

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität
München

ehemaliger Vorstand: Prof. Dr. med. H.J. Reulen

jetziger Vorstand: Prof. Dr. med. J.-Ch. Tonn

**Photodynamische Therapie experimenteller maligner Gliome mit
5-Aminolaevulinsäure-induziertem Protoporphyrin IX**

Dissertation

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

vorgelegt von
Bernhard Olzowy

aus
München

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. J. Reulen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Baethmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Herms
Prof. Dr. P. Kaudewitz
Prof. Dr. W. Lange

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. W. Stummer

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 10. 2003

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Das Glioblastom	1
1.1.1	Histologische Einordnung	1
1.1.2	Epidemiologische Daten	1
1.1.3	Übliche Therapiekonzepte und ihre Grenzen	2
1.2	Grundlagen der photodynamischen Therapie (PDT)	3
1.3	PDT in der Neurochirurgie	4
1.4	Der 5-Aminolaevulinsäure-induzierte Photosensibilisator Protoporphyrin IX (PpIX)	5
1.5.	Fragestellung dieser Untersuchung	7
2.	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1	Versuchstiere und Haltung	9
2.2	Versuchsgruppen	9
2.2.1	Nicht tumortragend	9
2.2.2	Tumortragend	10
2.3	Zellkultur	11
2.4	Eingriffe an den Versuchstieren	13
2.4.1	Narkose	13
2.4.2	Intravenöse Injektion	14
2.4.3	Kraniotomie	14
2.4.4	Kälteläsion	15
2.4.5	Laserbestrahlung	15
2.4.6	Inokulation der C6-Zellen	17
2.4.7	Magnetresonanztomographie	18
2.4.8	Perfusionsfixierung	18
2.5	Histologie	19
2.6	Messgrößen	19
2.7	Statistische Methoden	20

3.	ERGEBNISSE	21
3.1	PDT an normalem und ödematösem Hirngewebe	21
3.2	Übereinstimmung von Histologie und MRT	25
3.3	PDT an C6-Gliomen	27
4.	DISKUSSION	31
4.1	Material und Methoden	31
4.1.1	C6-Gliom in der Wistar-Ratte	31
4.1.2	Kälteläsionsmodell	32
4.1.3	Bestrahlungsparameter	32
4.2	Ergebnisse	33
4.2.1	Normales Hirngewebe	33
4.2.2	Tumortragendes Hirngewebe	35
4.2.3	Ödematöses Hirngewebe	37
4.2.4	Steroide und PDT	39
5.	ZUSAMMENFASSUNG	41
6.	LITERATURVERZEICHNIS	43
7.	DANKSAGUNG	52
8.	LEBENS LAUF	54

1. EINLEITUNG

1.1 Das Glioblastom

1.1.1 Histologische Einordnung

Das Glioblastom gehört zu der größeren Gruppe der Gliome. Diese werden in der derzeit gültigen WHO-Klassifikation der intrakraniellen Tumoren zusammen mit den Tumoren neuronaler Herkunft unter dem Überbegriff der „Tumoren des neuroepithelialen Gewebes“ zusammengefasst. Nach ihrem Ursprungsgewebe werden die Gliome weiter unterteilt in eine astrozytäre, eine oligodendrozytäre und eine ependymale Reihe, sowie in Mischformen. Von der histologischen Gradierung her werden jeweils niedrig maligne Formen WHO Grad II und eine anaplastische Form WHO Grad III unterschieden. Das hochmaligne Glioblastom (WHO Grad IV) wird der astrozytären Reihe zugeordnet (Kleihues et al., 1991).

Man geht heute von der Existenz dreier verschiedener Formen des Glioblastoms aus. Neben einer seltenen hereditären Form kann man primäre und sekundäre Glioblastome unterscheiden. Die primäre Form entsteht de novo, die sekundäre Form aus einem zunächst vorliegenden, niedriggradigem Gliom. Am häufigsten ist hierbei – entsprechend der heute üblichen Klassifikation – die Entstehung aus Astrozytomen des Erwachsenenalters. Wichtigstes Unterscheidungskriterium in der Abgrenzung zum anaplastischen Astrozytom sind die beim Glioblastom zu beobachtenden flächenhaften Nekrosen. Seltener kann sich auch durch Malignisierung eines Oligodendroglioms ein nicht von einem Glioblastom zu unterscheidender Tumor entwickeln (Schlegel et al., 2001). Anderen Autoren zufolge kann sich auch aus Ependymomen in seltenen Fällen ein Glioblastom entwickeln (Burger, 1990).

1.1.2 Epidemiologische Daten

Die Zahl der Neuerkrankungen an intrakraniellen Tumoren in Deutschland pro Jahr wird für Männer auf 3500, für Frauen auf 2900 geschätzt (Krebsatlas der BRD 1981 – 1990; N. Becker, J. Wahrendorf; Springer 1997). Bei etwa der Hälfte handelt es sich um Gliome. Etwa die Hälfte der Gliome wiederum sind Glioblastome. Der Anteil an der Gesamtzahl der

Hirntumore wird je nach Quelle mit 12-25% angegeben. In jedem Fall ist das Glioblastom der häufigste maligne Tumor des zentralen Nervensystems.

Das Glioblastom ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters. Die überwiegende Mehrheit der Patienten ist zwischen 50 und 70 Jahre alt. Der Altersgipfel liegt bei 57 Jahren. Männer sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Pathologie; W. Remmele, J. Pfeiffer, J.M. Schröder[Hrsg.]; Springer 1995).

1.1.3 Übliche Therapiekonzepte und ihre Grenzen

Die bisherigen Therapieergebnisse in der Behandlung des Glioblastoms sind äußerst unbefriedigend.

Aufgrund der Wachstumsform des Tumors sind der chirurgischen Therapie Grenzen gesetzt. Glioblastome befinden sich in der Regel im tiefen Marklager der Großhirnhemisphären, meist fronto-temporal. Sie bestehen aus einem nekrotischen Zentrum, umgeben von einem Areal mit solide-proliferierendem Tumorgewebe. Dieser Bereich wiederum ist umgeben von einem breiten Saum von Zellen, die das umliegende Normalgewebe diffus infiltrieren. Eine Unterscheidung von normalem Hirngewebe und tumorös veränderten Arealen ist intraoperativ bislang nicht mit letzter Sicherheit möglich. Zudem sind die im Randbereich des Tumors versprengten, maligne transformierten Zellen oft bereits von funktionellem Hirngewebe umgeben. Der Versuch, diese Zellen zu resezieren, wäre daher nicht ohne Schädigung von Normalgewebe möglich, was in der Regel zusätzliche neurologische Störungen zur Folge hat (Kelly et al., 1987). Aus diesen Gründen wird der Nutzen eines operativen Ansatzes kontrovers diskutiert. Neuere Studien allerdings zeigen einen positiven Effekt einer operativen Verringerung der Tumormasse. Sie schafft zudem bessere Voraussetzungen für adjuvante Therapieansätze. Eine möglichst radikale Operation ist daher die Basis der meisten modernen Therapiekonzepte (Burton et al., 2000; Prados et al, 2000; Shapiro et al., 1998 und 1989).

Als zweites Standardverfahren hat sich die postoperative Strahlentherapie etabliert. Hinsichtlich einer Verlängerung der Überlebenszeit stellt sie den wirksamsten Einzelbestandteil in kombinierten Therapieregimen dar (Burton et al., 2000; Prados et al, 2000; Shapiro et al., 1998 und 1989).

Auch verschiedene Chemotherapieschemata wurden erprobt, überzeugende Fortschritte konnten jedoch nicht verzeichnet werden. Während zwischenzeitlich dennoch generell im Anschluss an Operation und Strahlentherapie eine Chemotherapie mit Nitrosoharnstoffen empfohlen wurde (Shapiro et al., 1989), wird inzwischen auch von Befürwortern der Chemotherapie bei älteren Patienten (über 60 Jahre) oft davon abgesehen, da nur bei jüngeren Patienten zufriedenstellende Remissionsraten beobachtet wurden (Burton et al., 2000).

Die bislang nahezu unvermeidbaren Rezidive entstehen überwiegend im Randbereich der ursprünglichen Resektionshöhle (Alberts et al., 1994; Bashir et al., 1988). Deshalb ist anzunehmen, dass die Patienten von einer lokal aggressiveren, aber trotzdem tumorselektiven Ersttherapie profitieren könnten. Als solche könnte ein neuartiges Therapiekonzept, die Photodynamische Therapie (PDT), eine Möglichkeit bieten, die Tumorlast weiter zu reduzieren.

1.2 Grundlagen der Photodynamischen Therapie (PDT)

Die PDT basiert auf der scheinbar selektiven Anreicherung oder Retention bestimmter Farbstoffe, den sogenannten Photosensibilisatoren, in malignem Gewebe. Bei Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge entfalten diese cytotoxische Eigenschaften.

Das Prinzip der Phototoxizität wurde erstmals 1900 von Raab beschrieben. Wimperntierchen, die mit dem Farbstoff Acridin-Orange behandelt worden waren, starben bei zusätzlicher Einwirkung von Licht ab (Raab, 1900). V. Tappeiner prägte für diesen Prozess den Begriff der Photodynamik (v. Tappeiner, 1900). Auf v. Tappeiner gehen auch die ersten klinischen Versuche zurück, in denen Hautkarzinome mit Eosin und Licht behandelt wurden (v. Tappeiner und Jesionek, 1903). Durch Weiterentwicklungen, insbesondere im Bereich der Photosensibilisatoren, hat die PDT seither Eingang in verschiedene Bereiche der Medizin gefunden. In erster Linie in der Behandlung verschiedener Krebserkrankungen hat sie sich als nützlich erwiesen. Zulassungen wurden bislang für bestimmte Neoplasien des Ösophagus, der Harnblase und der Lunge erteilt (Dougherty et al., 1998).

Im Fall der am häufigsten untersuchten Photosensibilisatoren aus der Stoffklasse der Porphyrine scheint Singulett-Sauerstoff das entscheidende, zellschädigende Agens zu sein

(Weishaupt et al., 1976). Dieser wird in einer photochemischen Reaktion gebildet (Foote, 1991). Bei Absorption eines Photons wird das Porphyrinmolekül in einen angeregten Singulett-Zustand überführt, der eine extrem kurze Halbwertszeit hat (weniger als eine Mikrosekunde). Aus diesem kann der Photosensibilisator entweder unter Emission von Fluoreszenzlicht in den Grundzustand zurückfallen, oder durch intramolekulare Umlagerung in einen angeregten Triplett-Zustand übergehen. Aufgrund der etwas längeren Halbwertszeit dieses Triplett-Zustandes (im Millisekundenbereich) kann eine Energieübertragung auf molekularen Sauerstoff stattfinden, wobei das Porphyrinmolekül in den Grundzustand zurückkehrt und Singulett-Sauerstoff gebildet wird. Diese hochreaktive Sauerstoffspezies vermag verschiedene zelluläre Biomoleküle oxidativ zu schädigen, was bei ausreichender Konzentration zum Zelltod führt.

1.3 PDT in der Neurochirurgie

Für die Therapie maligner Gliome wurde die PDT erstmals 1972 vorgeschlagen (Diamond et al., 1972). Seither wurden eine Reihe kleinerer Studien durchgeführt. In der Regel wurde nach präoperativer Applikation der Photosensibilisatoren eine möglichst vollständige chirurgische Resektion der Tumoren durchgeführt. Anschließend wurde mit verschiedenen Methoden Licht möglichst gleichmäßig auf die Oberfläche der Resektionshöhle appliziert (Muller & Wilson, 1995; Popovic, Kaye & Hill, 1996; Kostron et al., 1996; Wharen et al., 1991; Perria et al., 1988). Bei inoperablen Gliomen oder postoperativem Verbleib größerer Tumormassen wurden stereotaktisch lichtleitende Fasern inseriert (Muller & Wilson, 1995; Kostron et al., 1996; Origitano et al., 1994; Powers et al., 1991; Wharen et al., 1991; Perria et al., 1988), da die Eindringtiefe von Licht in Gewebe begrenzt ist.

Die Resultate der ersten klinischen Versuche, die 1980 veröffentlicht wurden, waren eher enttäuschend (Perria et al., 1980). Neuere Heilversuchsserien berichten von marginal verlängerten Überlebenszeiten, insbesondere die beiden größten, in denen jeweils mehr als 50 Patienten behandelt wurden (Muller & Wilson, 1995; Popovic, Kaye & Hill, 1996). Verlässliche, prospektiv randomisierte Studien existieren allerdings bislang nicht.

Diesem nicht sicher belegten Überlebensvorteil stehen teils deutliche Nebenwirkungen gegenüber. In zwei Studien wurde eine Verstärkung des postoperativen Hirnödems beobachtet

(Muller & Wilson, 1995; McCulloch et al., 1984). Zudem rufen die bislang verwendeten Photosensibilisatoren Hematoporphyrinderivat (HpD), und seine gereinigten Abkömmlinge Porfimer Sodium (Photofrin®) und Dihematoporphyrinether (Photofrin II®) eine lang anhaltende Photosensibilisierung der Haut hervor, welche die Patienten dazu zwingt, direktes und indirektes Sonnenlicht für bis zu zwei Monate zu meiden (Muller & Wilson, 1996; Popovic, Kaye & Hill, 1996). Diese Tatsache fällt angesichts der begrenzten Überlebenszeit der Patienten besonders ins Gewicht.

Schon auf experimenteller Ebene haben die genannten Photosensibilisatoren gravierende Schwächen. So entstand bei tierexperimenteller Anwendung auch an gesundem Hirngewebe nicht unerheblicher Schaden (Cheng et al., 1984; Dereski et al., 1989 und 1991). Zudem fehlt Evidenz für Mechanismen, die eine selektive Akkumulation oder Retention in Gliomgewebe erklären könnten. Die scheinbar selektive Anreicherung kommt vermutlich nur über einen im Tumorbereich verstärkten Übertritt der Photosensibilisatoren ins Gewebe zustande, der sich durch die tumorbedingte Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke erklärt. Von hier werden sie mit dem Massenfluss des tumorassoziierten Hirnödems auch in tumorfreie Areale transportiert (Stummer et al., 1993), wodurch das Risiko einer unkontrollierten Zerstörung von Normalgewebe zusätzlich verstärkt wird.

1.4 Der 5-ALA-induzierte Photosensibilisator Protoporphyrin IX (PpIX)

Anders könnte es sich mit einem neuartigen Photosensibilisator, der 5-Aminolaevulinsäure (5-ALA), verhalten. Diese - selbst nicht photoaktive - Substanz ist Vorläufer der phototoxisch wirkenden Verbindung Protoporphyrin IX (PpIX). Die Umsetzung von 5-ALA zu PpIX erfolgt über Enzyme des Häm-Stoffwechsels. Die Zellen bestimmter Tumoren weisen im Vergleich zu Normalgewebe Besonderheiten in der Aktivität dieser Enzyme auf und bedingen hierdurch eine tumorselektive Anreicherung von PpIX.

Der Eisen(II)-Komplex des PpIX, Häm, ist Bestandteil wichtiger Biomoleküle wie Hämoglobin, Myoglobin und der Cytochrome der Atmungskette. Mit Ausnahme reifer Erythrozyten sind alle Zellen des menschlichen Körpers fähig, Häm zu synthetisieren. Im ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Häm-Synthese wird aus Glycin und Succinyl-CoA 5-ALA gebildet. Die Bildung von 5-ALA wird durch die Menge von Häm in

der Zelle reguliert. Im letzten Schritt wird, katalysiert durch das Enzym Ferrochelatase, Eisen in PpIX eingebaut. Bei exogener Zufuhr von 5-ALA kann aufgrund der beschränkten Kapazität der Ferrochelatase PpIX akkumulieren. Ein weiteres Enzym des Hämstoffwechsels ist Porphobilinogendesaminase, welches die Bildung von Uroporphyrinogen aus Porphobilinogen katalysiert. In bestimmten Tumoren ist die Aktivität dieses Enzyms erhöht (Leibovici et al., 1988; Schoenfeld et al., 1988; Kondo et al., 1993), während die Aktivität der Ferrochelatase erniedrigt ist (Rubino und Rasetti, 1966; Schoenfeld et al., 1988; Kondo et al., 1993; Dailey et al., 1984; Smith, 1987; El-Sharabasy et al., 1992; van Hillegersberg et al., 1992). Nach Gabe von 5-ALA akkumuliert PpIX daher bis zu einem gewissen Grad selektiv in solchen Tumoren (Kennedy et al., 1990; Peng et al., 1997).

