verfügbarkeit geregelt wird, sondern über den Verbrauch. Der pO_2 würde also weniger von dem Netzwerk bestimmt und geregelt, als durch die alleinige Anzahl der Zellen, die in direktem Konkurrenzkampf um Metabolite, Sauerstoff und Abtransport der Abfallprodukte miteinander stehen. Möglicherweise sind zu Beginn des Tumorwachstums eher mit Zusammenhängen in der Oxygenierung und den Mikrozirkulationsparametern zu rechnen. Bei geringerer Tumormasse wäre der Sauerstoffpartialdruck vielleicht weniger durch den Verbrauch als durch die Verfügbarkeit bestimmt. Zu solch frühen Zeitpunkten wäre allerdings auch die Extravasation des Palladiumporphyrins, welche Grundvoraussetzung für die Sauerstoffpartialdruckmessung ist, nicht ausreichend. Natürlich kann in biologischen Systemen meist nicht von einem einfachen Ursache Wirkungsprinzip ausgegangen

werden, doch scheint der Verbrauch in diesem Fall mehr Einfluss an der Tumoroxygenierung zu haben als bislang vermutet. Das könnte eine mögliche Erklärung für die fehlenden Zusammenhänge sein.

5. Zusammenfassung

Nach wie vor ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern nach den Erkrankungen des Herzkreislaufsystems. Dabei stellt der Sauerstoffpartialdruck im Tumor eine enorm wichtige Einflussgröße auf das Wachstum, die Progredienz, die Metastasierung, die Therapieeffizienz und das Überleben der Patienten mit Tumorerkrankung dar.

Die Mikrozirkulation reguliert im gesunden Gewebe den pO_2 . In wie weit diese Parameter im Tumorgewebe Einfluss auf den Sauerstoffpartialdruck haben ist bislang nicht näher erforscht. Ziel dieser experimentellen Arbeit war es daher am Walter Brendel Zentrum eine Methode zur Sauerstoffpartialdruckmessung zu etablieren, welche sich mit den bereits existierenden Versuchsaufbauten zur intravitalen Mikrozirkulationsmessung kombinieren lässt. Die Sauerstoffpartialdruckmessung sollte validiert werden, und die Ergebnisse mit den Mikrozirkulationsparametern im soliden Tumor korreliert werden.

Hierzu wurde ein Setup aufgebaut welches sowohl den pO_2 als auch die Parameter der Mikrozirkulation optisch zu erfassen im Stande ist. Die Sauerstoffpartialdruckmessung mittels Phosphoreszenz Quenching musste neu etabliert und validiert werden. Als Quencher kam Pd(II)meso-tetra(4-carboxyphenyl)Porphyrin zum Einsatz. Nach Excitation mit einem Stroboskop wurde die Leuchtdauer mit einem Photomultiplier detektiert und verstärkt, mit einem Oszilloskop gemessen und gespeichert und auf dem Personal Computer auf den entscheidenden Teil minimiert, logarithmiert und linear modelliert. Aus diesen Daten wurde der Sauerstoffpartialdruck berechnet. Die Visualisierung und Erfassung der Mikrozirkulation erfolgte nach Injektion von FITC-Dextran mittels Intravitalfluoreszenz Mikroskopie und digitaler Bildverarbeitung. Gemessen wurde in vivo am Modell der transparenten Rückenhautkammer des syrischen Goldhamsters. Als Tumorzelllinie diente das amelanotische Melanom A-Mel-3. Es wurden Tiere am Tag 5 und am Tag 8 nach Tumorimplantation untersucht. Dabei wurden periphere und zentrale Areale unterschieden. Der pO_2 wurde mit dem Blutvolumenfluss, der Gefäßdichte, der Fließgeschwindigkeit und dem durchschnittlichen Gefäßdurchmesser an den unterschiedlichen Messzeitpunkten und -orten korreliert.