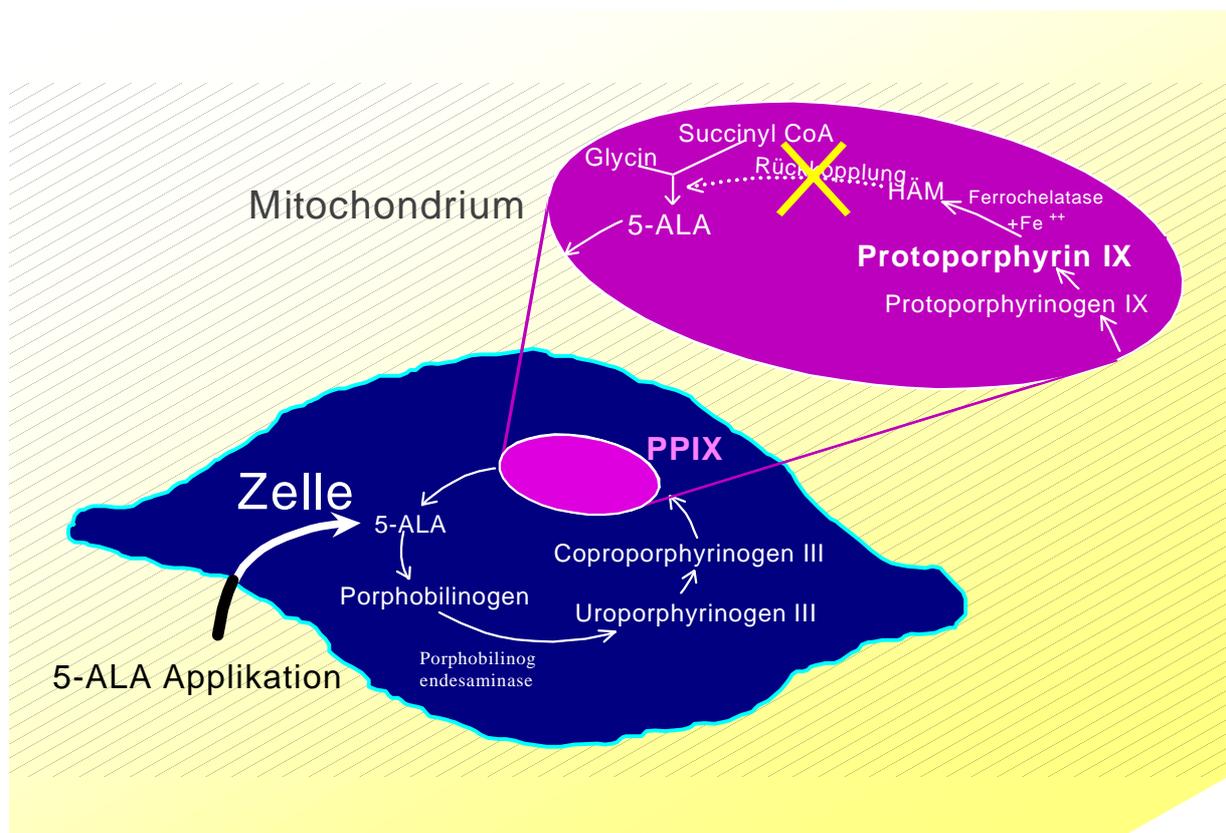


Abb. 1: Häm-Biosynthese und 5-ALA-Applikation.

Da die negative Rückkopplung der zellulären Häm-Konzentration auf den Schritt der ALA-Synthese wirkt, wird sie durch exogene Zufuhr von 5-ALA umgangen. Eine gesteigerte Aktivität der Porphobilinogendesaminase sowie eine verminderte Aktivität der Ferrochelatase gegenüber Normalgewebe in bestimmten Tumoren führt hier zu einer selektiven Anreicherung des Photosensibilisators PpIX.

Auch für maligne Gliome konnte eine selektive PpIX-Anreicherung nach 5-ALA-Applikation nachgewiesen werden. In seiner Eigenschaft als Fluoreszenzfarbstoff wird 5-ALA-induziertes PpIX bereits erfolgreich zur fluoreszenzgesteuerten Resektion maligner Gliome verwendet. Anhand der histologischen Aufarbeitung von Biopsien aus dem Tumorrandbereich konnte dabei klar gezeigt werden, dass die PpIX-Synthese hochspezifisch für Gliomgewebe ist und in gesundem Hirngewebe nicht auftritt (Stummer et al., 1998/1 und 2000).

Neben seiner Eigenschaft als Fluoreszenzfarbstoff ist PpIX auch ein potenter Photosensibilisator (Malik & Lugaci, 1987; Kennedy & Pottier, 1992). Im Gegensatz zu Hematoporphyrinderivaten beschränken sich die Nebenwirkungen von 5-ALA auf einen leichten Anstieg der Leberwerte und eine Hautsensibilisierung von weniger als 48 Stunden Dauer (Grant et al., 1993; Loh et al., 1993; Regula et al., 1995; Webber et al., 1997; Stummer et al., 1998/1). In Verbindung mit der hochselektiven Anreicherung in Gliomgewebe erfüllt 5-ALA daher alle Voraussetzungen für die PDT maligner Gliome.

1.5 Fragestellung dieser Untersuchung

Bislang bestehen keinerlei Erfahrungen mit der PDT mit 5-ALA-induziertem PpIX in der Behandlung maligner Gliome.

Im Vorfeld einer Anwendung an Patienten war es daher notwendig, eine Schädigung von Normalgewebe durch die Therapie so sicher wie möglich auszuschließen. Hierzu wurde im Tierexperiment der Effekt hochdosierter 5-ALA-PDT auf normales Hirngewebe untersucht. Da sich im Randbereich maligner Gliome in der Regel ein ausgeprägtes Hirnödem findet, musste zudem die Möglichkeit einer unspezifischen Schädigung ödematösen Hirngewebes evaluiert werden.

Weitere Experimente anhand eines Tumormodells sollten klären, ob eine photodynamische Schädigung von Gliomgewebe grundsätzlich möglich ist, und inwieweit eine eventuelle Schädigung selektiv Tumorgewebe erfasst.

Alle Patienten mit malignen Gliomen erhalten zur Behandlung des tumorinduzierten Hirnödems und als Neuroprotektivum gegen die chirurgische Manipulation perioperativ

Glukokortikoide. Der Fragestellung, ob diese Medikation mit der PDT mit 5-ALA-induziertem PpIX interferieren würde, widmete sich die abschließende Versuchsreihe.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere und Haltung

Für die Versuche wurden ausschließlich männliche Wistar-Ratten verwendet, die zu Versuchsbeginn ein Gewicht zwischen 240 und 260 Gramm hatten. Die Tiere wurden von der Firma Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, bezogen. Sie wurden in transparenten Polycarbonatkäfigen Typ 4 (Bodenfläche: 1815 cm², Höhe: 200 mm) der Firma Ehret, Emmendingen, im 12h Hell-/Dunkelrhythmus zu maximal fünf Tieren pro Käfig gehalten. Spezialfutter für Ratten und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung.

2.2 Versuchsgruppen

Bei einem Teil der Tiere wurden zur Induktion eines Tumorwachstums C6-Gliomzellen in den Cortex implantiert („tumortragend“). Versuche zur Auswirkung der 5-ALA-PDT auf gesundes bzw. ödematöses Hirngewebe wurden an Ratten ohne C6-Gliom durchgeführt („nicht tumortragend“).

2.2.1 Nicht tumortragend

Um die Wirkung der photodynamischen Therapie auf normales Hirngewebe zu untersuchen, wurden sechs Ratten sechs Stunden nach Gabe von 5-ALA kraniotomiert, und der Cortex mit Laserlicht bestrahlt. Als Kontrolle dienten weitere sechs Tiere, bei denen ohne Gabe von 5-ALA in identischer Weise kraniotomiert und bestrahlt wurde.

Um die PDT mit 5-ALA hinsichtlich einer Schädigung von Normalgewebe mit der PDT mit bereits klinisch erprobten Photosensibilisatoren zu vergleichen, wurde eine Gruppe von sechs Tieren sechs Stunden nach Applikation des herkömmlichen Photosensibilisators Photofrin II kraniotomiert, und der Cortex bestrahlt.

Bei einer vierten Gruppe wurde die Wirkung der 5-ALA-PDT auf ödematöses Hirngewebe untersucht. Hierzu wurde bei sechs Ratten drei Stunden nach Injektion von 5-ALA mittels einer Kälteläsion ein experimentelles Hirnödem induziert. Weitere drei Stunden später erfolgte die Laserbestrahlung des Cortex. Als Kontrollgruppe diente das isolierte Kältetrauma (n=6) (s.Tab.1).

2.2.2 Tumortragend

Zum Nachweis einer phototoxischen Wirkung an malignem Gewebe wurden bei 31 Tieren C6-Zellen cortical implantiert. Am neunten Tag nach Inokulation wurde das Tumorwachstum mittels Magnetresonanztomographie (MRT) bildgebend dargestellt. Dies war erforderlich, um später beurteilen zu können, ob sich phototoxische Nekrosen nur im Bereich tumorös veränderter Areale ausgebildet hatten, oder ob sie auch unspezifisch Normalgewebe betrafen. Am zehnten Tag wurden die induzierten Gliome wie folgt photodynamisch therapiert (Tab. 3):

Bei sechs Ratten erfolgte die Laserbestrahlung des tumorösen Areals drei Stunden, bei neun Ratten sechs Stunden nach 5-ALA-Applikation.

Eine Gruppe von zehn Tieren wurde mit Dexamethason vorbehandelt (Je eine Injektion zwei Tage, ein Tag und sechs Stunden vor Laserbestrahlung). Die Laserbestrahlung erfolgte sechs Stunden nach Gabe von 5-ALA.

Bei weiteren sechs Tieren wurden direkt im Anschluss an die Anfertigung der MRT die Gehirne entnommen, um die Übereinstimmung der histologischen Tumordimensionen mit dem Areal der Kontrastmittelaufnahme in der MRT zu verifizieren (Tab.2).

Tab. 1: *Versuchsgruppen, nicht tumortragend*

	Photosensitizer	Dosierung [pro kg Körpergewicht]	Kälteläsion	Lichtdosis
n=6	∅	∅	nein	200 J/cm ²
n=6	5-ALA	100 mg	nein	200 J/cm ²
n=6	Photophrin II	5 mg	nein	200 J/cm ²
n=6	5-ALA	100 mg	ja	200 J/cm ²
n=6	∅	∅	ja	∅

Tab. 2: *Versuchsgruppen, tumortragend*

	5-ALA [pro kg Körpergewicht]	Dexamethason [pro kg Körpergewicht]	Bestrahlungszeitpunkt	Lichtdosis
n=6	100 mg	∅	3 h nach 5-ALA	100 J/cm ²
n=9	100 mg	∅	6 h nach 5-ALA	100 J/cm ²
n=10	100 mg	3 × 0.17 mg	6 h nach 5-ALA	100 J/cm ²
n=6	Keine photodynamische Behandlung			

Tab. 3: *tumortragende Versuchsgruppen, Untersuchungsablauf*

Tag 0	Tag 9	Tag 10	Tag 13
Inokulation der C6-Zellen	MRT	PDT	Paraffinfixierung

2.3 Zellkultur

Die C6-Zellen wurden vom Institut für Chirurgische Forschung des Klinikums Großhadern, München, zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie geht zurück auf einen glialen Rattentumor, der in vivo durch Injektion von N-Nitroso-N-Methylharnstoff induziert wurde (Benda et al., 1968).

Zur Herstellung des Nährmediums wurden 500 ml Rohmedium mit 50 ml fötalem Kälberserum (FKS), 15 ml Penicillin/ Streptomycin/ Glutamin und 5 ml Natrium-Pyruvat (Bestandteile steril filtriert) versetzt.

Die Zellen wurden in Portionen von jeweils 10^6 Zellen zwischen Passage 68 und 77 in 1 : 10 mit Dimethylsulfoxid (DMSO) versetztem Nährmedium in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mindestens fünf Tage vor Inokulation wurden sie aufgetaut und in eine mit 20 ml Nährmedium gefüllte Kulturflasche gegeben. Diese wurde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt. Alle 24 Stunden wurde das Nährmedium gewechselt; ab dem zweiten Tag mussten die Zellen täglich geteilt werden. Zu diesem Zweck wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst. 1 ml der entstandenen Zellsuspension wurde in eine neue Kulturflasche gegeben. Neue und alte Flasche wurden wieder mit 20 ml Medium gefüllt und in den Brutschrank gelegt.

Zur Inokulation wurden Zellen zwischen Passage 72 und 88 verwendet. Nach Absaugen des Mediums und Ablösen der Zellen vom Flaschenboden mittels 2 ml Trypsin/EDTA wurde die entstandene Suspension in ein Gefäß mit 13 ml Nährmedium gegeben und gut durchmischt. Hieraus wurden 50 µl abpipettiert, mit der selben Menge Trypanblau vermischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Unter dem Mikroskop konnte so die Zellzahl bestimmt, und die Vitalität der Zellen überprüft werden. Zu den durch Zentrifugieren (5 min bei 1000 U/min) und Abkippen des Überstandes gewonnenen reinen C6-Zellen wurde so viel phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) gegeben, dass die nach sorgfältiger Durchmischung entstandene Zellsuspension pro Mikroliter 2×10^4 Zellen enthielt. Davon wurden jeder Ratte 5 µl - entsprechend 10^5 Zellen - inokuliert.

Alle Reagenzien, die mit den C6-Zellen in Kontakt kamen, wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Alle Arbeitsschritte, bei denen die Kulturflaschen geöffnet werden mußten, wurden unter der Sicherheitswerkbank vorgenommen. Die für die Zellkultur verwendeten Materialien sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tab. 4: Materialien für die Zellkultur

Material	Typ	Firma	Sitz
Brutschrank	BB 6220	Heraeus	Hanau
Sicherheitswerkbank	HERA Safe	Heraeus	Hanau
Zentrifuge	Megafuge 2.0	Heraeus	Ostrode
Mikroskop	Axiovert 35	Zeiss	München
Kulturflaschen	Nunclon 80 cm ²	Nunc GmbH & Co.KG	Wiesbaden
PBS	pH 7,4	Apotheke Klinikum Innenstadt	München
Rohmedium	Dulbecco's MEM	Seromed [®] Biochrom KG	Berlin
FKS		Seromed [®] Biochrom KG	Berlin
Natrium-Pyruvat	100 mM	Seromed [®] Biochrom KG	Berlin
Penicillin/ Streptomycin/ Glutamin	10000 U/ml 10000 µg/ml 29,2 mg/ml	Gibco BRL	Paisley, Schottland
Trypsin/EDTA		Gibco BRL	Paisley, Schottland
Trypanblau	0.5%ige Lösung	Serva Feinbiochemica GmbH & Co.KG	Heidelberg
<u>DMSO</u>		Merck	Darmstadt

2.4 Eingriffe an den Versuchstieren

2.4.1 Narkose

Für Injektionen, Kraniotomie, Kälteläsion, Tumorimplantation und Laserbestrahlung wurde eine Maskennarkose über ein Inhalationsnarkosegerät Titus mit Narkosemittelverdunster Isoflurane-Vapor 19.3 (Dräger Medizintechnik GmbH, Lübeck) mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch verwendet.

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 4 Vol% Isofluran unter einer über das Versuchstier gestülpten Plastikhaube. Nach Umlagerung auf ein Heizkissen wurde der Kopf in einem speziellen Stereotaxiegerät (Eigenbau des Institutes für chirurgische Forschung der LMU München) fixiert und die Isofluranmaske (Eigenbau) aufgesetzt.

Bei chirurgischen Eingriffen wurde Isofluran in einer Konzentration von 2,5 Vol%, während der Laserbestrahlung von 1,5 Vol% appliziert. Die Flussrate betrug bei allen Experimenten 0,5 l/min.

Für die MRT wurde die Narkose nach oben beschriebener Einleitung durch intraperitoneale Injektion einer 3,6%igen Chloralhydratlösung (Apotheke Klinikum Großhadern) in einer Dosierung von 1,2 ml pro 100 g Körpergewicht fortgesetzt.

2.4.2 Intravenöse Injektion

Intravenöse Injektionen erfolgten in die rechte vena femoralis. Hierzu wurde in Rückenlage nach Rasur und Hautdesinfektion ein 1 cm langer Hautschnitt entlang des Gefäßes angebracht und darüberliegendes Bindegewebe abgetragen. Die Injektion erfolgte unter Zuhilfenahme eines Mikroskopes (LEICA MZ6, Leica, Bensheim) unter Sicht. Es wurden UDS-Kanülen der Firma Hoechst, Frankfurt am Main, Größe G 30 kurz, 0,3 x 25 mm, verwendet, die über einen Silikonschlauch (Innendurchmesser 0,28 mm) flexibel mit einer Spritze verbunden wurden. Nach Blutstillung wurde die Wunde mit einer Naht (5-0 Vicryl) verschlossen.

Appliziert wurden folgende Substanzen:

- 5-ALA (Medac GmbH, Hamburg): 100 mg pro kg Körpergewicht, gelöst in PBS (30mg pro ml)
- Photophrin II (Lederle Parenterals, Puerto Rico, USA): 5 mg pro kg Körpergewicht, gelöst in 5%iger Glucoselösung (2,5mg pro ml)
- Dexamethason (Ratiopharm GmbH, Ulm): $3 \times 0,17$ mg pro kg Körpergewicht, verdünnt mit physiologischer Kochsalzlösung (0,08 mg pro ml)
- Kontrastmittel (siehe Kapitel „Magnetresonanztomographie“)

2.4.3 Kraniotomie

Bei den narkotisierten Tieren wurde nach Kopfrasur und Hautdesinfektion ein ca. 2 cm langer, sagittaler Hautschnitt entlang der Mittellinie angebracht. Auf der rechten Seite wurde über einem von Sagittalnaht, Koronarnaht, linea temporalis superior (Ansatz des Temporal Muskels) und Lamdanaht begrenzten Areal durch Abpräparieren des Bindegewebes

die Schädeldecke freigelegt. Unter Schonung der Knochennähte (Verlauf venöser Blutleiter) und der Kaumuskelatur wurde ein etwa 2 mal 3 mm großer Knochendeckel herausgeschliffen und mithilfe einer umgebogenen Kanüle von der Gehirnoberfläche abgehoben. Der Schleifvorgang erfolgte unter ständiger Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung, um Hitzeentwicklung vorzubeugen. Zudem wurde sorgfältig darauf geachtet, dass keine Verletzung der Dura erfolgte.

2.4.4 Kälteläsion

Zur Induktion eines experimentell reproduzierbaren Hirnödems wählten wir das Kälteläsionsmodell nach Klatzo (Klatzo et al., 1958), modifiziert nach Stummer (Stummer et al., 1993). Ein Kupferstempel (Durchmesser 1 mm) wurde mithilfe eines Mikromanipulators unter mikroskopischer Sichtkontrolle so auf die Dura aufgesetzt, dass eine minimale Eindellung sichtbar wurde. Die genaue Vertikalposition am Mikromanipulator wurde notiert, und der Kupferstempel wieder angehoben. Nach Kühlung auf ca. -70°C mit einem Azeton-Trockeneisgemisch wurde der Kupferstempel mit dem Mikromanipulator für einen Zeitraum von 15 Sekunden auf eine Vertikalposition von einem Millimeter unter dem zuvor notierten Wert abgesenkt. So wurde ein standardisierter, guter Kontakt des Kupferstempels zur Dura und dem darunter befindlichen Hirngewebe sichergestellt, ohne eine mechanische Verletzung zu produzieren.

2.4.5 Laserbestrahlung

Die Laserbestrahlung wurde an narkotisierten und kraniotomierten Tieren vorgenommen.

Es wurde ein Argon-gepumpter Farbstofflaser (Pumplaser: Firma Coherent, Darmstadt, INNOVA Sabre R DBW 15; Farbstofflaser: Coherent 599, Farbstoff: Sulforhodamin B) im roten Spektralbereich (Wellenlänge: $635 \pm 0.4 \text{ nm}$) bei einer Bestrahlungsstärke von 100 mW/cm^2 verwendet.

Das Licht wurde über eine Glasfaser (Kerndurchmesser: $600\ \mu\text{m}$) zur Bestrahlungsvorrichtung geleitet. Das distale Faserende wurde mittels einer Sammellinse auf den Bestrahlungsort abgebildet (Abb. 2).

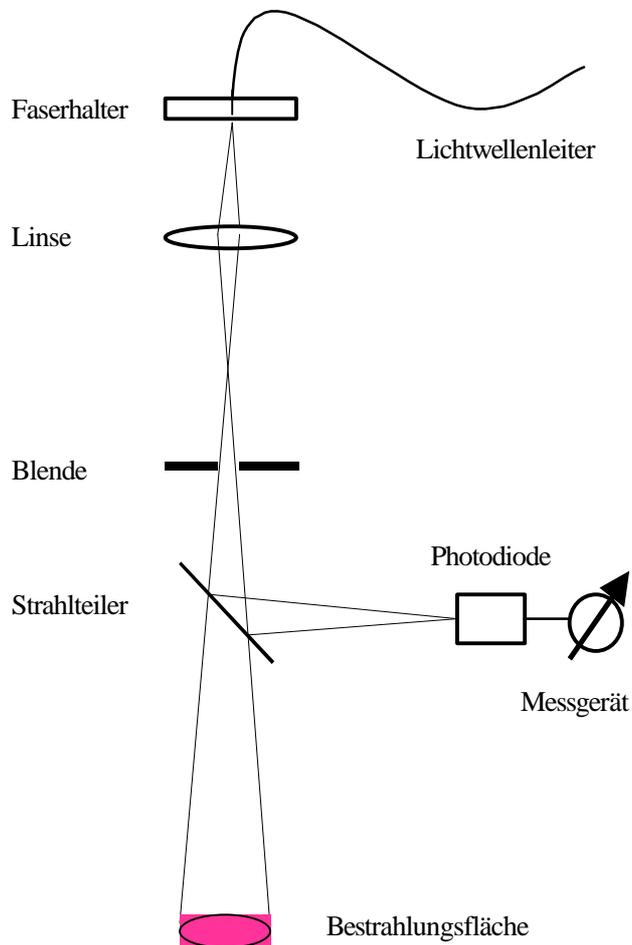


Abb 2: Bestrahlungsvorrichtung

Vorversuche hatten gezeigt, dass die Laserleistung Fluktuationen unterworfen war. Um die Bestrahlungsstärke während des Experiments kontrollieren zu können, wurde deshalb ein konstanter, kleiner Teil des Lichtes von einem Strahlteiler auf eine Photodiode gelenkt. Der erzeugte Photostrom war dabei proportional zur Bestrahlungsstärke. Inkonstanzen der Laserleistung konnten durch Öffnen oder Schließen einer Irisblende ausgeglichen werden (Abb. 2). Zur zusätzlichen Sicherheit wurde die Bestrahlungsstärke vor und nach der Bestrahlung mit einem Powermeter (Labmaster, Coherent, Darmstadt) kontrolliert.

Die Applikation verschiedener Lichtdosen wurde durch Variation der Bestrahlungsdauer nach der Formel

$$\text{Energie} = \text{Leistung} \cdot \text{Zeit}$$

erreicht.

Bei den nicht tumortragenden Versuchsgruppen betrug die applizierte Energie 200 J/cm².

Um zwischen kleinen photodynamischen und kraniotomiebedingten Läsionen sicherer unterscheiden zu können, wurde bei diesen Versuchsgruppen nur ein Teilbereich des freigelegten Cortex bestrahlt.

Um dies zu erreichen, erfolgte die Bestrahlung durch eine Schlitzblende (Länge: 5 mm, Breite: 1 mm), die auf den Schädelknochen aufgesetzt wurde. Zur Bestrahlung gesunden Hirngewebes wurde der Schlitz zur optimalen Differenzierung längs - d.h. senkrecht zur histologischen Schnitttrichtung - ausgerichtet. Über ödematösem Gewebe wurde - wegen der bekannten Ausbreitung der Ödemflüssigkeit nach medial über den Balken - einer queren Ausrichtung der Vorzug gegeben.

Bei tumortragenden Ratten wurde das ganze Knochenfenster bestrahlt, um insbesondere den Effekt auf die Randzone der Tumoren beurteilen zu können. Zudem war uns aus den Versuchen am gesunden Rattenhirn bereits bekannt, dass durch die Kraniotomie keine histologisch sichtbaren Läsionen entstanden, sofern makroskopisch keine Verletzung der Dura zu erkennen war. Es wurde eine Lichtdosis von 100 J/cm² appliziert.

2.4.6 Inokulation der C6-Zellen

Das Freilegen der Schädeldecke erfolgte wie unter 2.3.3. für die Kraniotomie beschrieben. Etwa 2 mm lateral und kaudal des Bregma (Treffpunkt von Sagittal- und Koronarnaht) wurde unter ständiger Spülung mit Kochsalzlösung ein Loch bis auf die Dura gebohrt. Von einer Zellsuspension mit 2×10^4 C6-Zellen pro Mikroliter phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) wurden 5 µl (entspricht 10^5 C6-Zellen) in eine Mikroliterspritze (Microliter® #701, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) aufgezogen. Die Spritze wurde in einen Mikromanipulator eingespannt und mit der Spitze unter Sicht (Mikroskop: Leica MZ6) auf die Dura aufgesetzt. Mittels des Mikromanipulators wurde die Nadel der Mikroliterspritze 3 mm tief eingestochen

und 1 mm zurückgezogen. Die manuelle Inokulation erfolgte langsam unter Sichtkontrolle. Anschließend wurde das Bohrloch mit Knochenwachs verschlossen und der Hautschnitt vernäht.

2.4.7 Magnetresonanztomographie

Den narkotisierten Tieren wurden 0.15 ml pro 100 g Körpergewicht Magnevist (Schering AG Pharma, Berlin) i.v. gespritzt. Mit einem Magnetom der Firma Siemens, München, (Modell Vision, 1,5 Tesla) wurden koronare, t1-gewichtete Aufnahmen angefertigt (Schichtdicke: 2 mm; Pixelgröße: $0,37 \times 0,37$ mm; Relaxationszeit: 480 ms; Echozeit: 14,0 ms) und auf Dry Star TM 1b Filme der Fa. Agfa gedruckt.

2.4.8 Perfusionsfixierung

Am dritten Tag nach PDT wurden die Tiere in so tiefe Äther-Narkose versetzt, dass die Spontanatmung aussetzte. Thorax und Abdomen wurden weiträumig eröffnet und aufgespreizt. Am noch schlagenden Herz wurde eine Kanüle in die linke Kammer eingestochen und mit einer Klemme fixiert. Nach Eröffnen des rechten Vorhofes wurde das Gefäßsystem über einen Dreiwegehahn zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung, anschließend mit 2-prozentiger, gepufferter Paraformaldehydlösung (Rezept siehe unten) gespült. Danach wurden die Gehirne entnommen und in 3,7-%iges Formalin gegeben.

Rezept für 2%-ige Paraformaldehydlösung:

Man löse:	43.6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Fa. Merck) in 1 l aqua dest.	Lösung A
	27.4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Fa. Merck) in 1 l aqua dest.	Lösung B
	20.0 g Paraformaldehyd in 500 ml aqua dest.	Lösung C
Man mische:	360 ml von Lösung A, 140 ml von Lösung B und 500 ml von Lösung C	
	Einstellung des pH mit einigen Tropfen 10 N NaOH auf 7.4	

2.5 Histologie

Nach mindestens 3 Tagen in Formalin wurden die Rattenhirne für 2 Stunden in 70%igen Alkohol gegeben und anschließend über 58 Stunden in einem Einbettautomaten (Hypercenter, Shandon, Frankfurt) wie folgt verarbeitet:

96%iger Alkohol: 3 × 6 Stunden

100%iger Alkohol: 4 × 4 Stunden

Aceton: 3 × 6 Stunden

Paraffin (60°C): 2 und 4 Stunden

Dieser außergewöhnlich lange Einbettvorgang wurde gewählt, da es anfänglich mit einem kürzeren häufig zu Sprüngen im Hirngewebe kam. Die eingebetteten Hirne wurden in Paraffinblöcke gegossen. Mit einem Rotationsmikrotom (2035 BIOCUT, Jung, Leica Instruments GmbH, Nußloch bei Heidelberg) wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Bei den Versuchen am gesunden Hirn wurden alle 100 µm, bei tumortragenden Hirnen alle 200 µm 2 Schnitte auf einen Objektträger aufgebracht. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte entparaffiniert und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

2.6 Messgrößen

Von jedem Versuchstier wurde der histologische Schnitt ausgesucht, auf dem die tiefste photodynamische Läsion, bzw. der unbehandelte Tumor in seinem größten Durchmesser zu sehen war.

Die histologischen Schnitte wurden auf einem Monitor vermessen. Der Vergrößerungsfaktor der Bildschirmprojektion wurde im Vorfeld mittels eines Mikrometermaßstabes bestimmt. Das Areal der Kontrastmittelaufnahme in der MRT konnte dank ausreichender Vergrößerung direkt an den Filmausdrucken mittels einer Millimeterskala vermessen werden. Der Vergrößerungsfaktor der Ausdrücke war jeweils am Filmrand vermerkt.

Photodynamische Läsionen wurden senkrecht zur Gehirnoberfläche, d.h. parallel zur Ausbreitungsrichtung des Lichtes, vermessen. Im Falle der tumortragenden, photodynamisch behandelten Tiere wurde an der jeweils zugehörigen MRT ebenfalls die tiefste Ausdehnung der Kontrastmittelaufnahme senkrecht zur Gehirnoberfläche festgestellt.

An unbehandelten Tumoren wurde entlang ihres größten Durchmessers und senkrecht dazu gemessen. Von einem zweiten Untersucher, dem die Ausrichtung der Messlinien, nicht jedoch die einzelnen Messwerte bekannt waren, wurde an den zugehörigen MRTs die Ausdehnung der Kontrastmittelaufnahme in den jeweils entsprechenden Richtungen vermessen (siehe Abb. 9 a und b in „Ergebnisse“).

Bei der histologischen Verarbeitung von Gewebe kann es zu Schrumpfungen, beim Schneiden zu Stauchungen kommen, die beim Vergleich mit entsprechenden Messungen an MRTs zu Fehlern führen können. Um diesen Fehler zu korrigieren, wurde die Höhe des gesamten Rattenhirnes am histologischen Schnitt und der entsprechenden MRT vermessen. Alle an Hirnschnitten gemessenen Werte wurden mit einem Korrekturfaktor $\text{Hirnhöhe MRT} / \text{Hirnhöhe histologisch}$ multipliziert.

2.7 Statistische Methoden

Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden durch Varianzanalyse mit dem post hoc Sheffe-F-Test untersucht. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

3. ERGEBNISSE

3.1 PDT an normalem und ödematösem Hirngewebe

Ziel des Versuchsabschnittes war, eine unspezifische Schädigung von normalem und ödematösem Hirngewebe durch die 5-ALA-PDT auszuschließen.

Die hierzu vorgenommene, alleinige Bestrahlung des Cortex mit Laserlicht führte zu einer oberflächlichen Schädigung von annähernd 0,5 mm Tiefe, gekennzeichnet durch Neuronenverlust, bzw. perinukleäre Vakuolisierung und Kernpyknose (Abb. 3, Grafik Abb. 8). Tiefe und Art der Schädigung waren identisch, wenn 6 Stunden vor Bestrahlung 5-ALA verabreicht wurde (Abb. 4, Grafik Abb. 8).

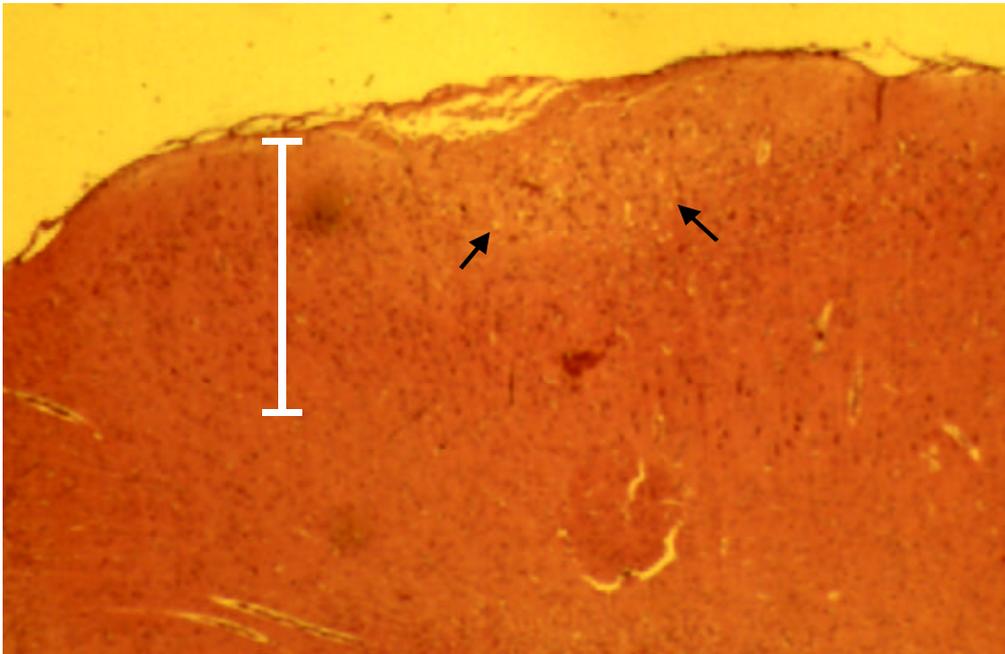


Abb. 3: Koronarschnitt (HE-gefärbt) durch ein Rattenhirn, das nur mit Laserlicht bestrahlt wurde. Das bestrahlte Areal kommt hier heller zur Darstellung, als Zeichen einer Schädigung finden sich Neuronenverlust, Kernpyknose und perinukleäre Vakuolisierung. Weißer Balken = 1 mm.