Die neu etablierte pO_2 Messung mittels Phosphoreszenz Quenching zeigte eine valide Korrelation mit bestehenden Sauerstoffpartialdruckmessverfahren. Die Ergebnisse der Sauerstoffpartialdruckmessung sowie intravitale Analyse der Tumormikrozirkulation im amelanotischen Melanom A-MEL-3 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die gemessenen pO_2 – Werte im A-Mel-3 liegen zwischen annähernd 0 und 25 mmHg, im Durchschnitt bei 10 mmHg.
- In der Peripherie des Tumors waren die gemessenen Sauerstoffpartialdruckwerte tendenziell höher als zentral.
- Am Tag 8 wurden tendenziell höhere pO_2 – Werte als am Tag 5 gemessen.
- Die Messwerte sind mit denen einer polarographischen Messung vergleichbar.
- Es besteht keine signifikante Korrelation des Sauerstoffpartialdruckes mit Parametern der Tumormikrozirkulation.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erlauben folgende Schlussfolgerungen:

In den an diesen Zeitpunkten untersuchten A-MEL-3 Tumoren besteht keine Korrelation zwischen den klassischen Mikrozirkulationsparametern und dem Sauerstoffpartialdruck. Die Ursache für diesen fehlenden Zusammenhang bleibt spekulativ. Eine Erklärung könnte der niedrige Sauerstoffpartialdruck im Tumor sein. Dieser befindet sich fast durchgehend am Rande des hypoxischen Bereichs. Die ohnehin chaotische Struktur der Mikrozirkulation im Tumor mit Shunts und Pendelflüßen ohne Regulation und mit fehlender Reserve kann also nur die absolute Mindestversorgung leisten. Der resultierende Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe scheint damit eher durch den regionalen Verbrauch als durch das Sauerstoffangebot determiniert zu sein.

Das etablierte Messverfahren ist geeignet, um in Zukunft den Einfluss antivaskulärer Therapiestrategien auf die Tumoroxygenierung nicht-invasiv zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

Algire, G. H. An adaption of the transparent-chamber technique to the mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* 4, 1-11 (1943).

Algire, G. H. et al. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. *J Natl Cancer Inst* 11, 73-85 (1945).

Altura, B. M., Altura, B. T., Carella, A., Turlapaty, P. D. & Weinberg, J. Vascular smooth muscle and general anesthetics. *Fed Proc* 39, 1584-91 (1980).

Asaishi, K., Endrich, B., Gotz, A. & Messmer, K. Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3. *Cancer Res* 41, 1898-904 (1981).

Babilas, P., G. Liebsch, et al. "In vivo phosphorescence imaging of pO₂ using planar oxygen sensors." *Microcirculation* 12(6): 477-87. (2005).

Baker, M. & Wayland, H. On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* 7, 131-43 (1974).

Begg, A. C. et al. Nitroakridin 3582: a fluorescent nitroacridine stain for identifying hypoxic cells. *Br J Radiol* 56, 970-3 (1983).

Bergers, G. & Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3, 401-10 (2003).

Boegehold, M. A. & Johnson, P. C. Periarteriolar and tissue pO₂ during sympathetic escape in skeletal muscle. *Am J Physiol* 254, H929-36 (1988).

Bohlen, H. G. & Lash, J. M. Resting oxygenation of rat and rabbit intestine: arteriolar and capillary contributions. *Am J Physiol* 269, H1342-8 (1995).

Boyer, P. D. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Annu Rev Biochem* 46, 955-1026 (1977).

Braun, R. D., Lanzen, J. L. & Dewhirst, M. W. Fourier analysis of fluctuations of oxygen tension and blood flow in R3230Ac tumors and muscle in rats. *Am J Physiol* 277, H551-68 (1999).

Clark, L. C., Jr., Kaplan, S., Matthews, E. C. & Schwab, L. Oxygen availability to the brain during inflow occlusion of the heart in normothermia and hypothermia. *J Thorac Surg* 32, 576-82 (1956).

Conzen, P. F. et al. Regional blood flow and tissue oxygen pressures of the collateral-dependent myocardium during isoflurane anesthesia in dogs. *Anesthesiology* 70, 442-52 (1989).

Conzen, P. F. et al. Myocardial contractility, blood flow, and oxygen consumption in healthy dogs during anesthesia with isoflurane or enflurane. *J Cardiothorac Anesth* 3, 70-7 (1989).

Dellian M., Helmlinger, G., F. Yuan, et al.. "Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation." *Nat Med* 3(2): 177-82 (1997).

Dellian, M., Richert, C., Gamarra, F. & Goetz, A. E. Photodynamic eradication of amelanotic melanoma of the hamster with fast acting photosensitizers. *Int J Cancer* 65, 246-8 (1996).

Dellian, M., Abels, C., Kuhnle, G. E. & Goetz, A. E. Effects of photodynamic therapy on leucocyte-endothelium interaction: differences between normal and tumour tissue. *Br J Cancer* 72, 1125-30 (1995).

Dellian, M. et al. High-energy shock waves enhance hyperthermic response of tumors: effects on blood flow, energy metabolism, and tumor growth. *J Natl Cancer Inst* 86, 287-93 (1994).

Dellian, M. et al. Relation between autoradiographically measured blood flow and ATP concentrations obtained from imaging bioluminescence in tumors following hyperthermia. *Int J Cancer* 53, 785-91 (1993a).

Dellian, M. et al. Ischemia and loss of ATP in tumours following treatment with focused high energy shock waves. *Br J Cancer* 68, 26-31 (1993b).

Denekamp, J. "Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours." *Acta Radiol Oncol* 23(4): 217-25. (1984).

Dewhirst, M. W., Braun, R. D. & Lanzen, J. L. Temporal changes in pO₂ of R3230AC tumors in Fischer-344 rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42, 723-6 (1998).

Dinse, G. E., Umbach, D. M., Sasco, A. J., Hoel, D. G. & Davis, D. L. Unexplained increases in cancer incidence in the United States from 1975 to 1994: possible sentinel health indicators? *Annu Rev Public Health* 20, 173-209 (1999).

Doll, R. Are we winning the war against cancer? A review in memory of Keith Durrant. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 4, 257-66 (1992).

Endrich, B., Asaishi, K., Gotz, A. & Messmer, K. Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)* 177, 125-34 (1980).

Endrich, B., A. Goetz, et al. "Distribution of microflow and oxygen tension in hamster melanoma." *Int J Microcirc Clin Exp* 1(1): 81-99. (1982).

Endrich, B., Laprell-Moschner, C., Brendel, W. & Messmer, K. Effects of prolonged cold injury on the subcutaneous microcirculation of the hamster. I. Technique, morphology and tissue oxygenation. *Res Exp Med (Berl)* 181, 49-61 (1982).

Falk, P. Differences in vascular pattern between the spontaneous and the transplanted C3H mouse mammary carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 18, 155-65 (1982).

Fatt, I. Rapid-Responding Carbon Dioxide and Oxygen Electrodes. *J Appl Physiol* 19, 550-3 (1964).

Fenton, B. M., Raubertas, R. F. & Boyce, D. J. Quantification of micro-regional heterogeneities in tumor oxygenation using intravascular HbO₂ saturations. *Radiat Res* 141, 49-56 (1995).

Field, S. B. et al. Are transplanted tumours suitable as models for studies on vasculature? *Int J Radiat Biol* 60, 255-60 (1991).

Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285, 1182-6 (1971).

Folkman, J. & Kalluri, R. Cancer without disease. *Nature* 427, 787 (2004).

Fortner, J. G., Mahy, A. G. & Schrodt, G. R. Transplantable tumors of the Syrian (golden) hamster. I. Tumors of the alimentary tract, endocrine glands and melanomas. *Cancer Res* 21(6)Pt 2, 161-98 (1961).