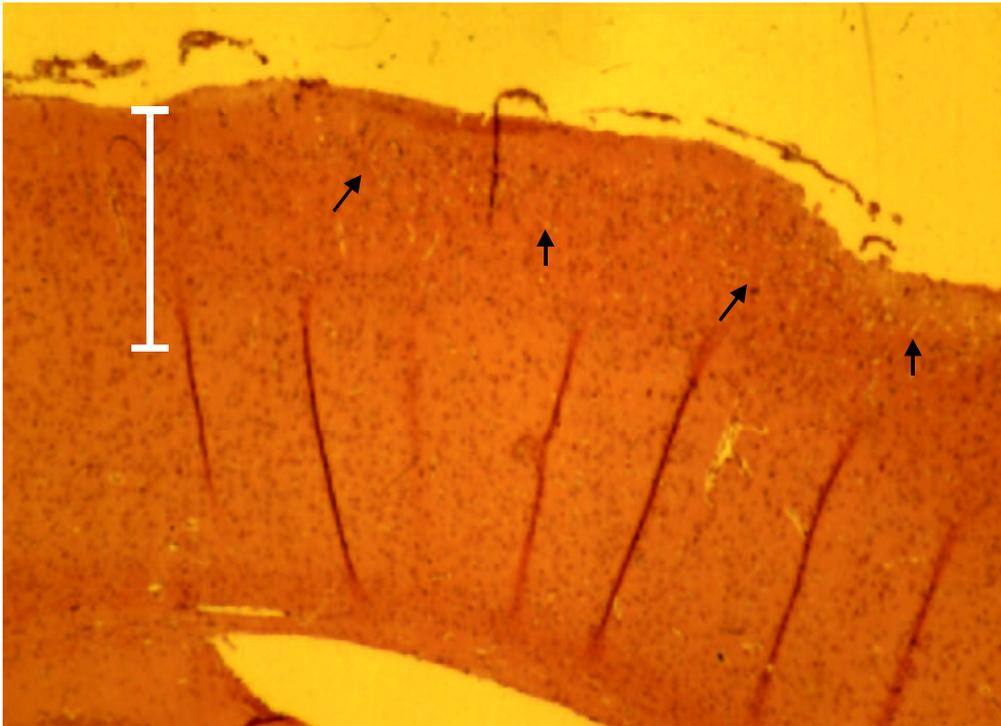


Abb. 4: HE-gefärbter Koronarschnitt durch ein Rattenhirn, das nach 5-ALA-Applikation mit Laserlicht bestrahlt wurde. Wie in Abb. 3 findet sich ein umschriebenes Areal mit Neuronenverlust, Kernpyknose und perinukleäre Vakuolisierung. Weißer Balken = 1 mm.

Das zur Induktion eines experimentellen Hirnödems beigebrachte Kältetrauma allein führte zu einer Cortexläsion, die von der Tiefe in etwa der Schädigung nach alleiniger Bestrahlung entsprach. Histologisch fand sich in diesem Fall allerdings eine deutliche Nekrose mit Verlust der Gewebeskohärenz (Abb. 5, Grafik Abb. 8). Eine Verdopplung der Schädigungstiefe gegenüber den anderen Versuchsgruppen fand sich, wenn die Bestrahlung nach Gabe von 5-ALA auf dem Boden der Kälteläsion, d.h. nach Induktion des experimentellen Hirnödems, durchgeführt wurde (Abb. 6, Grafik Abb. 8). Histologisch fand sich dabei oberflächlich ein Areal mit Nekrose und Verlust der Gewebeskohärenz, das der Schädigung durch die Kälteläsion entspricht. Darunter fand sich als Zeichen einer phototoxischen Schädigung eine Zone mit Neuronenverlust, Kernpyknose und perinukleärer Vakuolisierung. Auch in diesem Fall betrug die Läsionstiefe jedoch weniger als 1 mm.

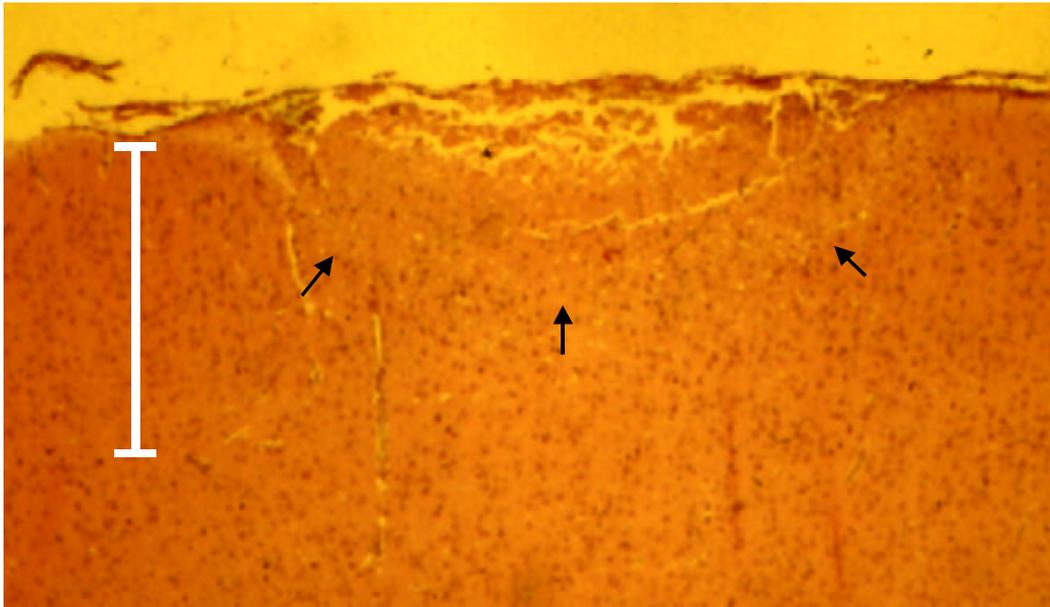


Abb. 5: HE-gefärbter Koronarschnitt durch ein Rattenhirn, dem nur eine Kälteläsion beigebracht wurde. Das betroffene Areal zeigt eine deutliche Nekrose mit Verlust der Gewebeskohärenz. Weißer Balken = 1 mm.

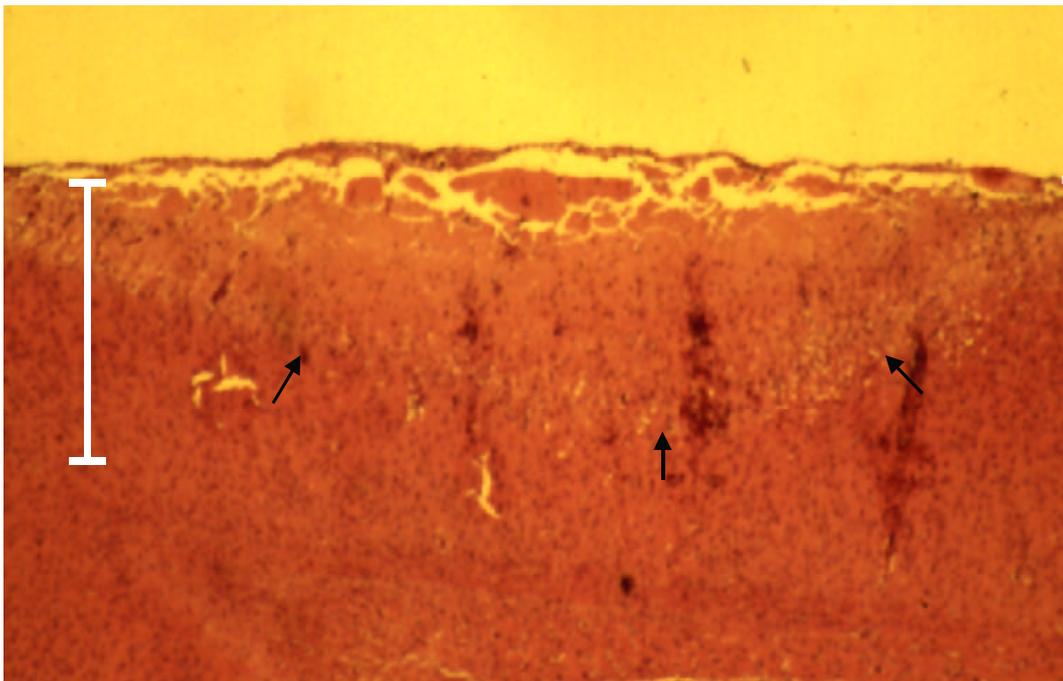


Abb. 6: HE-gefärbter Koronarschnitt durch ein Rattenhirn, dem 3 Stunden nach 5-ALA-Applikation eine Kälteläsion beigebracht wurde. Weitere 3 Stunden später wurde mit Laserlicht bestrahlt. Entsprechend der Schädigung durch die Kälteläsion ist oberflächlich ein Areal mit deutlicher Nekrose und Verlust der Gewebeskohärenz zu sehen. Darunter schließt sich eine Zone an, die als Zeichen einer phototoxischen Schädigung Neuronenverlust, Kernpyknose und perinukleäre Vakuolisierung aufweist. Weißer Balken = 1 mm.

Die mit Abstand tiefsten Läsionen fanden sich nach Applikation des herkömmlichen Photosensibilisators Photofrin II und Laserbestrahlung. In diesem Fall war histologisch ein scharf begrenztes nekrotisches Areal mit vollständigem Verlust der Gewebeskohärenz zu sehen (Abb. 7, Grafik Abb. 8).

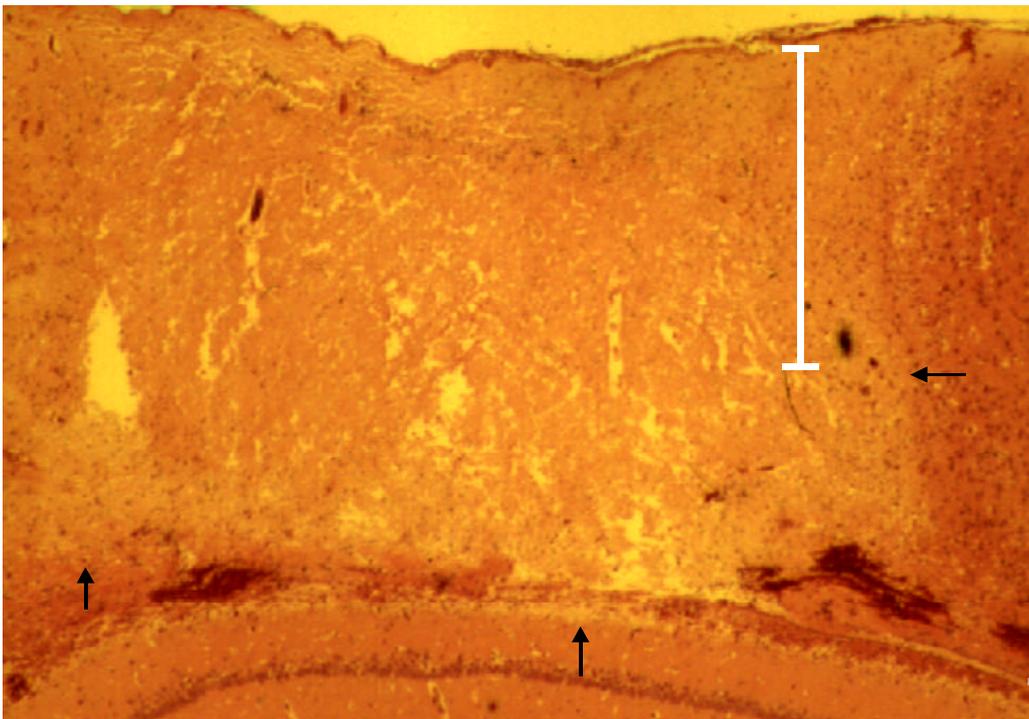


Abb. 7: HE-gefärbter Koronarschnitt durch ein Rattenhirn, das nach Applikation von Photofrin II mit Laserlicht bestrahlt wurde. Der gesamte Cortex zeigt sich nekrotisch mit vollständigem Verlust der Gewebeskohärenz. Am unteren Bildrand ist der intakte Hippokampus, am rechten Bildrand die Grenze zum nicht bestrahlten, intakten Cortex zu sehen.

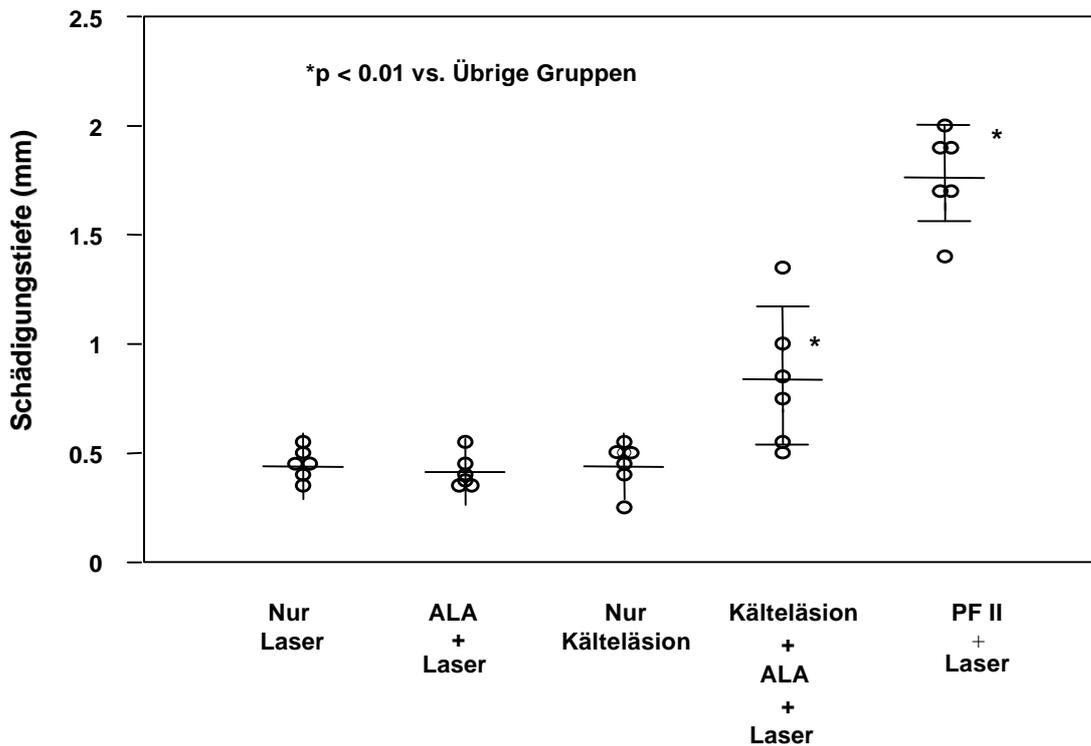


Abb. 8: Tiefe der Läsionen (Mittelwert und Standardabweichung) an nicht tumortragenden Rattenhirnen

3.2 Übereinstimmung von Histologie und MRT

Um zu zeigen, dass die histologischen Tumoren präzise durch die MRT abgebildet wurden, wurden eine Reihe tumortragender Ratten im Anschluss an die MRT geopfert, und histologische Schnitte des Tumoreals angefertigt. Eine genaue Übereinstimmung war wichtig, um bei photodynamisch behandelten Tumoren die exakte Tumorausdehnung vor der PDT zu kennen, und so die Tumorselektivität der photochemisch induzierten Nekrose beurteilen zu können.

Schon der grobe Vergleich der MRTs mit geeigneten histologischen Schnitten zeigte, dass die individuellen Formen der einzelnen Tumoren - inklusive Infiltrationen in Ventrikelsystem oder Striatum - im MRT zu erkennen waren (Abb. 9a und b). Die Messwerte des größten Tumordurchmessers betragen an den histologischen Schnitten $3,72 \pm 2,31$ mm, an den entsprechenden MRTs $3,78 \pm 2,38$. Die senkrecht dazu größten Durchmesser betragen $1,95 \pm$

1,49 mm in der Histologie, bzw. $1,88 \pm 1,54$ mm auf den zugehörigen MRTs (Abb. 10). Die durchschnittliche Differenz zwischen den einander entsprechenden Messwerten lag bei $0,06 \pm 0,24$ mm für die größten Durchmesser und $-0,07 \pm 0,29$ mm für die dazu senkrechten Messungen. Somit ergab sich ein hoher Grad der Übereinstimmung zwischen Abbildung in der MRT und histologischem Schnitt.

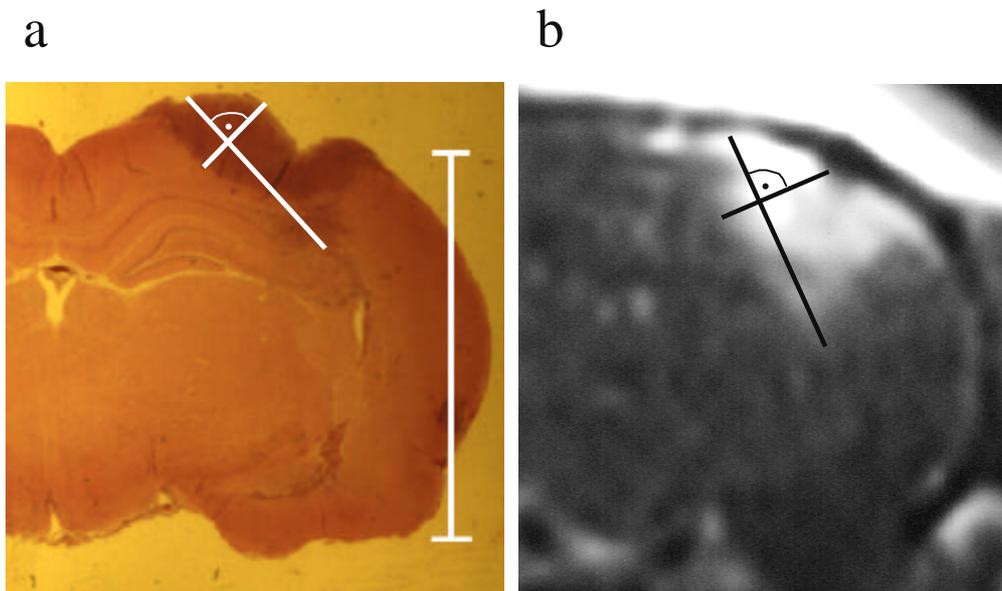


Abb. 9: a) HE-gefärbter Koronarschnitt durch ein Rattenhirn, das ein unbehandeltes C6-Gliom trägt. Der Tumor kommt dunkler zur Darstellung. Weißer Balken = 10 mm.

b) T1-gewichtete, mit Gadolinium-DTPA kontrastierte MRT des selben Rattenhirnes. Der Kontrastmittel aufnehmende Tumor kommt hell zur Darstellung.