Franke, N. & Endrich, B. [Effects of halothane and enflurane on the microcirculation]. *Anasth Intensivther Notfallmed* 18, 285-90 (1983).

Franke, N., Endrich, B., Laubenthal, H., Peter, K. & Messmer, K. [The effect of pentobarbital on the microcirculation of skeletal muscles and the subcutis. An animal-experimental study]. *Anasth Intensivther Notfallmed* 17, 11-4 (1982).

Froese, G. The respiration of ascites tumour cells at low oxygen concentrations. *Biochim Biophys Acta* 57, 509-19 (1962).

Funk, W., Endrich, B., Messmer, K. & Intaglietta, M. Spontaneous arteriolar vasomotion as a determinant of peripheral vascular resistance. *Int J Microcirc Clin Exp* 2, 11-25 (1983).

Gamarra, F., Spelsberg, F., Dellian, M. & Goetz, A. E. Complete local tumor remission after therapy with extra-corporeally applied high-energy shock waves (HESW). *Int J Cancer* 55, 153-6 (1993).

Gatenby, R. A. et al. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 14, 831-8 (1988).

Gerlowski, L. E. & Jain, R. K. Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvasc Res* 31, 288-305 (1986).

Goetz, A., Deininger, F. D., Conzen, P. & Brendel, W. Effects of FPL 55712 on leukotriene C4/leukotriene D4-induced vasoconstriction and macromolecular permeability. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 17B, 651-6 (1987).

Goldman, E. The growth of malignant disease in man and lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* 2, 1236-1240 (1907).

Graeber, T. G. et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379, 88-91 (1996).

Gray, L. H., Conger, A. D., Ebert, M., Hornsey, S. & Scott, O. C. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 26, 638-48 (1953).

Gross, M. W., Karbach, U., Groebe, K., Franko, A. J. & Mueller-Klieser, W. Calibration of misonidazole labeling by simultaneous measurement of oxygen tension and labeling density in multicellular spheroids. *Int J Cancer* 61, 567-73 (1995).

Guichard, M., Lespinasse, F. & Malaise, E. P. Influence of buthionine sulfoximine and misonidazole on glutathione level and radiosensitivity of human tumor xenografts. *Radiat Res* 105, 115-25 (1986).

Habazettl, H. et al. Left ventricular oxygen tensions in dogs during coronary vasodilation by enflurane, isoflurane and dipyridamole. *Anesth Analg* 68, 286-94 (1989).

Hammersen, F., Endrich, B. & Messmer, K. The fine structure of tumor blood vessels. I. Participation of non-endothelial cells in tumor angiogenesis. *Int J Microcirc Clin Exp* 4, 31-43 (1985).

Hodgkiss, R. J., Webster, L. & Wilson, G. D. Development of bioreductive markers for tumour hypoxia. *Acta Oncol* 34, 351-5 (1995).

Hoeckel, M. Predictive power of the tumor oxygenation status. *Adv Exp Med Biol* 471, 533-9 (1999).

Hoeckel, M. et al. Oxygen tension distributions are sufficient to explain the local response of human breast tumors treated with radiation alone. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26, 631-6 (1993).

Hoeckel, M., Thews, O. & Vaupel, P. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 18, 243-59 (2001).

Honig, C. *Modern cardiovascular physiology*. (1988).

Intaglietta, M., Johnson, P. C. & Winslow, R. M. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res* 32, 632-43 (1996).

Intaglietta, M. & Zweifach, B. W. Microcirculatory basis of fluid exchange. *Adv Biol Med Phys* 15, 111-59 (1974).

Jain, R. K. Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res* 48, 2641-58 (1988).

Kallinowski, F., Zander, R., Hoeckel, M. & Vaupel, P. Tumor tissue oxygenation as evaluated by computerized-pO₂-histography. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19, 953-61 (1990).

Kim, C. Y. et al. Selection of human cervical epithelial cells that possess reduced apoptotic potential to low-oxygen conditions. *Cancer Res* 57, 4200-4 (1997).