In beide Abbildungen wurden die jeweiligen Messlinien durch den größten Tumordurchmesser und senkrecht dazu eingezeichnet.

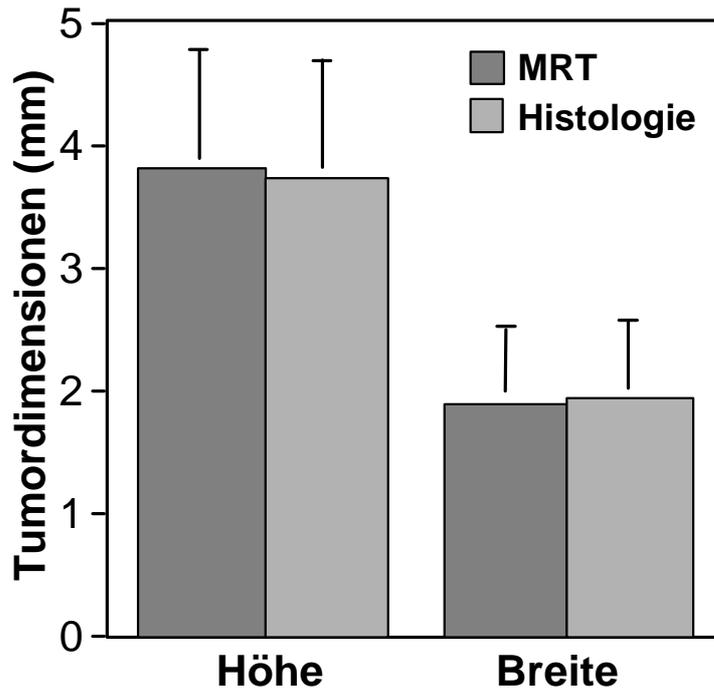


Abb. 10: Messwerte des größten Tumordurchmessers („Höhe“) und des größten Durchmessers senkrecht dazu („Breite“) an den HE-gefärbten Koronarschnitten unbehandelter tumortragender Rattenhirne bzw. an den zugehörigen MRTs (Mittelwerte und Standardabweichungen)

3.3 PDT an C6-Gliomen

Um die grundsätzliche Möglichkeit einer Schädigung von Gliomgewebe durch die 5-ALA-PDT sowie deren eventuelle Selektivität für Tumorgewebe zu untersuchen, wurden zwei Gruppen tumortragender Ratten mit jeweils 3 bzw. 6 Stunden Abstand zwischen 5-ALA-Gabe und Laserbestrahlung photodynamisch behandelt.

In beiden Gruppen war eine eindeutige Tumorschädigung festzustellen. Es fanden sich Koagulationsnekrosen, hämorrhagische Nekrosen und Verlust der Gewebeskohärenz als Zeichen der photodynamischen Wirkung (Abb. 11). Bei den unbehandelten Tumoren waren diese Phänomene nicht zu beobachten. Bei Läsionstiefen von $2,8 \pm 0,16$ mm bei Bestrahlung 3 Stunden nach 5-ALA-Gabe, bzw. $2,7 \pm 0,87$ mm bei Bestrahlung 6 Stunden nach 5-ALA-Gabe bestand zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied. Die Tiefen der Kontrastmittelaufnahme auf den zugehörigen Kernspinaufnahmen betragen $2,7 \pm 0,76$ mm

(3h), bzw. $2,6 \pm 1,08$ mm (6h) (Abb. 12). Somit stimmten die Tiefen der photodynamischen Läsionen weitgehend mit den radiologisch ermittelten Tumortiefen zum Zeitpunkt der Behandlung überein. Die tiefste Läsion von 3,7 mm fand sich bei einem Tier aus der 6-Stunden-Gruppe, der entsprechende Tumor im MR erreichte eine Tiefe von 4 mm. Innerhalb der einzelnen Tumoren war der photodynamische Gewebsschaden allerdings nicht immer homogen verteilt. In einzelnen Fällen fanden sich unversehrte Tumorzellnester in ansonsten nekrotischen Arealen, mit zerstörtem Gewebe darunter. In diesen Fällen wurde trotzdem die tiefste Ausdehnung der Nekrose vermessen. Bei den meisten Tieren war die Tumorkläsion von einer schmalen Zone umgeben, die eine schwächere Anfärbung des Gewebes mit Hämatoxylin/Eosin zeigte.

Im Vergleich zu den Kontrollgruppen, bei denen normales und ödematöses Hirngewebe nach 5-ALA-Applikation bestrahlt wurde, erreichten die Läsionen am Tumorgewebe eine signifikant größere Tiefe ($p < 0,05$; Abb. 13).

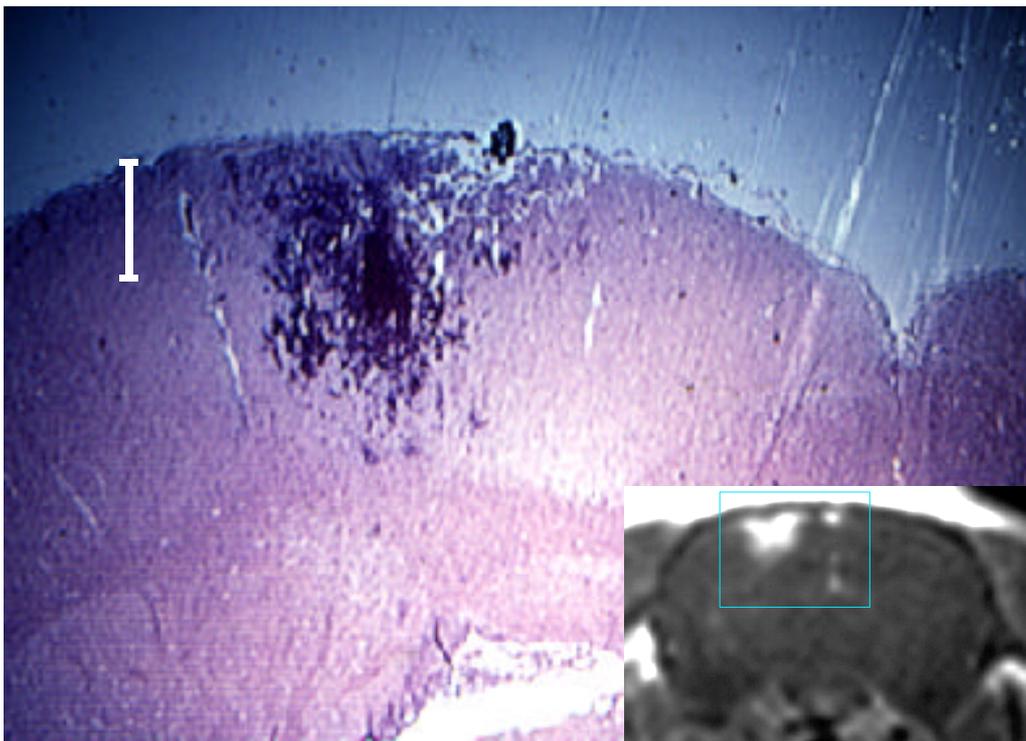


Abb. 11: HE-gefärbter Koronarschnitt durch ein photodynamisch behandeltes C6-Gliom mit hämorrhagischer Nekrose (Laserbestrahlung 6 Stunden nach 5-ALA-Applikation). Im Eck eingefügt die T1-gewichtete, mit Gadolinium-DTPA kontrastierete MRT des selben Tumors vor der photodynamischen Behandlung. Weißer Balken 1 mm.

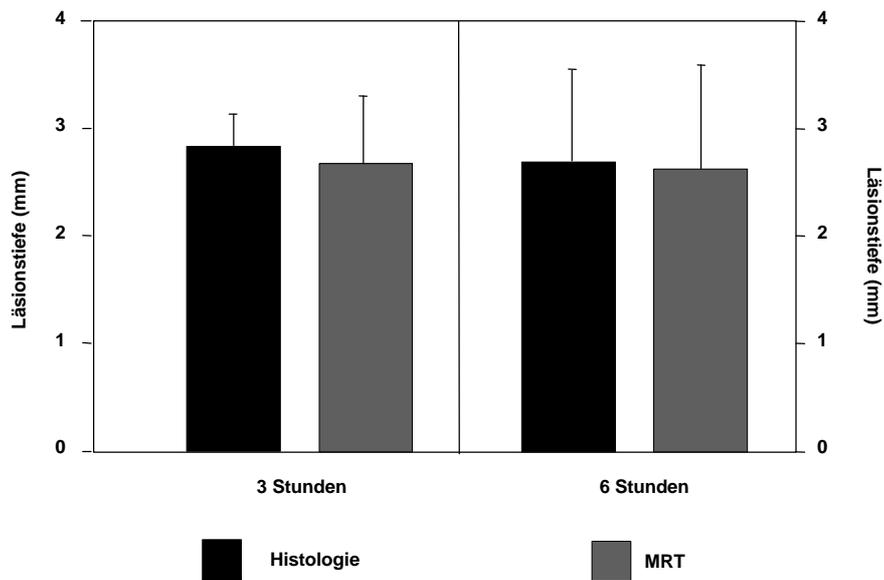


Abb. 12: Mittelwerte und Standardabweichungen der Läsionstiefen an C6-Gliomen, die 3 bzw. 6 Stunden nach 5-ALA-Gabe mit Laserlicht bestrahlt wurden, sowie der Tiefe der Kontrastmittelaufnahme in den zugehörigen MRTs.

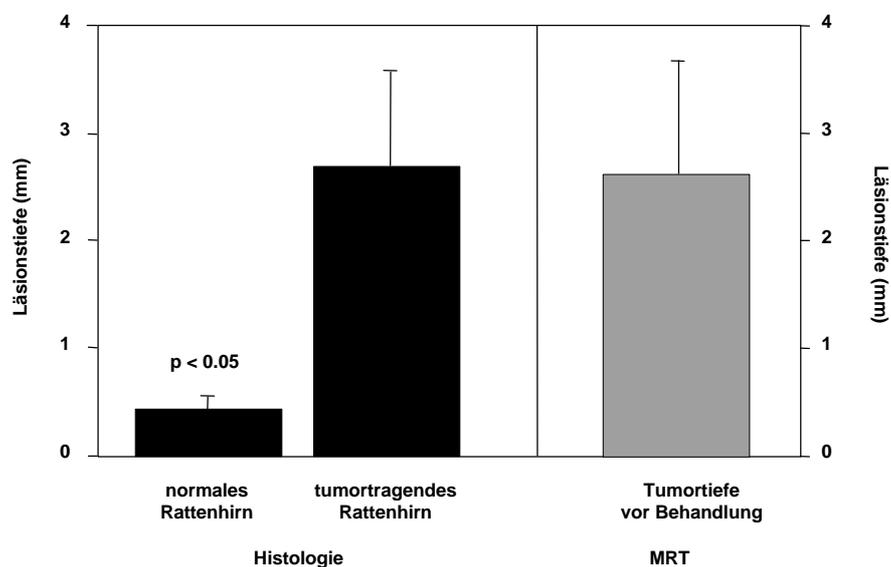


Abb. 13: Mittelwerte und Standardabweichungen der Läsionstiefen an C6-Gliomen und der Tiefe der Kontrastmittelaufnahme in den zugehörigen MRTs für die 3 bzw. 6 Stunden nach 5-ALA-Gabe mit Laserlicht bestrahlten Gruppen zusammengefasst. Dazu im Vergleich die Läsionstiefen am normalen Rattenhirn.

Einer weiteren Gruppe tumortragender Ratten wurde vor der PDT Dexamethason verabreicht. Hier konnte nur bei einem von 10 Tieren eine phototoxische Tumorschädigung festgestellt werden. Diese betraf nur das Zentrum des Tumors und erreichte nicht die radiologisch bestimmte Tumortiefe von 4,0 mm (Abb. 14). Bei einem Tier war weder im Kernspin noch an den Hirnschnitten ein Tumorwachstum zu erkennen. Bei drei Tieren wurden schwache Veränderungen am Tumorgewebe gefunden, die etwa mit der Schädigung am Normalgewebe durch ALA-PDT bzw. alleinige Laserbestrahlung zu vergleichen waren. Bei den übrigen Ratten waren keinerlei Veränderungen an den C6-Gliomen erkennbar. Die anhand der MRT bestimmten Tumortiefen waren tendenziell geringer als die tatsächliche, histologisch ermittelte Tumortiefe (2,93 mm vs. 3,21 mm, nicht signifikant).

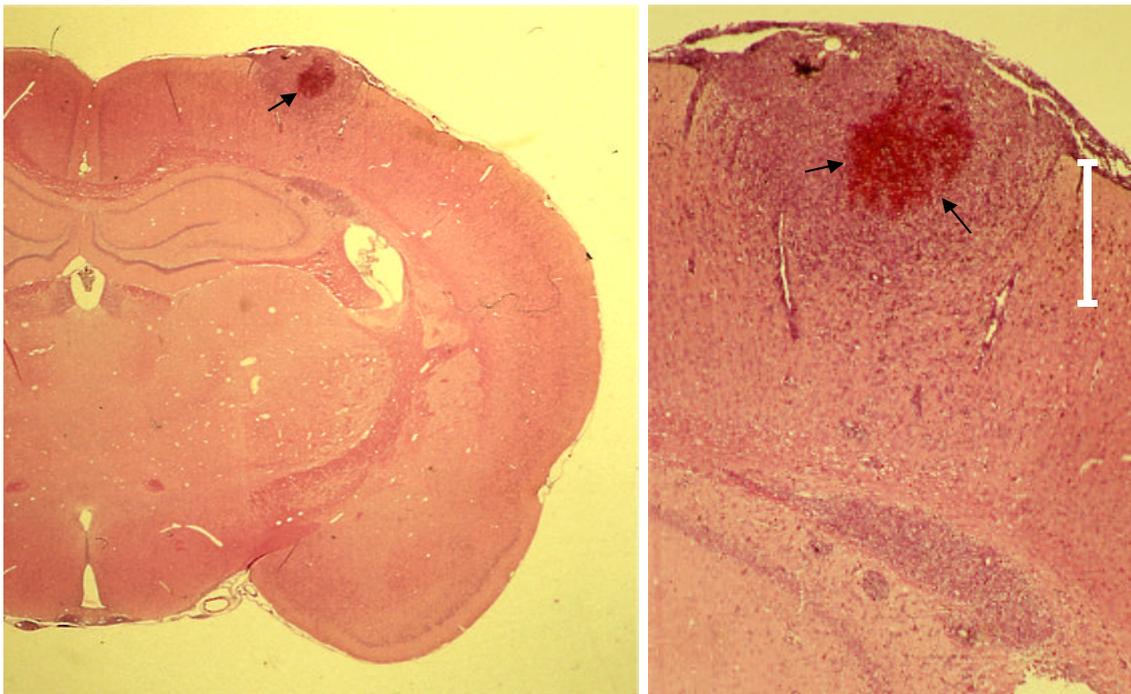


Abb. 14: HE-gefärbter Koronarschnitt durch ein Rattenhirn, das ein nach Dexamethasongabe photodynamisch behandeltes C6-Gliom trägt, links in der Übersicht, rechts in stärkerer Vergrößerung. Das Tumorzentrum weist eine hämorrhagische Infarzierung auf, darum herum ist vitales Tumorgewebe zu sehen. Weißer Balken = 1 mm.

4. DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungen belegen, dass durch die PDT mit 5-ALA am normalen und ödematösen Rattenhirn ein nur geringgradiger, oberflächlicher Schaden entsteht. C6-Gliomgewebe hingegen konnte unter Schonung des umliegenden Normalgewebes effektiv photodynamisch zerstört werden.

4.1 Material und Methoden

4.1.1 C6-Gliom in der Wistar-Ratte

Als Tumormodell wurde für die vorliegenden Untersuchungen das C6-Gliom der Wistar-Ratte gewählt, für das eine Suspension von C6-Zellen in das Rattenhirn inokuliert wurde. Ursprünglich wurde die C6-Zelllinie in Ratten durch transplazentare Exposition gegenüber N-Nitrosoharnstoff induziert. Die Zellen weisen astrozytische Merkmale auf (Benda et al., 1968). Nach Inokulation in die Hirne von Ratten oder Mäusen bilden sie dank der kurzen Generationszeit von 35 bis 41 Stunden schnell solide Tumoren. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers wurde eine mikroskopische Invasion in umliegendes Hirngewebe nachgewiesen (Kaye et al., 1986). Die größte Ähnlichkeit mit humanen Gliomen mit Parenchyminvasion, Neovaskularisation und Nekrosen wird bei Verwendung von Wistar-Ratten erreicht (San-Galli et al., 1989; Cohen et al. 1990; Peterson et al. 1994).

Für PDT-Studien eignet sich das Modell insbesondere, weil sich bei Inokulation von Zellsuspensionen ein oberflächliches Tumorwachstum induzieren lässt, das der Laserbestrahlung optimal zugänglich ist. Dementsprechend wurde es für Studien mit anderen Photosensibilisatoren bereits verwendet (Karagianis et al., 1996; Kaye & Morstyn, 1987; Kaye et al., 1985). Zudem ist auch die von uns gewählte Kälteläsion oberflächlicher Natur, sodass die gemessenen Nekrosertiefen aus den Versuchen am tumortragenden und ödematösen Gewebe gut vergleichbar sind.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass C6-Gliomzellen in Zellkultur und im Tumormodell in der Wistar-Ratte nach Exposition mit 5-ALA in der Lage sind, PpIX zu synthetisieren (Sroka et al., 1996; Hebeda et al., 1998; Stummer et al., 1998/2). In vitro wurde auch eine Empfindlichkeit der Zelllinie gegenüber der Photochemotherapie mit 5-ALA-induzierten Porphyrinen nachgewiesen (Sroka et al., 1996).

4.1.2 Kälteläsionsmodell

Im Rahmen der Untersuchung sollte unter anderem geprüft werden, ob peritumorales, ödematöses Hirngewebe nach 5-ALA-Gabe unspezifisch sensibilisiert wird. Hierzu wurde das Kälteläsionsmodell nach Klatzo in modifizierter Form eingesetzt (Stummer et al., 1993). Es handelt sich um ein reproduzierbares Modell, das – vermutlich durch Zerstörung von Endothelverbindungen (Long, 1984) – ein vasogenes Hirnödem erzeugt (Klatzo et al., 1958; Klatzo et al., 1967). Das tumorassoziierte Hirnödem, welches auf dem Boden von Fenestrierung und abnormen Zellverbindungen des Gefäßendothels entsteht, ist ebenfalls vasogener Natur (Coomber et al., 1988). Beide sind bezüglich ihrer Elektrolyt- und Proteinzusammensetzung gut vergleichbar (Bothe et al., 1984).

Das Kältetrauma diente bereits in zahlreichen Studien als Modell für das tumorassoziierte Hirnödem (Reulen et al., 1977; Reulen et al., 1978; Stummer et al., 1993; Hebeda et al., 1998). Für die vorliegende Arbeit war außerdem die oberflächliche Lokalisation des induzierten Ödems von Vorteil, da es der Laserbestrahlung so problemlos zugänglich war, und die gemessenen Nekrosertiefen gut mit den an den ebenfalls oberflächlichen C6-Gliomen festgestellten Schädigungstiefen vergleichbar waren.

4.1.3 Bestrahlungsparameter

Für die PDT ist es grundsätzlich von großer Wichtigkeit, Licht geeigneter Wellenlänge und Energie unter standardisierten Bedingungen applizieren zu können. Der für die vorliegende Arbeit benutzte Argon-gepumpte Rhodamin-Farbstofflaser emittiert konstantes Licht einer definierten Wellenlänge von $635 \pm 0,4$ nm. Im Bereich der gewünschten Lichtintensität von 100 mW/cm^2 ließ sich die Laserleistung ohne Schwierigkeiten konstant halten.

Die Bestrahlungsstärke von 100 mW/cm² wurde gewählt, um Hyperthermieeffekte, welche ab etwa 200 mW/cm² auftreten (Dougherty et al., 1998; Svaasand, 1985; Henderson et al., 1985; Levendag et al., 1988; Leunig et al., 1994), möglichst auszuschließen. Bei entsprechenden Studien mit vergleichbaren Wellenlängen an Hirngewebe wurden für Bestrahlungsstärken von 100 mW/cm² (Dereski et al., 1991) bzw. 177 mW/cm² (Cheng et al., 1994) kein signifikanter kortikaler Temperaturanstieg registriert.

Bei den Versuchen am normalen und ödematösen Hirngewebe wurde, im Interesse möglichst großer Sicherheit hinsichtlich der Schonung von Normalgewebe, eine höhere Lichtdosis von 200 J/cm² appliziert. Hierzu waren allerdings Bestrahlungszeiten von über 32 Minuten notwendig. Da für die klinische Anwendung kürzere Bestrahlungszeiten vorteilhaft sind, wurde für die Behandlung von tumortragenden Rattenhirnen eine niedrigere Lichtdosis von 100 J/cm² gewählt, mit der eine gute tumortoxische Wirkung erzielt werden konnte.

Aufgrund der größeren Eindringtiefe von Licht in Gewebe bei größeren Wellenlängen (Hillegersberg et al., 1994; Wilson, 1989; Van Gemert et al., 1985; Wilson et al., 1985) wird für die klinische Anwendung nicht die sogenannte Soretbande (stärkste Absorptionsbande) von PpIX bei 405 nm verwendet, sondern die langwelligste der insgesamt vier sogenannten Q-Banden (zusätzliche, schwächere Absorptionsbanden). Hier liegt das Maximum des Aktionsspektrums für die PDT mit 5-ALA-induzierten Porphyrinen im roten Spektralbereich bei 635 nm (Stocker et al., 1997; Riesenberg et al., 1995; Szemies et al., 1995). Diese Wellenlänge wurde auch bei den vorliegenden Versuchen verwendet.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Normales Hirngewebe

Um eine unspezifische Sensibilisierung normalen Hirngewebes auszuschließen, wurden im Rahmen der vorliegenden Studie zwei Gruppen von je sechs Ratten kraniotomiert und der normale Cortex mit Laserlicht bestrahlt. Bei einer der beiden Gruppen wurde sechs Stunden vor der Laserbestrahlung 5-ALA verabreicht, bei der anderen nicht. In beiden Gruppen

wurden flache Läsionen von weniger als einem halben Millimeter Tiefe gefunden, die in Ausdehnung und histologischem Erscheinungsbild identisch waren.

Diese Beobachtung deckt sich mit der inzwischen etablierten Ansicht, dass 5-ALA die intakte Blut-Hirn-Schranke nicht in relevanten Mengen passieren kann (Terr & Weiner, 1982; Stummer et al. 1998/1). Dementsprechend findet sich nach 5-ALA-Applikation kein PpIX in Hirnanteilen mit intakter Blut-Hirn-Schranke (Hebeda et al., 1998; Peng et al., 1997; Peng et al., 1993), zu denen der Cortex zu rechnen ist. Dies steht nicht im Widerspruch zu anderen Studien, bei denen erhöhte Konzentrationen an 5-ALA und Porphyrinen in Hirngewebe gefunden wurden, da diese auf Homogenisierung von Gewebeproben oder ganzen Hirnen beruhen (McGillion et al., 1974; McGillion et al., 1975; Anderson et al., 1981; Fukuda et al., 1992). Dabei kann nicht zwischen Regionen mit intakter bzw. durchlässiger Blut-Hirn-Schranke unterschieden werden. Außerdem können bei derartigen Versuchen 5-ALA und Porphyrine aus Blut- und Liquorkompartiment zur Gesamtkonzentration beitragen.

Der Grund für die dennoch entstandenen oberflächlichen Läsionen ist unklar. In einer vergleichbaren Studie (Cheng et al., 1984) wurden die Läsionen nach alleiniger Kraniotomie und Kraniotomie mit anschließender Laserbestrahlung mit und ohne vorheriger Applikation des Photosensibilisators Haematoporphyrinderivat (HpD) verglichen. Bei einer Bestrahlungsstärke von 177 mW/cm² produzierte die applizierte Lichtenergie von 676 J/cm² eine signifikant tiefere Läsion als die alleinige Kraniotomie, obwohl kein signifikanter kortikaler Temperaturanstieg zu verzeichnen war. Wie bereits unter 4.1.3. erläutert, dürften bei der für die vorliegende Studie verwendeten Bestrahlungsstärke von 100 mW/cm² (applizierte Lichtdosis 200 J/cm²) thermische Effekte ohnehin kaum eine Rolle spielen. In der vorliegenden Studie wurde – wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben – durch eine Schlitzblende nur ein Teil des bei der Kraniotomie freigelegten Areals bestrahlt. Die beobachteten Schäden sind klar dem durch die Schlitzblende bestrahlten Areal zuzuordnen, sodass sie auf einer Wirkung des Laserlichtes beruhen dürften. Mechanische Irritationen oder Austrocknen während der Bestrahlung erscheinen als Ursachen eher unwahrscheinlich. Die Klärung des zugrunde liegenden Schädigungsmechanismus dürfte aufgrund der geringen Tiefe der Läsionen für die klinische Anwendung jedoch zweitrangig sein.

Laserbestrahlung nach Applikation von Photofrin II® hingegen erzeugte deutlich tiefere Läsionen einer mittleren Tiefe von 1,77 mm. In anderen tierexperimentellen Studien wurden

nach intraperitonealer Applikation von 12,5 mg/kg KG und einer Bestrahlungsstärke von 100 mW/cm² ab einer Lichtdosis von 1,47 J/cm² Gewebsveränderungen mit partiellen Nekrosen, ab 35 J/cm² komplette Koagulationsnekrosen gefunden (Dereski et al., 1989 und 1991; Yoshida et al., 1992). Eine Dosierung von 4 mg/kg KG i.v. bei stereotaktischer Lichtapplikation von 15 Joule Energie wurde von normalem Hirngewebe ebenfalls nicht toleriert. Bei einer Dosierung von 2 mg/kg KG i.v. wurde im HE-gefärbten Schnitt nach einem bzw. nach drei Tagen eine Aufhellung gefunden, die bis zum siebten Tag reversibel war (Ji et al., 1994). Bei einer Verwendung von HpD wurden ab einer Dosierung von 20 mg/kg KG Schäden am Normalgewebe beobachtet (Kaye et al., 1987; Berenbaum et al., 1984). Eine Studie berichtet sogar schon bei einer klinisch üblichen Dosierung von 5 mg/kg KG (Popovic, Kaye & Hill, 1996; Perria et al., 1980) von einer, wenn auch geringen, Steigerung der Nekrosentiefe gegenüber alleiniger Laserbestrahlung (Cheng et al., 1984).

Die verwendete 5-ALA-Dosierung liegt mit 100 mg/kg KG deutlich über der zur Fluoreszenzdetektion benutzten Dosis von 20 mg/kg KG, mit der eine starke Fluoreszenz humaner maligner Gliome erreicht wird (Stummer et al., 1998/1 und 2000). Zudem werden bei der verwendeten oralen Applikationsform im Vergleich zur intravenösen Verabreichung höhere Dosen benötigt, um vergleichbare PpIX-Konzentrationen zu erzielen (Loh et al., 1993). Trotzdem resultierte keine Steigerung der Läsionstiefe gegenüber alleiniger Laserbestrahlung. Somit bietet 5-ALA bezüglich einer Schädigung von Normalgewebe eine größere Sicherheit als HpD oder Photofrin II®.

4.2.2 Tumortragendes Hirngewebe

Um am histologischen Schnitt durch ein photodynamisch behandeltes C6-Gliom beurteilen zu können, ob die entstandene Nekrose selektiv Tumorgewebe betraf, wurden vor der Behandlung MRTs angefertigt. Anhand einer Serie tumortragender Ratten, deren Hirne unmittelbar im Anschluss an die Anfertigung der MRTs entnommen wurden, konnte durch exakte Vermessung der Tumoren in den histologischen Schnitten und den MRTs gezeigt werden, dass die Tumordimensionen in der MRT korrekt zur Darstellung kommen.

In den PDT-Gruppen wurde bei jedem Tier die phototoxische Nekrose an ihrer tiefsten Stelle vermessen. Im Vergleich dazu wurde die tiefste Ausdehnung des Tumors an der

korrespondierenden MRT bestimmt. Die am tumortragenden Rattenhirn beobachteten, photodynamischen Läsionen stimmten dabei in ihrer Tiefe mit dem entsprechenden Kontrastmittel aufnehmenden Areal in der zugehörigen MRT überein. Es kann also von einer weitgehend selektiven Zerstörung von Tumorgewebe ausgegangen werden.

Bei einigen Tieren fanden sich im Bereich der phototoxischen Tumornekrose Reste vitalen Tumorgewebes. Dieser Befund entspricht den Erwartungen an die PDT von C6-Gliomen der Wistar-Ratte. Studien, in denen nach 5-ALA-Gabe Gefrierschnitte von entsprechenden Tumoren angefertigt wurden, zeigten erhebliche Inhomogenitäten der Anreicherung von PpIX. In manchen Tumorarealen war überhaupt keine Fluoreszenz sichtbar, d.h. kein oder kaum PpIX vorhanden (Hebeda et al., 1998; Stummer et al., 1998/2). Nimmt man die Akkumulation von fluoreszierendem PpIX als notwendige Voraussetzung für eine phototoxische Tumorzerstörung an, so können solche Bereiche durch die PDT nicht zerstört werden. Humane maligne Gliome zeigen dagegen in vitalen Tumorbereichen ein relativ homogenes Fluoreszenzbild (Stummer et al., 1998/1 und 2000). Bedenken hinsichtlich der Effektivität der PDT mit 5-ALA ergeben sich also aus der in der vorliegenden Studie gefundenen, unvollständigen Tumorzerstörung nicht.

Phototoxische Gewebsreaktionen wurden bis in eine maximale Tiefe von 3,7 mm beobachtet. Allerdings erreichte das Tumorwachstum bei den vorliegenden Versuchen in keinem Fall eine größere Tiefe, sodass über die mit 5-ALA-PDT maximal erreichbare Schädigungstiefe aufgrund der vorliegenden Studie keine Aussagen gemacht werden können. Die Erfahrung mit Haematoporphyrinderivat (HpD) zeigt, dass im Tiermodell effektive Schädigungstiefen von 4-7 mm erreicht werden (Kaye & Morstyn 1987), bei der klinischen Anwendung jedoch bis zu 18 mm (Kaye & Hill, 1992). Die für die Photoaktivierung von HpD benutzte Wellenlänge liegt bei 628 nm. Da mit steigender Wellenlänge die Eindringtiefe von Licht in Gewebe zunimmt (Hillegersberg et al., 1994; Wilson, 1989; Van Gemert et al., 1985; Wilson et al., 1985), ist für die 5-ALA-PDT bei einer Wellenlänge von 635 nm mit tieferen Läsionen zu rechnen.

Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass sich die erzielten Läsionstiefen bei Bestrahlung nach 3 bzw. 6 Stunden nach 5-ALA-Applikation nicht unterscheiden, obwohl die Fluoreszenzintensität, die der PpIX-Gesamtkonzentration entspricht, nach 3 Stunden deutlich geringer ist (Stummer et al., 1998/2). Da die Mitochondrien einerseits Bildungsort für PpIX

sind (Ferreira et al., 1988) und andererseits einen der entscheidenden intrazellulären Angriffspunkte der PDT mit endogenen Porphyrinen darstellen (Überriegler et al., 1995), ist denkbar, dass dort sehr frühzeitig für eine Zellzerstörung ausreichende Konzentrationen an PpIX zur Verfügung stehen. Bei anhaltender Synthese, welche zu höherer Fluoreszenzintensität führt, erfolgt eine Umverteilung auf andere zelluläre Strukturen wie Zytoplasma und Zellmembran (Überriegler et al., 1995), die möglicherweise gegenüber der Photooxidation weniger empfindlich sind. Weitere Forschung diesbezüglich ist im Hinblick auf die Wahl des richtigen Bestrahlungszeitpunktes, sowie auf eine eventuell ausreichende, niedrigere Dosierung von 5-ALA wünschenswert.

4.2.3 Ödematöses Hirngewebe

Das tumor-assoziierte Ödem, welches - wie unter 4.1.2. erläutert - durch Austritt von Plasma aus pathologischen Tumorgefäßen entsteht, ist für die Photochemotherapie maligner Gliome von besonderer Bedeutung. Aufgrund seiner Clearance in das Ventrikelsystem durch Massenfluss, findet sich Ödemflüssigkeit auch weit jenseits der Tumorgrenzen (Reulen et al., 1977 und 1978). Intravenös applizierte Photosensibilisatoren, wie z.B. Photofrin, breiten sich mit dem Ödem über die Randzonen des Tumors hinaus aus, was eine unspezifische Sensibilisierung von perifokalem Normalgewebe gegenüber Laserlicht zur Folge hat (Stummer et al., 1993).

In tierexperimentellen Studien wurden auch 5-ALA-induzierte Porphyrine in ödematösen Regionen außerhalb des Tumorgewebes gefunden (Hebeda et al., 1998; Stummer et al., 1998/2). Ihr Ursprung ist bislang unklar. Einerseits wurden nach 5-ALA-Applikation erhöhte Porphyrinspiegel im Blut gefunden (Rick et al., 1997), deren Übertritt über die intratumoral gestörte Blut-Hirn-Schranke und Ausbreitung mit dem Ödem eine denkbare Erklärung wäre. Andererseits breitet sich vermutlich auch im Bereich des Tumors in den Extrazellularraum gewandertes 5-ALA mit der Ödemflüssigkeit aus. Ob Zellen des normalen Hirngewebes die Fähigkeit besitzen, 5-ALA aus dem Extrazellularraum aufzunehmen und daraus Porphyrine zu synthetisieren, ist nicht bekannt. Schlüsselenzyme der Porphyrinsynthese sind in Hirngewebe jedenfalls nachweisbar (Verma et al., 1993), sodass auch eine solche, unspezifische Porphyrinsynthese in Normalgewebe in Betracht gezogen werden muss. Aufgrund der Beobachtung, dass in Zellkultur intrazelluläre, 5-ALA-induzierte Porphyrine in

Gegenwart von Serumalbumin in die Extrazellulärflüssigkeit übertreten (Hananina & Malik, 1992; Steinbach et al., 1995), ist zudem anzunehmen, dass auch in vivo in Gliomzellen synthetisiertes PpIX in die Ödemflüssigkeit übertreten kann.