Klyszcz, T., Junger, M., Jung, F. & Zeintl, H. [Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]. *Biomed Tech (Berl)* 42, 168-75 (1997).

Knopp, J. A. & Longmuir, I. S. Intracellular measurement of oxygen by quenching of fluorescence of pyrenebutyric acid. *Biochim Biophys Acta* 279, 393-7 (1972).

Krogh, A. The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J Physiol* 52, 409-15 (1918).

Krogh, A. The supply of oxygen to the tissues and the regulation of the capillary circulation. *J Physiol* 52, 457-74 (1919).

Kruger, W., W. K. Mayer, et al. "Acute changes of systemic parameters in tumour-bearing rats, and of tumour glucose, lactate, and ATP levels upon local hyperthermia and/or hyperglycaemia." *J Cancer Res Clin Oncol* 117(5): 409-15. (1991).

Leunig, M. et al. Interstitial fluid pressure in solid tumors following hyperthermia: possible correlation with therapeutic response. *Cancer Res* 52, 487-90 (1992).

Leunig, M. et al. Photodynamic therapy-induced alterations in interstitial fluid pressure, volume and water content of an amelanotic melanoma in the hamster. *Br J Cancer* 69, 101-3 (1994a).

Leunig, M., Leunig, A., Lankes, P. & Goetz, A. E. Evaluation of photodynamic therapy-induced heating of hamster melanoma and its effect on local tumour eradication. *Int J Hyperthermia* 10, 297-306 (1994b).

Lipowsky, H. H. & Zweifach, B. W. Application of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates. *Microvasc Res* 15, 93-101 (1978).

Longnecker, D. E. & Harris, P. D. Microcirculatory actions of general anesthetics. *Fed Proc* 39, 1580-3 (1980).

Lo, L. W., C. J. Koch, et al. "Calibration of oxygen-dependent quenching of the phosphorescence of Pd-meso-tetra (4-carboxyphenyl) porphine: a phosphor with general application for measuring oxygen concentration in biological systems." *Anal Biochem* 236(1): 153-60. (1996).

Lord, E. M., Harwell, L. & Koch, C. J. Detection of hypoxic cells by monoclonal antibody recognizing 2-nitroimidazole adducts. *Cancer Res* 53, 5721-6 (1993).

Marshall, R. S., Koch, C. J. & Rauth, A. M. Measurement of low levels of oxygen and their effect on respiration in cell suspensions maintained in an open system. *Radiat Res* 108, 91-101 (1986).

Mason, R. P., Rodbumrung, W. & Antich, P. P. Hexafluorobenzene: a sensitive ¹⁹F NMR indicator of tumor oxygenation. *NMR Biomed* 9, 125-34 (1996).

Menke, H. & Vaupel, P. Effect of injectable or inhalational anesthetics and of neuroleptic, neuroleptanalgesic, and sedative agents on tumor blood flow. *Radiat Res* 114, 64-76 (1988).

Miller, F. N., Sims, D. E., Schuschke, D. A. & Abney, D. L. Differentiation of light-dye effects in the microcirculation. *Microvasc Res* 44, 166-84 (1992).

Miller, L. S. et al. Suppression of cytokine-induced neutrophil accumulation in rat mesenteric venules in vivo by general anesthesia. *Int J Microcirc Clin Exp* 16, 147-54 (1996).

Mik EG, van Leeuwen TG, Raat NJ, Ince C. Quantitative determination of localized tissue oxygen concentration in vivo by two-photon excitation phosphorescence lifetime measurements. *J Appl Physiol.* 97(5):1962-9. (2004)

Mueller-Klieser, W., Vaupel, P., Manz, R. & Schmidseder, R. Intracapillary oxyhemoglobin saturation of malignant tumors in humans. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 7, 1397-404 (1981).

Nolte, D., Botzlar, A., Pickelmann, S., Bouskela, E. & Messmer, K. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb) on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster: a study on safety and toxicity. *J Lab Clin Med* 130, 314-27 (1997).

Nolte, D., Pickelmann, S., Lang, M., Keipert, P. & Messmer, K. Compatibility of different colloid plasma expanders with perflubron emulsion: an intravital microscopic study in the hamster. *Anesthesiology* 93, 1261-70 (2000).

Nordmark, M. et al. The relationship between tumor oxygenation and cell proliferation in human soft tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 35, 701-8 (1996).

Oda, T., Lehmann, A. & Endrich, B. Capillary blood flow in the amelanotic melanoma of the hamster after isovolemic hemodilution. *Biorheology* 21, 509-20 (1984).

Okunieff, P. et al. Effects of pentobarbital anesthesia on the energy metabolism of murine tumors studied by in vivo ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Radiat Res* 115, 361-72 (1988).

Papenfuss, H. D., Gross, J. F., Intaglietta, M. & Treese, F. A. A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 18, 311-8 (1979).

Raleigh, J. A., Zeman, E. M., Calkins, D. P., McEntee, M. C. & Thrall, D. E. Distribution of hypoxia and proliferation associated markers in spontaneous canine tumors. *Acta Oncol* 34, 345-9 (1995).

Reinhold, H. S. & Endrich, B. Tumour microcirculation as a target for hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2, 111-37 (1986).

Reynolds, T. Y., Rockwell, S. & Glazer, P. M. Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res* 56, 5754-7 (1996).

Rice, G. C., Hoy, C. & Schimke, R. T. Transient hypoxia enhances the frequency of dihydrofolate reductase gene amplification in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 5978-82 (1986).

Robiolio, M., Rumsey, W. L. & Wilson, D. F. Oxygen diffusion and mitochondrial respiration in neuroblastoma cells. *Am J Physiol* 256, C1207-13 (1989).

Russo, C. A. et al. An anoxia inducible endonuclease and enhanced DNA breakage as contributors to genomic instability in cancer. *Cancer Res* 55, 1122-8 (1995).

Saetzler, R. K. et al. Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 45, 505-13 (1997).

Saltzman, D. J., Toth, A., Tsai, A. G., Intaglietta, M. & Johnson, P. C. Oxygen tension distribution in postcapillary venules in resting skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H1980-5 (2003).

Sanders, A. G. Microcirculation in grafts of normal and malignant tissue. *J. Anat.* 97, 631-632 (1963).

Sanders, A. G., and Shubik P. A transparent window for use in Syrian hamster. *Isr. J. Exp. Med.* 11, 118 (1964).

Sandison, J. C. A new method for the microscopic study of living growing tissue by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat. Rec.* 28, 281-287 (1924).

Schaefer, C., Okunieff, P. & Vaupel, P. Oxygenation and bioenergetic status of murine fibrosarcomas. *Adv Exp Med Biol* 317, 161-7 (1992).

Sewell, I. A. Studies of the microcirculation using transparent tissue observation chambers inserted in the hamster cheek pouch. *J Anat* 100, 839-56 (1966).

Sinaasappel, M. & Ince, C. Calibration of Pd-porphyrin phosphorescence for oxygen concentration measurements in vivo. *J Appl Physiol* 81, 2297-303 (1996).

Starlinger, H. & Lubbers, D. W. [Methodical studies on the polarographic measurement of respiration and "critical oxygen pressure" in mitochondria and isolated cells with membrane-covered platinum electrodes]. *Pflugers Arch* 337, 19-28 (1972).

Steinbauer, M., Harris, A. G., Abels, C. & Messmer, K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 385, 290-8 (2000).

Stern, O., Volmer, M. *Über die Abklingungszeit der Fluoreszenz*. *Physikalische Zeitschrift*, 20, 183-188, (1919)

Stone, H. B., Brown, J. M., Phillips, T. L. & Sutherland, R. M. Oxygen in human tumors: correlations between methods of measurement and response to therapy. Summary of a workshop held November 19-20, 1992, at the National Cancer Institute, Bethesda, Maryland. *Radiat Res* 136, 422-34 (1993).