Die beiden erstgenannten Mechanismen können auch in dem für die vorliegende Studie verwendeten Kälteläsionsmodell wirksam werden. Tatsächlich finden sich am in Folge der Kryoläsion ödematösen Gewebe im Vergleich zum Normalgewebe nach 5-ALA-PDT signifikant tiefere Läsionen von im Mittel 0,83 mm Tiefe. Bei der Kontrollgruppe mit alleinigem Kältetrauma reichte die Gewebsnekrose nur etwa halb so tief, sodass die zusätzliche Schädigung auf der Photoaktivierung von unspezifisch im Ödem angereichertem PpIX beruhen dürfte. Angesichts der oberflächlichen Schädigungstiefen unter einem Millimeter scheint die klinische Bedeutung dennoch eher untergeordnet. Zudem erreichte die Läsionstiefe bei weitem nicht die für Tumorgewebe (2,6 bzw. 2,7 mm) oder Normalgewebe nach Photofrin-PDT (1,77 mm) beobachteten Werte.

Die Selektivität der Photochemotherapie maligner Gliome kann allerdings theoretisch durch den dritten oben angeführten Mechanismus – die Auswaschung von PpIX aus Tumorzellen - zusätzlich beeinträchtigt werden. Der Vergleich der phototoxischen Tumorkläsionen mit dem Kontrastmittel aufnehmenden Areal in den vor der Behandlung angefertigten MRTs zeigte jedoch keine Nekrosen außerhalb tumorös veränderter Areale. Allenfalls die beobachtete Aufhellung des an manifeste Tumornekrosen angrenzenden Normalgewebes kann als unspezifische photodynamische Schädigung gewertet werden. Ebenso ist jedoch denkbar, dass diese Aufhellungen einem posttherapeutisch verstärkten, perifokalen Ödem entsprechen. Jedenfalls wurden vergleichbare Phänomene nach photodynamischer Behandlung von Normalgewebe mit Photofrin II in niedriger Dosierung als reversibel beschrieben (Ji et al., 1994). Auch bei 6 mit 5-ALA behandelten tumortragenden Ratten, bei denen die Hirne erst nach 7 Tagen entnommen wurden, waren keine Gewebsabblösungen mehr zu beobachten (Olzowy und Stummer, unveröffentlichte Beobachtungen).

Die klinische Situation unterscheidet sich ohnehin grundlegend von derjenigen im Tierexperiment, da vor jedem operativen Eingriff an Hirntumoren Glukokortikoide verabreicht werden, wodurch das tumorbegleitende Ödem stark eingedämmt wird (Maxwell et al., 1972). Tatsächlich konnte eine unspezifische Anreicherung von Porphyrinen im perifokalen Normalgewebe humaner maligner Gliome anhand zahlreicher Biopsien aus

fluoreszierendem Gewebe während fluoreszenzgesteuerter Resektion weitestgehend ausgeschlossen werden (Stummer et al., 1998/1 und 2000).

4.2.4 Steroide und PDT

Bei 9 von 10 mit Dexamethason vorbehandelten Tieren konnte keine phototoxische Tumorschädigung festgestellt werden. Die einzige beobachtete Tumorkläsion erreichte nur etwa die halbe Tiefe des vorliegenden Tumors.

Die Mechanismen, die nach Steroidgabe zur Verringerung des tumorassoziierten Ödems führen, sind nicht vollständig bekannt. Entscheidend ist jedoch eine Hemmung der Bildung von Ödemflüssigkeit, nicht eine Beschleunigung der Resorption (Ito et al., 1986; Andersen et al., 1993). Steroide verringern die Durchlässigkeit der Blut-Tumor-Schranke (Andersen et al., 1994), wodurch die Extravasation von Serumbestandteilen (v.a. Albumin) abnimmt (Reichmann et al., 1986). Da 5-ALA ebenso wie Photosensibilisatoren auf Porphyrinbasis die intakte Blut-Hirn-Schranke kaum passieren kann, ist eine Beeinträchtigung der intratumoralen Akkumulation nach Steroidapplikation durchaus denkbar. Tatsächlich ist die Aufnahme von mit Indium-111 markiertem Photofrin unter mehr als 12 mg Dexamethason täglich verringert (Origitano et al., 1993 und 1994; Whelan et al., 1994). Im C6-Gliommodell wurden unter Steroidtherapie nach Applikation von HpD verminderte Fluoreszenzintensitäten gefunden (Hebeda et al., 1995).

In den vorliegenden Experimenten wurde offenbar ebenfalls nicht ausreichend 5-ALA in das Tumorgewebe aufgenommen und zu PpIX verstoffwechselt, um eine phototoxische Wirkung zu erzielen. Tatsächlich wurde bei 6 tumortragenden Ratten, deren Hirne nach identischer Vorbehandlung mit Dexamethason und 5-ALA-Applikation entnommen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden, keine PpIX-Fluoreszenz im Tumorgewebe gefunden (Stummer und Rachinger, bisher unveröffentlichte Beobachtungen). Im Gegensatz dazu zeigen humane maligne Gliome trotz vorheriger Steroidapplikation nach 5-ALA-Gabe eine starke PpIX-Fluoreszenz (Stummer et al., 1998/1 und 2000). Offensichtlich erfolgt die Verringerung der Durchlässigkeit der Blut-Tumor-Schranke durch Dexamethason bei C6-Gliomen - trotz vergleichbarer Dosierung - in stärkerem Maße als bei humanen malignen Gliomen. Worauf diese unterschiedliche Steroidwirkung in Tiermodell und klinischer

Situation beruht, ist nicht bekannt. Da sich jedoch das Ausbleiben einer phototoxischen Wirkung in den vorliegenden Versuchen aus der fehlenden Anreicherung von PpIX im C6-Gliomgewebe hinreichend erklärt, eine ausreichende PpIX-Anreicherung in humanen malignen Gliomen hingegen außer Frage steht, sind Bedenken bezüglich der Effektivität der PDT mit 5-ALA in der klinischen Anwendung aufgrund der vorliegenden Ergebnisse mit hoher Wahrscheinlichkeit unbegründet.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Unter den Tumoren des zentralen Nervensystems weist insbesondere die häufigste Gruppe, die der malignen Gliome, eine sehr schlechte Prognose auf. Diese Tumoren reichern nach Gabe von 5-Aminolaevulinsäure (5-ALA) selektiv fluoreszierendes Protoporphyrin IX (PpIX) an. Dies wird bereits mit gutem Erfolg und ohne wesentliche Nebenwirkungen zur intraoperativen Darstellung des Tumorrandes verwendet. Trotzdem ist eine vollständige Resektion des Tumors wegen der weitläufigen Infiltration des umliegenden Normalgewebes meist nicht ohne das Risiko zusätzlicher neurologischer Ausfälle möglich. Da PpIX auch phototoxische Eigenschaften besitzt, wurde im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen der Möglichkeit nachgegangen, verbleibendes Tumorgewebe durch Bestrahlung mit Laserlicht geeigneter Wellenlänge selektiv zu zerstören. Eine erste Versuchsreihe diente dem Ausschluss einer schädigenden Wirkung der photodynamischen Therapie (PDT) mit 5-ALA auf normales und ödematöses Hirngewebe. Weitere Versuche anhand eines C6-Gliommodells sollten klären, ob sich im Tiermodell eine selektive Tumorzerstörung erzielen lässt.

Hierzu wurden männliche Wistar-Ratten unter Isoflurannarkose kraniotomiert und den folgenden Gruppen zugeordnet: 1) ausschließlich cortikale Laserbestrahlung (Argon-Dye-Laser, 635 nm, 100 mW/cm², 200 J/cm²). 2) Laserbestrahlung des Cortex sechs Stunden nach intravenöser Applikation von 5-ALA (100 mg/kg Körpergewicht). 3) cortikale Kälteläsion zur Induktion eines Hirnödems. 4) Laserbestrahlung des Cortex sechs Stunden nach 5-ALA-Applikation und drei Stunden nach Setzen einer corticalen Kälteläsion 5) Laserbestrahlung des Cortex sechs Stunden nach intravenöser Gabe von Photofrin II (5 mg/kg Körpergewicht).

Zur Tumorinduktion wurden C6-Gliomzellen stereotaktisch in die Hirne von Ratten inokuliert. Am neunten Tag nach Inokulation wurde den Tieren nach MRT-Kontrolle des Tumorwachstums 5-ALA (100 mg/kg KG) i.v. verabreicht und die Gehirne drei bzw. sechs Stunden später bestrahlt (635 nm, 100 mW/cm², 100 J/cm²).

72 Stunden nach Laserbestrahlung wurden die Gehirne entnommen und histologisch untersucht.

Laserbestrahlung nach Gabe von 5-ALA hinterließ oberflächliche Läsionen von weniger als 0,5 mm Tiefe, die sich nicht von denen durch alleinige Laserbestrahlung unterschieden.

Demgegenüber - wie auch gegenüber der isolierten Kälteläsion - erzeugte Laserbestrahlung nach 5-ALA-Gabe auf dem Boden einer Kälteläsion signifikant tiefere Schäden (Mittelwert 0,82 mm). Die mit Abstand tiefsten Läsionen von fast 2 mm Tiefe wurden bei Laserbestrahlung nach Gabe des herkömmlichen Photosensibilisators Photofrin II beobachtet. Die jeweiligen Ausdehnungen der photodynamischen Schädigung an tumortragenden Rattenhirnen stimmten mit dem Areal der Kontrastmittelaufnahme in den vor der Behandlung angefertigten MRTs überein.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass am normalen Rattenhirn durch die Photochemotherapie mit 5-ALA-induziertem PpIX kein nennenswerter Schaden entsteht. Für ödematöses Hirngewebe wurde eine leichte Photosensibilisierung beobachtet, die für die klinische Situation kaum von Bedeutung sein dürfte. Für den bereits klinisch verwendeten Photosensibilisator Photofrin II wurden in der vorliegenden Studie - wie auch zuvor in zahlreichen anderen - bedeutendere Schäden an normalem Hirngewebe beobachtet. Im Hinblick auf Sicherheit gegen Schädigung von Normalgewebe ergibt sich also eine deutliche Überlegenheit von 5-ALA gegenüber herkömmlichen Photosensibilisatoren. Eine klinische Erprobung der PDT mit 5-ALA-induziertem PpIX in der Therapie maligner Gliome ist diesbezüglich ohne Bedenken vertretbar.

Im C6-Gliommodell konnte eine selektive Tumorzerstörung unter Schonung von Normalgewebe erreicht werden. Wie aufgrund des Fluoreszenzmusters von C6-Gliomen nach 5-ALA-Applikation zu erwarten, war diese in den meisten Fällen nicht vollständig. Vergleicht man jedoch die Fluoreszenzmuster von C6-Gliomen und humanen Gliomen, sind für die klinische Anwendung bessere Resultate zu erwarten.

Im Licht der Ergebnisse der vorliegenden Studie, sowie der positiven klinischen Erfahrungen mit der fluoreszenzgesteuerten Resektion maligner Gliome mit 5-ALA-induziertem PpIX hinsichtlich Nebenwirkungen und Spezifität der Anreicherung, sind nun klinische Studien wünschenswert. Als adjuvante Therapieform nach fluoreszenzgesteuerter Resektion maligner Gliome, sowie in der gezielten Behandlung fluoreszierender Tumorreste, die der chirurgischen Entfernung aufgrund ihrer Lokalisation nicht zugänglich sind, könnte die photodynamische Therapie mit 5-ALA-induziertem PpIX einen Fortschritt für die medizinische Handhabung maligner Gliome bedeuten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Albert FK, Forsting M, Sartor K, Adams HP, Kunze S (1994). Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: Objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis. *Neurosurg* 34: 45-61
- (2) Andersen C, Haselgrove JC, Doenstrup S, Astrup J, Gyldensted C (1993). Resorption of peritumoral oedema in cerebral gliomas during dexamethasone treatment evaluated by NMR relaxation time imaging. *Acta Neurochir (Wien)* 122: 218-224
- (3) Andersen C, Astrup J, Gyldensted C (1994). Quantitation of peritumoral oedema and the effect of steroids using NMR-relaxation time imaging and blood-brain barrier analysis. *Acta Neurochir (Wien) [Suppl]* 60: 413-415
- (4) Anderson KE, Drummond GS, Freddara U, Sardina MK, Sassa S (1981). Porphyrinogenic effects and induction of heme oxygenase in vivo by 5-aminolevulinic acid. *Biochem Biophys Acta* 676: 289-299
- (5) Bashir R, Hochberg F, Oot R (1988). Regrowth patterns of glioblastoma multiforme related to planning of interstitial brachytherapy radiation fields. *Neurosurg* 23: 27-30
- (6) Becker N, Wahrendorf J. Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990. Springer 1997;
- (7) Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161: 370-371
- (8) Berenbaum MC, Hall GW, Hoyes AD (1986). Cerebral photosensitization by hematoporphyrin derivative. Evidence for an endothelial site of action. *Br J Cancer* 53: 81-89
- (9) Bothe HW, Botsch W, Hossmann K-A (1884). Relationship between specific gravity, water content and serum protein extravasation in various types of vasogenic brain edema. *Acta Neuropathol (Berl)* 64: 37-42
- (10) Burger PC (1990). Classification, Grading and Patterns of Spread of Malignant Gliomas. In: Apuzzo MLJ (Ed.). *Malignant cerebral glioma. American Association of Neurological Surgeons 1991*
- (11) Burton EC, Prados MD (2000). Malignant Gliomas. *Curr Treat Options Oncol* 1: 459-468
- (12) Cheng M-K, McKean J, Boisvert D, Tulip J, Mielke BW (1984). Effects of photoradiation therapy on normal rat brain. *Neurosurg* 15: 804-810

- (13) Coomber BD, Stewart PA, Hayakawa K, Farrell CL, Del Maestro RF (1987). Quantitative morphology of human glioblastoma multiforme microvessels: Structural basis of blood-brain barrier defect. *J Neurooncol* 6: 299-307
- (14) Cohen JD, Robins HI, Javid MJ et al. (1990). Intracranial C6 glioma model in adult Wistar-Furth rats. *J Neurooncol* 8: 95-96 (Letter)
- (15) Dailey HA, Smith A (1984). Differential interactions of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase. *Biochem J* 223: 441-445
- (16) Dereski MO, Chopp M, Chen Q, Hetzel FW (1989). Normal brain tissue response to photodynamic therapy: histology, vascular permeability and specific gravity. *Photochem Photobiol* 50(5): 653-657
- (17) Dereski MO, Chopp M, Garcia JH, Hetzel FW (1991). Depth measurements and histopathological characterization of photodynamic therapy generated normal brain necrosis as a function of incident optical energy dose. *Photochem Photobiol* 54: 109-112
- (18) Diamond I, Granelli SG, McDonagh AF, Nielsen S, Wilson CB, Jaenicke R (1972). Photodynamic therapy of malignant tumors. *Lancet* 2: 1175-1177
- (19) Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korblik M, Moan J, Peng Q (1998). Photodynamic therapy. Review. *J Natl Cancer Inst* 90: 889-905
- (20) El-Sharabasy MMH, El-Wassel AM, Hafez MM, Salim SA (1992). Porphyrin metabolism in some malignant diseases. *Br J Cancer* 65:409-412
- (21) Ferreira GC, Andrew TL, Karr SW, Dailey HA (1988). Organization of the terminal two enzymes of the heme biosynthetic pathway. Orientation of protoporphyrinogen oxidase and evidence for a membrane complex. *J Biol Chem* 263: 3835-3839
- (22) Foote CS (1991). Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 54: 659
- (23) Fukuda H, Paredes S, Del C. Battle AM (1992). Tumor-localizing properties of porphyrins. In vivo studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid. *Comp Biochem Physiol* 102B: 433-436
- (24) Graham DI, Lantos PL (Eds.). Greenfields Neuropathology, sixth edition. Vol.2, S. 607;
- (25) Grant WE, Hopper C, MacRobert AJ, Speight PM, Bown SG (1993). Photodynamic therapy of oral cancer: photosensitization with systemic aminolaevulinic acid. *Lancet* 342: 147-148