Teicher, B. A. et al. Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo. *Science* 247, 1457-61 (1990).

Thomas, D. L. The effects of anaesthetics and high pressure on the responses of the rat superior cervical ganglion in vitro. *J Physiol* 374, 387-99 (1986).

Torres Filho, I. P. & Intaglietta, M. Microvessel pO₂ measurements by phosphorescence decay method. *Am J Physiol* 265, H1434-8 (1993).

Tsai, A. G., Cabrales, P., Hangai-Hoger, N. & Intaglietta, M. Oxygen distribution and respiration by the microcirculation. *Antioxid Redox Signal* 6, 1011-8 (2004).

Tsai, A. G., Friesenecker, B., Cabrales, P., Hangai-Hoger, N. & Intaglietta, M. The vascular wall as a regulator of tissue oxygenation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15, 67-71 (2006).

Vajkoczy, P. et al. Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy. *Neoplasia* 1, 31-41 (1999).

Vajkoczy, P., Schilling, L., Ullrich, A., Schmiedek, P. & Menger, M. D. Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multicolor fluorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 18, 510-20 (1998).

Vanderkooi, J. M., Erecinska, M. & Silver, I. A. Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions. *Am J Physiol* 260, C1131-50 (1991).

Vanderkooi, J. M., G. Maniara, et al. "An optical method for measurement of dioxygen concentration based upon quenching of phosphorescence." *J Biol Chem* 262(12): 5476-82. (1987).

Vanderkooi, J. M. & Wilson, D. F. A new method for measuring oxygen concentration in biological systems. *Adv Exp Med Biol* 200, 189-93 (1986).

Vanzetta, I. & Grinvald, A. Increased cortical oxidative metabolism due to sensory stimulation: implications for functional brain imaging. *Science* 286, 1555-8 (1999).

Vaupel, P., Thews, O., Kelleher, D. K. & Hoeckel, M. Oxygenation of human tumors: the Mainz experience. *Strahlenther Onkol* 174 Suppl 4, 6-12 (1998).

Vaupel, P., Thews, O., Kelleher, D. K. & Hoeckel, M. Current status of knowledge and critical issues in tumor oxygenation. Results from 25 years research in tumor pathophysiology. *Adv Exp Med Biol* 454, 591-602 (1998).

Vaupel, P. Effect of lactic acid in tumours on antitumour activity of hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 13, 247-8 (1997).

Vaupel, P. Is there a critical tissue oxygen tension for bioenergetic status and cellular pH regulation in solid tumors? *Experientia* 52, 464-8 (1996).

Vaupel, P., Schaefer, C. & Okunieff, P. Intracellular acidosis in murine fibrosarcomas coincides with ATP depletion, hypoxia, and high levels of lactate and total Pi. *NMR Biomed* 7, 128-36 (1994).

Vaupel, P., Schlenger, K. & Hoeckel, M. Blood flow and tissue oxygenation of human tumors: an update. *Adv Exp Med Biol* 317, 139-51 (1992).

Vaupel, P. "Physiological properties of malignant tumours." *NMR Biomed* 5(5): 220-5 (1992).

Vinogradov, S. A., Dunphy, I. & Wilson, D. F. Oxyphor R2 and G2: phosphors for measuring oxygen by oxygen-dependent quenching of phosphorescence. *Anal Biochem* 310, 191-8 (2002).

Vinogradov, S. A. et al. Noninvasive imaging of the distribution in oxygen in tissue in vivo using near-infrared phosphors. *Biophys J* 70, 1609-17 (1996).

Vovenko, E. Distribution of oxygen tension on the surface of arterioles, capillaries and venules of brain cortex and in tissue in normoxia: an experimental study on rats. *Pflugers Arch* 437, 617-23 (1999).

Weissbach, L. et al. RPLND or primary chemotherapy in clinical stage IIA/B nonseminomatous germ cell tumors? Results of a prospective multicenter trial including quality of life assessment. *Eur Urol* 37, 582-94 (2000).

West, J. *Respiratory physiology - the essentials*. (1999).

Williams, R. G. An adaption of the transparent chamber technique of the skin of the body. *Anat. Rec.* 60, 487-491 (1934).

Wilson, D. F. et al. Tissue oxygen sensing and the carotid body. *Adv Exp Med Biol* 454, 447-54 (1998).

Yamura, H., Suzuki, M. & Sato, H. Transparent chamber in the rat skin for studies on microcirculation in cancer tissue. *Gann* 62, 177-85 (1971).

Young, S. D., Marshall, R. S. & Hill, R. P. Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9533-7 (1988).

Yuan, F. et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res* 55, 3752-6 (1995).

Yuan, F., Leunig, M., Berk, D. A. & Jain, R. K. Microvascular permeability of albumin, vascular surface area, and vascular volume measured in human adenocarcinoma LS174T using dorsal chamber in SCID mice. *Microvasc Res* 45, 269-89 (1993).

Zander, R. & Vaupel, P. Proposal for using a standardized terminology on oxygen transport to tissue. *Adv Exp Med Biol* 191, 965-70 (1985).

Zanelli, G. D., Lucas, P. B. & Fowler, J. F. The effect of anaesthetics on blood perfusion in transplanted mouse tumours. *Br J Cancer* 32, 380-90 (1975).

Zweifach, B. W. Microcirculation. *Annu Rev Physiol* 35, 117-50 (1973).

7. Lebenslauf

Alexander Passon
Erhard Auer Str. 6
80637 München
Tel.: 089 / 15704044
Mobil: 0178 / 5013133
E-mail: alexander.passon@gmail.com

Persönliche Angaben

Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 12.06.80
Geburtsort: München
Eltern: Helmer Passon; Studiendirektor
Rosemarie Passon, geb. Fischl; Lehrerin

Ausbildung

- 09/1990 – **Städtisches Käthe-Kollwitz-Gymnasium München**
09/1994 Neusprachliches Gymnasium mit Latein als erster, Englisch als zweiter und Französisch als dritter Fremdsprache
- 09/1994 – **Staatliches Wittelsbacher-Gymnasium München**
06/1999 Humanistisches und Neusprachliches Gymnasium Abschluss Juni 1999: Abitur, Durchschnittsnote: 1,9
- 09/1999 – **ASB Landesschule Landesverband Bayern e.V.**
01/2000 Ausbildung zum Rettungssanitäter
- 09/1999 – **ASB München**
08/2000 Zivildienst im Rettungsdienst

11/2000 –
04/2007

Ludwig Maximilians Universität München

Studium der Humanmedizin

Ärztliche Vorprüfung Februar 2002:

Gesamtnote gut (2,0)

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung August 2003:

Gesamtnote befriedigend (3,0)

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung März 2006

Gesamtnote gut (1,66)

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung April 2007

Gesamtnote sehr gut (1,0)

Praktika

02/2003 –
03/2003

Dr. med. Peter Bayerl, Internist / Psychotherapie München

08/2004 –
09/2004

**Stiftsklinikum Augustinum, Innere Medizin /
Gastroenterologie München**

08/2005 –
10/2005

**Klinikum Grosshadern, Hals – Nasen – Ohren – Heilkunde
München**

04/2006 –
06/2006

**Royal North Shore Hospital, Thorax- und Neurochirurgie
Sydney Australien**

06/2006 –
8/2006

**Klinikum Traunstein, Allgemeine Chirurgie
Traunstein**

08/2006 –
11/2006

**Stiftsklinikum Augustinum, Innere Medizin
München**

11/2006 –
03/2007

**Urologische Klinik und Poliklinik Innenstadt, Urologie
München**

Berufliche Stationen

10/2007 –
heute

**Assistenzarzt in der urologischen Klinik, Zentralklinikum
Augsburg**