- (26) Hebeda KM, Wolbers JB, Sterenborg HJCM, Kamohorst W, van Gemert JJC, van Alphen HAM (1995). Fluorescence localisation in tumor and normal brain after intratumoral injection of haematoporphyrin derivative into rat brain tumor. *J Photochem Photobiol B: Biol* 27: 85-92
- (27) Hebeda KM, Saarnak AE, Olivo M, Sterenborg HJCM, Wolbers JG (1998). 5-Aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence in 9L and C6 brain tumors and in normal rat brain. *Acta Neurochir* 140: 503-513
- (28) Henderson BW, Waldow SM, Potter WR, Dougherty TJ (1985). Interaction of photodynamic therapy and hyperthermia: tumor response and cell survival studies after treatment of mice in vivo. *Cancer Res* 45: 6071-6077
- (29) Ito U, Tomita H, Tone O, Shishido T, Hayashi H (1986). Formation and resolution of white matter oedema in various types of brain tumors. *Acta Neurochir (Wien) [Suppl]* 51: 149-151
- (30) Ji Y, Powers SK, Brown TJ, Walstad D, Maliner L (1994). Toxicity of photodynamic therapy with Photofrin in the Normal rat brain. *Lasers Surg Med* 14: 219-228
- (31) Kaneko SH, Kobayashi Y, Kohama Y (1995). Stereotactic intratumoral photodynamic therapy on malignant brain tumors. *International Symposium on photodynamic therapy in clinical practice, Innsbruck, 1995, Abstract.*
- (32) Karagianis G, Hill JS, Stylli SS, Kaye AH, Varadaxis NJ, Reiss JA, Phillips DR (1996). Evaluation of porphyrin C analogues for photodynamic therapy of cerebral glioma. *Br J Cancer* 73: 514-521
- (33) Kaye AH, Morstyn G, Ashcroft RG (1985). Uptake and retention of hematoporphyrin derivative in an in vitro/ in vivo model of cerebral glioma. *Neurosurg* 17: 883-890
- (34) Kaye AH, Morstyn G, Gardner I, Pyke K (1986). Development of a xenograft glioma model in mouse brain. *Cancer Res* 46: 1367-1373
- (35) Kaye AH, Morstyn G (1987). Photoradiation therapy causing selective tumor kill in a rat glioma model. *Neurosurg* 20: 408-415
- (36) Kelly PJ, Dumas-Duport C, Kispert DB, Kall BA, Scheithauer BW, Illig JJ (1987). Imaging-based stereotaxic serial biopsies in untreated intracranial glial neoplasms. *J Neurosurg* 66: 865-874
- (37) Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC (1990). Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: Basic principle and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B: Biol* 6: 143-148

- (38) Kennedy JC, Pottier RH, (1992). Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B: Biol* 14: 275-292
- (39) Klatzo I, Piraux A, Laskowski EJ (1958). The relationship between edema blood-brain barrier and tissue elements in a local injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 17: 548-564
- (40) Klatzo I, Wisniewski H, Steinwall O, Streicher E (1967). Dynamics of cold injury edema. In: Klatzo, Seitelberger (eds.). *Brain edema (1st edn)*. Springer-Verlag New York, pp 554-563
- (41) Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1991). Histological typing of tumours of the central nervous system (2nd edn). *Springer-Verlag Berlin* 1993
- (42) Kondo M, Hirota N, Takaoka T, Kajiwara M (1993). Heme-biosynthetic enzyme activities and porphyrin accumulation in normal liver and hepatoma cell line of rats. *Cell Biol Toxicol* 9: 95-105
- (43) Kostron H, Obwegeser A, Jakober R (1996). Photodynamic therapy in neurosurgery: a review. *J Photochem Photobiol B: Biol* 36: 157-186
- (44) Leibovici L, Schoenfeld N, Yehoshua HA, Mamet R, Rakowski E, Shindel A, Atsmon A (1988). Activity of porphobilinogen deaminase in peripheral blood mononuclear cells of patients with metastatic cancer. *Cancer* 62: 2297-2300
- (45) Leunig M, Leunig A, Lankes P, Goetz AE (1994). Evaluation of photodynamic therapy-induced heating of hamster melanoma and its effect on local tumor eradication. *Int J Hyperthermia* 10: 297-306
- (46) Levendag PC, Marijnissen HP, de Ru VJ, Versteeg JA, van Rhooon GC, Star WM (1988). Interaction of interstitial photodynamic therapy and interstitial hyperthermia in a rat rhabdomyosarcoma – a pilot study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 14: 139-145
- (47) Loh CS, MacRobert AJ, Bedwell J, Regula J, Krasner N, Brown SG (1993). Oral versus intravenous administration of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy. *Br J Cancer* 68: 41-51
- (48) Long DM (1984). Microvascular changes in cold injury edema. In: Go KG, Baethman A (eds.). *Recent progress in the study and therapy of brain edema*. New York, Plenum pp 45-54
- (49) Malik Z, Lugaci H (1987). Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins. *Br J Cancer* 56: 589-595
- (50) Maxwell RE, Long DM, French LA (1972). The clinical effects of a synthetic glucocorticoid used for brain edema in the practice of neurosurgery. In: Reulen HJ,

- Schuermann K (eds.). Steroids and brain edema. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1972, pp 219-232*
- (51) McCulloch GAJ, Forbes IJ, Lee See K et al. (1984). Phototherapy in malignant brain tumors. *In: Doiron D, Gomer CJ (eds.). Porphyrin localization and treatment of tumors. New York: Alan R Liss, pp 709-717*
- (52) McGillion FB, Thompson GG, Moore MR, Goldberg A (1974). The passage of 5-aminolevulinic acid across the blood brain barrier of the rat: effect of ethanol. *Biochem Pharmacol 23: 472-474*
- (53) McGillion FB, Thompson GG, Goldberg A (1975). Tissue uptake of 5-aminolevulinic acid. *Biochem Pharmacol 24: 299-301*
- (54) Muller PJ, Wilson BC (1995). Photodynamic therapy for recurrent supratentorial gliomas. *Sem Surg Oncol 11: 346-354*
- (55) Origitano TC, Karesh SM, Henkin RE, Halama JR, Reichmann OH (1993). Photodynamic therapy for intracranial neoplasms: investigations of photosensitizer uptake and distribution using indium-111 photofrin-II single photon emission computed tomography scans in humans with intracranial neoplasms. *Neurosurg 32: 357-364*
- (56) Origitano TC, Caron MJ, Reichmann OH (1994). Photodynamic therapy for intracranial neoplasms. Literature review and institutional experience. *Mol Chem Neuropathol 21: 337-352*
- (57) Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM (1997). 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. Invited Review. *Photochem Photobiol 65(2): 235-251*
- (58) Peng Q, Warloe T, Moan J, Steen H, Giercksky K-E, Nesland JM (1993). Localization of ALA-induced porphyrins in normal and malignant tissues of mice, dogs and patients. *Conference on photosensitization and photochemotherapy of cancer. March 16-17, 1993, Oslo. Abstract book p. S4*
- (59) Perria C, Capuzzo T, Cavagnaro G, Datti R, Francaviglia N, Rivano C, Tercero VE (1980). First attempts at the photodynamic treatment of human gliomas. *J Neurosurg Sci 24: 119-129*
- (60) Perria C, Carai M, Falzoi A, Orunesu G, Rocca A, Massarelli G, Francaviglia N, Jori G (1988). Photodynamic therapy of malignant brain tumors: clinical results of, difficulties with, questions about, and future prospects for the neurosurgical applications. *Neurosurg 23: 557-563*

- (61) Peterson DL, Sheridan PJ, Brown WE (1994). Animal models for brain tumors: historical perspectives and future directions. *J Neurosurg* 80: 865-876
- (62) Popovic EA, Kaye AH, Hill JS (1996). Photodynamic therapy of brain tumors. *J Clin Laser Med Surg* 14: 251-261
- (63) Powers SK, Cush SS, Walstad DL, Kwock L (1991). Stereotactic intratumoral photodynamic therapy for recurrent malignant brain tumors. *Neurosurg* 29: 688-696
- (64) Prados MD, Levin V (2000). Biology and treatment of malignant glioma. *Semin Oncol* 27: 1-10
- (65) Raab O (1900). Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Z Biol* 39:524
- (66) Regula J, MacRobert AJ, Gorchheim A, Buonaccorsi GA, Thorpe SM, Spencer GM, Hatfield ARW, Bown SG (1995). Photosensitization and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal and colorectal tumors using 5-aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX – a pilot study. *Gut* 36: 67-75
- (67) Reichmann HR, Farrell CL, Del Maestro RF (1986). Effects of steroids and nonsteroid anti-inflammatory agents on vascular permeability in a rat glioma model. *J Neurosurg* 65: 233-237
- (68) Remmele W, Pfeiffer J, Schröder JM (Hrsg.). Pathologie. Springer 1995;
- (69) Reulen HJ, Graham R, Spatz M, Klatzo I (1977). Role of pressure gradients and bulk flow in dynamics of vasogenic brain edema. *J Neurosurg* 46: 24-35
- (70) Reulen HJ, Tsuyumu M, Tack A, Fenske AR, Prioleau GR (1978). Clearance of edema fluid into cerebrospinal fluid. A mechanism for resolution of vasogenic brain edema. *J Neurosurg* 48: 754-764
- (71) Rick K, Sroka R, Stepp H, Kriegmaier M, Huber RM, Jacob K, Baumgartner R (1997). Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood. *J Photochem Photobiol B: Biol* 40: 313-319
- (72) Riesenberger R, Fuchs C, Kriegmaier M (1995). Photodynamic effect of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins on human bladder carcinoma cells in vitro. *Eur J Cancer* 32A: 328-334
- (73) Rubino GF, Rasetti L (1966). Porphyrin metabolism in human neoplastic tissues. *Panminerva Medica* 8: 290-292
- (74) San-Galli F, Vrignaud P, Robert J, et al.(1989). Assessment of the experimental model of transplanted C6 glioblastoma in Wistar rats. *J Neurooncol* 7: 299-304

- (75) Schlegel J, Peraud A, Bise K (2001). WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems. In: Reulen HJ, Kreth FW (Bandherausgeber), Tumorzentrum München (Hrg.). *Hirntumoren und primäre Tumoren des Rückenmarks*. W. Zuckschwerdt Verlag München 2001
- (76) Schoenfeld N, Epstein O, Lahav M, Mamet R, Shaklai M, Atsmon A (1988). The heme biosynthetic pathway in lymphocytes of patients with malignant lymphoproliferative disorders. *Cancer Lett* 43: 43-48
- (77) Shapiro WR, Shapiro JR (1998). Biology and treatment of malignant glioma. *Oncology (Huntingt)* 12: 233-240
- (78) Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Mahaley MS, Selker RG, VanGilder JC, Robertson JT, Ransohoff J, Mealey J, Strike TA, Pistenmaa DA (1989). Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. Brain tumor cooperative group trial 8001. *J Neurosurg* 71: 1-9
- (79) Smith A (1987). Mechanisms of toxicity of photoactivated artificial porphyrins. Role of porphyrin-protein interactions. *Ann NY Acad Sci* 514: 309-322
- (80) Sroka R, Gonnert M, Sassy T (1996). In-vitro study of the photodynamic effect of 5-ALA, AIS2Pc and AIS4Pc on squamous epithelial cells in comparison to glioblastoma cells. *Laser & Technology* 6: 105-111
- (81) Stocker S, Knuechel R, Sroka R, Kriegmaier M, Steinbach P, Baumgartner R (1997). Wavelength dependent photodynamic effect on chemically induced rat bladder tumor following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *J Urol* 157: 357-361
- (82) Stummer W, Novotny A, Stepp H, Goetz C, Bise K, Reulen HJ (2000). Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. *J Neurosurg* 93(6): 1003-1013.
- (83) Stummer W, Stocker S, Novotny A, Heimann A, Sauer O, Kempfski O, Plesnila N, Wietzorrek J, Reulen HJ (1998). In vitro and in vivo porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol B*. 45(2-3):160-169
- (84) Stummer W, Stocker S, Wagner S, Stepp H, Fritsch C, Goetz C, Goetz AE, Kiefmann R, Reulen HJ (1998). Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Neurosurgery* 42(3):518-525

- (85) Stummer W, Götz C, Hassan A, Heimann A, Kempfski O (1993). Kinetics of Photofrin II in perifocal brain edema. *Neurosurg 33: 1075-1082*
- (86) Svaasand LO (1985). Photodynamic and photohyperthermia response of malignant tumors. *Med Phys 12: 455-461*
- (87) Szemies R-M, Abels C, Fritsch C, Karrer S, Steinbach P, Bäuml W, Görz G, Goetz A, Landthaler M (1995). Wavelength-dependency of photodynamic effects after sensitization with 5-aminolevulinic acid. In vitro and in vivo. *J Invest Dermatol 105: 672-677*
- (88) Tappeiner Hv, Jesionek D (1903). Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Münchener Medizinische Wochenschrift 47:2042*
- (89) Tappeiner Hv (1900). Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab (Vortrag gehalten bei der Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte zu München in der Abteilung für Innere Medizin und Pharmakologie, 19. September 1899). *Münchener Medizinische Wochenschrift 47,1:5*
- (90) Terr L, Weiner LP (1983). An autoradiographic study of d-aminolevulinic acid uptake by mouse brain. *Exp Neurol 79: 564-568*
- (91) Van Gemert MJC, Berenbaum MC, Gijsberts GHM (1985). Wavelength and light-dose dependence in tumor phototherapy with hematoporphyrin derivative. *Br J Cancer 52: 43-49*
- (92) Van Hillegersberg R, Van den Berg JW, Kort WJ, Terpstra OT, Wilson JHP (1992). Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats. *Gastroenterology 103: 647-651*
- (93) Van Hillegersberg R, Kort WJ, Wilson JHP (1994). Current status of photodynamic therapy in oncology. *Drugs 48 (4): 510-527*
- (94) Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH (1993). Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science 259: 381-384*
- (95) Webber J, Kessel D, Fromm D (1997). Side effects and photosensitization of human tissues after aminolevulinic acid. *J Surg Res 68(1): 31-37*
- (96) Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ (1976). Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer Res 36: 2326-2329*
- (97) Wharen RE, Anderson RE, Laws ER Jr. (1991). Photoradiation therapy of brain tumors. In: *Salzman M (ed.). Neurobiology of brain tumors. New York: Williams & Wilkins, pp 341-357*

- (98) Whelan HT, Kras LH, Ozker K, Bajic D, Schmidt MH, Liu Y, Trembath LA, Uzun F, Meyer GA, Segura AD (1994). Selective incorporation of ¹¹¹In-labeled photofrin by glioma tissue in vivo. *J Neurooncol* 22: 7-13
- (99) Wilson BC, Jeeves WP, Lowe DM (1985). In vivo and post-mortem measurements of the attenuation spectra of light in mammalian tissues. *Photochem Photobiol* 2: 153-162
- (100) Wilson BC (1989). Photodynamic therapy: light delivery and dosage for second-generation photosensitizers. *Ciba Found Symp* 146: 60-77
- (101) Yoshida Y, Dereski MO, Garcia JH, Hetzel FW, Chopp M (1992). Neuronal injury after photoactivation of Photofrin II. *Am J Pathol* 141: 989-997

7. DANKSAGUNG

Diese Stelle möchte ich dazu nutzen, all denjenigen meinen Dank auszusprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. H-J. Reulen, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese experimentelle Arbeit an der von ihm geführten Neurochirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. med. W. Stummer für die Überlassung des interessanten Themas. Er lehrte mich wissenschaftliches Arbeiten und stand mir mit seiner hohen fachlichen Kompetenz „unermüdlich“ mit Rat und Tat zur Seite. Seine freundschaftliche und herzliche Art schafften eine außergewöhnliche, kreative Atmosphäre, unter der das Arbeiten immer Spaß gemacht hat.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente wurden am Laser-Forschungslabor der Urologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Herrn Dr. rer. nat. R. Baumgartner durchgeführt.

Herrn Dr. rer. nat. H. Stepp, Herrn Dr. rer. nat. R. Baumgartner, Thomas Pongratz und all den anderen aus dem Team des Laserforschungslabors, die Ratschläge gaben, mit diskutierten, physikalisches und technisches Know How zur Verfügung stellten, mich vor der drohenden Verzweiflung des Computers wegen bewahrten und ein sehr angenehmes Arbeitsklima schafften.

Herrn Dr. K. Bise, Institut für Neuropathologie, ohne dessen Hilfe bei Auswertung und Dokumentation der histologischen Schnitte diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Die Gespräche mit ihm erweiterten meinen Horizont in neuropathologischer, altphilologischer, kunst- und theaterwissenschaftlicher, universitätspolitischer, philosophischer und jedweder sonst nur irgendwie denkbaren Hinsicht.

Frau A. Henn, deren viele kleine Ratschläge aus ihrer langjährigen neurohistologischen Erfahrung die gute Qualität der Präparate ermöglichten.

Meiner Schwester Claudia, die trotz Stress mit ihrer Magisterarbeit das dringend notwendige Korrekturlesen übernahm.

Meinen Eltern, die mir ohne Diskussionen das für diese Arbeit notwendige Freisemester finanzierten und mich unterstützten wo sie konnten.

Mein besonderer Dank gilt zum Abschluss Frau Dr. hum. biol. S. Stocker. Sie begleitete mich durch die Arbeit von der ersten Ratte bis zur letzten Seite der abgabefertigen Version. Ohne ihre unermüdliche Unterstützung, ihr Organisationstalent und die mit ihrer Hilfe hergestellten Kontakte hätte diese Arbeit wohl doppelt so lange gedauert und sicher nicht halb so viel Spaß gemacht.

8. LEBENSLAUF

Name: Bernhard Olzowy

Geburtsdatum: 11.05.1975

Geburtsort: München

Eltern: Dr. med. Ingeborg Olzowy, geb. Seiler
Dr. med. Michael Olzowy

Familienstand: ledig

Ausbildung:

1981 - 1985 Grundschole an der Peslmüllerstraße, München-Pasing

1985 - 1994 Karlsruhgymnasium Pasing, München

Feb.- Sept. 1995 Reise nach Asien, Neuseeland, Pazifische Inseln, Hawaii

1995 – 2002 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität München

1999 – 2002 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes