

Aus dem  
**Laser-Forschungslabor**  
der **Laser-Immunologie-Forschungs-Einrichtung (LIFE-Zentrum)**  
**Urologische Klinik und Poliklinik**  
**Klinik der Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Stief

UNTERSUCHUNGEN ZUM  
SPEKTRALEN ONLINE-MONITORING  
DER  
INTERSTITIELLEN PHOTODYNAMISCHEN THERAPIE  
AN  
MALIGNEN GLIOMEN

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Maximilian Christian Aumiller  
aus Augsburg  
2023



---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. biol. hum. Ronald Sroka

Mitberichterstatter: PD Dr. Bogdana Suchorska  
Prof. Dr. Olaf Dietrich

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. biol. hum. Herbert Stepp  
Dr. rer. nat. Adrian Rühm

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2023



---

# INHALTSVERZEICHNIS

I.	Publikationsliste .....	1
II.	Abstract .....	5
III.	Zusammenfassung .....	7
IV.	Abkürzungsverzeichnis .....	9
V.	Untersuchungen zum Spektralen Online-Monitoring der interstitiellen photodynamischen Therapie an malignen Gliomen.....	11
A.	Medizinischer Hintergrund der iPDT an malignen Gliomen.....	13
1.	Maligne Gliome .....	13
2.	Diagnose und Therapie des malignen Glioms .....	14
B.	Klinische interstitielle 5-ALA-PDT.....	19
1.	Grundlagen der Gewebeoptik .....	19
2.	Photodynamische Therapie.....	21
3.	Stereotaktische iPDT an malignen Gliomen.....	22
4.	Spektrales Online-Monitoring .....	25
C.	iPDT und SOM an malignen Gliom-Rezidiven .....	27
D.	Untersuchungen zur Ursache der Signalveränderungen im SOM.....	31
1.	Auswirkungen von Blut auf SOM-Signale.....	31
2.	Posttherapeutische MRT-Bildgebung .....	32
3.	Vergleich zwischen Intensitätsänderungen im SOM und T1-Hyperintensitäten im posttherapeutischen MRT .....	34
E.	Weitere iPDT-induzierte Veränderungen optischer Gewebeeigenschaften.....	39
F.	Bedeutung und Zukunft des SOM für die iPDT .....	41
VI.	Originalmanuskripte .....	43
A.	Interstitial Photodynamic Therapy using 5-ALA for Malignant Glioma Recurrences .....	45
B.	Interrelation between Spectral Online Monitoring and Postoperative T1-Weighted MRI in Interstitial Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas.....	63
VII.	Literaturverzeichnis .....	87
VIII.	Danksagung .....	101
IX.	Eidesstattliche Versicherung .....	103



---

# I. PUBLIKATIONSLISTE

## Veröffentlichungen in begutachteten Fachmagazinen:

- Adrian Rühm, Herbert Stepp, Wolfgang Beyer, Maurice Hermwille, Julian Rudrof, Niklas Markwardt, Gabriel Scheib, **Maximilian Aumiller**, Yik-Long Li, Thomas Pongratz, Ronald Sroka, „*Investigation on optical signals for use in interstitial interventions*”, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, (2017), 17:A9; doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.01.021, **JIF**: 2,895
- Christian Heckl, **Maximilian Aumiller**, Adrian Rühm, Ronald Sroka, Herbert Stepp „*Fluorescence and Treatment Light Monitoring for Interstitial Photodynamic Therapy*”, Photochem Photobiol., 96(2):388-396. doi: 10.1111/php.13203 (2020), **JIF**: 3,421
- Stefanie Lietke, Michael Schmutzer, Christoph Schwartz, Jonathan Weller, Sebastian Siller, **Maximilian Aumiller**, Christian Heckl, Robert Forbrig, Karim-Maximilian Niyazi, Rupert Egensperger, Herbert Stepp, Ronald Sroka, Jörg-Christian Tonn, Adrian Rühm, Niklas Thon „*Interstitial Photodynamic Therapy using 5-ALA for Malignant Glioma Recurrences*”, Cancers (Basel), (2021), 13 (8), doi:10.3390/cancers13081767, **JIF**: 6,639
- **Maximilian Aumiller**, Christian Heckl, Stefanie Quach, Herbert Stepp, Birgit Ertl-Wagner, Ronald Sroka, Niklas Thon, Adrian Rühm, „*Interrelation between Spectral Online Monitoring and Postoperative T1-Weighted MRI in Interstitial Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas*”, Cancers (Basel), (2021), 14 (1), doi:10.3390/cancers14010120, **JIF**: 6,639
- Christian Freymüller, Stephan Ströbl, **Maximilian Aumiller**, Maximilian Eisel, Ronald Sroka and Adrian Rühm, „*Development of a microstructured tissue phantom with adaptable optical properties for use with microscopes and fluorescence lifetime imaging systems*”, Lasers Surg Med. 2022 Jun 26. doi: 10.1002/lsm.23556, **JIF**: 4,025
- **Maximilian Aumiller**, Stefanie Quach, Adrian Rühm, Ronald Sroka, „*Interstitial PDT on Malignant Gliomas: About the Possible Relation between Optical Spectral Online Monitoring and T1 Hyper intensity in MRI*”, J Basic Clin Pharma.2023;14(1):216-219. doi:10.37532/0976-0113.14(1).216. Online ahead of print
- Stefanie Quach, Christoph Schwartz, **Maximilian Aumiller**, Marco Foglar, Michael Schmutzer, Sophie Katzendobler, Mohamed El Fahim, Robert Forbrig, Katja Bochmann, Rupert Egensperger, Ronald Sroka, Herbert Stepp, Adrian Rühm and Niklas Thon, „*Interstitial photodynamic therapy for newly diagnosed glioblastoma*”, Journal of Neuro-Oncology 2023 (Accepted) **JIF**: 4.506
- Marco Foglar, Mohamed El Fahim, **Maximilian Aumiller**, Stefanie Quach, Katja Bochmann, Robert Forbrig, Alexander Buchner, Niklas Thon, Ronald Sroka, Adrian Rühm, „*Interstitial photodynamic therapy of glioblastoma: An MRI-based follow-up analysis*” (Submitted to MDPI Cancers 2023)

---

## Veröffentlichungen in Vorbereitung:

- **Maximilian Aumiller**, Maximilian Eisel, Christian Heckl, Christian Freymüller, Herbert Stepp, Ronald Sroka, Adrian Rühm, „*Investigations on the temperature dependence of optical tissue parameters in the range from 25°C to 50°C*” (in Vorbereitung)
- **Maximilian Aumiller**, Asmerom Arazar, Herbert Stepp, Ronald Sroka, Olaf Dietrich, Adrian Rühm, „*Development of an Artificial System with MR and Optical tissue properties (ASMO) of brain tissue*” (in Vorbereitung)
- Mohamed El Fahim, Marco Foglar, **Maximilian Aumiller**, Stefanie Quach, Niklas Thon, Alexander Buchner, Robert Forbrig, Ronald Sroka, Katja Bochmann, Adrian Rühm, „*Posttherapeutic Morphological changes in MRI after interstitial photodynamic therapy*” (in Vorbereitung)
- **Maximilian Aumiller**, Stefanie Quach, Christian Freymüller, Marco Foglar, Mohamed El Fahim, Katja Bochmann, Robert Forbrig, Herbert Stepp, Ronald Sroka, Jörg-Christian Tonn, Niklas Thon, Adrian Rühm, „*MRI-based analysis of light dosimetry in 5-aminolevulinic acid mediated interstitial photodynamic therapy of malignant gliomas with Monte Carlo simulations*” (in Vorbereitung)

## Weitere Veröffentlichungen in „Conference Proceedings“:

- **Maximilian Aumiller**, Birgit Ertl-Wagner, Christian Heckl, Stefanie Lietke, Herbert Stepp, Ronald Sroka, Niklas Thon, Adrian Rühm, „*Investigation on Treatment Light Transmission Changes During IPDT in Comparison to T1 Hyperintensity in Early Posttherapeutic T1-Weighted MRI*”, European Conferences on Biomedical Optics 2021 (ECBO), OSA Technical Digest (Optical Society of America, 2021), paper EW1A.7; (Juni 2021); ISBN: 978-1-943580-95-8
- **Maximilian Aumiller**, Maximilian Eisel, Christian Heckl, Christian Freymüller, Herbert Stepp, Ronald Sroka, Adrian Rühm, „*Investigation of Changes of Optical Tissue Properties up to 50°C*”, Biophotonics Congress 2021, OSA Technical Digest (Optical Society of America, 2021), paper JW1A.6.; (April 2021); ISBN: 978-1-943580-85-9
- Stefanie Lietke, Michael Schmutzer, Adrian Rühm, Christian Heckl, **Maximilian Aumiller**, Ronald Sroka, Friedrich-Wilhelm Kreth, „*Stereotactic interstitial photodynamic treatment of glioblastoma recurrences*”, 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) 9. Joint Meeting mit der Japanischen Gesellschaft für Neurochirurgie; (Juni 2020); doi: 10.3205/20dgnc088
- Stefanie Lietke, Michael Schmutzer, Christoph Schwartz, Jonathan Weller, **Maximilian Aumiller**, Christian Heckl, Robert Forbrig, Maximilian Niyazi, Herbert Stepp, Ronald Sroka, Jörg-Christian Tonn, Adrian Rühm, Niklas Thon, „*CTIM-16. INTERSTITIAL, PHOTODYNAMIC THERAPY WITH 5-ALA FOR MALIGNANT GLIOMA RECURRENCES*”, Neuro-Oncology, Volume 22, Issue Supplement\_2, November 2020, Page ii36 doi: 10.1093/neuonc/noaa215.150
- Christian Heckl, **Maximilian Aumiller**, Adrian Rühm, Herbert Stepp, Ronald Sroka, „*Influence of oxy-, deoxy- and met-hemoglobin absorption in interstitial photodynamic therapy*”, Biophotonics Congress: Biomedical Optics 2020. TW1B.8 (B7); (April 2020); ISBN: 978-1-943580-74-3



- **Maximilian Aumiller**, Adrian Rühm, Maximilian Eisel, Christian Freymüller, Herbert Stepp, André Liemert, Alwin Kienle, Ronald Sroka, „*Individualization of interstitial photodynamic Therapy for malignant gliomas*”, European Conference on Biomedical Optics 2019. 11079 (110790P); (Juni 2019); doi: 10.1117/12.2527115

#### Konferenzbeiträge:

- Mündlicher Vortrag: **Maximilian Aumiller**, Birgit Ertl-Wagner, Christian Heckl, Stefanie Lietke, Herbert Stepp, Ronald Sroka, Niklas Thon, Adrian Rühm, „*Investigation on Treatment Light Transmission Changes During IPDT in Comparison to T1 Hyperintensity in Early Posttherapeutic T1-Weighted MRI*”, European Conference on Biomedical Optics 2021, e-Congress, 20.–24.6.2021
- Poster Präsentation: **Maximilian Aumiller**, Maximilian Eisel, Christian Heckl, Christian Freymüller, Herbert Stepp, Ronald Sroka, Adrian Rühm, „*Investigation of Changes of Optical Tissue Properties up to 50°C*”, OSA Biophotonics Congress, Optics in the Life Sciences, e-Congress, 12.–16.4.2021
- Mündlicher Vortrag: **Maximilian Aumiller**, Birgit Ertl-Wagner, Christian Heckl, Friedrich-Wilhelm Kreth, Adrian Rühm, Stefanie Lietke, Herbert Stepp, Niklas Thon, Ronald Sroka, „*Investigation of changes during treatment light monitoring for interstitial photodynamic therapy of malignant gliomas and hyperintensity in postoperative T1 weighted MRI*”, PD & PDT Update 2020, e-Congress, 5.-6.11.2020
- Poster Präsentation: **Maximilian Aumiller**, Maximilian Eisel, Christian Heckl, Christian Freymüller, Adrian Rühm, Herbert Stepp, Ronald Sroka, „*Investigations on the temperature dependence of optical tissue properties in the range of 20° to 50°C*”, PD & PDT Update 2020, e-Congress, 5.-6.11.2020
- Mündlicher Vortrag: **Maximilian Aumiller**, Adrian Rühm, Maximilian Eisel, Christian Freymüller, Herbert Stepp, André Liemert, Alwin Kienle, Ronald Sroka, „*Individualization of interstitial photodynamic Therapy for malignant gliomas*”, European Conference on Biomedical Optics 2019, Munich, Deutschland, 23.–27.6.2019
- Poster Präsentation: **Maximilian Aumiller**, Gabriel Scheib, Maximilian Eisel, Adrian Rühm, Ronald Sroka „*Interstitial measurement of optical tissue properties for interstitial photodynamic therapy*”, PD & PDT Update 2018, Kochel a. See, Deutschland, 18.-22.9.2018

#### Weitere Konferenzbeiträge als Ko-Autor:

- Mündlicher Vortrag: Stefanie Lietke, Michael Schmutzer, Christoph Schwartz, Jonathan Weller, **Maximilian Aumiller**, Christian Heckl, Robert Forbrig, Karim-Maximilian Niyazi, Herbert Stepp, Ronald Sroka, Jörg-Christian Tonn, Adrian Rühm, Niklas Thon, „*Interstitial Photodynamic Therapy using 5-ALA for malignant Glioma Recurrences*“, PD & PDT Update 2020, e-Congress, 5.-6.11.2020
- Poster Präsentation: Christian Heckl, **Maximilian Aumiller**, Adrian Rühm, Ronald Sroka, Herbert Stepp, „*Hemoglobin absorption during interstitial photodynamic therapy*”, PD & PDT Update 2020, e-Congress, 5.-6.11.2020
- Mündlicher Vortrag: Adrian Rühm, **Maximilian Aumiller**, Christian Heckl, Herbert Stepp, Christoph Schwartz, Stefanie Lietke, Niklas Thon, Jörg-Christian Tonn, Friedrich-Wilhelm Kreth, Ronald Sroka, „*Light Dosimetry and Spectral Online Monitoring*”

---

for *Interstitial Photodynamic Therapy of Brain Tumors*“, PD & PDT Update 2020, e-Congress, 5.-6.11.2020

- Mündlicher Vortrag: Stefanie Lietke, Micheal Schmutzer, Adrian Rühm, Christian Heckl, **Maximilian Aumiller**, Ronald Sroka, Friedrich-Wilhelm Kreth, „*Stereotactic interstitial photodynamic treatment of glioblastoma recurrences*“, 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) 9. Joint Meeting mit der Japanischen Gesellschaft für Neurochirurgie, e-Congress, 21.-24.06.2020
- Mündlicher Vortrag: Christian Heckl, **Maximilian Aumiller**, Adrian Rühm, Herbert Stepp, Ronald Sroka, „*Influence of oxy-, deoxy- and met-hemoglobin absorption in interstitial photodynamic therapy*“, Biophotonics Congress: Biomedical Optics, OSA Virtual Event, 20.-23.04.2020
- Mündlicher Vortrag: Christain Heckl, Adrian Rühm, **Maximilian Aumiller**, Herbert Stepp, Ronald Sroka, „*Intra-operative measurement of optical tissue parameters to individualize treatment planning in stereotactic interstitial PDT of malignant glioma*“, Topical Problems of Biophotonics, Nizhny Novgorod, Russland, 27.-31.07.2019
- Mündlicher Vortrag: Adrian Rühm, **Maximilian Aumiller**, Christian Heckl, Herbert Stepp, Ronald Sroka, „*Light Dosimetry and Monitoring Approaches for Interstitial Photodynamic Therapy*“, 17th International Photodynamic Association World Congress, Cambridge, Massachusetts, USA, 28.06.-04.07.2019
- Mündlicher Vortrag: Adrian Rühm, **Maximilian Aumiller**, Christian Heckl, Thomas Pongratz, Wolfgang Beyer, Herbert Stepp, Ronald Sroka, „*Fluorescence Diagnostic and PDT in Neurosurgery*“, Sino-German Workshop, Fuzhou, China, 10.04.2019
- Mündlicher Vortrag: Adrian Rühm, **Maximilian Aumiller**, Christian Heckl, Herbert Stepp, Ronald Sroka, „*Spectral Online Monitoring during interstitial PDT*“, PD & PDT Update 2018, Kochel a. See, Deutschland, 18.-22.9.2018
- Mündlicher Vortrag: Genny A. Pang, Adomas Griauslys, **Maximilian Aumiller**, Adrian Rühm, Christoph Haisch, „*Experimental Determination of Absorption, Scattering, and Photoacoustic Signal from Gold Nanoparticles*“, ICNP 2016, The 9th International Conference on Nanophotonics, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, 21-25.03.2016

---

## II. ABSTRACT

The most common primary brain tumors are gliomas, of which 66% are classified as malignant tumors. Malignant gliomas are associated with a poor prognosis for overall survival (OS). With the best possible therapy, the median OS is about 2 years for WHO2016–grade III and 15-22 months for WHO2016-grade IV. The standard treatment for malignant gliomas is fluorescence-guided resection followed by radiochemotherapy. If eloquent brain areas are affected by the malignant glioma, resection is only partially possible or not at all possible. For such cases, additional innovative forms of therapy are necessary.

A selective therapeutic approach for the treatment of malignant gliomas, which is investigated in clinical trials and is under further development, is the interstitial photodynamic therapy (iPDT).

During iPDT, a phototoxic response is initiated by the interaction of light with a photosensitizer in the presence of intracellular oxygen. In 5-aminolevulinic acid (5-ALA) mediated iPDT, 5-ALA is administered orally as a prodrug and metabolized to the photosensitizer protoporphyrin IX (PpIX) during heme biosynthesis. Tumor-specific peculiarities (e.g. defective blood-brain barrier, metabolism) lead to a transient selective accumulation of PpIX in the tumor cells.

Light-induced excitation of PpIX produces singlet-oxygen molecules ( $^1\text{O}_2$ ) and other reactive oxygen species (ROS) via energy transfer. These reactive molecules oxidize macromolecules in the cells, thus inducing cell death by apoptosis and necrosis. The irradiation is performed with laser light applied via cylindrical light diffusers (wavelength 635 nm, power 200 mW/cm diffuser length; duration 60 min). The light diffusers are positioned in the tumor volume within the framework of a stereotactic procedure. The light diffusers' number and their positions are determined individually based on the tumor's size, shape and localization. To control the accumulation of the photosensitizer within the target tissue and to evaluate the irradiation, Spectral Online Monitoring (SOM) was developed as an extension of iPDT. During SOM, the crosstalk of the light propagating in the tissue between 2 light diffusers, before and after iPDT irradiation, can be measured with a suitable detection unit. This way, the intensity of PpIX fluorescence on the one hand and of transmitted laser light on the other can be detected and evaluated intraoperatively between all pairs of light diffusers.

In this dissertation, for the first time, clinical data sets from iPDT healing trials with SOM data collection were analyzed and also correlated with MRI data (pre- and post-iPDT) and iPDT-induced effects [1, 2]. The retrospectively analyzed iPDT treatments included healing trials on malignant glioma recurrences and de novo malignant gliomas.

47 iPDT healing trials (44 with fully evaluable clinical data set) on non-resectable malignant glioma recurrences were retrospectively analyzed, and promising iPDT treatment outcomes were noted [1]. The median time to recurrence after iPDT (progression-free survival, PFS) was 7,1 months. The median survival after iPDT (post-recurrence survival, PRS) was 13,0 months. Overall survival of at least 2 years was observed in 25% of patients.

The hypothesis of an association between SOM data and response to iPDT could be tested in the patients with collected SOM data ( $n = 18/47$ ). It was found that the presence of both

---

PpIX fluorescence before iPDT irradiation and detectable light transmission of laser light after iPDT irradiation may be associated with more prolonged survival.

Furthermore, 11 iPDT healing trials of non-resectable de-novo malignant gliomas were retrospectively analyzed concerning the collected SOM and MRI data (T1-weighted with/without contrast agent) in this work [2]. Post-therapeutic T1-weighted MRI without contrast agent showed tissue volumes with newly diagnosed intrinsic T1 hyperintensity in all cases, which is usually associated with methemoglobin (MetHb). These tissue volumes were smaller than 4 cm<sup>3</sup> (median 0,79 cm<sup>3</sup>) and were comparable in size to silent hemorrhages after tumor biopsies. In general, on MRI, T1 hyperintensity is expected only after 48 h in the subacute phase of hemorrhage.

The hypothesis that there is a relationship between the localization of intrinsic T1 hyperintensity and changes in transmitted therapy light or optical absorption evident in the SOM was confirmed by three-dimensional analyses ( $p = 0,003$ ). The early appearance of a MetHb signal on MRI (median: 26 h after iPDT) can also be considered an indicator of an iPDT-promoted formation of MetHb. This is consistent with laboratory and animal studies in which MetHb emergence associated with PDT-irradiation was also observed.

Furthermore, *in vitro* studies under the hypothesis that there is a temperature dependence on optical tissue properties were performed in this dissertation. These show that the oxidation of hemoglobin to MetHb can also be initiated by a temperature increase of hemoglobin from 36°C to 41°C (auto-oxidation), not only by PDT-induced processes.

The analyses of iPDT treatment data, clinical imaging, and SOM data, performed for the first time in this dissertation, contribute to the understanding of iPDT-induced processes and provide an enhanced insight regarding iPDT-induced responses and effects in the treatment volume.

The applied analytical procedures can be further developed to establish a method for *in vivo* determination of brain optical tissue properties based on SOM data, which can subsequently be elaborated into an individualized treatment concept of iPDT. Although the clinical predictive value of the SOM data should remain the subject of intensive investigation and discussion, meaningful information about the light distribution in the treatment volume can already be directly derived from the SOM data (fluorescence and transmission signal). And this may be integrated into future light dosimetric concepts.

---

### III. ZUSAMMENFASSUNG

Die am häufigsten auftretenden Primärtumore im Gehirn sind Gliome, von denen 66% als maligne einzustufen sind. Die malignen Gliome sind mit einer schlechten Prognose für das Gesamtüberleben (overall survival, OS) verbunden. Bei bestmöglicher Therapie ist das mediane Gesamtüberleben bei WHO2016-Grad III etwa 2 Jahre und bei WHO2016-Grad IV 15-22 Monate. Die Standardtherapie des malignen Glioms besteht in fluoreszenzgestützter Resektion mit anschließender Radiochemotherapie. Wenn durch das maligne Gliom eloquente Gehirnareale betroffen sind, ist eine Resektion entweder nur teilweise oder gar nicht möglich. Für solche Fälle sind zusätzliche innovative Therapieformen notwendig.

Ein selektiver Therapieansatz zur Behandlung von malignen Gliomen, der sich in der Zulassungsphase und klinisch-technischen Entwicklung befindet, ist die interstitielle photodynamische Therapie (iPDT). Bei dieser wird durch die Interaktion von Licht mit einem Photosensibilisator in Anwesenheit von intrazellulärem Sauerstoff eine phototoxische Reaktion initiiert. Bei der iPDT auf Basis von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) wird 5-ALA als Prodrug oral verabreicht und im Rahmen der Hämbiosynthese zum Photosensibilisator Protoporphyrin IX (PpIX) metabolisiert. Tumorspezifische Besonderheiten (z.B. defekte Blut-Hirn-Schranke, Metabolismus) führen zu einer transient-selektiven Anreicherung von PpIX.

Durch Anregung des PpIXs mittels Licht entstehen durch einen Energieübertrag Sauerstoffmoleküle im Singulett-Zustand ( $^1\text{O}_2$ ) und weitere reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Diese oxidieren in der Zelle befindliche Makromoleküle, wodurch der Zelltod durch Apoptose und Nekrose eingeleitet wird. Die Bestrahlung wird mit Laserlicht durchgeführt, welches über zylindrische Lichtdiffusoren appliziert wird (Wellenlänge 635 nm, Leistung 200 mW/cm Diffusorlänge; Dauer 60 min). Hierzu werden Lichtdiffusoren im Rahmen eines stereotaktischen Eingriffs im Tumolvolumen positioniert. Deren Anzahl und Lage werden anhand der Größe, Form und Lokalisation des Tumors individuell festgelegt. Zur Kontrolle der Anreicherung des Photosensibilisators im Zielgewebe, sowie zur Beurteilung der Bestrahlung wurde als Erweiterung der iPDT das Spektrale Online-Monitoring (SOM) entwickelt. Im Zuge des SOM kann das Übersprechen des Lichtes im Gewebe zwischen 2 Lichtdiffusoren vor und nach der iPDT-Bestrahlung mit einer geeigneten Detektionseinheit gemessen werden. So können intraoperativ zwischen den jeweiligen Lichtdiffusorpaaren einerseits die Intensität der PpIX-Fluoreszenz und andererseits die Intensität des transmittierten Laserlichtes nachgewiesen und ausgewertet werden.

In der vorliegenden Dissertationsschrift wurden erstmalig klinische Datensätze von iPDT-Heilversuchen mit SOM-Datenerhebung analysiert und auch mit MRT-Daten (prä- und post-iPDT), sowie mit iPDT-induzierten Effekten in Zusammenhang gebracht [1, 2]. Die retrospektiv analysierten iPDT-Behandlungen umfassten Heilversuche an malignen Gliom-Rezidiven und De-novo malignen Gliomen.

Es wurden 47 iPDT-Heilversuche (44 mit vollständig auswertbarem klinischen Datensatz) an nicht resezierbaren malignen Gliom-Rezidiven retrospektiv analysiert und vielversprechende iPDT-Behandlungsergebnisse festgestellt [1]. Der mediane Zeitraum nach

---

iPDT bis zum Wiederauftreten eines Rezidivs (progression-free survival, PFS) betrug 7,1 Monate. Das mediane Gesamtüberleben nach iPDT (post-recurrence survival, PRS) betrug 13,0 Monate. Ein Gesamtüberleben von mind. 2 Jahren wurde bei 25% der Patienten beobachtet.

Die Hypothese eines Zusammenhanges zwischen SOM-Daten und dem Ansprechen auf die iPDT konnte an den Patienten mit erhobenen SOM-Daten ( $n = 18/47$ ) überprüft werden. Es zeigte sich, dass das Vorhandensein sowohl von PpIX-Fluoreszenz vor iPDT-Bestrahlung als auch von detektierbarer Lichttransmission des Laserlichtes nach iPDT-Bestrahlung mit einem längeren Überleben assoziiert werden kann.

Des Weiteren wurden 11 iPDT-Heilversuche an nicht resezierbaren De-novo malignen Gliomen in dieser Arbeit retrospektiv analysiert bezüglich der erhobenen SOM- und MRT-Daten (T1-Bildgebung mit/ohne Kontrastmittel) [2]. Die posttherapeutische T1-Bildgebung ohne Kontrastmittel zeigt in allen Fällen Gewebevolumina mit intrinsischer T1-Hyperintensität, welche üblicherweise mit der Anwesenheit von Methämoglobin (MetHb) in Verbindung gebracht wird. Diese Gewebevolumina waren kleiner als  $4 \text{ cm}^3$  (Median  $0,79 \text{ cm}^3$ ) und in ihrer Größe vergleichbar mit stillen Hämorrhagien nach Tumorbiopsien. Im Allgemeinen wird eine mit MetHb-Bildung assoziierte T1-Hyperintensität erst nach 48 h in der subakuten Phase einer Hämorrhagie im MRT erwartet.

Die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation intrinsischer T1-Hyperintensität und im SOM ersichtlichen Änderungen des transmittierten Therapielichts bzw. der optischen Absorption besteht, konnte durch dreidimensionale Analysen bestätigt werden ( $p = 0,003$ ). Das frühe Auftreten eines MetHb-Signals im MRT (Median: 26 h nach iPDT) kann auch als Indikator einer durch die iPDT geförderten von MetHb aus Hämoglobin angesehen werden. Dies steht im Einklang mit Labor- und Tierversuchen, bei denen ebenfalls eine MetHb Entstehung in Verbindung mit der PDT-Bestrahlung beobachtet wurde.

Weiterhin wurden im Rahmen dieser Dissertation In-vitro-Untersuchungen unter der Hypothese, dass eine Temperaturabhängigkeit optischer Gewebeeigenschaften besteht, durchgeführt. Diese zeigen, dass die Oxidation von Hämoglobin zu MetHb auch durch eine Temperaturerhöhung des Hämoglobins von  $36^\circ\text{C}$  auf  $41^\circ\text{C}$  (Autooxidation) initiiert werden kann, nicht nur durch PDT-induzierte Prozesse.

Die im Rahmen dieser Dissertation erstmalig durchgeführten Analysen von iPDT-Behandlungsdaten, klinischer Bildgebung und SOM-Daten tragen zum Verständnis der iPDT-induzierten Prozesse bei und ermöglichen einen erweiterten Einblick hinsichtlich iPDT-induzierter Reaktionen und Effekte im Behandlungsvolumen.

Die angewendeten Analyse-Verfahren können zur Etablierung einer Methode zur In-vivo-Bestimmung von optischen Gewebeeigenschaften des Gehirns anhand der SOM-Daten weiterentwickelt werden, welche in der Folge zu einem individualisierten Behandlungskonzept der iPDT ausgearbeitet werden kann. Wenngleich der klinisch-prognostische Wert der SOM-Daten weiterhin Gegenstand intensiver Untersuchungen und Diskussionen bleiben sollte, können aus den SOM-Daten (Fluoreszenz- und Transmissionssignal) bereits unmittelbar wichtige Informationen über die Lichtverteilung im Behandlungsvolumen abgeleitet und in zukünftige lichtdosimetrische Konzepte integriert werden.

---

## IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$^1\text{O}_2$	-	Singulett-Sauerstoff
5-ALA	-	5-Aminolävulinsäure
CI	-	Konfidenzintervall
CNS	-	Zentrales Nervensystem
CNS5	-	WHO-Kategorie der Gliome, glioneuralen Tumore und neuronalen Tumore
CRET	-	<b>C</b> omplete <b>R</b> esection of <b>E</b> nha <b>n</b> c <b>i</b> ng <b>T</b> umor
CT	-	Computertomographie
FGR	-	Fluoreszenzgestützte Resektion
HbO <sub>2</sub>	-	Oxygeniertes Hämoglobin
Hb	-	Deoxygeniertes Hämoglobin
IDH	-	Isocitrat-Dehydrogenase
MetHb	-	Methämoglobin
MGMT	-	O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase
MRI	-	Magnetresonanztomographie
OS	-	Gesamtüberleben ( <b>O</b> ver <b>S</b> urvival)
PDT	-	Photodynamische Therapie
iPDT	-	Interstitielle Photodynamische Therapie
iqr	-	Interquartilabstand
PET	-	Positronen-Emissionstomographie
FET-PET	-	F-18-Fluorethyltyrosin PET
PpIX	-	Protoporphyrin IX
ROS	-	Reaktive Sauerstoffspezies
PFS	-	Progressionsfreies Überleben ( <b>P</b> rogression- <b>F</b> ree <b>S</b> urvival)
PRS	-	Zeitraum nach Auftreten eines Rezidivs bis zum Tod ( <b>P</b> ost- <b>R</b> ecurrence <b>S</b> urvival)
SOM	-	Spektrales Online-Monitoring
TERT	-	Telomerase Reverse Transcriptase
TMZ	-	Temozolomid
TTF	-	Tumor-Treating-Fields
WHO	-	World Health Organisation
WHO2016	-	WHO-Klassifizierung der Tumore des zentralen Nervensystems des Jahres 2016
WHO2021	-	WHO-Klassifizierung der Tumore des zentralen Nervensystems des Jahres 2021
$\mu_a$	-	Optischer Absorptionskoeffizient
$\mu_s$	-	Optischer Streukoeffizient
$\mu_s^c$	-	Optischer reduzierter Streukoeffizient





---

# V. UNTERSUCHUNGEN ZUM SPEKTRALEN ONLINE-MONITORING DER INTERSTITIELLEN PHOTODYNAMISCHEN THERAPIE AN MALIGNEN GLIOMEN

Die nachfolgende Arbeit wurde im Rahmen der Forschungstätigkeit am Laser-Forschungslabor des LIFE-Zentrums der Urologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität zu München in Großhadern angefertigt. Sie wird als kumulative Dissertation, basierend auf zwei Veröffentlichungen, welche beide in der Fachzeitschrift *Cancers* (ISSN 2072-6694, MDPI, Basel, Schweiz) publiziert wurden, an der Fakultät für Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität zu München eingereicht.

Inhalt dieser Arbeit sind Analysen und Untersuchungen von technischen und bildgebenden Daten, welche im Zuge von Heilversuchen mit der *5-Aminolävulinsäure* (5-ALA) basierten *interstitiellen photodynamischen Therapie* (interstitielle PDT oder iPDT) an malignen Gliomen aufgenommen wurden. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die spektroskopischen Messungen während der iPDT gerichtet, das *Spektrale Online-Monitoring* (SOM). Beim SOM werden unmittelbar vor und nach der iPDT-Bestrahlung intraoperativ Messungen des Fluoreszenzsignals des Photosensibilisators *Protoporphyrin IX* (PpIX) und des Transmissionssignales des Therapielichtes im Gewebe zwischen jeweils zwei für die iPDT-Bestrahlung positionierten Lichtdiffusoren durchgeführt. Beide Signale wurden hinsichtlich ihrer Änderung (vor/nach iPDT-Bestrahlung) an malignen De-novo-Gliomen und Gliom-Rezidiven untersucht. Im Rahmen der Dissertation wurden die Daten von iPDT-Behandlungen maligner Gliome retrospektiv analysiert, um das Verständnis und Wissen über Mechanismen der iPDT zu vertiefen.

In der ersten Publikation dieser Arbeit wurden 47 iPDT-Heilversuche (44/47 mit vollständigem klinischen Datensatz) an malignen Gliom-Rezidiven zusammengefasst und bezüglich der klinischen Faktoren, wie Nebenwirkungen und Überleben analysiert [1]. Außerdem wurden erste klinische Vergleiche durchgeführt um mögliche prognostische Faktoren zur iPDT an Gliom-Rezidiven zu erhalten.

Es wurden bei 18/44 iPDT-Behandlungen SOM-Daten aufgenommen und erstmals mit einer eigens entwickelten Methodik bezüglich der Signale der Transmission des Therapielichtes im Gewebe und der Fluoreszenz des Photosensibilisators analysiert.

Eine vertiefte SOM-Datenanalyse sollte Hinweise liefern, ob SOM-Daten sich als prognostische Faktor anbieten und die SOM-Daten wurden unter der Hypothese analysiert; dass ein positives SOM-Ergebnis mit einem guten Ansprechen des Tumors auf die Therapie korreliert. Denn das SOM-Verfahren ermöglicht eine grundlegende patientenspezifische Beurteilung der Qualität der Lichtapplikation und des Verlaufs der iPDT-Bestrahlung.

In der zweiten Publikation wurden 11 SOM-Datensätze von 15 iPDT-Behandlungen an neu diagnostizierten (De-novo) malignen Gliomen analysiert. Dabei wurden die Analysen des

---

SOM und die zugehörigen Methoden weiter vertieft und derart erweitert, dass die exakte Veränderung der Signalintensitäten der Transmission des Therapielichtes bestimmt werden kann [2]. Ferner wurden aus den SOM-Signalen optische Gewebeeigenschaften und deren Änderung in Folge der iPDT-Bestrahlung extrahiert. Die Analyse der zugehörigen MRT-Bildaufnahmen zeigt PDT-spezifische Bildveränderungen in Form einer neu auftretenden (24h nach iPDT-Bestrahlung) intrinsischen T1-Hyperintensität.

Die Vergleiche zwischen den aus den SOM-Daten erhaltenen Ergebnissen zur Signalveränderung und der im MRT beobachteten neu auftretenden intrinsischen T1-Hyperintensität nach erfolgter iPDT basiert auf der Hypothese, dass der Verlust an Signalstärke der Transmission des Therapielichtes mit der einer neu aufgetretenen intrinsischen T1-Hyperintensität in dem das Lichtapplikatorpaar umgebende Volumen korreliert.

Dazu wurden Methoden entwickelt, um einen dreidimensionalen Vergleich zwischen der Lokalisation der intrinsischen T1-Hyperintensität und der Position der Lichtdiffusoren, welche für die iPDT-Bestrahlung verwendet werden, durchzuführen.

Nachfolgend werden die medizinischen Grundlagen zu malignen Gliomen und deren Behandlung, sowie zur iPDT und des SOM-Verfahrens beschrieben.

---

## A. MEDIZINISCHER HINTERGRUND DER iPDT AN MALIGNEN GLIOMEN

Das in der Entwicklung befindliche iPDT-Konzept an malignen Gliomen setzt ein grundlegendes Verständnis über maligne Gliome, sowie deren Diagnostik und der therapeutischen Verfahren voraus, welche im Folgenden beschrieben werden.

### 1. MALIGNE GLIOME

Maligne Gliome zählen zu den Tumoren des zentralen Nervensystems aus der Kategorie der Gliome. Gliome sind Primärtumore im Gehirn, welche am häufigsten im Erwachsenenalter auftreten [3, 4]. Die Gesamtepidemiologie der Gliome beträgt 6/100000 Menschen pro Jahr, wobei Männer etwa 1,6-mal öfter betroffen sind als Frauen [5-7]. Der Anteil von höhergradigen, malignen Gliomen inklusive sogenannter Glioblastome an allen Gliomen beträgt etwa 66% (4/100000 Menschen pro Jahr) [8]. Erste Symptome bei der Erkrankung sind meist alltägliche Erscheinungen wie Kopfschmerz und Migräne. Die Diagnose erfolgt erst nach dem Auftreten schwerwiegender neurologischer Ausfälle. Diese reichen von Analgesie und weiteren Empfindungsstörungen, über Paresen bis hin zu (neu-)auftretender Epilepsie [8-10]. Diverse genetische Erkrankungen können die Wahrscheinlichkeit der Entstehung erhöhen (z. B.: Neurofibromatose Typ I u. II, Lynch Syndrom, Li-Fraumeni Syndrom u. a.) [11-14].

Die klinische Erstdiagnose erfolgt nach Screening des Patienten mittels bildgebender Verfahren, *Computertomographie* (CT) und / oder *Magnetresonanztomographie* (MRT) [15]. Die Verifikation der CT / MRT-Diagnose erfolgt meist auf Basis eines histopathologischen Befundes einer Gewebeprobe (Biopsie) aus dem identifizierten Hirnareal [16].

Anhand der diagnostischen Ergebnisse wird der Tumor klassifiziert, indem dessen Tumorart bestimmt wird und dem entsprechenden *World Health Organisation* (WHO) Grad zugeordnet wird. Die Tumore des *Zentralen Nervensystems* (CNS) werden nach den Vorgaben der WHO in vier Grade unterteilt, wobei sich die Prognosen für Heilung und Überleben mit der Höhe des Grades verschlechtern [17, 18]. Die WHO führte 2021 eine Überarbeitung der Klassifizierung der Tumore des CNS ein. Die Nummerierung der Schweregrade der Tumoren wurde von römischen Ziffern (WHO2016-Grad I-IV) auf arabische (WHO2021-Grad 1-4) umgestellt. Die Einteilung der Tumortypen wurden überarbeitet, indem teils neue Tumorentitäten eingeführt wurden oder die Definition der alten Entitäten erweitert und/oder abgeändert wurde. Die Tumorklassifizierung erfolgt nun primär anhand biomolekularer Marker (Genmutationen des Tumors), wie beispielsweise *Isocitrat-Dehydrogenase Mutation* (IDH-Mutation) oder *Telomerase Reverse Transcriptase Mutation* (TERT-Mutation) [19, 20]. Mit der erweiterten Berücksichtigung der Genmutationen wurden im Bereich der Gliome, der glioneuralen Tumore und der neuronalen Tumore (Tumor-Gruppe WHO CNS5) insgesamt 14 Entitäten eingeführt oder geändert [18]. Bei der bisherigen Einteilung (WHO2016-Grad I-IV) wurde der Schweregrad hauptsächlich anhand des Wachstums der Zellstruktur und der prognostizierten Überlebenszeit festgesetzt, wodurch die Einteilung stark von der Erfahrung des jeweiligen Pathologen abhing. Mit den WHO2021-Graden 3 und 4 zählen maligne Gliome zu den Tumoren mit einer sehr ungünstigen Prognose. Außerdem zeigen Glioblastome und

---

andere maligne Gliome ein diffuses Zellwachstum in gesundes Gewebe hinein [21, 22]. Zusätzlich verteilen sich die Gliomzellen entlang der Axone im gesamten Gehirn. Dadurch ist eine exakte Festlegung des Tumorrandes und die Bestimmung der genauen Größe der Raumforderung nicht möglich, wodurch die Festlegung des Behandlungsvolumens erschwert wird. Bei idealer Behandlung ist beim WHO2021-Grad 4 das mediane Gesamtüberleben 48 Monate (WHO2016-Grad IV 22 Monate), im Falle des methylierten Status des *O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase* (MGMT) Promoter [23]. Im nicht-methylierten Fall des MGMT-Status verschlechtert sich das mediane Überleben auf 15 Monate.

## 2. DIAGNOSE UND THERAPIE DES MALIGNEN GLIOMS

Durch die spezifischere Einteilung der Tumorentitäten wurde neben der Prognose des Patienten auch die Erstellung des individuellen Behandlungsschemas vereinfacht, da neben Lage und Größe des Tumors nun die biomolekulare Klassifizierung stärker berücksichtigt wird. Im Folgendem werden die grundlegenden, diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen erläutert, welche auch in den „*EANO Leitlinien zur Diagnose und Behandlung diffuser Gliome des Erwachsenenalters*“ [4] zu finden sind.

### a) Diagnostische Verfahren

Die initiale Differentialdiagnose wird mittels CT oder MRT durchgeführt und ist der erste Schritt zur Diagnose eines malignen Glioms [24]. Anhand der initialen Bildgebung kann nicht nur ein erster Anhaltspunkt gefunden werden, ob ein benigner (WHO2021-Grad 1/2) oder maligner (WHO2021-Grad 3/4) Tumor vorliegt, sondern sie wird primär zum Ausschluss anderer akuter neurologischer Erkrankungen, wie eines ischämischen oder hämorrhagischen Schlaganfalls, einer Zyste oder einer intrazerebralen Blutung, genutzt. Diese Erkrankungen können auch die oben beschriebene diffuse Symptomatik hervorrufen [25-28]. Für die weitere Diagnose eines malignen Glioms werden nach erstem Verdacht weitere MRT-Bildgebungen mit standardisierten Sequenzen der T1- und T2-Wichtung verwendet, (T1-Wichtung mit und ohne Gabe eines MR-Kontrastmittels, T2-Wichtung und FLAIR-Sequenz) [10, 24, 29]. In der T1-Wichtung mit Kontrastmittel ist das aktive Tumolvolumen, in dem sich das Kontrastmittel anreichert und dessen Nekrose besser von umgebendem gesundem Gewebe unterscheidbar, während in der T2-Wichtung und FLAIR-Darstellung die Ödemzone hervorgehoben ist.

Zur weiteren Charakterisierung und Differenzierung des Tumors ist neben konventionellen MRT-Sequenzen auch ein MRT mit Perfusionsdarstellung oder eine *Positronen-Emissionstomographie* (PET) empfohlen [30, 31]. Für die Perfusionsbildgebung mit Kontrastmittel (DCE-Perfusion) wird dem Patienten ein Kontrastmittel verabreicht und dessen Anflutung im Gewebe zeitaufgelöst mit einem T1-gewichteten MRT gemessen [32, 33]. Alternativ existieren weitere Methoden ohne Kontrastmittelzugabe mittels Spin-Labeling (ASL-Perfusion) oder T2\*-gewichteten MRT (DSC-Perfusion) [33].

Bei der PET Untersuchung wird dem Patienten ein Radiopharmakon, basierend auf einer radioaktiv markierten Aminosäure, verabreicht [34]. Im Falle des *F-18-Fluorethyltyrosin* PETs (FET-PET) ist die Aminosäure Tyrosin mit radioaktivem Fluor-18 markiert. Maligne Gliome

---

reichern aufgrund des erhöhten Zellmetabolismus eine größere Menge der markierten Aminosäure an. Dadurch werden im FET-PET Tumorbereiche sichtbar, welche im T1-MRT mit Kontrastmittel nicht dargestellt werden. Dies betrifft in erster Linie Bereiche des Tumors mit weitgehendem Erhalt der Blut-Hirnschrankenfunktion [30, 35]. Die Bildauflösung ist allerdings schlechter im Vergleich zum T1-MRT, da ein Versatz (ca. 2 mm) zwischen dem Zerfallsort des Radiopharmakons und des Annihilationsortes des Positrons besteht [34]. Die genaue Verifizierung der Diagnose erfolgt anschließend mittels einer Biopsie aus dem Tumorgewebe, wobei eine stereotaktische Biopsie empfohlen wird [36-39]. Bei der stereotaktischen Biopsie wird entlang einer zuvor geplanten Trajektorie durch den Tumor an verschiedenen Positionen Gewebe entnommen. Dabei wird die Biopsienadel meist durch ein kleines in die Schädeldecke gebohrtes Loch geführt. Durch anschließende biomolekulare Analyse der Gewebeproben wird in Verbindung mit den histologischen Markern, der Tumortyp bestimmt und dem entsprechenden WHO-Grad zugeordnet. Einer der wichtigsten biomolekularen Marker für die Klassifizierung eines Tumors ist die IDH-Mutation [20, 40, 41]. Für die Einordnung eines Tumors als Glioblastom nach WHO2021 ist zwingend das Vorhandensein des IDH-Wildtyps erforderlich [18]. Weitere Mutationen, welche bei der Einordnung des Tumors als Glioblastom oder eines anderen malignen Gliom überprüft werden, sind beispielsweise der Verlust des ATRX-Gens oder die TERT-Mutation [20, 42, 43]. Ein weiterer wichtiger Marker ist der MGMT-Status [44]. Dieser beeinflusst zwar nicht die Kategorisierung des Tumors, hat aber eine hohe prognostische Bedeutung für das Ansprechverhalten der Radiochemotherapie und ist damit entscheidend für die weitere Therapieauswahl. Ist der MGMT-Status methyliert, ist der automatische Zellreparaturmechanismus der Tumorzellen geschädigt und somit das Ansprechverhalten des Tumors auf die Chemotherapie besser. Daraus resultiert eine längere mediane Überlebenszeit dieser Patienten.

## **b) Standardtherapie**

Die Therapieentscheidung wird anhand der WHO-Klassifizierung und der damit verbundenen Gewebediagnostik festgelegt. Die Standardtherapie beginnt mit der operativen Resektion des Tumolvolumens im Rahmen eines neurochirurgischen Eingriffs, sofern davon keine neurologisch eloquenten Gehirnareale betroffen sind [4, 45]. Ist eine Verletzung solcher Areale nicht vollständig auszuschließen, wird eine partielle Resektion durchgeführt oder ein alternativer therapeutischer Ansatz verfolgt. Das Ziel der Resektion ist immer eine möglichst vollständige und sichere Entfernung des Tumolvolumens („gross total resection“), da in Studien gezeigt wurde, dass sich die Prognose mit der Größe des Resttumolvolumens verschlechtert [46, 47]. Zunächst war das Ziel der Resektion die vollständige Entfernung der im MRT und später auch PET sichtbaren Raumforderung („*complete resection of enhancing tumor*“, CRET) [48, 49].

Um eine möglichst vollständige Resektion inklusive der Entfernung von Tumorrandbereichen zu gewährleisten, wird eine *fluoreszenzgestützte Resektion* (FGR) durchgeführt [50, 51]. Bei Fluoreszenzunterstützung werden zusätzliche, in der MRT-Bildgebung nicht sichtbare, Tumorbereiche identifizierbar und können im Gegensatz zur CRET entfernt werden [48]. Bei der FGR wird dem Patienten 5-8 Stunden vor der Operation 5-ALA oral verabreicht. 5-ALA ist eines der Ausgangsmoleküle der Häm-Biosynthese. Durch die nicht intakte Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke im Tumolvolumen kann 5-ALA aus der Vaskularisation austreten

---

und sich selektiv im Tumorgewebe anreichern [52, 53]. Das angereicherte 5-ALA wird der Häm-Biosynthese im Tumorgewebe zugeführt. Im Verlauf der enzymatischen Schritte zur Herstellung von Häm wird 5-ALA unter anderem in Protoporphyrin IX (PpIX) umgewandelt. Aufgrund des erhöhten Zellmetabolismus im Tumor wird 5-ALA vermehrt von den Tumorzellen aufgenommen und auch die intrazelluläre Häm-Biosynthese scheint effektiver abzulaufen. Die Umwandlung von PpIX in Häm ist unterdrückt, da das zuständige Enzym (Ferrochelatase) in den Tumorzellen unterexprimiert ist. Deshalb findet eine selektive Anreicherung von PpIX in Tumorzellen gegenüber gesunden Zellen statt [54]. Bei Beleuchtung mit blauem Licht (PpIX-Soret-Bande: Wellenlänge 405 nm) wird ein Valenz-Elektron des PpIX durch Lichtabsorption vom Grundzustand in den angeregten Zustand versetzt [53]. Bei der Relaxation in den Grundzustand wird die Differenzenergie durch Emission von Fluoreszenzphotonen (Intensitätsmaxima des PpIX-Fluoreszenzspektrums bei 635 nm und 705 nm) abgegeben. Das kurzwellige Anregungslicht kann durch geeignete Filtertechnik im Operationsmikroskop soweit reduziert werden, dass die durch die rotverschobene Fluoreszenz hervorgehobenen Gewebsareale deutlich vom Normalgewebe unterscheidbar sind. Die Fluoreszenzunterstützung ermöglicht eine sehr umfassende Resektion, die auch die diffusen Randtumorbereiche miteinschließt. In der Regel wird nach erfolgter Resektion eine Radiochemotherapie (Kombination aus Strahlentherapie und paralleler *Temozolomid* (TMZ) Chemotherapie) nach dem Stupp-Protokoll angewandt, sobald sich der Zustand des Patienten stabilisiert hat [55, 56]. Es wird empfohlen die Chemotherapie mit der *Tumor Treating Fields* (TTF) Behandlung zu kombinieren [57]. Diese Kombination zeigte für das Glioblastom (WHO2016 Grad IV), unabhängig vom MGMT-Status, eine Verlängerung des Gesamtüberlebens von 4,9 Monaten. Beim Einsatz von TTF wird mittels sich verändernden, elektrischen Feldern mittlerer Frequenz das Tumorwachstum gehemmt, um eine weitere Expansion der Raumforderung zu verhindern [58, 59].

Neben Resektion, Radiochemotherapie und TTF gibt es weitere in der Erprobung befindliche Behandlungsmöglichkeiten für maligne Gliome: Brachytherapie oder Immuntherapie. Bei der Brachytherapie wird eine lokale Strahlentherapie durchgeführt, bei der radioaktive Isotope in sog. Seeds mittels chirurgischem Eingriff in das Tumolvolumen positioniert und nach Erreichen der applizierten Zieldosis wieder entfernt werden [60, 61]. Im Falle der Immuntherapie wird versucht die Immunsuppression des Tumors zu verändern oder zu umgehen. Es gibt verschiedene Ansätze, indem beispielsweise nach molekularer Analyse des Tumors eine Impfung mit Antigenen erfolgt, welche eine Reaktion der T-Zellen stimulieren [62]. Ein anderer Ansatz ist die Blockade der Antigen-Rezeptoren des Tumors, damit dieser für das Immunsystem „sichtbar“ wird. Bisher wurde ein heterogenes Ansprechen auf die Immuntherapie beobachtet, wobei in Falle des Glioblastoms (WHO2016 –Grad IV) in 21% der in [62] untersuchten Fälle ein Gesamtüberleben von länger als 2 Jahre vorlag.

Einige Therapieansätze können aufgrund eloquenter Lage des Tumors, der Größe des Tumolvolumens oder genetischer Faktoren nicht immer durchgeführt werden. Nach der Therapie eines malignen Glioms tritt wegen des diffusen Tumorrandes und/oder der infiltrativen Verteilung von Tumorzellen im Gehirn fast immer ein lokales oder distantes Rezidiv auf. Die Behandlungsmöglichkeiten eines Rezidivs sind in der Regel limitierter gegenüber einem neudiagnostizierten malignen Gliom. Gleiches gilt für das Ansprechverhalten auf Therapien.

---

Aus diesem Grund sind alternative Therapieformen notwendig, mit welchen die Behandlung von neu-diagnostizierten malignen Gliomen und Rezidiven erweitert werden können [63]. Eine dieser Alternativen stellt die interstitielle photodynamische Therapie für maligne Gliome dar, die bereits im Rahmen klinischer Studien untersucht wird und im Folgenden näher erläutert wird.





---

## B. KLINISCHE INTERSTITIELLE 5-ALA-PDT

---

Im Folgenden wird die klinische Umsetzung der interstitiellen 5-ALA-PDT für die Behandlung maligner Gliome beschrieben. Dies beinhaltet Grundlagen der Gewebeoptik, zum Verständnis der Lichtausbreitung im Gehirn, sowie einer Einführung in die PDT. Außerdem wird der stereotaktische Eingriff inklusive der vorausgehenden Planung, sowie das für die iPDT entwickelte SOM-Verfahren zur intraoperativen Messung der PpIX-Fluoreszenz und der Transmission des Therapielichtes zwischen den Lichtdiffusoren beschrieben.

### 1. GRUNDLAGEN DER GEWEBEOPTIK

Physikalische Grundlage für die Lichtausbreitung im Gewebe, Dosimetrie und detektierten Signale mit dem SOM im Zielvolumen während der iPDT ist die Gewebeoptik. Phänomenologisch wird die Lichtausbreitung in Gewebe durch die optischen Gewebeeigenschaften beschrieben, welche das Gewebe in seiner makroskopischen Gesamtheit darstellen. Die Hauptinteraktionen bei der Lichtausbreitung im Gewebe sind Absorption und Streuung [64]. Die optischen Gewebeeigenschaften welche diese Interaktionen beschreiben sind der Absorptionskoeffizient  $\mu_a$ , der Streukoeffizient  $\mu_s$  und der Anisotropiefaktor  $g$  [65].

Absorptions- und Streukoeffizient sind als Kehrwert der mittleren freien Weglänge für ein Absorptions- bzw. Streuereignis definiert und beschreiben somit die Wahrscheinlichkeit des jeweiligen Ereignisses pro mm Weglänge im Gewebe.

Unter Nutzung des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann bei Kenntnis des Dämpfungskoeffizienten  $\mu_t = \mu_a + \mu_s$  und der Eingangsintensität  $I_0$  die Lichtintensität  $I(r)$  nach einer bestimmten Wegstrecke  $r$  im Medium bestimmt werden [64-68]:

$$I(r) = I_0 e^{-\mu_t r}$$

Bei reiner Absorption ( $\mu_s = 0$ ) wird ein Photon von einem Valenzelektron des Moleküls bzw. Atoms eingefangen [65]. Wenn die Energie des Photons nicht der Energielücke entspricht, ändert sich nur der Schwingungszustand des Moleküls und es entsteht in Folge Wärme. Wenn die Energie des Photons größer als die Energielücke zwischen den energetischen Zuständen ist, wird das Valenzelektron in einen angeregten Zustand versetzt [65].

Bei den Wellenlängen, die den Energielücken eines Moleküls entsprechen, sind in dessen Absorptionsspektrum Maxima zu sehen, welche bei Porphyrinen, wie sie in der PDT verwendet werden, Soret-Banden (Hauptabsorptionsbande) und Q-Banden genannt werden [69].

Der angeregte Zustand ist ein Singulett-Zustand mit kurzer Lebensdauer in der Größenordnung von Nanosekunden und bei Relaxation des Elektrons in den Grundzustand entsteht Wärme und ein neues Photon (Fluoreszenz) [70]. Es besteht aber auch die Möglichkeit einer Interkombination der Spin-Zustände des Elektrons, sodass sich der Singulett-Zustand (Antiparalleler Spin) in einen Triplett Zustand überträgt (Paralleler Spin). Dieser hat eine längere Lebensdauer (Mikrosekundenbereich) und der Übergang in den Grundzustand kann als Phosphoreszenz sichtbar werden. Im Allgemeinen sind die dominanten Stoffe, welche die optischen Eigenschaften im Gehirn bestimmen Hämoglobin, Melanin und Lipofuscin [71]. Die Streuprozesse können im Gewebe durch die Mie-Theorie beschrieben werden [65, 72]. Diese ist eine Lösung der Streutheorie für Photonenstreuung an Partikeln deren ungefähre

Größe der Wellenlänge entspricht. Ähnlich zur Absorption kann mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Intensität des ungestreuten Lichtes nach einer bestimmten Wegstrecke  $r$  in einem Medium ohne Absorption ( $\mu_a=0$ ) berechnet werden. Biologisches Gewebe ist kein isotrop streuendes Medium ist, d.h., die Photonen werden nicht gleichmäßig in alle Richtungen gestreut [64, 65]. Dieser Umstand wird durch den Anisotropiefaktor  $g$  beschrieben, welcher Werte von -1 bis +1 einnehmen kann, wobei -1 Rückstreuung, +1 Vorwärtsstreuung und 0 isotrope Streuung bedeuten. Der  $g$ -Wert ist der Erwartungswert der Henyey-Greenstein Phasenfunktion der Streuung, welche die Wahrscheinlichkeitsverteilung der ausfallenden Streuwinkel der Photonen angibt [73, 74]. Im biologischen Gewebe beträgt die Anisotropie meist zwischen 0,7 und 0,99, was gleichbedeutend mit einem bevorzugt vorwärts streuenden Medium ist. Um die Streurichtung zu berücksichtigen, wird oftmals der reduzierte Streukoeffizient  $\mu_s'$  angeführt. Dieser ist definiert als

$$\mu_s' = \mu_s (1 - g)$$

und beschreibt den Anteil der Photonen, welche durch Streuung von der ursprünglichen Propagationsrichtung abgelenkt werden [64]. Wegen dieser Komplexität ist zur analytischen Berechnung der Lichtdosis an einem bestimmten Punkt im Gewebe das Lambert-Beer'sche Gesetz nur bedingt geeignet. Die Maxwell Gleichungen im Falle der Gewebeoptik sind wegen fehlender Kenntnis der vielen verschiedenen mikroskopischen Bestandteile und Eigenschaften des Gewebes nicht lösbar. Daher wird zur analytischen Beschreibung der Lichtverteilung die Strahlungstransportgleichung (Radiation Transfer Equation; RTE) und deren Lösung, die Diffusionsnäherung, verwendet [64, 65, 75].

$$I(r, \mu_a, \mu_s') = \frac{I_0}{4 \pi r} 3(\mu_a + \mu_s') e^{-r \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s')}}$$

Diese beschreibt die Lichtintensität  $I$  ausgehend von einer Lichtquelle mit Intensität  $I_0$  welche nach einer Strecke  $r$  in einem unendlich ausgedehnten absorbierenden und streuenden Medium.

Mittels der Diffusionsnäherung können nicht nur Intensitätswerte berechnet werden, sondern auch Erwartungswerte für detektierte Signale oder anhand von gemessenen Signalen Näherungswerte für die optischen Gewebeeigenschaften extrapoliert werden. Im Zuge der mit der Diffusionsnäherung durchgeführten Rechnungen wurde eine Absorption ( $\mu_a = 0,02 \text{ mm}^{-1}$ ) und ein red. Streukoeffizient ( $\mu_s' = 2,0 \text{ mm}^{-1}$ ) als Grundlage für die Berechnungen bei der iPDT des malignen Glioms angenommen [76, 77]. Diese Parameter entstammen in-vivo Messungen von optischen Gewebeeigenschaften eines malignen Glioms bei einer Resektion.

Zur bestmöglichen Durchführung einer iPDT ist nebst den Grundkenntnissen der Lichtausbreitung auch die Lichtdosimetrie von hoher Bedeutung. Denn zur ausreichenden Aktivierung des Photosensibilisators und der Initiierung einer ausreichenden Zellschädigung ist eine Mindestdosis des applizierten Lichtes nötig [54]. Diese variiert je nach Typ des verwendeten Photosensibilisators und der Tumorart.

Unter Lichtdosimetrie versteht man die Energie oder Leistung des Lichtes pro Fläche in einem bestimmten Bereich im Zielvolumen ( $\text{J}/\text{m}^2$  oder  $\text{W}/\text{m}^2$ ) und die Energiemenge der absorbierten Photonen pro Volumenelement ( $\text{J}/\text{m}^3$ ). Aufgrund der anatomischen, strukturellen und physiologischen Vielfältigkeit des Gehirns können dosimetrische Berechnung nur bedingt mit der Diffusionsnäherung durchgeführt werden, da hierfür die Voraussetzung der

---

Homogenität und eines unendlichen ausgedehnten Mediums nicht gegeben ist. Im Gehirn wird die Lichtausbreitung in der ROI durch verschiedene Gewebearten (Tumor, Nekrose, Weiße Substanz, Graue Substanz, CSF) mit individuellen optischen Gewbeeigenschaften beeinflusst [75]. Deswegen wird für lichtdosimetrische Simulationen auf Monte-Carlo oder Finite-Elemente basierende Techniken zurückgegriffen. Bei diesen Techniken kann anhand von Bildaufnahmen die makroskopische Anordnung der verschiedenen Gewebearten mit Zuweisung der individuellen optischen Eigenschaften nachgebildet werden [78, 79]. Mit den Simulationsergebnissen können dann die Lichtausbreitung, sowie die applizierte Dosis im Gewebe analysiert werden.

Neuere Entwicklungen zielen darauf ab eine Individualisierung der Lichtapplikation zu ermöglichen, da anhand der Simulationen Bereiche mit zu geringer Dosis identifiziert und gegebenenfalls die Bestrahlungsparameter (Lichtleistung, Zeit) angepasst oder die Positionen der Lichtapplikatoren verbessert werden können [80]. Des Weiteren können mittels Dosimetrie Bereiche in gesunden Gewebearealen, in denen eine zu hohe Leistung appliziert wird, identifiziert und die Bestrahlung dementsprechend angepasst werden. Eine zu hohe Leistung kann ungewünschte thermische Effekte verursachen, welche gesundes Gewebe schädigen könnten. Solche „Hotspots“ sollten deshalb unbedingt vermieden oder zumindest minimiert werden. Diesbezügliche lichtdosimetrische Simulationstechniken für die iPDT auf Basis von Monte-Carlo-Verfahren wurden im Zuge des Promotionsvorhabens untersucht und angewendet [81].

## 2. PHOTODYNAMISCHE THERAPIE

Die PDT nutzt die Interaktion zwischen Licht, einem Photosensibilisator und intrazellulärem Sauerstoff. Dabei werden phototoxische Reaktionen induziert, welche zum Zelltod durch Apoptose und Nekrose führen. Im Falle der 5-ALA-PDT wird nach oraler Gabe die Selektivität von 5-ALA bei der Anreicherung im Tumor ausgenutzt, und das dort entstehende PpIX dient als selektiver Photosensibilisator-[52, 77]. Intramolekular wird infolge der Absorption von Photonen des Behandlungslichtes ein Valenzelektron des PpIX-Moleküls in den angeregten Zustand versetzt [82]. Für die PDT ist die zuvor beschriebene Interkombination des Valenzelektrons vom Singulett in den Triplett-Zustand, welcher im Falle des PpIX ein metastabiler Zustand ist, entscheidend. Nur das nun im Triplett-Zustand befindliche Valenz-Elektron des PpIX kann durch einen Energieübertrag auf ein Valenz-Elektron des intrazellulären Sauerstoffs mit diesem reagieren, da der Grundzustand des Sauerstoff-Elektrons ebenfalls ein Triplett-Zustand ist. Durch diesen Energieübertrag entstehen während der iPDT Bestrahlung *reaktive Sauerstoffspezies* (ROS) und Singulett-Sauerstoff  $^1\text{O}_2$  [52]. ROS und  $^1\text{O}_2$  reagieren durch Oxidation mit benachbarten Makromolekülen und ändern so Funktionen und Strukturen in den Zellbestandteilen [83]. In Folge führt dieser Prozess zum direkten Zelltod durch Nekrose oder zum programmierten Zelltod mittels Apoptose. Neben der direkten phototoxischen Zellschädigung des Tumorgewebes wurde bei photodynamischen Anwendungen auch eine verstärkte Immunreaktion des Körpers beobachtet, welche zusätzlich zum Therapieeffekt beitragen kann [84, 85]. Als Lichtquelle für die PDT-Bestrahlung werden Laser mit schmalbandigem Licht, angepasst auf die Absorptionsbande des Photosensibilisators, oder LED und Weißlichtquellen genutzt [79, 86].

---

Das beschriebene Konzept der 5-ALA-PDT zur Behandlung von malignen Gliomen wird momentan systematisch im Rahmen von Studien erforscht [82].

Weitere Tumore in medizinischen Fachbereichen, für die mittels 5-ALA-PDT (und andere PDT-Varianten) Behandlungskonzepte untersucht/angewendet werden, sind beispielsweise: Blasen- und Prostata-Tumore in der Urologie, sowie Lungentumore [87-91]. Mit der PDT können zudem Behandlungen von oberflächlichen Krebsläsionen der Haut und anderen dermatologischen Erkrankungen [92-94] durchgeführt werden. Je nach Anwendungsfall wird das Therapie-Licht in unterschiedlicher Weise appliziert, z.B. mittels fokaler Beleuchtung bei oberflächlichen Läsionen (z.B. auf der Haut), mittels intraluminal platzierter Sonden im Falle von Hohlorganen (z.B. Harnblase, Bronchien, Gallengang) bzw. mittels interstitiell platzierter Sonden bei soliden Organen (z.B. Prostata oder Gehirn). Im Falle von oberflächlichen Tumoren auf der Haut besteht auch die Möglichkeit die PDT ohne künstliche Lichtquelle sondern unter Verwendung von Tageslicht als Anregungsbeleuchtung (sog. Daylight-PDT) durchzuführen [95].

### **3. STEREOTAKTISCHE iPDT AN MALIGNEN GLIOMEN**

Zur Behandlung von malignen Gliomen mittels PDT werden zwei klinische Ansätze verfolgt. Erstens, die Bestrahlung der Resektionshöhle direkt nach einer erfolgten FGR mit 5-ALA-PpIX [96-99] oder auch in Kombination mit Talaporfin-Natrium als Photosensibilisator [100]. Zweitens, die stereotaktische 5-ALA-iPDT als Primärbehandlung des Tumorumfanges anstelle einer Resektion [77, 101-104], wie sie am Klinikum der Universität München im Rahmen von Heilversuchen durchgeführt und im Folgenden näher erläutert wird. Vor Empfehlung einer iPDT wird für jeden Patienten ein individuelles Risikoprofil erstellt, eine Zustimmung vom Tumorboard eingeholt, sowie die intern definierten Kriterien für die Zulassung als individueller Heilversuch geprüft. Voraussetzung ist ein Karnofsky-Index von mindestens 70 und ein unifokaler und scharf abgegrenzter Tumor [1, 105]. Im Falle eines neu-diagnostizierten, unbehandelten malignen Glioms darf bei supratentorialer Lage der Tumordurchmesser nicht größer als 4 cm sein und keine bzw. nur eine moderate Verschiebung der Mittellinie vorliegen [105]. Zudem dürfen keine Beeinträchtigungen des Ventrikelsystems und keine transtentoriale Herniation vorliegen. Zur iPDT an malignen Gliom-Rezidiven, darf der Tumordurchmesser 3 cm nicht überschreiten und es muss ein Rezidiv nach erfolgter multimodaler Standardtherapie vorliegen [1].

Zur Durchführung der iPDT erfolgt nach oraler 5-ALA Gabe (20 mg/kg Körpergewicht), mehrere Stunden vor iPDT, die interstitielle Platzierung zylindrischer Lichtdiffusoren im Tumor im Rahmen eines stereotaktischen Eingriffs [77]. Diese dienen zur Applikation des Therapielichtes, welches zur Aktivierung des angereicherten PpIXs und Initiierung der phototoxischen Reaktion führt. Die zylindrischen Lichtdiffusoren bestehen aus einer Glasfaser an deren distalem Ende sich ein zylindrischer, lichtstreuender Bereich (Diffusor), befindet. Entlang dieses Bereiches wird das eingestrahlte Licht radial zur Faserachse homogen gestreut [106, 107]. Die genutzte Diffusorlänge wird je nach Ausdehnung und Volumen des Tumors individuell gewählt und kann zwischen 1 und 5 cm betragen. Die Anzahl der Lichtdiffusoren, deren distale Diffusorlänge und Trajektorienkoordinaten werden in der Behandlungsplanung unter Berücksichtigung von Größe und Lokalisation des Tumors ermittelt [77].

---

Eine genaue Planung der Positionen der Lichtdiffusoren im Gehirn beinhaltet neben einer Berücksichtigung der Lichtdosimetrie auch eine Vermeidung von Gefäßverletzungen bei der Trajektorienfindung und eine Bestrahlung der in der MRT- und PET-Bildgebung nicht sichtbaren Tumordinfiltrationszone. Als Basis für die Planung werden diagnostische MRT- und, falls vorhanden, PET-Aufnahmen herangezogen. In der T1-Wichtung mit Kontrastmittel wird zunächst das Tumolvolumen anhand der Kontrastmittelaufnahme definiert [77, 108]. Dieses wird um das im PET zusätzlich sichtbare Tumolvolumen erweitert, sodass das bestimmte Gesamtvolumen (Zielvolumen) nach Möglichkeit auf beiden Messmethoden (MRT und PET) basiert [1]. Anhand der Ausdehnung und Lokalisation des Zielvolumens werden die Anzahl der benötigten Lichtdiffusoren und die jeweilige zugehörige Diffusorlänge festgelegt. Neben den Aufnahmen zur Definition des Zielvolumens und der Diffusorpositionen werden angiographische Bildaufnahmen (CT und MRT) zur Visualisierung der Blutgefäße verwendet. Mit den Angiographiebildern wird sichergestellt, dass die geplanten Trajektorien möglichst weit von größeren Blutgefäßen entfernt sind und somit das Risiko einer Blutung bei Positionierung der Lichtdiffusoren minimal ist [109].

Als Standard für die Bestrahlung bei der iPDT wurde bei einer Wellenlänge von 635 nm eine Leistung von 200 mW/cm Diffusorlänge festgelegt, wie sie bereits 1991 zur iPDT an Hirntumorrezidiven verwendet wurde [110]. Eine höhere Leistung würde ungewünschte thermische Schäden am Gewebe verursachen [111]. Ziel ist es eine Lichtdosis von mindestens 18,72 J/cm<sup>2</sup> bei einer Leistungsdichte von 520 mW/cm<sup>2</sup> zu applizieren, welche zu einer Ausbleichrate des PpIXs von mind. 95% führt [112]. Daraus resultiert eine Bestrahlungsdauer von 60 min [77]. Anhand dieser Rahmenbedingungen für die Bestrahlung wurde mittels Monte Carlo Simulation der Lichtverteilung der ideale Abstand zweier Lichtdiffusoren im Tumolvolumen bestimmt. Die in der Simulation verwendeten optischen Eigenschaften basieren auf intraoperativ erhobenen optischen Gewebeeigenschaften des Tumorrandbereiches von Glioblastomen für eine Wellenlänge von 635 nm [76]. Aus den Simulationen resultierte ein Durchmesser von 7,6 mm bei einer Isodosis von 520 W/cm<sup>2</sup> (Effektbereich) um einen einzelnen Lichtdiffusor. Bei Verwendung von 405 nm zur Anregung des PpIXs (ähnlich zur FGR) würde sich der Durchmesser des angedachten Effektbereiches stark verkleinern, da gesundes Hirngewebe und Tumorgewebe bei 405 nm eine bis zu 10-mal höhere Lichtabsorption als bei 635 nm aufweisen [113]. Dies würde die effektive Lichteindringtiefe um das 10-fache verringern und somit den Durchmesser des Isodosisbereiches sehr verkleinern. Angewendet auf die Planung mit mehreren Lichtdiffusoren resultiert, unter Einbezug der Addition der Lichtdosis zweier benachbarter Lichtdiffusoren, ein idealer Abstand zweier benachbarter Lichtdiffusorzentren von in etwa 10,6 mm. Aufgrund anatomischer Gegebenheiten kann diese Distanz nicht immer eingehalten werden. Deswegen wird darauf geachtet, dass die Lichtdiffusoren möglichst parallel zueinander ausgerichtet sind und benachbarte Lichtdiffusoren einen Abstand von 9 – 12 mm zueinander aufweisen [77]. Ein geringerer Abstand könnte eine Hyperthermie im Gewebe hervorrufen [77]. Eine solche hätte auch Auswirkungen auf die optischen Gewebeeigenschaften wie es im Zuge dieser Arbeit untersucht wurde [114, 115]. Des Weiteren sollte der Abstand der Lichtdiffusoren zum Rand des Zielvolumens nicht mehr als 3 mm betragen, sodass auch Licht in die nicht Kontrastmittel aufnehmende Infiltrationszone des Tumors appliziert wird [48]. So können die dort diffus verteilten Tumorzellen geschädigt werden. Diese Herangehensweise zur Dosimetrie beruht

---

auf der Annahme konstanter und homogener optischer Gewebeeigenschaften im Zielvolumen. Die tatsächliche Lichtverteilung ist jedoch stark abhängig von den individuellen optischen Gewebeeigenschaften des Tumors und der makroskopischen Struktur des umliegenden Gewebes wie bereits beschrieben wurde.

Die von der Lage der Lichtdiffusoren abhängige Dosimetrie kann bei den derzeitigen Anwendungen nur mittels Näherung in der Dosimetrie-Planung berücksichtigt werden, da lichtdosimetrische Planungsprogramme basierend auf optischen Gewebeeigenschaften für die iPDT im Gehirn bisher nicht existieren sondern sich nur in der Entwicklungsphase befinden [80, 116]. Zur Näherung der Lichtdosimetrie kann das Brachytherapiemodul einer stereotaktischen Planungssoftware verwendet werden, in dem durch Einstellung der Isotop-Parameter der Seeds der angenommene Nekrosradius der Brachytherapie entsprechend des Effektbereiches eines Lichtdiffusors angepasst wird. Eine andere Möglichkeit zur Trajektorienplanung besteht in der Nutzung von virtuellen Trajektorien mit Durchmessern von 10,6 mm, entsprechend des theoretischen Idealabstandes zwischen zwei Lichtdiffusoren in einem Stereotaxie-Planungsprogramm. Es werden jedoch bereits Ansätze erforscht, in denen eine in Echtzeit erfolgende oder retrospektive Berechnung der Lichtdosimetrie für die iPDT-Planung untersucht wird [78, 80, 116-118].

Anhand der endgültigen Trajektorien, welche in Abhängigkeit von Tumorgöße, dessen Lage und den vorgegebenen Faserabständen, sowie unter Berücksichtigung der Blutgefäße geplant wurden, werden abschließend die nötigen Winkeleinstellungen am Zielbügel des stereotaktischen Rahmens unter Verwendung einer stereotaktischen CT-Aufnahme des Schädels festgelegt.

Zur Positionierung der Diffusoren im Zielvolumen werden entlang der stereotaktisch geplanten Trajektorien zunächst Löcher in die Schädeldecke gebohrt. Anschließend wird mit einem Mandrin entsprechend der stereotaktischen Zielkoordinaten die Trajektorie im Gehirn vorkanalisiert [1]. Zusätzlich dient der Mandrin als Referenz zum axialen Positionsabgleich mit dem Lichtdiffusor. Dazu werden die Positionen bei Durchleuchtung mit einem Röntgen-C-Bogen dokumentiert. Die korrekte Position der Lichtdiffusoren kann mittels zweier zylinderförmiger Röntgenmarker, die Anfang und Ende des Diffusorbereiches definieren, durch Überlagerung mit dem Röntgenabbild des Mandrins festgestellt werden. Die Lichtdiffusoren sind proximal mit einem Therapielaser verbunden, welcher rotes schmalbandiges Licht der Wellenlänge 635 nm, entsprechend der PpIX-Soret-Absorptionsbande, emittiert [77]. Nach Positionierung der Lichtdiffusoren erfolgt die Bestrahlung, wie bereits erwähnt, mit einer Lichtleistung von 200 mW/cm Diffusorlänge für 60 min [119].

Zur Gewährleistung einer optimalen Sauerstoffversorgung für die  $^1\text{O}_2$  und ROS Entstehung wird der Patient im Verlauf der iPDT mit 100%  $\text{O}_2$  beatmet [120]. Für die Begutachtung und Darstellung der PpIX-Fluoreszenz und der Transmission des Laserlichtes im Tumorgewebe wird unmittelbar zu Beginn und nach Abschluss der Bestrahlung das SOM durchgeführt [1, 104, 121].

Neben dem Vorteil der Behandlung von Tumoren, die für die Resektion nicht geeignet sind, hat die klinische iPDT aufgrund der selektiven Anreicherung des Photosensibilisators PpIX den Vorteil, dass nicht-photosensibilisiertes Gewebe durch die niedrig dosierte und somit nicht-thermisch wirkende Lichtbehandlung auch nicht geschädigt oder beeinträchtigt wird. Dem gegenübergestellt wird bei strahlentherapeutischen Verfahren die applizierte Dosis im

---

gesunden Gewebe genau abgewogen, um dort keine Kollateralschäden zu erzeugen. Eine erste Studie zur iPDT an De-novo-Glioblastomen (WHO2016-Grad IV) zeigte, dass das mediane Überleben 16 Monate betrug gegenüber nur 10,2 Monaten bei der Vergleichskohorte, bei der eine Resektion vorgenommen wurde [108]. Zudem zeigte sich, dass bei der iPDT das 3-Jahres Überleben mit 55% signifikant größer war als bei der Resektion mit nur 21%.

Momentan werden in Deutschland zwei multizentrische, klinische Zulassungsstudien zur stereotaktischen iPDT an malignen Gliomen nach dem oben dargestellten Verfahren durchgeführt, die GL-01 (EudraCT Nummer:2016-004775-51) zur iPDT an De-novo malignen Gliomen und die NOA11 (EudraCT Nummer: 2015-002727-25) zur iPDT an malignen Gliom Rezidiven.

#### **4. SPEKTRALES ONLINE-MONITORING**

Neben der genauen Bestrahlungsplanung ist das SOM ein wichtiger Bestandteil der iPDT. Die Verwendung des SOM-Systems ermöglicht es, in Echtzeit vor, während und nach der Licht-Bestrahlungsphase eine Rückmeldung über das bestrahlungsabhängige PpIX-Fluoreszenz- und das Transmissionssignal zu erhalten. Das SOM-Verfahren basiert auf der spektralen Messung von Licht, welches von einem positionierten Lichtdiffusor aufgenommen und an das Messsystem (Spektrometer) geleitet wird. So können die Intensitäten der PpIX-Fluoreszenz im Wellenlängenbereich 650 bis 725 nm (Maximum bei 705 nm) und der Transmission des Therapielichtes bei 635 nm durch das Gewebe zwischen jeweils zwei Lichtdiffusoren gemessen werden. Durch die Echtzeit Darstellung ist es perspektivisch möglich, bereits im Operationssaal die PpIX-Fluoreszenz und die Applikation des Therapielichtes getrennt zu beurteilen. Aus diesen Daten lassen sich Hinweise zum Vorliegen einer PpIX-Fluoreszenz, sowie zum Ausbleichen der PpIX-Fluoreszenz und mögliche Beeinträchtigungen der optischen Verhältnisse und somit der Lichtverteilung und Lichtdosimetrie während der Bestrahlung feststellen [121].

Der grundlegende Gedanke des SOM liegt darin, während der Therapie Aufschluss darüber zu erhalten, ob sich PpIX im Tumor gebildet und akkumuliert hat. Bei der FGR wurde beobachtet, dass eine PpIX-Akkumulation nicht zwangsweise bei malignen Gliomen vorliegt und es auch fluoreszenznegative Tumore gibt [122].

Ein Ziel der SOM-Messung besteht darin, die verbleibende Fluoreszenz nach der PDT-Bestrahlung zu analysieren und ggf. für eine Erweiterung des Bestrahlungsprotokolls zu nutzen. In der Weiterentwicklung des SOM können auf Basis des Therapielichtsignals Anhaltspunkte über Lichtdosisverteilung und Informationen über die Lokalisation der PpIX-Anreicherung im Tumor gewonnen werden [104]. Monitoring Verfahren hatten sich bei in-vitro PDTs von Zellkulturen und PDTs an oberflächlichen Tumoren der Speiseröhre, sowie bei dermatologischen Anwendungen als äußerst hilfreich erwiesen, um eine ausreichende Behandlung zu sichern und deren Qualität festzustellen. [123-126].

Bei der Durchführung der SOM-Messung wird jeweils einer der eingesetzten Lichtdiffusoren als Emitter verwendet; die jeweils anderen Lichtdiffusoren werden als Detektor verwendet und leiten sequentiell geschaltet das aufgesammelte Licht jeweils an das Spektrometer [1, 104, 121]. Durch Permutation des mit dem Laser verbundenen Lichtdiffusors werden nach Mög-

---

lichkeit für alle Lichtdiffusorpaare entsprechende Spektren gemessen. Diese Messungen werden unmittelbar vor und nach der iPDT-Bestrahlung durchgeführt. Je nach Umsetzung der Bestrahlung und dem technischen Aufbau des SOM-Systems sind auch nach definierten Zeitintervallen SOM-Messungen im Verlauf der iPDT-Bestrahlung möglich.

Die Analyse der SOM-Daten, insbesondere des Fluoreszenzsignals, bei Messung vor iPDT-Bestrahlungsbeginn gibt dabei Rückschlüsse auf die Anreicherung von PpIX im Tumor. Dadurch kann bereits zu Beginn der Bestrahlung bewertet werden, ob und wie gut die Umsetzung von 5-ALA zu PpIX im Tumoreal erfolgte. Anhand der spektralen Messung wird erkennbar, ob PpIX-Fluoreszenz vorliegt, ob ganze Areale oder ggf. bei welchem Diffusor Bereiche mit geringer PpIX-Fluoreszenz vorliegen. Schlussendlich ist zu erwarten, daraus eine Aussage über den zu erwartenden PDT-Effekt ableiten zu können [104, 127]. Anhand der Änderung der bisher erhobenen spektralen Daten wurde ersichtlich, dass insbesondere die Signalintensität der PpIX-Fluoreszenz bereits während der ersten Hälfte der iPDT-Bestrahlung ausbleicht [121]. Die SOM-Daten am Ende der iPDT-Bestrahlung deuten auf einen Verbrauch der PpIX-Moleküle hin, wobei von einem vollständigen Ausbleichen des PpIX bei einer Reduktion des Fluoreszenzsignals von mehr als 95% ausgegangen werden kann, da aufgrund der Autofluoreszenz des Gewebes und der Fluoreszenz des während der Bestrahlung entstehenden Photoproduktes die Messung eines 100% Verlustes der PpIX-Fluoreszenz nicht möglich ist. Die Reduktion des Fluoreszenzsignals kann zudem als ein Anzeichen für die Entstehungsrate von Sauerstoffradikalen, welche hauptverantwortlich für den PDT-Effekt sind, gesehen werden [112, 128].



---

## C. iPDT UND SOM AN MALIGNEN GLIOM-REZIDIVEN

---

Die stereotaktische iPDT wird am Klinikum der Universität München im Rahmen von individuellen Heilversuchen durchgeführt. Diese Möglichkeit besteht, falls eine andere Therapieform nicht möglich ist, oder auf Wunsch des Patienten und nach entsprechender Genehmigung durch das Tumorboard. Da die klinische iPDT ein in der Entwicklung befindliches technisch komplexes Therapieverfahren ist, sind alle damit in Verbindung stehenden Informationen, die Aufschluss über die Durchführung der Behandlung und das Ansprechen der Patienten geben von großem Interesse.

Eine Methodik, die bereits während der Behandlung erste Rückmeldung über die iPDT-Bestrahlung geben kann, ist das SOM, welches im Verlauf der iPDT-Heilversuche als zusätzlich Erkenntnis bringender Bestandteil der Therapie integriert wurde.

In einer Zusammenfassung der iPDT-Heilversuche an malignen Gliom-Rezidiven wurden neben den patientenspezifischen Daten und den technischen Daten der iPDT (applizierte Gesamtleistung, Dosis pro Tumolvolumen) erstmals auch die gewonnenen SOM-Daten umfassend analysiert [1]. Bisher liegen zu klinisch erhobenen SOM-Daten nur Einzelanalysen vor, die sich auf die Menge des akkumulierten PpIX und dessen Verteilung konzentrierten [104, 121], sowie erste Auswertungen zum Ausbleichen des PpIX [121].

Nebst der klinischen Fragestellung des Patientenüberlebens und dessen Abhängigkeit von bekannten klinischen prognostischen Faktoren (Nebenwirkungen, Karnofsky-Index, Mutationen) wurden erstmals auch Zusammenhänge mit den SOM-Daten genauer analysiert. Diesbezüglich wurden in [1] folgende Fragestellungen untersucht:

„Hat die iPDT einen Einfluss auf das Überleben der Patienten?“; und  
„Korrelieren SOM-Daten mit einem verlängerten Überleben?“.

Ein PDT-Effekt und somit ein Ansprechen des Tumors auf die Therapie ist im Hinblick auf SOM-Daten nur dann zu erwarten, wenn diese das Vorhandensein von PpIX-Fluoreszenz im Tumolvolumen sowie eine ausreichende Anregung des PpIX durch das Therapielicht bestätigen.

Somit sind bei der Auswertung der SOM-Daten folgende Fragestellungen bearbeitet worden:

„Wie können die Daten analysiert werden?“;  
„Welche Faktoren können für eine Ersteinschätzung genutzt werden?“; und  
„Gibt es Korrelationen zwischen SOM-Daten und dem Ansprechverhalten auf die iPDT?“

Von insgesamt 47 mit iPDT behandelten Patienten standen für 44 Patienten ausreichend klinische Daten zur Verfügung, von denen wiederum nur von 18 Patienten iPDT-begleitend SOM-Daten erhoben wurden, da bei den restlichen Heilversuchen das SOM-Verfahren noch nicht existierte. Zur Analyse der SOM-Daten wurden das Signal der Transmission des Therapielichtes bei der Wellenlänge 635 nm und die PpIX-Fluoreszenz im Wellenlängenbereich 650-750 nm getrennt voneinander betrachtet. Zunächst wurde geprüft, ob das jeweilige Signal einen Schwellwert, der dem Dreifachen des Signalausens entsprach, überschritt. Im

---

Falle der Fluoreszenz wurde zuvor mit einem nicht linearen Fit die Autofluoreszenz des Gewebes von der PpIX-Fluoreszenz separiert und subtrahiert bevor die Überschreitung des Schwellwerts geprüft wurde. Neben einer automatischen Analyse (Matlab R2018b, MathWorks Inc., Natick, MA, USA) wurde zudem eine manuelle Datensichtung vorgenommen, um falsch-positive bzw. falsch-negative Signal-Detektionen auszuschließen.

Zur Erstellung eines prognostischen Faktors zur Einschätzung des SOM wurden Transmissions- und PpIX-Fluoreszenzsignale jeweils unabhängig voneinander betrachtet. Zudem wurde in die Einschätzung jeder individuellen iPDT-Behandlung die Anzahl der jeweils eingesetzten Lichtdiffusorpaare einbezogen, sodass das Auftreten von prätherapeutischer Fluoreszenz und posttherapeutischer Transmission jeweils dann als positiv eingeschätzt wurde, wenn mehr als 75% der gemessenen Lichtdiffusorpaare ein Signal oberhalb des Schwellwertes aufwiesen. Bei diesem Vorgehen wurden nur Diffusorpaare berücksichtigt, welche einen Abstand von weniger als 19 mm aufwiesen, da bei größerem Abstand kein Signal mehr zu erwarten ist.

Eine Unterschreitung des Schwellwertes bei vielen Diffusorpaaren entspricht einer massiven Änderung der optischen Gewebeeigenschaften gegenüber der Erwartung, insbesondere einer Erhöhung der Absorption. Eine solche Veränderung stellt den Therapieerfolg aufgrund geringer Eindringtiefe des Therapielichts und unzureichender Dosisapplikation in das Zielvolumen infrage.

Die Ausbleichrate des PpIX (Vergleich der PpIX-Fluoreszenzintensität vor und nach iPDT) konnte nicht berücksichtigt werden, da die nachgewiesene PpIX-Fluoreszenzintensität von der Anregungsintensität und somit von der Transmission abhängig ist. Aus diesem Grund ist ein Signalabfall der Fluoreszenzintensität nicht eindeutig einem Ausbleichprozess oder dem Fehlen von Anregungslicht durch erhöhte Absorption zuzuordnen. Wegen der Untrennbarkeit der beiden Effekte, wurde entschieden, die PpIX-Akkumulation anhand des Fluoreszenzsignals nur zu Beginn der iPDT zu bewerten.

Aus den klinischen Daten konnte für die 44 ausgewerteten iPDT-Behandlungen ein medianes PFS von 7,1 Monate ermittelt werden, ferner hatten mehr als 20% der behandelten Patienten ein Überleben nach iPDT von mindestens 2 Jahren. Somit hat die iPDT-Behandlung einen positiven Einfluss auf das Überleben dieser Patienten.

Von den SOM-Daten der 18 iPDT-Behandlungen mit im Median 4 verwendeten Lichtdiffusoren (Bereich: 3-8) konnten insgesamt 600 Spektren bei jeweils 300 prä- und posttherapeutischen Messungen (Median 28 pro Patient, Bereich: 12-84) ausgewertet werden. In 82,9% der Daten konnte ein prätherapeutisches PpIX-Fluoreszenzsignal, sowie in 78,3% ein posttherapeutisches Transmissionssignal oberhalb des Schwellwertes bestimmt werden. Somit zeigten 10/18 Patienten eine als positiv eingeschätzte Fluoreszenz vor iPDT-Bestrahlung und 13/18 Patienten eine positiv bewertete postoperative Transmission.

Vergleiche mit dem Überleben (PFS und PRS) dieser Patienten zeigten, dass jeweils eine positive Fluoreszenz- oder Transmissionseinschätzung vor bzw. nach iPDT-Bestrahlung mit einem längeren Patientenüberleben in Verbindung gebracht werden können, wobei jedoch, wie in Tabelle 1 dargestellt, der Unterschied gegenüber den jeweiligen Negativ-Einschätzungen noch nicht signifikant ist.

Tabelle 1: Ergebnisse zum Patientenüberleben und deren Vergleich bei positiver und negativer Einschätzung der präoperativen Fluoreszenz und posttherapeutischen Transmission des Therapielichtes [1].

Überleben median [CI] /Monate	Fluoreszenz- pos.	Fluoreszenz- neg.	Transmission pos.	Transmission neg.
PFS	12,1 [3,8 20,4]	9,6 [4,2; 15,1]	15,7 [4,7; 25,0]	9,6 [1,0 18,3]
	p = 0,427		p = 0,196	
PRS	17,5 [4,2 30,7]	16,6 [7,8; 25,3]	19,7 [4,3; 35,1]	13,0 [12,0; 13,9]
	p = 0,326		p = 0,130	

Obwohl aufgrund der geringen (n=18) Fälle noch keine statistisch signifikante Korrelation zwischen SOM-Daten und Überleben festgestellt werden konnte, erscheint es sinnvoll, weitere Auswertungen der SOM-Daten vorzunehmen und insbesondere die Anzahl der nutzbaren Daten zu erhöhen.

**In der ersten Publikation dieser Dissertationsschrift wurden die Ergebnisse von iPDT's an malignen Gliom-Rezidiven (n = 47) zusammengefasst. Hierbei wurden klinische Daten von 44/47 iPDT's, sowie insbesondere erstmals SOM-Daten von 18/47 iPDT's ausgewertet. Die untersuchten Fragestellungen führten zu folgenden Schlüssen:**

**Die iPDT-Behandlung hat einen positiven Einfluss auf das Überleben. Aus den SOM-Daten konnten auf Basis präoperativer PpIX-Fluoreszenz und postoperativer Therapielicht-Transmission zwei prognostische Faktoren abgeleitet werden, welche eine Tendenz zu einer verlängerten Überlebensdauer zeigen.**



---

## D. UNTERSUCHUNGEN ZUR URSACHE DER SIGNALVERÄNDERUNGEN IM SOM

---

Erste klinische Anwendungen des SOM-Verfahrens, sowie die SOM-Auswertungen in [1] zeigten Intensitätsänderungen der Fluoreszenz und der Transmission des Therapielichtes zwischen jeweils 2 Lichtdiffusoren bei Vergleich der gemessenen Intensitäten vor (prä-iPDT-Bestrahlung) und nach Bestrahlungsende (post-iPDT-Bestrahlung). Ziel weiterer Untersuchungen war es aufzuklären, wie die Änderungen der Signale im Zusammenhang mit der Licht-Wechselwirkung während der Bestrahlung stehen oder ob es im Verlauf einer iPDT weitere mögliche Einflussfaktoren auf die optischen Gewebeeigenschaften gibt.

Die zeitliche Änderung des PpIX-Fluoreszenzsignals war aufgrund des Ausbleichens des PpIXs im Verlauf der Bestrahlung zu erwarten [121]. Die festgestellte Änderung der Transmissionssignale ist nur über eine Änderung der optischen Gewebeeigenschaften zu erklären. Theoretisch könnten Einblutungen während der iPDT auftreten und diese Änderungen hervorrufen. Für den spektroskopischen Nachweis wären weißlichtspektroskopische Untersuchungen ggfs. durch Einführen weiterer Sonden notwendig [129]. Die Durchführung eines CT nach der iPDT, für den Nachweis einer Blutung ist ohne direkten Anlass nicht angemessen. Die Betrachtung von posttherapeutischen MRT-Aufnahmen (ca. 24h nach iPDT) zeigte nebst bereits bekannten Veränderungen der Ödemzone und Kontrastmittelaufnahme nach erfolgter iPDT eine neu-diagnostizierte intrinsische T1-Hyperintensität im Bestrahlungsvolumen, welche mit MetHb als Produkt einer Einblutung assoziiert wurde [130].

Dies führte zur Fragestellung der 2. Publikation dieser Arbeit, in der der Zusammenhang zwischen der im MRT sichtbaren intrinsischen T1-Hyperintensität und den Änderungen des Transmissionssignales untersucht wurde.

Im Folgenden werden die Auswirkungen von Blut auf die SOM-Signale, sowie die Beobachtungen im MRT näher erläutert. Des Weiteren wird eine Einführung in die 2. Publikation der Arbeit gegeben, in der Signaländerungen im SOM näher analysiert wurden und mit intrinsischen T1-Hyperintensitäten im ersten posttherapeutischen T1-MRT näher verglichen wurden um einen möglichen Zusammenhang zu untersuchen.

### 1. AUSWIRKUNGEN VON BLUT AUF SOM-SIGNALE

Der Vergleich von prä- und post-iPDT-Bestrahlung gemessenen Transmissionssignalen zeigt unterschiedlich ausgeprägte Intensitätsänderungen. Bei keiner Änderung kann rückgeschlossen werden, dass die optischen Gewebeparameter sich während der iPDT-Bestrahlung nicht verändert haben. Signifikante Änderungen des Transmissionssignals bis hin zu einem vollständigen Signalverlust können Hinweis auf eine deutliche Erhöhung der optischen Gewebeeigenschaften für Lichtabsorption  $\mu_a$  und Lichtstreuung  $\mu_s$  interpretiert werden [1, 121]. Ähnliche Veränderungen der optischen Gewebeparameter wurden bereits im Rahmen von iPDT-Untersuchungen, sowohl in vivo als auch in vitro, an optischen Gewebephantomen oder Zellkulturen festgestellt [131-134]. Spektrale Analysen bei diesen Experimenten haben gezeigt, dass durch die PDT-Bestrahlung das oxygenierte Hämoglobin ( $\text{HbO}_2$ ) in den Erythrozyten teils zu deoxygeniertem Hämoglobin (Hb) umgewandelt wurde und am Ende der

---

PDT-Bestrahlung auch Methämoglobin (MetHb) entstanden war. Mit der Entstehung von Hb und MetHb verändern sich die optischen Eigenschaften insbesondere bei der Wellenlänge 635 nm, da Hb hier eine bis zu 4-fach höhere Absorption im Vergleich zu HbO<sub>2</sub> besitzt und MetHb eine bis zu 27-fache [135]. Dies führt schließlich zu einer Reduktion der optischen Eindringtiefe des Lichts bei der Wellenlänge 635 nm, was eine unzureichende Ausleuchtung des Tumervolumens und somit einen reduzierten PDT-Effekt im Zielvolumen zur Folge haben kann [135, 136].

Mittels experimentellen Simulationen einer 5-ALA-iPDT an optischen Gewebephantomen bei Verwendung von Vollblut wurde dieser Aspekt genauer untersucht [135]. SOM-Messungen in kurzen Zeitintervallen während der Laserbestrahlung mit 635 nm ermöglichten die Beobachtung der zeitlichen und spektralen Änderungen der Signale, welche der Entstehung von Hb und MetHb zugeordnet werden konnten. Diese Zuordnung und der zeitliche Verlauf lassen darauf schließen, dass HbO<sub>2</sub> zunächst zu Hb deoxygeniert wird und erst nach längerer Bestrahlungsdauer MetHb entsteht. Dieser Prozess der Deoxygenierung von Blut in der Umgebung der Lichtdiffusoren im Verlauf einer iPDT und einer möglichen MetHb-Entstehung resultieren in einer effektiven Änderung der optischen Verhältnisse bei 635 nm [135]. Die an Gewebephantomen simulierten Prozesse reproduzieren die Änderung der gemessene Lichttransmission zwischen den Lichtdiffusorpaaren in der klinischen Realität, wie sie auch im Rahmen des klinischen SOM beobachtet wurde [1, 2, 121].

Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass eine Veränderung der gemessenen Lichttransmission bei der klinischen iPDT im Zusammenhang mit einer Blutung während der iPDT stehen könnte. Zudem konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass im Verlauf der iPDT-Bestrahlung bei einer Blutung oder Mikrohäorrhagie im Bestrahlungsvolumen eine Hämoglobin-Deoxygenierung zu Hb und eine MetHb-Entstehung stattfindet.

## **2. POSTTHERAPEUTISCHE MRT-BILDGEBUNG**

In der postoperativen Überwachung nach der iPDT werden als bildgebende Follow-Up-Untersuchungen MRT- und PET-Aufnahmen durchgeführt. Die erste MRT-Bildgebung erfolgt bereits etwa 24 h nach der iPDT.

Anhand dieser Aufnahmen wurde beobachtet, dass beim 24h-MRT in der T1-Wichtung keine oder nur eine unspezifische Kontrastmittelaufnahme des Tumors sichtbar ist [1, 77], wohingegen das Tumoreal im 3-Monats-MRT wieder eine Kontrastmittelaufnahme zeigt [1] oder eine solche zumindest teilweise beobachtet wird [77]. Klinisch gesehen muss dies aber nicht einer erneuten Tumorprogression entsprechen, da ohne Applikation weiterer therapeutischer Maßnahmen im weiteren klinischen Verlauf der MRT-Aufnahmen (Follow-Up >3 Monate) im Falle der iPDT auch eine Reduktion der Kontrastmittelaufnahme beobachtet werden kann. In diesem Fall würde die erneute Kontrastmittelaufnahme als Pseudoprogession bezeichnet werden, da keine Tumorprogression vorliegt [137-139]. Ferner wird aus den MRT-Aufnahmen die zeitliche Entwicklung einer Ödemzone deutlich, bei der zunächst eine Vergrößerung nach der iPDT und eine Verkleinerung im zeitlichen Verlauf beobachtet werden kann [1]. Zusätzlich ist eine Diffusionsstörung in der entsprechenden Sequenz des MRTs zu beobachten [1]. Diese sichtbaren Veränderungen in den MRT-Bildern nach iPDT sind

---

Gegenstand weiterer retrospektiver Datenanalysen einer Publikation, die sich in Vorbereitung befindet [140].

Neben den genannten Veränderungen wurde nach iPDT im 24h-MRT bei allen Patienten eine neu auftretende intrinsische T1-Hyperintensität in der T1-Wichtung ohne zusätzliche Kontrastmittelgabe beobachtet, die vor iPDT nicht sichtbar war [2, 130]. Eine solche T1-Hyperintensität wird in der Regel mit den Abbauprodukten einer intrazerebralen Blutung (Hämorrhagie) verbunden [141]. Eine Hämorrhagie ist im Falle einer Verletzung von Gefäßen zu erwarten, ebenso bei Einwirkung von mechanischem Stress auf das Gewebe [142, 143]. Hämorrhagien können auch durch Schwachstellen in Gefäßwänden und Hirnaneurysmen verursacht werden, deren Wahrscheinlichkeit aufgrund von genetischen Risikofaktoren und Suchtmittelmissbrauch erhöht sein kann [144].

Im Falle der iPDT wird davon ausgegangen, dass die beobachteten Mikrohämmorrhagien beim Einsetzen der Lichtdiffusoren ggf. durch direkte Verletzung der Kapillargefäße oder mechanischem Stress auf das Gewebe entstehen könnten, ähnlich wie für den Vorschub von Kathetern und Biopsienadeln beschrieben [145, 146]. Eine so provozierte Hämorrhagie würde zunächst in der T1-Bildgebung mittels MRT nicht sichtbar werden, da hyperakute, frische Hämorrhagien aus arteriellem oder venösem Blut größtenteils HbO<sub>2</sub> beinhalten, welche in der T1-Wichtung keine Intensitätsänderung (Isointensität) verursachen [141, 147, 148]. Eine Hämorrhagie im hyperakuten Stadium könnte mittels eines CT aufgrund der sich verändernden Hounsfield Unit im Vergleich zum unbeeinflussten Gewebe dargestellt werden [147-149]. Eine frische Hämorrhagie deoxygeniert mit der Zeit. In der akuten Phase (24 h nach Auftreten der Hämorrhagie) ist überwiegend Hb im hämorrhagischen Volumen vorhanden [141, 148], dieses erscheint in der T1-Wichtung hypointens, sodass die Hämorrhagie im T1-MRT etwas dunkler als das umliegende Gewebe erscheint. Schließlich bildet sich in der subakuten Phase MetHb (> 48 h) und die Hämorrhagie wird in Form einer intrinsischen T1-Hyperintensität in der T1-Wichtung sichtbar [141, 148]. Bei der Entstehung von MetHb verliert eines der vier Eisenatome des Hämoglobin-Moleküls ein Valenzelektron, wodurch sich die Wertigkeit des Eisens von II (Fe<sup>2+</sup>) auf III (Fe<sup>3+</sup>) ändert [150]. Das Fe<sup>3+</sup> Ion bindet mit einer OH-Gruppe welche von vorhandenem H<sub>2</sub>O abgespalten wird. Hierdurch entsteht ein Überschuss an H<sup>+</sup> bzw. H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> Ionen [141]. Dieser Überschuss resultiert in einem sehr starken MRT-Signal in der T1-Wichtung, welches als Hyperintensität beobachtet wird.

Es ist jedoch zu beachten, dass diese konventionelle Einteilung nicht immer anwendbar ist, da durch einsetzende Entzündungsreaktionen und je nach Größe der Hämorrhagie die Umwandlung nicht nur patientenindividuell, sondern auch lokal in der Hämorrhagie unterschiedlich schnell stattfinden kann [151]. Dadurch können auch zu frühen Zeitpunkten gemischte Signalintensitäten von allen Hämoglobinspezies stammend in einer Hämorrhagie in der T1-Wichtung beobachtet werden.

---

### 3. VERGLEICH ZWISCHEN INTENSITÄTSÄNDERUNGEN IM SOM UND T1-HYPERINTENSITÄTEN IM POSTTHERAPEUTISCHEN MRT

Da die Analysen der MRT-Daten die Auffälligkeit der T1-Hyperintensität zeigten und diese als Anzeichen für die Entstehung von MetHb interpretiert wird, entsteht die Frage ob die T1-Hyperintensitäten lokal mit den Signalverlusten zwischen den Lichtdiffusorpaaren zusammenhängen und führt zur Hypothese:

„Eine intrinsische T1-Hyperintensität im frühen posttherapeutischen T1-MRT ohne Kontrastmittel korreliert mit der Signalreduktion des Therapielichtes bei 635 nm im SOM und somit einer Erhöhung der optischen Absorption.“

Denn Hb und vor allem MetHb weisen eine weitaus höhere optische Absorption als HbO<sub>2</sub> bei der Therapiewellenlänge von 635 nm auf. Um dies zu überprüfen wurden in [2] die SOM- und MRT-Daten und von 11 iPDT-Heilversuchen an De-novo malignen Gliomen analysiert, und untersucht:

„Wie kann der Vergleich zwischen MRT- und SOM-Daten durchgeführt werden?“; und „Gibt es Korrelationen zwischen dem Auftreten bzw. dem Volumen der T1-Hyperintensität und den beobachteten Signalverlusten im SOM?“

Als Basis dafür wurden zunächst grundlegende Analysen der Transmissionssignale der SOM-Daten bezüglich ihrer Änderungen untersucht. Zudem wurden die im MRT beobachteten T1-Hyperintensitäten volumetriert.

Größte Herausforderung bei der Analyse war die Zusammenführung der erhaltenen Daten aus den zwei Verfahren MRT und SOM in einem Koordinatensystem. Für den räumlichen Vergleich wurde um jedes Lichtdiffusorpaar eine Lichtzone konstruiert. Die Lichtzone ist definiert auf Basis eines stadionförmigen Volumens um ein Lichtdiffusorpaar, in dem sich mindestens 67% der Propagationswege der detektierten Photonen befinden. Das Volumen eines solchen Stadions ist durch den standardisierten Radius von 2,1 mm bestimmt. Dieser wurde mit der Diffusionsnäherung berechnet, unter Annahme zweier paralleler Lichtdiffusoren im Abstand 10 mm, sowie von Literaturwerten für Absorption und Streuung.

Die resultierende Lichtzone wurde individuell für alle Lichtdiffusorpaare als 3D-Objekt erstellt und mit dem T1-Hyperintensitätsvolumen geschnitten und ermittelt ob ein Schnittvolumen vorliegt und ggf. wie groß dieses ist.

Ausgehend von den Ergebnissen für die Schnittvolumina konnte nun untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen einer Signaländerung und dem Vorliegen eines T1-Hyperintensitätsbereiches gibt. Da die feststellbare Signaländerung jedoch auch durch den Abstand zwischen den beiden Lichtdiffusoren beeinflusst ist, wurde zusätzlich aus der Intensität des Transmissionssignales der Absorptionskoeffizient, aus Berechnungen mit der Diffusionsnäherung für die prä- und post-iPDT SOM-Signale, bestimmt und daraus dessen Änderung im Verlauf der iPDT berechnet. Diese Änderung wurde nicht nur mit dem generellen Auftreten einer intrinsischen T1-Hyperintensität in der Lichtzone um ein Lichtdiffusorpaar, sondern auch mit dem ermittelten Schnittvolumen, verglichen.



---

Die Daten zeigen, dass nach jeder iPDT ein Volumen mit intrinsischer T1-Hyperintensität auftritt. Die analysierten Volumina mit intrinsischer T1-Hyperintensität sind aufgrund des geringen Volumens (Median  $0,79 \text{ cm}^3$ ) als kleine Mikro-Hämorrhagien anzusehen [2, 130]. Diese sind vergleichbar mit asymptomatischen, „stillen“ Hämorrhagien [152].

Die aus den SOM-Rohdaten mittels Diffusionsnäherung berechneten Absorptionswerte zeigten eine breite Variation (Median  $\mu_a = 0,068 \text{ mm}^{-1}$  IQR: [0,045 0,093]).

Ein statistischer Vergleich zwischen Absorptionsänderung  $\Delta\mu_a$  und dem Auftreten, sowie des Schnittvolumens der T1-Hyperintensität mit der jeweiligen, die Faserpaare umgebenden, Lichtzone zeigte eine signifikante Korrelation zwischen einer Erhöhung der Absorption und dem Auftreten der T1-Hyperintensität (Median  $\Delta\mu_a$  (mit T1-Hyp.) =  $0,025 \text{ mm}^{-1}$  vs.  $\Delta\mu_a$  (ohne T1-Hyp.) =  $0,013 \text{ mm}^{-1}$ ;  $p = 0,003$ ), bzw. eine positive Regression zwischen Erhöhung der Absorption und dem Volumen der T1-Hyperintensität zwischen den Lichtdiffusorpaaren ( $p < 0,001$ ).

Diese Ergebnisse legen einen Zusammenhang zwischen den Transmissionssignaländerungen und den beobachteten intrinsischen T1-Hyperintensitäten nahe und bestätigen somit die Hypothese. Laboruntersuchungen und Tierversuche zeigen, dass durch die frühe Sichtbarkeit der T1-Hyperintensität bei iPDT-Bestrahlung scheinbar aufgrund der ROS-Produktion mit Sauerstoffverbrauch die Entstehung von MetHb nach einer Blutung beschleunigt werden kann [131, 135].

Es ist zu vermuten, dass die, durch die iPDT-Bestrahlung, beschleunigte MetHb-Entstehung möglicherweise den nahen zeitlichen Zusammenhang mit dem Auftreten der T1-Hyperintensität im MRT bereits etwa 24 h nach iPDT erklären kann.

Trotz signifikanter Korrelation muss darauf geachtet werden, dass die erhaltenen Ergebnisse diversen Annahmen unterlagen. So kann mit der Diffusionsnäherung nur homogenes Gewebe betrachtet werden, und dadurch eine Inhomogenität in Form der Hämorrhagie und deren Auswirkung nicht exakt berechnet werden. Somit muss bei Interpretation dieser Ergebnisse auch berücksichtigt werden, dass sich in der ROI und zwischen den Lichtdiffusoren strukturell und lokalisationsspezifisch unterschiedliche Gewebearten, (Tumorgewebe, Weiße Substanz, Graue Substanz, Nekrose und Ödemzone) befinden. Jedes Gewebe wird durch seine individuellen, patientenspezifischen optischen Gewebeeigenschaften in Werten von  $\mu_a$ ,  $\mu_s$  und  $g$  charakterisiert [76, 113, 153, 154]. Messungen zeigten, dass Weiße Substanz bei der iPDT-Therapiewellenlänge von 635 nm eine bis zu viermal höhere optische Absorption und Streuung als Tumorgewebe aufweist [113]. Auf Basis dieser Eigenschaften werden die gemessenen Signalintensitäten der SOM-Signale lokalisationsspezifisch beeinflusst. Die daraus berechneten Absorptionswerte stellen daher einerseits einen Näherungswert für den Gewebereich um das jeweilige Lichtdiffusorpaar dar, gleichzeitig sind sie ein guter Anhaltspunkt für die mittleren optischen Eigenschaften des Gehirngewebes. Die in dieser Analyse berechneten in-vivo Absorptionswerte für Gehirntumore (Median  $\mu_a = 0,068 \text{ mm}^{-1}$  IQR: [0,045 0,093]) werden durch ex-vivo gemessene Literaturwerte für Hirngewebe bei 635 nm bestätigt ( $\mu_a$  Literatur-Wertebereich: [0,02 0,08]  $\text{mm}^{-1}$ ) [113, 153, 154].

Die Größe des Volumens der Hämorrhagie unmittelbar nach einer iPDT-Intervention kann auf dieser Basis nicht bestimmt werden, da das MRT erst am nächsten Tag aufgenommen wird. Daher kann nur angegeben werden in welchem Volumen bis dahin auch durch mögliche Entzündungsreaktionen MetHb umgewandelt wurde. Es kann jedoch nicht

---

bestimmt werden, welche Konzentration vorliegt, oder welchen Umfang das T1-Hyperintensitätsvolumen nach der iPDT hatte, falls MetHb während der iPDT-Bestrahlung entstanden ist oder ob nur eine Deoxygenierung des Blutes während der iPDT-Bestrahlung durch die ROS-Produktion vorlag. Bei der Interpretation ist zu beachten, dass die MetHb-Entstehung auch durch enzymatische oder entzündungsbedingte Reaktionen ausgelöst werden kann [151].

Eine Hämorrhagie hat gegebenenfalls erst am Ende der iPDT-Bestrahlung signifikante Auswirkungen auf die optischen Gewebeeigenschaften, denn anhand von in-vitro Laborexperimenten wurde gezeigt, dass die Umwandlung des Hämoglobins stark zeitabhängig ist und erst gegen Ende der Bestrahlung MetHb entstehen könnte. [135]. Dies führt zu der Annahme, dass sich bei Änderung der gemessenen SOM-Signalintensitäten die Lichtdosimetrie während der iPDT erst ändert, wenn das PpIX ausreichend ausgebleicht ist und der gewünschte PDT-Effekt bereits erzielt ist [121]. Diese Annahme und die Frage, wie sich die Lage von verschiedenen Inhomogenitäten mit unterschiedlicher Absorption auf die SOM-Signale auswirkt, sind Bestandteil von sich momentan in Arbeit befindlichen Projekten und Publikationen [140, 155] mit Fragestellung wie:

„Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Volumen und der Lokalisation der intrinsischen T1-Hyperintensität im Vergleich zum Ansprechverhalten auf die Therapie?“; und  
„Gibt es eine lokale Schnittmenge zwischen der Lokalisation eines Rezidivs und der T1-Hyperintensität?“

Gesamt wird in der zweiten Publikation [2] ein großer Einblick in die bisher teils noch unbekanntem Vorgänge, die während einer iPDT-Bestrahlung stattfinden. Die erstellten Methoden können als Basis für weitergehende Untersuchungen und die Weiterentwicklung des SOM zur Erstellung individualisierter Bestrahlungspläne genutzt werden, welche auch die Absorptionsänderung berücksichtigen.

**In der zweiten Publikation dieser Dissertationsschrift wurden MRT und SOM-Daten von 11 iPDT-Behandlungen an zuvor unbehandelten (De-novo) malignen Gliomen analysiert. Unter der Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen den Änderungen der Transmissionssignale im SOM und in der MRT-Bildgebung sichtbaren neu auftretenden intrinsischen T1-Hyperintensität besteht, wurden sowohl SOM- als auch MRT-Daten analysiert und dann zusammengeführt.**

**Die MRT-Analysen waren auf die Auffälligkeit einer in der posttherapeutischen, nativen T1-Wichtung (~24h nach iPDT) sichtbaren intrinsischen T1-Hyperintensität fokussiert, welche ein indirekter Nachweis für eine stille, kleinvolumige Hämorrhagie ist.**

**Die SOM-Daten wurden bezüglich des Auftretens des Transmissionssignals des Therapielichtes und PpIX-Fluoreszenz vor und nach iPDT untersucht. Zudem wurde die Änderung der Signalstärke der Transmission bestimmt.**

**Weiterhin wurden die SOM-Daten tiefgreifender analysiert, indem aus den Transmissionssignalen der Therapiewellenlänge zwischen den Lichtdiffusoren optische**

---

Absorptionskoeffizienten bestimmt wurden und daraus deren Änderung im Verlauf der iPDT.

Ergebnisse aus MRT und SOM-Analysen wurden mit einer eigens entwickelten Methodik verglichen, in der die Trajektorienkoordinaten der Lichtdiffusoren und die ein Lichtdiffusorpaar umgebende Lichtzone mit der Lokalisation der T1-Hyperintensität überlagert und geschnitten wurden. Dies ermöglichte den statistischen Vergleich zwischen Transmissions- bzw. Absorptionsänderung mit der Lage und dem Volumen der T1-Hyperintensität in dem die Lichtdiffusorpaare umgebenden Volumen. In diesem statistischen Vergleich wurde eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Größen nachgewiesen und die Hypothese bestätigt.



---

## E. WEITERE iPDT-INDUZIERTE VERÄNDERUNGEN OPTISCHER GEWEBEEIGENSCHAFTEN

---

Die Analyse der SOM-Signale in Kombination mit den MRT-Bildern zeigte eine Änderung der optischen Eigenschaften welche im Zusammenhang mit dem Auftreten von Methämoglobin sichtbar als intrinsische T1-Hyperintensität im Bestrahlungsvolumen steht [2]. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass neben einer Einblutung auch andere Faktoren während der iPDT-Behandlung Einfluss auf die optischen Gewebeeigenschaften im Bestrahlungsvolumen haben und somit die SOM-Signale beeinflussen können.

Um eine Änderung der optischen Eigenschaften zu verursachen, ist eine Veränderung entweder der Menge oder Zusammensetzung der die Absorption oder Streuung verursachenden Stoffe nötig. Dies könnte durch die im Rahmen der iPDT-Bestrahlung applizierte Energie oder die Initiierung einer biochemischen Reaktion erfolgen.

Untersuchungen belegen, dass durch die iPDT-Bestrahlung die Permeabilität der Blut-Hirnschranke erhöht wird, wodurch Blutplasma und andere Blutbestandteile in das Bestrahlungsvolumen einströmen können und das Gewebe anschwillt [156, 157]. Dies führt zur beobachteten Vergrößerung des perifokalen Ödems [1]. Es wurde gezeigt, dass mit Erhöhung der Permeabilität der Gefäße die optischen Streueigenschaften im Gewebe sinken [158, 159]. Es ist jedoch unbekannt, wie schnell sich die Erhöhung der Permeabilität aufgrund der iPDT-Bestrahlung auf die Ödemgröße und somit auf die optischen Eigenschaften auswirkt.

Ein weiterer durch die iPDT induzierter Effekt ist eine mögliche Erhöhung der Gewebetemperatur. Ein ausreichend großer Abstand der Lichtdiffusoren zueinander ( $> 9$  mm) oder eine Reduktion der Laserleistung im Falle geringer Lichtdiffusorabstände wird gewählt, um eine Temperaturerhöhung, welche eine Denaturierung oder Koagulation des Hirngewebes verursachen könnte, zu vermeiden [77]. Simulationen und Experimente an Gewebephantomen zeigen eine mögliche Erhöhung der Gewebetemperatur um bis zu  $5^{\circ}\text{C}$  [77, 160]. Bereits kleine Temperaturerhöhungen können Auswirkungen auf grundlegende physikalische und zelluläre, sowie metabolische Eigenschaften haben [161, 162], und somit ggf. sogar die Ödembildung fördern. Temperaturbedingte Änderungen in diesem Bereich (Körpertemperatur  $+ 5^{\circ}\text{C}$ ) können auch Auswirkungen auf die optischen Gewebeeigenschaften haben. Die Veränderung von biologischem Gewebe infolge einer Temperatureinwirkung kann mit der Arrhenius-Gleichung beschrieben werden [163, 164]. Eine wärmeinduzierte Neu-Anordnung beispielsweise von Proteinen (ohne Denaturierung) entspricht einem Arrhenius-Prozess 1. Ordnung [164, 165]. Analog zu diesem wurde bei einer 1,8 %igen Intralipid<sup>®</sup>-Lösung eine lineare Erhöhung der Absorption um 10% bzw. auch eine lineare Reduktion der Streuung um 10% bei einem Temperaturanstieg um  $10^{\circ}\text{C}$  festgestellt [166-168].

Die Temperatureinwirkung auf Lipide, Fette und Gewebe mit hohem Proteinanteil kann mit der Arrhenius-Gleichung beschrieben werden [163, 164]. Die wärmeinduzierte Neu-Anordnung der Proteine (ohne Denaturierung) entspricht Arrhenius-Prozessen der 1. Ordnung [164, 165]. Dies verursacht bereits eine Änderungen der Absorption und Streuung von Licht in Lipid-Lösungen, wie es für eine 1,8%tige Intralipid Lösung beobachtet wurde (Erhöhung der Absorption um 10% und Reduktion der Streuung um 10%) [166-168].

---

Zur eingehenden Untersuchung des Effektes einer Temperaturänderung auf die optischen Gewebeeigenschaften bei Temperaturen, wie sie während der iPDT-Bestrahlung erreicht werden, sind im Rahmen dieser Promotionsarbeit Experimente an Blut und tierischen Gewebe durchgeführt worden [114, 115].

Diese fanden unter der Hypothese statt, dass eine Erhöhung der Temperatur der Probe eine Änderung der optischen Gewebeeigenschaften verursacht.

Dazu wurde die orts aufgelöste Remission von Gewebe bei Temperaturen im Bereich von 20°C -50°C vermessen. Das Messverfahren beruht darauf, dass ein Lichtspot auf der Probe mit einer Kamera erfasst wird und aus der Größe des Lichtpunktes bei verschiedenen Integrationszeiten die optischen Gewebeeigenschaften bestimmt werden [169].

Die Ergebnisse zeigen, dass selbst ohne Denaturierung von Proteinen eine Änderung der optischen Gewebeeigenschaften auftritt und belegen somit die Hypothese einer temperaturinduzierten Veränderung der optischen Gewebeeigenschaften. Derartige Änderungen hätten auch Auswirkungen auf die gemessenen SOM-Signale und somit auch die Lichtdosimetrie während der iPDT [114]. Beispielsweise wurde eine signifikante Erhöhung der Absorption bei 40°C im Vergleich zu 25°C um bis zu 140% im Falle von Schweinegehirn für die iPDT-Therapiewellenlänge von 635 nm beobachtet. Eine Erhöhung der Absorption würde dann die effektive Lichteindringtiefe reduzieren [2]. Nimmt die Absorption um 100% zu,  $\mu_a$  von 0,02 mm<sup>-1</sup> vs. 0,04 mm<sup>-1</sup>, so reduziert sich die optische Eindringtiefe von 2,9 mm auf 2,0 mm, wodurch sich im Endeffekt auch der Durchmesser der Isodosis, welche der Zieldosis entspricht, um den Lichtapplikator verringert [2].

Messungen von auf Agar-Agar basierten optischen Gewebephantomen mit 4% Blutvolumenanteil, ohne Anwesenheit eines Photosensibilisators, zeigten beispielsweise eine Erhöhung der Absorption um bis zu 200% bei der iPDT-Therapiewellenlänge (635 nm) und konnten der Entstehung von MetHb zugeordnet werden [114, 115]. Dies würde bedeuten, dass sich Hämoglobin bei einer im Verlauf der iPDT auftretenden Hämorrhagie nicht nur durch die ROS-induzierte Oxidation, sondern auch durch temperaturinduzierte Autooxidation in MetHb umwandeln würde. Eine Veröffentlichung zum Thema der Temperaturabhängigkeit optischer Gewebeeigenschaften befindet sich in Vorbereitung [115]. In dieser werden die Ergebnisse der Messung von optischen Gewebeeigenschaften von tierischem Gewebe und optischen Gewebephantomen bei Temperaturen im Bereich 25°C bis 50°C beschrieben. (Die Verwendung von Blut in dieser Arbeit wurde genehmigt durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität zu München Votum-Nr. 18-144. Im Falle des tierischen Gewebes war kein Votum nötig, da Schlachtprodukte der Lebensmittelindustrie verwendet wurden.)

Zusammenfassend zeigen diese und bisherige Arbeiten zur Temperaturabhängigkeit optischer Gewebeeigenschaften einen Zusammenhang zwischen Temperatur und Absorption oder Streuung im Gewebe auf. Wie sich lokale Änderungen der optischen Gewebeeigenschaften durch Temperaturänderungen auf die SOM-Signale und damit auf die Lichtdosimetrie bei der iPDT auswirken können, sollte weiter untersucht werden.

---

## F. BEDEUTUNG UND ZUKUNFT DES SOM FÜR DIE IPDT

---

Mit dem SOM-Verfahren kann die Anreicherung des PpIXs in Tumoreal vor Durchführung der iPDT-Bestrahlung nachgewiesen werden. Ob aus den SOM-Daten ein prognostischer Faktor hinsichtlich der Überlebensdauer abgeleitet werden kann, konnte nur tendenziell ermittelt werden und bedarf weitere Untersuchungen. Die Änderungen optischer Gewebeeigenschaften im Tumor können mit dem SOM-Verfahren nachgewiesen werden und so könnte indirekt eine induzierte Blutung erkannt werden.

Mit der Möglichkeit der Ableitung der Änderung der optischen Gewebeeigenschaften während der Bestrahlung aus der Änderung des Transmissionssignals werden wiederum weitere Interpretationen hinsichtlich Gewebeänderungen ermöglicht. Schließlich können diese Anzeichen als Indikatoren für ein mögliches Nicht-Erreichen der angestrebten applizierten Lichtdosis bzw. für eine inhomogene Verteilung der angestrebten applizierten Lichtdosis im Bestrahlungsvolumen liefern, welches ggf. unmittelbaren Handlungsbedarf erfordert [121].

Mit solchen Informationen könnte eine exakte Abschätzung der Lichtdosimetrie durchgeführt und nach erfolgter iPDT-Bestrahlung mögliche Gewebereiche, welche eine zu niedrige Lichtdosis erhielten, identifiziert werden [78, 170, 171]. Diese Bereiche könnten dann gezielt anderweitig therapiert oder auch mit einer zweiten iPDT behandelt werden. Diese Forschungsansätze könnten zudem dahingehend erweitert werden, dass Inhomogenitäten oder zeitabhängige Änderung der optischen Gewebeeigenschaften berücksichtigt werden.

Des Weiteren hat das SOM das Potential neben einer Optimierung der iPDT die patientenspezifische Individualisierung, durch die Extraktion patientenindividueller optischer Gewebeeigenschaften und deren Änderung, voranzutreiben [172, 173]. Damit wiederum könnten optimierte Bestrahlungspläne erstellt oder Echtzeit Anpassungen der Bestrahlungsparameter auf Basis lichtdosimetrischer Berechnung oder Simulation durchgeführt werden [80, 117, 118, 172, 173].

Durch Echtzeit-Analyse der optischen Eigenschaften erscheint es möglich, die SOM-Daten hinsichtlich einer gesteigerten Therapiesicherheit zu untersuchen, indem durch individuelle Planung die Belastung des gesunden Gewebes reduziert werden kann und mögliche thermische Effekte vermieden werden können. Das SOM-Verfahren wurde mittlerweile derart weiterentwickelt, dass es in Lasersysteme, die Teil klinischer Zulassungsstudien sind, integriert ist, sodass SOM-Daten automatisch aufgenommen und zur weiteren Analyse genutzt werden könnten.

Zusammenfassend erscheint es sinnvoll das SOM-Verfahren als ein Verfahren zur Therapieüberwachung mit der Möglichkeit zur Individualisierung und zur Prognose des Ansprechverhaltens der iPDT-Behandlung beim Einsatz in der iPDT zu etablieren [1].





---

## VI. ORIGINALMANUSKRIPTE

Stefanie Lietke, Michael Schmutzer, Christoph Schwartz, Jonathan Weller, Sebastian Siller, **Maximilian Aumiller**, Christian Heckl, Robert Forbrig, Karim-Maximilian Niyazi, Rupert Egensperger, Herbert Stepp, Ronald Sroka, Jörg-Christian Tonn, Adrian Rühm, Niklas Thon „*Interstitial Photodynamic Therapy using 5-ALA for Malignant Glioma Recurrences*”, *Cancers* (Basel), (2021), 13 (8), doi:10.3390/cancers13081767 **JIF**: 6,639

**Maximilian Aumiller**, Christian Heckl, Stefanie Quach, Herbert Stepp, Birgit Ertl-Wagner, Ronald Sroka, Niklas Thon, Adrian Rühm, “*Interrelation between Spectral Online Monitoring and Postoperative T1-Weighted MRI in Interstitial Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas*”, *Cancers* (Basel), (2021), 14 (1), doi:10.3390/cancers14010120, **JIF**: 6,639



---

## A. INTERSTITIAL PHOTODYNAMIC THERAPY USING 5-ALA FOR MALIGNANT GLIOMA RECURRENCES

---

Stefanie Lietke, Michael Schmutzer, Christoph Schwartz, Jonathan Weller, Sebastian Siller, **Maximilian Aumiller**, Christian Heckl, Robert Forbrig, Karim-Maximilian Niyazi, Rupert Egensperger, Herbert Stepp, Ronald Sroka, Jörg-Christian Tonn, Adrian Rühm, Niklas Thon „*Interstitial Photodynamic Therapy using 5-ALA for Malignant Glioma Recurrences*”, *Cancers* (Basel), (2021), 13 (8), doi:10.3390/cancers13081767 **JIF**: 6,639

### **Kurzfassung:**

Ziel dieser Arbeit war es anhand retrospektiver Analysen von interstitiellen photodynamischen Therapien (iPDT) an malignen Gliom-Rezidiven zu untersuchen, ob die iPDT eine vorteilhafte Therapieoption ist und ob prognostische Faktoren für die iPDT ermittelt werden können.

Die iPDT unter Verwendung von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) als Vorstufe des Photosensibilisators Protoporphyrin IX (PpIX) könnte eine innovative und praktikable Option für die Behandlung von malignen Gliomen darstellen. Der zytotoxische Effekt erfolgt dabei nach Anregung von PpIX mittels Laserlicht. Zwischen den Jahren 2006 und 2018 wurden in einer monozentrischen Patientenkohorte (n=47) mit lokalen Rezidiven maligner Gliome mit iPDT behandelt. Die iPDT wurde nur bei Patienten durchgeführt, welche nach primärer Standardtherapie (d.h. Resektion mit nachfolgender Radiochemotherapie nach Stupp-Protokoll) ein malignes Gliom-Rezidiv entwickelten, welches durch eine Gewebebiopsie histologisch nachgewiesen wurde und bei dem eine sichere vollständige Resektion nicht möglich war. Die Bestrahlungsplanung wurde mit einer 3D-Planungssoftware durchgeführt, welche für die iPDT-Bestrahlung adaptiert wurde. Während des Planungsprozesses wurden anhand der Tumorumlage und Größe die Anzahl der zylindrischen Lichtdiffusoren und deren Position festgelegt. Diese wurden in einem nachfolgenden stereotaktischen, neurochirurgischen Eingriff im Tumorumfang positioniert. Zusätzlich wurden vor und nach der iPDT bei 18 /47 Patienten Messungen mittels spektralem Online-Monitoring (SOM) durchgeführt.

Die SOM-Daten wurden bezüglich des Auftretens der PpIX-Fluoreszenz und der Transmission des Therapielichtes im Gewebe zwischen den Lichtdiffusorpaaren analysiert. Zunächst wurde ermittelt, ob die Signale vor und nach der iPDT-Bestrahlung einen Schwellwert überschritten. Die Ergebnisse daraus wurden anschließend genutzt, um prognostische Faktoren bezüglich des SOM zu bestimmen. Diese basierten zum einen auf dem vorwiegenden Vorkommen von PpIX-Fluoreszenz zu iPDT-Beginn zwischen den Lichtdiffusorpaaren eines Patienten. Zum anderen auf dem Auftreten eines Laserlichttransmissionssignales nach Ende der iPDT-Bestrahlung.

Zusätzlich zum SOM wurden folgende weitere Faktoren analysiert und betrachtet: das Risikoprofil der iPDT, die Zeit bis zum Auftreten eines erneuten Rezidivs (Progression-Free Survival PFS, in der Publikation abgekürzt als Time to Treatment Failure TTF), die Überlebenszeit nach dem Auftreten des neuen Rezidivs (Post-Recurrence Survival, PRS). Zudem wurden anhand eines Vergleichs der gesammelten medizinischen, technischen und SOM-Daten mit dem tatsächlichen Überleben mögliche prognostische Faktoren untersucht.

Insgesamt wurden 47 Patienten mittels iPDT behandelt, von diesen konnten 44 retrospektiv ausgewertet werden (medianes Alter 44,9 Jahre, [33,4-87,0] Jahre; 27/17 männlich/weiblich). Die behandelten Tumore stellten sich als 37 Glioblastome (WHO2016-Grad IV) und 7 anaplastische Astrozytome (WHO2016-Grad III) dar. Bei 30 Tumoren wurde eine Methylierung der O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase nachgewiesen, 29 zeigten einen Isocitratdehydrogenase (IDH) Wildtyp. Insgesamt wurden 26 Patienten wegen eines ersten Rezidivs, 9

---

wegen eines zweiten und 9 wegen ihres dritten oder weiteren Rezidivs behandelt. Im Median betrug das behandelte Tumolvolumen  $3,34 \text{ cm}^3$  ( $[0,50-22,8] \text{ cm}^3$ ). Die nach der iPDT teilweise auftretende schwerwiegendere, neurologische Verschlechterung, beispielsweise in Form einer Parese, hielt nur bei einem Patienten länger als sechs Wochen an. Das PFS betrug im Median 7,1 Monate (95% Konfidenzintervall (CI): 4,4-9,8 Monate) und das mediane PRS betrug 13,0 Monate (CI: 9,2-16,8 Monate). Die Patientenanteile mit einem Überleben nach iPDT von mindestens 2- und 5-Jahren betrugen 25% beziehungsweise 4,5%. Ein gutes PpIX-Fluoreszenzsignal bei Beginn und ein ausreichendes Transmissionssignal nach Ende der iPDT-Bestrahlung konnte mit längerem Überleben in Verbindung gebracht werden.

Insgesamt wurden keine signifikanten Zusammenhänge zwischen allen analysierten Faktoren, d.h., den Patientenmerkmalen, behandlungsbezogenen Faktoren, SOM-Einschätzung oder molekularen Faktoren festgestellt. Der Therapieausgang war darüber hinaus auch unabhängig von den Mutationen des Tumors wie dem MGMT-Status.

Die vielversprechenden Ergebnisse mit gutem 2-Jahres-Überleben dieser Arbeit und das Risikoprofil der iPDT untermauern, dass prospektive Studien und Untersuchungen durchgeführt werden sollten, um die iPDT weiterzuentwickeln. Mögliche prognostische Faktoren wie Angaben aus dem SOM sollten tiefergehender untersucht werden, um eine bestmögliche Behandlung mit gutem Ansprechverhalten des Tumors zu ermöglichen.

**Maximilian Aumiller erarbeitete die der Arbeit zugrundeliegende Methodik zur Analyse der SOM-Daten, welche eine Beurteilung und quantitative Auswertung der spektralen Daten ermöglicht und entwickelte ein darauf aufbauendes Konzept zur Ersteinschätzung der durchgeführten iPDT-Bestrahlung. Beides wurde von M. Aumiller auf die Daten der 18 / 47 iPDT's angewendet, bei denen erstmalig SOM-Untersuchungen durchgeführt wurden.**

**Darauf aufbauend unterstützte M. Aumiller bei der klinischen Durchführung der zugrundeliegenden iPDT-Behandlungen einerseits bei der stereotaktischen iPDT-Planung insbesondere hinsichtlich Positionierung der Lichtdiffusoren unter lichtdosimetrischen Aspekten, andererseits während der iPDT-Durchführung durch Unterstützung in der Bedienung des Therapie-Lasers und der Durchführung der intraoperativen SOM-Messungen.**

**Sämtliche für die Publikation relevanten technischen Daten wurden von M. Aumiller zusammengestellt, deren Auswertung (für alle 47 iPDT's) durchgeführt und die Ergebnisse schließlich in die Publikation sinnvoll integriert.**

**Bei der Verfassung der Manuskriptabschnitte zu den technischen Aspekten der iPDT und des SOM im Methodik- und Ergebnisteil war M. Aumiller wesentlicher Autor, sowie in der Unterstützung bei der kritischen Korrektur des Manuskriptes in Zusammenarbeit mit den anderen Autoren.**

Article

# Interstitial Photodynamic Therapy Using 5-ALA for Malignant Glioma Recurrences

Stefanie Lietke<sup>1,2,†</sup>, Michael Schmutzer<sup>1,2,†</sup>, Christoph Schwartz<sup>1,3</sup>, Jonathan Weller<sup>1,2</sup>, Sebastian Siller<sup>1,2</sup>, Maximilian Aumiller<sup>4,5</sup>, Christian Heckl<sup>4,5</sup>, Robert Forbrig<sup>6</sup>, Maximilian Niyazi<sup>2,7</sup>, Rupert Egensperger<sup>8</sup>, Herbert Stepp<sup>4,5</sup>, Ronald Sroka<sup>4,5</sup>, Jörg-Christian Tonn<sup>1,2</sup>, Adrian Rühm<sup>4,5,‡</sup> and Niklas Thon<sup>1,2,\*,‡</sup>

<sup>1</sup> Department of Neurosurgery, University Hospital, LMU Munich, 81377 Munich, Germany

<sup>2</sup> German Cancer Consortium (DKTK), Partner Site Munich, 81377 Munich, Germany

<sup>3</sup> Department of Neurosurgery, University Hospital Salzburg, Paracelsus Medical University Salzburg, 5020 Salzburg, Austria

<sup>4</sup> Laser-Forschungslabor, LIFE Center, University Hospital, LMU Munich, 81377 Munich, Germany

<sup>5</sup> Department of Urology, University Hospital, LMU Munich, 81377 Munich, Germany

<sup>6</sup> Institute for Clinical Neuroradiology, University Hospital, LMU Munich, 81377 Munich, Germany

<sup>7</sup> Department of Radiation Oncology, University Hospital, LMU Munich, 81377 Munich, Germany

<sup>8</sup> Center for Neuropathology and Prion Research, University Hospital, LMU Munich, 81377 Munich, Germany

\* Correspondence: niklas.thon@med.uni-muenchen.de; Tel.: +49-89-4400-0

† Both authors contributed equally.

‡ This study is guided by AR and NT equally thus both serve as shared last authors.



**Citation:** Lietke, S.; Schmutzer, M.; Schwartz, C.; Weller, J.; Siller, S.; Aumiller, M.; Heckl, C.; Forbrig, R.; Niyazi, M.; Egensperger, R.; et al. Interstitial Photodynamic Therapy Using 5-ALA for Malignant Glioma Recurrences. *Cancers* **2021**, *13*, 1767. <https://doi.org/10.3390/cancers13081767>

Academic Editors: Giuseppe Lombardi, Emilie Le Rhun, Ahmed Idbaih, Matthias Preusser and Pim French

Received: 23 February 2021

Accepted: 29 March 2021

Published: 7 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** Malignant glioma has a poor prognosis, especially in recurrent situations. Interstitial photodynamic therapy (iPDT) uses light delivered by implanted light-diffusing fibers to activate a photosensitizing agent to induce tumor cell death. This study examined iPDT for the treatment of malignant glioma recurrences. Forty-four patients treated at one institution were retrospectively analyzed and patient-, tumor- and treatment-related factors were retrieved from hospital charts. Most of the patients (37) had glioblastomas, the most aggressive type of glioma. Brain swelling or small bleedings caused worsening of symptoms in 18 patients, but only in one case severe symptoms persisted for more than six weeks. After iPDT, tumors recurred after a median of 7.1 months and patients lived for a median of 13.0 months. Two years after iPDT treatment, 25% of the patients were still alive. These promising results should be evaluated further in a prospective study.

**Abstract:** Interstitial photodynamic therapy (iPDT) using 5-aminolevulinic acid (5-ALA)-induced protoporphyrin IX (PpIX) as a cytotoxic photosensitizer could be a feasible treatment option for malignant gliomas. In a monocentric cohort of consecutive patients treated between 2006 and 2018, a risk profile analysis of salvage iPDT for local malignant glioma recurrences and associated outcome measures are presented here. It was considered indicated in patients with circumscribed biopsy-proven malignant glioma recurrences after standard therapy, if not deemed eligible for safe complete resection. A 3D treatment-planning software was used to determine the number and suitable positions of the cylindrical diffusing fibers placed stereotactically to ensure optimal interstitial irradiation of the target volume. Outcome measurements included the risk profile of the procedure, estimated time-to-treatment-failure (TTF), post-recurrence survival (PRS) and prognostic factors. Forty-seven patients were treated, of which 44 (median age, 49.4 years, range, 33.4–87.0 years, 27 males) could be retrospectively evaluated. Recurrent gliomas included 37 glioblastomas (WHO grade IV) and 7 anaplastic astrocytomas (WHO grade III). Thirty (68.2%) tumors were O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)-methylated, 29 (65.9%)—isocitrate dehydrogenase (IDH)-wildtype. Twenty-six (59.1%) patients were treated for their first, 9 (20.5%)—for their second, 9 (20.5%)—for the third or further recurrence. The median iPDT target volume was 3.34 cm<sup>3</sup> (range, 0.50–22.8 cm<sup>3</sup>). Severe neurologic deterioration lasted for more than six weeks in one patient only. The median TTF was 7.1 (95% confidence interval (CI), 4.4–9.8) months and the median PRS was 13.0 (95% CI, 9.2–16.8) months. The 2- and 5-year PRS rates were 25.0% and 4.5%, respectively. The treatment response was heterogeneous and not significantly associated with patient characteristics,

treatment-related factors or molecular markers. The promising outcome and acceptable risk profile deserve further prospective evaluation particularly to identify mechanisms and prognostic factors of favorable treatment response.

**Keywords:** malignant glioma; glioblastoma; recurrence; photodynamic therapy; 5-ALA; stereotactic surgery; outcome

## 1. Introduction

Despite recent advances in the treatment of malignant glioma, prognosis remains poor with a median overall survival (OS) of less than two years in IDH-wildtype glioblastomas [1,2]. Upon inevitable tumor recurrence, median post-recurrence survival (PRS) is limited to 7–12 months in most recent studies [3–12]. Salvage treatment options include resurgery, reirradiation protocols, chemotherapy and any combination thereof. Each of these treatment options offers specific advantages and limitations. While salvage surgery can be of advantage in selected cases, only complete resection of the contrast-enhancing tumor mass seems to prolong post-recurrence survival [10,13–15]. In the case of eloquent, diffuse and/or multifocal tumor recurrences, reirradiation and/or second-line chemotherapy regimens may be preferable [16,17]. No randomized controlled study, however, has been able to show a relevant survival benefit for any of the treatment regimens tested [18–25]. This also concerns the use of recently introduced tumor-treating fields [6] and some early results from immunotherapy [26]. Accordingly, no standard treatment for progressive/recurrent malignant gliomas exists, and therefore, management has to be optimally tailored to the individual patient [27].

Photodynamic therapy (PDT) has been introduced as a local surgical treatment option which is based on cytotoxic effects induced by a photosensitizing agent that is accumulated within malignant glioma tissue and activated by light of an appropriate wavelength [28]. PDT for malignant glioma was developed alongside fluorescence-guided resection with 5-aminolevulinic acid (5-ALA) [29] which provides highly tumor-specific fluorescence in combination with minimal side effects: in an approval study [29] as well as in a more recent assessment [30], safety concerns with respect to drug application or morbidity caused by fluorescence-guided resection did not exceed the ones of standard surgery. PDT can be applied as surface PDT within a resection cavity [31–33]. At our institution, PDT is applied as interstitial PDT (iPDT) by cylindrical diffusing fibers that are stereotactically inserted to ensure a spatially precise interstitial irradiation of the target tumor volume. In a former iPDT series of 10 patients with local recurrence of a malignant glioma after multimodal therapy, we demonstrated the feasibility and tolerability of iPDT [28]. In addition, cases of remarkably long tumor control have been observed [34]. Here, results of salvage iPDT of patients ( $N = 44$ ) suffering from local malignant glioma recurrences after standard therapy are presented. Special attention is given to the risk profile of iPDT and associated outcome parameters in this selected patient cohort.

## 2. Patients and Methods

### 2.1. Patient Selection

At our institution, salvage iPDT was considered in adult patients with a Karnofsky performance score (KPS) of at least 70 who presented with a unifocal circumscribed malignant glioma recurrence after standard multimodal therapy. Local tumor recurrence or progressive disease as suspected by contemporary measurements [35,36] must not exceed a maximum extension of 3 cm defined by the contrast-enhancing tumor volume in gadolinium T1-weighted magnetic resonance imaging (MRI). As part of clinical routine, viable tumor tissue was always histologically verified upfront by minimally invasive stereotactic biopsy procedures [37] to exclude treatment-associated effects or pseudoprogression. Use of iPDT was considered indicated in consensus by the neurooncological tumor board when

other local therapy options such as (re-)resection or (re-)radiotherapy alone were deemed not to be safely feasible or refused by the patient who qualified for novel experimental treatment options.

For this single-center retrospective analysis, all 47 consecutive patients who underwent salvage iPDT for malignant glioma recurrences between 2006 and 2018 were included. In three patients, however, no follow-up data were available. All patients provided written informed consent to treatment. This retrospective investigation was approved by the ethics committee of the Ludwig Maximilian University, Munich, Germany (reference number 19–650).

## 2.2. Magnetic Resonance Imaging Protocol

Magnetic resonance imaging always included three-dimensional gadolinium-enhanced T1- (1 mm slices) and T2-weighted (2 mm slices) scans preoperatively and thereafter. Early postoperative MRI was routinely performed within 48 h after iPDT treatment and additionally included diffusion-weighted imaging (DWI) and apparent diffusion coefficient (ADC) to assess early treatment effects.

## 2.3. Neuropathological Analysis

Neuropathological diagnosis of tumor recurrence was performed according to the respective valid WHO classification from the years 2007 and 2016 [38,39]. After 2009, pyrosequencing was performed routinely to determine isocitrate dehydrogenase (IDH) mutational status and microsatellite analysis for 1 p/19 q codeletion status. In all patients for whom materials were available, IDH mutations were analyzed retrospectively. O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation was analyzed by methylation-specific PCR and sequencing.

## 2.4. Interstitial PDT Protocol

Interstitial illumination was performed using a diode laser (Ceralas Diode Laser, Biolitec AG, Jena, Germany) and cylindrical diffusing fibers as described before [25]. The target volume was defined after multimodal image fusion of the intraoperative stereotactic CT (contrast-enhanced scans, 0.6 mm axial slices) with the preoperative MRI and, if available, O-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethyl)-L-tyrosine (18F-FET)-PET scan. A spatially precise interstitial irradiation of the individual tumor volumes was planned using the @target 1.19 software (Brainlab, Munich, Germany) [29].

The patients were administered 20 mg/kg body weight of 5-ALA three to five hours before the start of iPDT illumination. Depending on tumor geometry, cylindrical diffusing fibers with an active diffuser length of, optionally, 20 mm or 30 mm were selected. The fibers had an outer diameter of 1600 µm (CeramOptec GmbH, Bonn, Germany) (first 26 treatments) and 1560 µm (Light Guide Optics, Rheinbach, Germany) (last 18 treatments), respectively. The fibers were stereotactically inserted with 6 to 12 mm interfiber distances using a modified Riechert stereotactic frame system (Medical High Tech GmbH, Bad-Krozingen-Biengen, Germany). Prior to fiber placement, a mandrin was inserted into the brain along the trajectory to the target to prepare a channel for the fibers and to serve as a reference for an accurate implantation procedure by means of an orthogonal C-arm X-ray evaluation (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany). Correct positioning of the light diffusers within the target volume was then ensured using metallic X-ray markers integrated at the distal and proximal ends of the active segment of the cylindrical diffusing fibers. During therapy, patients received mechanical ventilation with 100% oxygen to ensure adequate oxygen supply for the production of free radicals. Interstitial PDT irradiation was performed with a laser light of 635 nm wavelength at the illumination power of 200 mW/cm diffuser length for a treatment time of 60 min. In cases where the treatment plan resulted in small interfiber distances, the illumination power was decreased and the illumination time was prolonged. Illumination was stopped after the scheduled time if no residual fluorescence was observed. Intraoperative spectral online monitoring

was performed prior to and after iPDT illumination as described previously [33,40]. In brief, one after the other, each cylindrical diffusing fiber was used as an emitter, while each of the other fibers sequentially served as an optical detection probe connected to a spectrometer (S2000 or USB2000+, Ocean Optics/Ocean Insight, Ostfildern, Germany) measuring the detected light in the wavelength range of 550 nm to 800 nm. After iPDT irradiation, the cylindrical diffusing fibers were removed.

### 2.5. Spectral Online Monitoring Analysis

The acquired spectral online monitoring data were analyzed for detectable transmitted treatment light at  $635 \pm 3$  nm and protoporphyrin IX (PpIX) fluorescence signals at  $705 \pm 3$  nm. To distinguish between signal artifacts and the true signal, a signal threshold of three times the signal-to-noise ratio was assumed. In addition, only fiber pairs less than 19 mm apart were used for spectral analyses. If at least 75% of all transmission or fluorescence signals of a patient showed a true signal, the patient was graded as good, otherwise—as poor.

### 2.6. Perioperative Management and Risk Assessment of iPDT

All iPDT procedures were performed under general anesthesia. In order not to inhibit antitumor immunological effects, no cortisone was administered peri- and postoperatively except in case of uncontrolled edema causing severe neurological deterioration.

Any perioperative sequelae resolving within six weeks were considered transient, all others—as permanent complications of this kind of iPDT treatment. Severity was classified according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events Version 5 (CTCAE) [41].

### 2.7. Treatment after iPDT and Follow-Up Evaluation

The decision to perform iPDT as standalone treatment or in combination with additional salvage treatment was made individually by the interdisciplinary neurooncological tumor board considering each patient's risk profile, previous therapies, as well as molecular tumor characteristics.

Patients were followed in the outpatient clinic for six weeks after therapy and in three-month intervals thereafter. Radiologic tumor recurrence was defined according to MacDonald or after the response assessment in neuro-oncology (RANO) 2010 criteria [35,36]. Once validated FET-PET data had become available [42,43], FET-PET examination was used, partially in combination with rebiopsy, to rule out pseudoprogression in unclear non-palliative cases.

### 2.8. Statistical Evaluation

The reference point for overall survival (OS) was the date of the initial tumor diagnosis. Time-to-treatment failure (TTF) and post-recurrence survival (PRS) were calculated from the date of iPDT. Patients had been followed until the last patient died. The distribution of continuous (categorical) variables was analyzed by means of the Wilcoxon test ( $X^2$  statistics). Survival was analyzed with the Kaplan–Meier method. A Cox proportional hazards model was used to identify epidemiologic and molecular prognostic factors. Differences between responders and non-responders were analyzed using logistic regression models. The complete statistical analysis was performed with the use of SPSS Statistics 25 (IBM, Armonk, New York, USA). The significance level was set to  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Patient Characteristics

This study included 44 patients (27 (61.4%) males) (Table 1) between 2006 and 2018. The median age at the time of iPDT was 49.4 years (range, 33.4–87.0 years) and the median KPS was 90 (range, 70–100) (Table 1). The median time between initial tumor diagnosis and salvage iPDT was 16.9 months (range, 3.5–192.4 months). Twenty-six (59.1%) patients were treated for their first, 9 (20.5%)—for their second, 9 (20.5%)—for the third or



further recurrence. Thirty-six (81.8%) patients had undergone open tumor resection, 43 (97.7%) patients had been treated with percutaneous irradiation and 39 (88.6%)—with chemotherapy before salvage iPDT for circumscribed tumor recurrences was considered. At the time of salvage iPDT, 37 (84.1%) of the recurrent tumors were classified as WHO grade IV glioblastomas, 7 (15.9%)—as WHO grade III anaplastic astrocytomas. Six (13.6%) patients suffered from a malignant transformation of an initially diagnosed WHO grade II diffuse astrocytoma. Twenty-nine (65.9%) of the tumors were IDH-wildtype tumors, 9 (20.5%) had an IDH mutation. For six patients, residual tumor material was insufficient for retrospective analysis of the IDH status. A methylated MGMT promoter status was recorded for 30 (68.2%) tumors as part of the integrated histopathological diagnosis.

**Table 1.** Summary of patients' characteristics.

Characteristics at iPDT	All Patients (N = 44)
Age (years)	
Median	49.4
Range	33.4–87.0
Gender, n (%)	
Male	27 (61.4)
Female	17 (38.6)
KPS, n (%)	
100	3 (6.8)
90	29 (65.9)
80	9 (20.5)
70	3 (6.8)
Symptoms, n (%)	
Seizures	27 (61.4)
Aphasia without paresis	12 (27.3)
Paresis without aphasia	4 (9.1)
Aphasia and paresis	1 (2.3) <sup>1</sup>
Side, n (%)	
Right	20 (45.5)
Left	24 (54.5)
Localization, n (%)	
Deep-seated involvement	31 (70.5)
Eloquent lobar localization	17 (38.6)
Stage of disease, n (%)	
First tumor recurrence	26 (59.1)
Second tumor recurrence	9 (20.5)
Third tumor recurrence	6 (13.6)
Later stages	3 (6.8)
WHO grade, n (%)	
IV	37 (84.1)
III	7 (15.9)

Table 1. Cont.

Characteristics at iPDT	All Patients (N = 44)
WHO grade at initial diagnosis, n (%)	
IV	30 (68.2)
III	8 (18.2)
II	6 (13.6)
MGMT promoter methylation status, n (%)	
Methylated	30 (68.2)
Unmethylated	14 (31.8)
IDH mutation, n (%)	
Wildtype	29 (65.9)
Mutated	9 (20.5)
Unknown (no material left)	6 (13.6)
1 p/19 q codeletion, n (%)	
1 p/19 q codeletion	1 (2.3)
No 1 p/19 q codeletion	20 (45.5)
Not tested	23 (52.3)

<sup>1</sup> Percentages may not total 100.0 due to rounding.

### 3.2. Interstitial PDT Treatment

The median iPDT target volume was 3.34 cm<sup>3</sup> (range, 0.50–22.8 cm<sup>3</sup>), targeted with a median of 4 (range, 3–8) cylindrical diffusing fibers (Table 2). The minimum irradiation time of 60 min (range, 60–167 min) was received by 29 patients. The median applied light power per cm diffuser length was 200 mW (range, 82–210 mW). The median energy dose applied during iPDT illumination was 8996 J (range, 5760–17,388 J), largely depending on the iPDT target volume and the corresponding adapted number of cylindrical diffusing fibers.

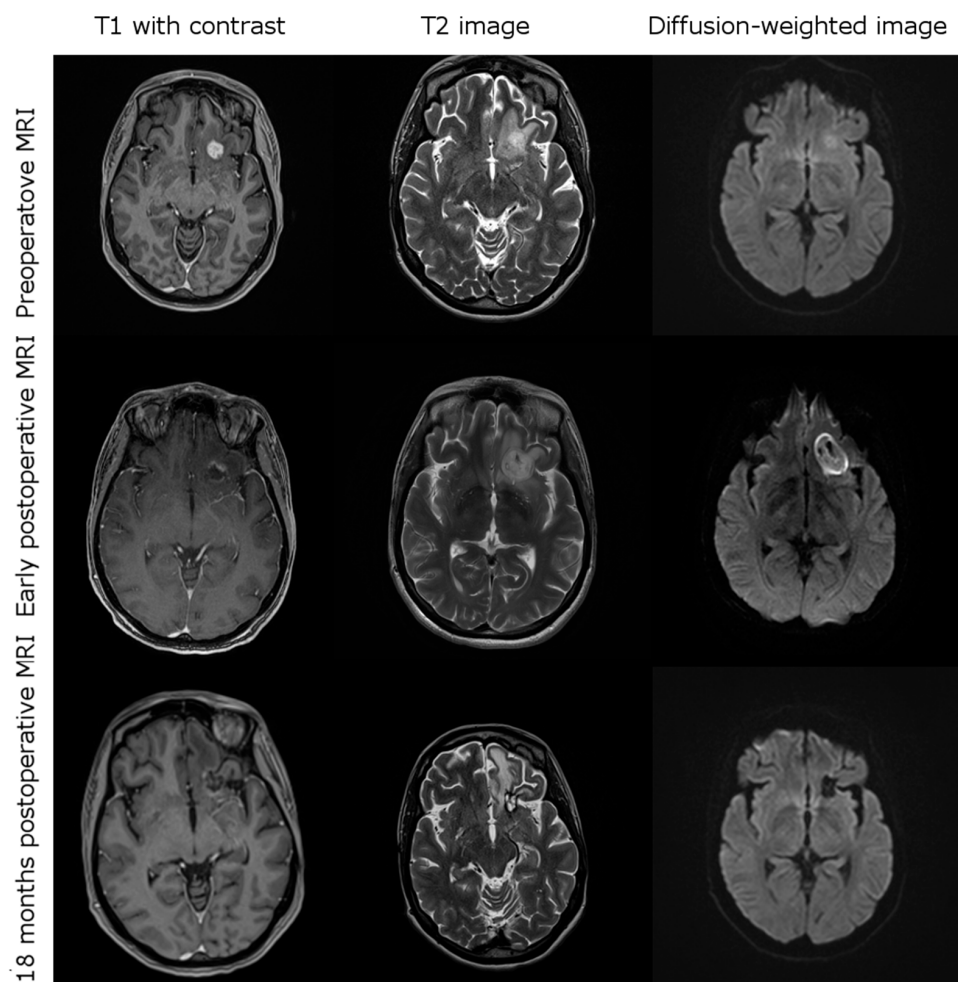
Table 2. Treatment characteristics.

Treatment Algorithms	All Patients (N = 44)
<b>Treatment before iPDT, n (%)</b>	
Tumor resection	36 (81.9)
Irradiation	43 (97.7)
Chemotherapy	39 (88.6)
<b>Interstitial PDT characteristics</b>	
Target volume (cm <sup>3</sup> )	
Median	3.34
Range	0.50–22.8
Number of cylindrical diffusing fibers (range)	4 (3–8)
Applied light power per diffuser length (mW/cm)	
Median	200
Range	82–210
Treatment dose (J)	
Median	8883
Range	5760–17,388
Treatment time (minutes)	
Median	60 (N = 29)
Range	60–167
<b>Salvage treatment with iPDT, n (%)</b>	
Chemotherapy	20 (45.4)
Radiotherapy	7 (15.9)
Radiochemotherapy	4 (9.1)
<b>Treatment after iPDT failure, n (%)</b>	
Any chemotherapy	31 (70.5)
Any (re-)radiotherapy	20 (45.5)
Any tumor resection/debulking	4 (9.1)

The bold cells are sub-headlines.

### 3.3. Imaging after iPDT

Early postoperative imaging within 48 h after iPDT showed a decrease or effacement of contrast enhancement in all cases. Typically, diffusion restriction occurred in the treated area (Figure 1). A transient increase in edema surrounding the tumor treatment volume was seen in 12 cases, six of which caused transient neurological deterioration (two—paresis, four—aphasia).



**Figure 1.** Exemplary case of a 41-year-old female patient suffering from a left frontal glioblastoma recurrence causing mild aphasia. Post-iPDT MRI showing characteristic changes such as disappearance of contrast enhancement, diffusion restriction within the treatment volume and mild perifocal edema. Peri-interventionally, there was transient worsening of aphasia, which then resolved completely in subsequent weeks.

### 3.4. Complications after iPDT

Complications after iPDT are listed in Table 3. Overall, 18 patients (40.0%) experienced transient worsening of the usually preexistent neurological deficits, i.e., mainly incomplete aphasia and/or hemiparesis. One patient developed malignant edema and underwent emergency decompression within 24 h after iPDT treatment. In this case, only slight word-finding difficulties (CTCAE °2) persisted. After six weeks, most deficits resolved or would not inhibit activities of daily life ( $N = 9$ , CTCAE °1). Three patients (6.8%) suffered from residual deficits; in one case, self-care was affected (CTCAE °3). Postoperative complications were not found to correlate with the patients' TTF ( $p = 0.841$ ) and PRS ( $p = 0.492$ ).

**Table 3.** Complications after iPDT.

<b>Complications after iPDT</b>	<b>All Patients (N = 44)</b>
<b>Postoperative CTCAE grade, N (%)</b>	
0	26 (59.1)
1	4 (9.1)
2	10 (22.7)
3	3 (6.8)
4	1 (2.3)
5	0 (0.0)
<b>CTCAE grade at six weeks, N (%)</b>	
0	32 (72.7)
1	9 (20.5)
2	2 (4.5)
3	1 (2.3)
4	0 (0.0)
5	0 (0.0)
<b>Type of complications, N (%)</b>	
Aphasia	7 (15.9)
Paresis	6 (13.6)
Paresis and aphasia	4 (9.1)
Hyp-/dysaesthesia only	1 (2.3)
None	26 (59.1)

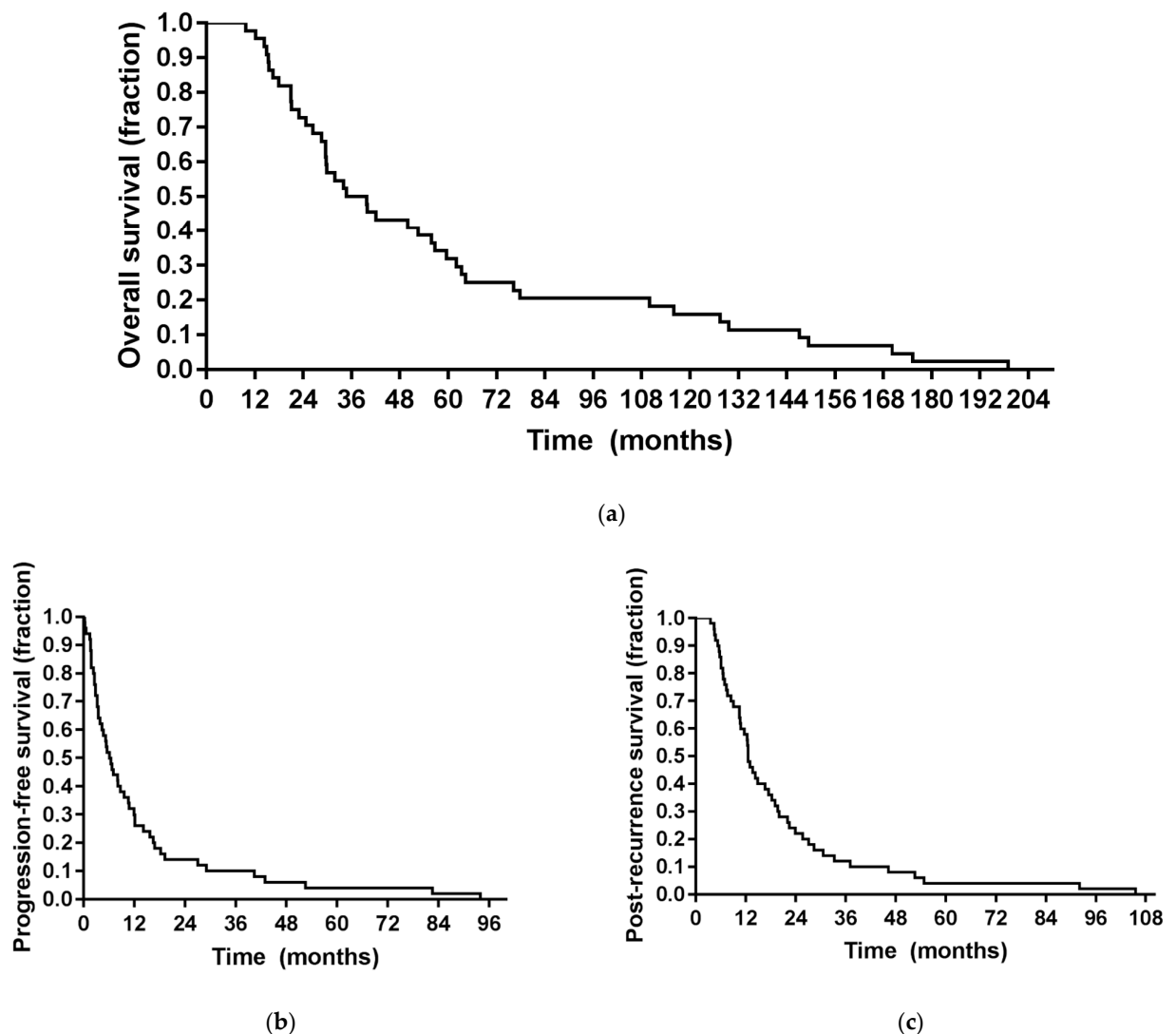
The bold cells are sub-headlines.

### 3.5. Treatment after iPDT

As part of a predefined combined treatment algorithm, iPDT was immediately followed by chemotherapy in 20 cases (45.5%; temozolomide,  $N = 14$ , 31.8%; procarbazine/lomustine,  $N = 6$ , 13.6%) and by re-radiotherapy with/without chemotherapy in 11 (25.0%) cases (Table 2). At the time of tumor progression after iPDT treatment, all patients were found eligible for additional multimodal treatment (31 (70.5%) patients were treated with chemotherapy, 20 (45.5%) received re-radiotherapy and 4 (9.1%) underwent open tumor debulking for space-occupying recurrences before salvage chemotherapy was initiated). No immediately palliative case (usually confined to best supportive care only) was observed. Patients with MGMT-methylated tumors did not receive more or less often radiotherapy ( $p = 0.81$ ) or chemotherapy ( $p = 0.92$ ) in the further course of their disease.

### 3.6. Outcome

The median follow-up duration was 13.0 months (range, 4.7–105.6 months). In three patients, however, no follow-up data were available. Within their individual follow-up duration, all the remaining patients experienced tumor progression and died, with all recorded deaths being tumor-related. Here, the median OS from the first tumor diagnosis was 39.7 months (range, 9.8–199.0 months). The median time between the first diagnosis and salvage iPDT was 16.9 months (range, 3.5–192.4 months), median TTF after iPDT was 7.1 months (range, 0.6–93.9 months; 95% confidence interval (CI), 4.4–9.8) and median PRS was 13.0 months (range, 4.7–105.6 months; CI, 9.2–16.8) (Figure 2). When the three patients lost to follow-up were also included in the analysis (as part of the intended-to-treat population), median TTF was 6.8 months and mean PRS was 12.5 months (Supplementary Figure S1). As can be derived from Figure 2, six- and twelve-months recurrence-free survival rates after salvage iPDT were 59.1% and 34.1%, respectively. Six- and twelve-months survival rates after iPDT were 88.6% and 63.6%, respectively. Two years after iPDT treatment, eleven (25.0%) patients were alive, seven (15.9%) of them recurrence-free.



**Figure 2.** Survival curves. (a) Overall survival of the study population after initial tumor diagnosis; (b) time-to-treatment failure (TTF) of the study population after iPDT treatment; (c) post-recurrence survival (PRS) of the study population after iPDT treatment.

### 3.7. Prognostic Factors

In Table 4, the correlations of prognostic factors with regard to PRS after iPDT are summarized. Univariate analysis showed a significant influence of KPS on PRS ( $p = 0.019$ ). No significant influence of age, MGMT promoter methylation or IDH mutational status, target volume, time to iPDT treatment or any salvage treatment modality on PRS could be found. Time between initial diagnosis and iPDT did not correlate with PRS (Pearson's coefficient,  $-0.112$ ,  $p = 0.469$ ) or TTF (Pearson's coefficient,  $-0.169$ ,  $p = 0.274$ ). No salvage treatment regimen was associated with an additional survival benefit, neither in the complete study cohort nor in the subgroup of patients with a methylated MGMT promoter sequence. No known prognostic factor was found to correlate with TTF (Supplementary Table S1). FET-PET imaging before treatment was available for 12 patients (median maximum Standardized Uptake Value (SUV<sub>max</sub>), 2.95, range, 2.2–8.2) and after treatment for 15 patients (median SUV<sub>max</sub>, 2.7, range, 1.5–7.4). Post-therapeutic decrease in SUV<sub>max</sub> was associated with longer TTF ( $p = 0.081$ ).

**Table 4.** Prognostic factors for PRS after iPDT in uni- and multivariate models; HR—hazard ratio, CI—confidence interval.

Characteristic	HR	Univariate 95% CI	p-Value	HR	Multivariate 95% CI	p-Value
<b>Post-recurrence survival (after iPDT)</b>						
Age at iPDT	1.006	0.981–1.033	0.635	1.023	0.968–1.080	0.424
KPS at iPDT	0.936	0.886–0.989	0.019	1.961	0.755–5.092	0.167
MGMT methylation	0.751	0.392–1.438	0.388	1.000	0.339–2.946	1.000
IDH mutation	0.878	0.405–1.904	0.742	1.018	0.326–3.178	0.976
Target volume	1.019	0.956–1.086	0.557	1.017	0.943–1.096	0.666
Time to iPDT	1.003	0.996–1.010	0.392	1.003	0.992–1.015	0.553
Further chemotherapy	0.811	0.421–1.561	0.530	1.030	0.443–2.392	0.946
Further radiotherapy	0.999	0.540–1.849	0.999	1.005	0.317–3.189	0.994
Further surgery	0.782	0.276–2.212	0.643	1.303	0.258–6.568	0.748

The bold cells are sub-headlines.

### 3.8. Intraoperative Spectral Online Monitoring

Intraoperative transmission and fluorescence data could be evaluated for 18 patients. A total of 300 pre- and postoperative spectra each were analyzed, with one spectrum recorded for each possible fiber pair. The median number of spectra per patient was 24 (range, 12–84). Overall, insufficient postoperative transmission was detected in 21.7% of the spectra and preoperative fluorescence in 15.8%. Of the 18 patients, 13 (72.2%) showed good postoperative transmission rates between two fibers (of 75% or more), indicating sufficient illumination over the complete duration of treatment. Ten (55.6%) also showed PpIX fluorescence over a threshold of 75%. In three (16.7%) cases, only preoperative fluorescence was graded as good, but not the postoperative transmission. In all patients, no residual PpIX fluorescence could be detected after the iPDT. Good postoperative transmission and preoperative fluorescence were associated with longer TTF and PRS, although the differences were not highly significant (Table 5).

**Table 5.** Results of statistical tests of the association of intraoperative spectral online monitoring with time-to-treatment failure (TTF) and post-recurrence survival (PRS), including 95% confidence intervals (CI).

Spectral Data (N = 18)	Median TTF (CI) (Months)	p-Value	Median PRS (CI) (Months)	p-Value
Transmission < 75%	9.63 (.978; 18.28)		12.97 (12.03; 13.92)	
Transmission > 75%	15.73 (4.71; 24.96)	0.196	19.70 (4.32; 35.08)	0.130
Fluorescence < 75%	9.63 (4.20; 15.06)		16.57 (7.83; 25.31)	
Fluorescence > 75%	12.13 (3.84; 20.42)	0.427	17.47 (4.20; 30.74)	0.326

## 4. Discussion

This study's main findings are: (1) iPDT was technically feasible in all patients; (2) iPDT can be performed with acceptable risk even in highly eloquent tumor localizations; (3) iPDT appears to be associated with favorable treatment effects even in heavily pretreated malignant glioma recurrences; (4) iPDT as part of a salvage treatment concept is associated with considerable long-term survival (PRS > 2 years) in a—so far—poorly defined subpopulation of malignant glioma patients; (5) treatment success was not associated with any of the known conventional and molecular prognostic factors of malignant gliomas.

Interstitial PDT is a technically demanding form of local treatment that is used for various tumor diseases [44]. Malignant glioma cells are characterized by a selective and effective uptake of systematically administered 5-ALA with subsequent intracellular conversion into the red fluorescent, phototoxic PpIX by exploiting the enzymatic machinery of heme synthesis [45]. As a photosensitizer, PpIX mediates energy transfer from light photons to oxygen molecules to generate reactive oxygen species that lead to oxidation and destruction of membranes, proteins and other vital intracellular structures [46,47].

Some of the cell death mechanisms initiated in this manner effectively stimulate the immune response, adding an intriguing systemic effect to this otherwise local treatment modality [48,49].

These characteristics of 5-ALA in combination with the possibility of a spatially precise interstitial illumination by means of a stereotactic frame-based installation of the respective light diffusers make iPDT an attractive tool for local malignant glioma recurrences after standard therapy. This minimally invasive procedure might be of advantage over the technical alternative of a surface PDT, in which an illumination source is introduced directly into the resection cavity at the end of surgery to illuminate any residual tumor tissue. The disadvantage of this method is that the extent of the residual tumor tissue cannot be determined with certainty and the penetration depth of illumination is limited to a few millimeters. However, since a spatially precise illumination of the target tumor volume seems to be fundamental to achieve full treatment effects, the image-guided stereotactic iPDT may be preferred. Moreover, iPDT is not limited to resectable tumors. Only few centers, however, have gained some preliminary clinical experience with iPDT in malignant brain tumors so far (yet unpublished personal communications). To date, just one prospective study has been published which suggested 5-ALA-based iPDT to be safe and feasible for a selected patient population with glioblastoma recurrences [28]. No permanent procedure-related morbidity was seen in the 10 patients treated and select patients survived surprisingly long, possibly thanks to immunological effects known from PDT treatment [50].

This manuscript presents clinical experiences in a large cohort of 44 multimodally pretreated patients who underwent iPDT for small, unifocal and circumscribed malignant glioma recurrences with a maximum extension of 3 cm. This size limitation was based on the maximum number of light fibers per laser and the experimental data, which have shown optimal spacing of light diffusers of about 7–9 mm for accurate tissue illumination without causing critical thermal effects [28].

Based upon intense interdisciplinary and collaborative efforts, dedicated equipment had been made available so that treatment planning, diffusing fiber insertion and light application were technically feasible in all intended cases. By means of the intraoperative spectral online monitoring technique, transmission of treatment light between fibers and PpIX fluorescence light could be monitored. During most treatments, PpIX fluorescence was characterized as good before starting the illumination and vanished during irradiation, which, at least in cases with good postoperative light transmission grading, indicates substantial consumption of PpIX as expected due to photobleaching of this photosensitizer. The technique of spectral online monitoring seems to be a promising tool to monitor 5-ALA administration, PpIX accumulation and fiber placement and potentially to estimate treatment effectiveness. In addition, it was observed that the portion of spectral data indicating good treatment light transmission decreased during treatment. This can be used as an indicator that optical tissue properties change such that the light penetration depth is reduced during iPDT illumination, commonly leading to partial and, in some cases, complete transmission signal loss. The reasons for these changes in the *in vivo* situation have not yet been investigated and understood in detail. However, this observation is in accordance with a previous study [51], where a reduction of treatment light transmission during iPDT was already reported.

Transient clinical deterioration was recorded in about 40% of patients and was mainly due to exaggerated edema and/or some hemorrhagic imbibition. The latter observations could not be attributed to direct interference of individual catheter trajectories with intratumoral vascular structures.

Only one patient experienced a grade 3 neurological deterioration persisting for more than six weeks. In this retrospective iPDT study, symptoms usually resolved within six weeks after iPDT even without steroid treatment, which was held back so as not to impede possible immunological effects. The development of perioperative complications was independent of the density of previous tumor treatments, tumor volume and the number

of laser fibers implanted. This may be due to the limitation to tumors not exceeding 3 cm in extension suggested by earlier studies [33].

Comparison of these complication rates to those reported after other local treatments is challenging because of differences in patient selection, especially regarding tumor size and potentially eloquent location. In the de novo unselected setting, the current gold standard local treatment, fluorescence-guided resection, has reported adverse events in about 40% of the cases, with grade 3 or worse aphasia in up to 6% and hemiparesis in up to 4% of the treatments [52]. For resection in eloquent location, neurological deterioration in up to 60% of the treatments has been reported [53]. In the recurrent setting, complication rates for open resection have been suggested to even increase sequentially in each recurrence situation [54,55]. As an adjunct or alternative to resection, re-radiotherapy (with/without bevacizumab) emerged as an increasingly used salvage treatment option after 2011. Notably, toxicity rates of grade III or higher aphasia have been described in between 4% [56] and 32% [57] of the treatments. In summary, in an often multimodally pretreated and symptomatic patient population, any local treatment is associated with an increased risk of at least transient morbidity.

The observed median PRS of 13.0 months is in the upper range of the median PRS originated by other treatment modalities, ranging mostly between seven and nine months [17]. In the DIRECTOR study where first glioblastoma recurrences were treated with different temozolomide dose regimens, PRS ranged between 7.9 months for MGMT-unmethylated and 12.5 months for MGMT-methylated tumors [58]. In that cohort, complete resection of contrast enhancement was associated with a more favorable PRS of 12.9 months, compared to incomplete resection (PRS, 6.5 months) and no resection (PRS, 9.8 months), indicating, like the present study, a benefit of local treatment if possible [10].

In the present iPDT cohort, no influence of molecular markers such as MGMT and IDH on response to iPDT with or without adjuvant therapy including temozolomide can be observed. Different numbers and types of pretreatments and a heterogeneous patient population may explain the lack of an observable effect or a still too low total number of cases, as other studies also did not uniformly observe a prognostic effect of MGMT promoter methylation or lack thereof in recurrent situations [58,59]. Due to different treatment groups in different studies, a direct meaningful comparison of outcome data is rather difficult. Interestingly, though, more than 20% of patients in the iPDT series survived more than two years after malignant glioma recurrence irrespective of time to PDT and later salvage treatments and even with MGMT-unmethylated primary glioblastomas. This high percentage of long-term survivors warrants further investigation. As shown, common prognostic factors in malignant glioma patients did not differ between long-term and short-term survivors in this cohort, based on a threshold PRS of two years. Possibly, immunological factors may play a role, as has been suggested in experimental settings [60,61]. One of the key factors stimulating the immune response may be the heat shock protein HSP-70 as it was shown that sublethal 5-ALA PDT upregulated HSP-70 by up to 50-fold in glioma cells [49]. The upregulation of HSP-70 and the fact that 5-ALA PDT on glioma spheroids attracted and matured coincubated dendritic cells was experimentally confirmed [62]. The cell death mechanisms glioblastoma cells in a patient treated with iPDT undergo are expected to be very heterogeneous, as both light distribution and photosensitizer distribution are not homogenous. Therefore, parts of the tumor may undergo direct necrosis, others—apoptotic cell death and some cells in the periphery may survive. However, the plethora of cell death mechanisms initiated may be advantageous for an efficient stimulation of immune response with presentation of damage-associated molecular patterns, production of inflammatory cytokines such as interleukin 6 and attraction and maturation of dendritic cells, altogether leading to recruitment of effector T cells as reviewed in [63]. These authors suggested a combined therapeutic approach of PDT with immune checkpoint blockade. Further research, especially into immunological processes surrounding glioblastoma treatment, is required to gain more detailed and specific knowledge to benefit most from iPDT.



In addition, standard MRI images after iPDT showed loss of contrast and FET enhancement and a change in the diffusion restriction precisely confined to the treatment volume. The interpretation of such findings with regard to mechanisms and clinical relevance will be addressed in future studies. Importantly, data interpretation in this study is not hampered by immunologically induced imaging effects as tumor recurrence was histologically verified in all non-palliative cases.

## 5. Conclusions

Interstitial PDT of gliomas remains a challenging procedure due to limited light penetration depth in brain tissue, a complex planning and implantation procedure and potential risk of clinical deterioration especially after treatment in eloquent areas. Nevertheless, in experienced hands, iPDT may be a promising treatment option in a high-risk patient population combining acceptable, mostly transient morbidity with the possibility of long-term survival. It does not critically interfere with but may rather complement other treatment options in the recurrent disease such as re-radiotherapy and/or salvage chemotherapy regimens. These data strongly support further investigation in a controlled prospective setting.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13081767/s1>, Figure S1: Survival curves. (a) Overall survival of the intention to treat population after initial tumor diagnosis; (b) time-to-treatment failure (TTF) of the intention to treat population after iPDT treatment; (c) post-recurrence survival (PRS) of the intention to treat population after iPDT treatment; Table S1: Prognostic factors for TTF after iPDT in uni- and multivariate models HR—Hazard ratio, CI—confidence interval.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.L., R.S., H.S., A.R. and N.T.; methodology, S.L., M.S. and M.A.; validation, C.S., J.W. and H.S.; formal analysis, S.L.; investigation, M.S., S.L.; resources, R.E., R.F.; data curation, M.S., S.L.; writing—original draft preparation, S.L., M.S. and M.A.; writing—review and editing, C.S., J.W., S.S., C.H., R.F., M.N., R.E., H.S., R.S., J.-C.T., A.R. and N.T.; visualization, S.L.; supervision, A.R., N.T. and R.S.; project administration A.R., N.T. and R.S.; funding acquisition, A.R., N.T. and R.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** We thank the German Research Foundation (DFG) for financial support of the research training group (RTG) GRK2274.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Ludwig Maximilian University, Munich, Germany (reference number 19-650).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

**Acknowledgments:** We gratefully acknowledge Christoph Barth and Wolfgang Beyer for technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Stupp, R.; Taillibert, S.; Kanner, A.A.; Kesari, S.; Steinberg, D.M.; Toms, S.A.; Taylor, L.P.; Lieberman, F.; Silvani, A.; Fink, K.L.; et al. Maintenance Therapy with Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2015**, *314*, 2535–2543. [[CrossRef](#)]
2. Stupp, R.; Taillibert, S.; Kanner, A.; Read, W.; Steinberg, D.M.; Lhermitte, B.; Toms, S.; Idbaih, A.; Ahluwalia, M.S.; Fink, K.; et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients with Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2017**, *318*, 2306–2316. [[CrossRef](#)]
3. Nam, J.Y.; Groot, J.F.D. Treatment of Glioblastoma. *J. Oncol. Pract.* **2017**, *13*, 629–638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Brada, M.; Hoang-Xuan, K.; Rampling, R.; Dietrich, P.Y.; Dirix, L.Y.; Macdonald, D.; Heimans, J.J.; Zonnenberg, B.A.; Bravo-Marques, J.M.; Henriksson, R.; et al. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Ann. Oncol.* **2001**, *12*, 259–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lombardi, G.; De Salvo, G.L.; Brandes, A.A.; Eoli, M.; Rudà, R.; Faedi, M.; Lolli, I.; Pace, A.; Daniele, B.; Pasqualetti, F.; et al. Regorafenib compared with lomustine in patients with relapsed glioblastoma (REGOMA): A multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, 110–119. [[CrossRef](#)]
6. Stupp, R.; Wong, E.T.; Kanner, A.A.; Steinberg, D.; Engelhard, H.; Heidecke, V.; Kirson, E.D.; Taillibert, S.; Liebermann, F.; Dbaly, V.; et al. NovoTTF-100A versus physician’s choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: A randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur. J. Cancer (Oxf. Engl. 1990)* **2012**, *48*, 2192–2202. [[CrossRef](#)]
7. Weller, M.; Le Rhun, E. How did lomustine become standard of care in recurrent glioblastoma? *Cancer Treat. Rev.* **2020**, *87*, 102029. [[CrossRef](#)]
8. Desjardins, A.; Gromeier, M.; Herndon, J.E., 2nd; Beaubier, N.; Bolognesi, D.P.; Friedman, A.H.; Friedman, H.S.; McSherry, F.; Muscat, A.M.; Nair, S.; et al. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 150–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Puduvalli, V.K.; Wu, J.; Yuan, Y.; Armstrong, T.S.; Vera, E.; Wu, J.; Xu, J.; Giglio, P.; Colman, H.; Walbert, T.; et al. A Bayesian Adaptive Randomized Phase II Multicenter Trial of Bevacizumab with or without Vorinostat in Adults with Recurrent Glioblastoma. *Neuro-Oncology* **2020**, 1505–1515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Suchorska, B.; Weller, M.; Tabatabai, G.; Senft, C.; Hau, P.; Sabel, M.C.; Herrlinger, U.; Ketter, R.; Schlegel, U.; Marosi, C.; et al. Complete resection of contrast-enhancing tumor volume is associated with improved survival in recurrent glioblastoma—results from the DIRECTOR trial. *Neuro-Oncology* **2016**, *18*, 549–556. [[CrossRef](#)]
11. Chiocca, E.A.; Yu, J.S.; Lukas, R.V.; Solomon, I.H.; Ligon, K.L.; Nakashima, H.; Triggs, D.A.; Reardon, D.A.; Wen, P.; Stopa, B.M.; et al. Regulatable interleukin-12 gene therapy in patients with recurrent high-grade glioma: Results of a phase 1 trial. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*. [[CrossRef](#)]
12. Cloughesy, T.F.; Petrecca, K.; Walbert, T.; Butowski, N.; Salacz, M.; Perry, J.; Damek, D.; Bota, D.; Bettegowda, C.; Zhu, J.J.; et al. Effect of Vocimagene Amiretrorepvec in Combination With Flucytosine vs Standard of Care on Survival Following Tumor Resection in Patients With Recurrent High-Grade Glioma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* **2020**, *6*, 1939–1946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Stummer, W.; Reulen, H.J.; Meinel, T.; Pichlmeier, U.; Schumacher, W.; Tonn, J.C.; Rohde, V.; Opperl, F.; Turowski, B.; Woiciechowsky, C.; et al. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: Identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery* **2008**, *62*, 564–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lu, V.M.; Jue, T.R.; McDonald, K.L.; Rovin, R.A. The Survival Effect of Repeat Surgery at Glioblastoma Recurrence and its Trend: A Systematic Review and Meta-Analysis. *World Neurosurg.* **2018**, *115*, 453–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Wann, A.; Tully, P.A.; Barnes, E.H.; Lwin, Z.; Jeffree, R.; Drummond, K.J.; Gan, H.; Khasraw, M. Outcomes after second surgery for recurrent glioblastoma: A retrospective case-control study. *J. Neuro-Oncol.* **2018**, *137*, 409–415. [[CrossRef](#)]
16. Wick, W.; Gorlia, T.; Bendszus, M.; Taphoorn, M.; Sahm, F.; Harting, I.; Brandes, A.A.; Taal, W.; Domont, J.; Idhah, A.; et al. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 1954–1963. [[CrossRef](#)]
17. Seystahl, K.; Wick, W.; Weller, M. Therapeutic options in recurrent glioblastoma—An update. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* **2016**, *99*, 389–408. [[CrossRef](#)]
18. Rosenthal, M.A.; Gruber, M.L.; Glass, J.; Nirenberg, A.; Finlay, J.; Hochster, H.; Muggia, F.M. Phase II Study of Combination Taxol and Estramustine Phosphate in the Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. *J. Neuro-Oncol.* **2000**, *47*, 59–63. [[CrossRef](#)]
19. Oudard, S.; Carpentier, A.; Banu, E.; Fauchon, F.; Celerier, D.; Poupon, M.F.; Dutrillaux, B.; Andrieu, J.M.; Delattre, J.Y. Phase II study of lonidamine and diazepam in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *J. Neuro-Oncol.* **2003**, *63*, 81–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Puduvalli, V.K.; Yung, W.K.; Hess, K.R.; Kuhn, J.G.; Groves, M.D.; Levin, V.A.; Zwiebel, J.; Chang, S.M.; Cloughesy, T.F.; Junck, L.; et al. Phase II study of fenretinide (NSC 374551) in adults with recurrent malignant gliomas: A North American Brain Tumor Consortium study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 4282–4289. [[CrossRef](#)]
21. Robe, P.A.; Martin, D.H.; Nguyen-Khac, M.T.; Artesi, M.; Deprez, M.; Albert, A.; Vanbelle, S.; Califice, S.; Bredel, M.; Bours, V. Early termination of ISRCTN45828668, a phase 1/2 prospective, randomized study of sulfasalazine for the treatment of progressing malignant gliomas in adults. *BMC Cancer* **2009**, *9*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rich, J.N.; Reardon, D.A.; Peery, T.; Dowell, J.M.; Quinn, J.A.; Penne, K.L.; Wikstrand, C.J.; Van Duyn, L.B.; Dancey, J.E.; McLendon, R.E.; et al. Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 133–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Sathornsumetee, S.; Desjardins, A.; Vredenburgh, J.J.; McLendon, R.E.; Marcello, J.; Herndon, J.E.; Mathe, A.; Hamilton, M.; Rich, J.N.; Norfleet, J.A.; et al. Phase II trial of bevacizumab and erlotinib in patients with recurrent malignant glioma. *Neuro-Oncology* **2010**, *12*, 1300–1310. [[CrossRef](#)]
24. Wick, W.; Puduvalli, V.K.; Chamberlain, M.C.; van den Bent, M.J.; Carpentier, A.F.; Cher, L.M.; Mason, W.; Weller, M.; Hong, S.; Musib, L.; et al. Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 1168–1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Filley, A.C.; Henriquez, M.; Dey, M. Recurrent glioma clinical trial, CheckMate-143: The game is not over yet. *Oncotarget* **2017**, *8*, 91779–91794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lim, M.; Xia, Y.; Bettegowda, C.; Weller, M. Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2018**, *15*, 422–442. [[CrossRef](#)]
27. Stupp, R.; Brada, M.; van den Bent, M.J.; Tonn, J.-C.; Pentheroudakis, G. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann. Oncol.* **2014**, *25*, iii93–iii101. [[CrossRef](#)]
28. Beck, T.J.; Kreth, F.W.; Beyer, W.; Mehrkens, J.H.; Obermeier, A.; Stepp, H.; Stummer, W.; Baumgartner, R. Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. *Lasers Surg. Med.* **2007**, *39*, 386–393. [[CrossRef](#)]
29. Stummer, W.; Pichlmeier, U.; Meinel, T.; Wiestler, O.D.; Zanella, F.; Reulen, H.J. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: A randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet. Oncol.* **2006**, *7*, 392–401. [[CrossRef](#)]
30. Schucht, P.; Beck, J.; Abu-Isa, J.; Anderegg, L.; Murek, M.; Seidel, K.; Stieglitz, L.; Raabe, A. Gross total resection rates in contemporary glioblastoma surgery: Results of an institutional protocol combining 5-aminolevulinic acid intraoperative fluorescence imaging and brain mapping. *Neurosurgery* **2012**, *71*, 927–935. [[CrossRef](#)]
31. Stylli, S.S.; Kaye, A.H.; MacGregor, L.; Howes, M.; Rajendra, P. Photodynamic therapy of high grade glioma-long term survival. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* **2005**, *12*, 389–398. [[CrossRef](#)]
32. Dupont, C.; Vermandel, M.; Leroy, H.-A.; Quidet, M.; Lecomte, F.; Delhem, N.; Mordon, S.; Reyns, N. INtraoperative photoDYnamic Therapy for GliOblastomas (INDYGO): Study protocol for a phase I clinical trial. *Neurosurgery* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Johansson, A.; Faber, F.; Kniebühler, G.; Stepp, H.; Sroka, R.; Egensperger, R.; Beyer, W.; Kreth, F.-W. Protoporphyrin IX Fluorescence and Photobleaching During Interstitial Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas for Early Treatment Prognosis. *Lasers Surg. Med.* **2013**, *45*, 225–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Stummer, W.; Beck, T.; Beyer, W.; Mehrkens, J.H.; Obermeier, A.; Etminan, N.; Stepp, H.; Tonn, J.C.; Baumgartner, R.; Herms, J.; et al. Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: Case report. *J. Neuro-Oncol.* **2008**, *87*, 103–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Macdonald, D.R.; Cascino, T.L.; Schold, S.C., Jr.; Cairncross, J.G. Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **1990**, *8*, 1277–1280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wen, P.Y.; Macdonald, D.R.; Reardon, D.A.; Cloughesy, T.F.; Sorensen, A.G.; Galanis, E.; Degroot, J.; Wick, W.; Gilbert, M.R.; Lassman, A.B.; et al. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: Response assessment in neuro-oncology working group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 1963–1972. [[CrossRef](#)]
37. Eigenbrod, S.; Trabold, R.; Brucker, D.; Eros, C.; Egensperger, R.; La Fougere, C.; Gobel, W.; Ruhm, A.; Kretschmar, H.A.; Tonn, J.C.; et al. Molecular stereotactic biopsy technique improves diagnostic accuracy and enables personalized treatment strategies in glioma patients. *Acta Neurochir.* **2014**, *156*, 1427–1440. [[CrossRef](#)]
38. Louis, D.N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Cavenee, W.K.; Burger, P.C.; Jouvet, A.; Scheithauer, B.W.; Kleihues, P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* **2007**, *114*, 97–109. [[CrossRef](#)]
39. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [[CrossRef](#)]
40. Rühm, A.; Stepp, H.; Beyer, W.; Hennig, G.; Pongratz, T.; Sroka, R.; Schnell, O.; Tonn, J.-C.; Kreth, F.-W. 5-ALA based photodynamic management of glioblastoma. In Proceedings of the SPIE, San Francisco, CA, USA, 24 March 2014.
41. *National Institutes of Health Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)*; National Cancer Institute: Bethesda, MD, USA, 2017.
42. Rachinger, W.; Goetz, C.; Popperl, G.; Gildehaus, F.J.; Kreth, F.W.; Holtmannspotter, M.; Herms, J.; Koch, W.; Tatsch, K.; Tonn, J.C. Positron emission tomography with O-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethyl)-L-tyrosine versus magnetic resonance imaging in the diagnosis of recurrent gliomas. *Neurosurgery* **2005**, *57*, 505–511. [[CrossRef](#)]
43. Mehrkens, J.H.; Popperl, G.; Rachinger, W.; Herms, J.; Seelos, K.; Tatsch, K.; Tonn, J.C.; Kreth, F.W. The positive predictive value of O-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethyl)-L-tyrosine (FET) PET in the diagnosis of a glioma recurrence after multimodal treatment. *J. Neuro-Oncol.* **2008**, *88*, 27–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Shafirstein, G.; Bellnier, D.; Oakley, E.; Hamilton, S.; Potasek, M.; Beeson, K.; Parilov, E. Interstitial Photodynamic Therapy-A Focused Review. *Cancers* **2017**, *9*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Collaud, S.; Juzeniene, A.; Moan, J.; Lange, N. On the selectivity of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX formation. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2004**, *4*, 301–316. [[CrossRef](#)]
46. Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K.A.; Foster, T.H.; Girotti, A.W.; Gollnick, S.O.; Hahn, S.M.; Hamblin, M.R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA A Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 250–281. [[CrossRef](#)]
47. Stepp, H.; Stummer, W. 5-ALA in the management of malignant glioma. *Lasers Surg. Med.* **2018**, *50*, 399–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Beltrán Hernández, I.; Yu, Y.; Ossendorp, F.; Korbelik, M.; Oliveira, S. Preclinical and Clinical Evidence of Immune Responses Triggered in Oncologic Photodynamic Therapy: Clinical Recommendations. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 333. [[CrossRef](#)]

49. Kammerer, R.; Buchner, A.; Palluch, P.; Pongratz, T.; Oboukhovskij, K.; Beyer, W.; Johansson, A.; Stepp, H.; Baumgartner, R.; Zimmermann, W. Induction of immune mediators in glioma and prostate cancer cells by non-lethal photodynamic therapy. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Castano, A.P.; Mroz, P.; Hamblin, M.R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 535–545. [[CrossRef](#)]
51. Heckl, C.; Aumiller, M.; Rühm, A.; Sroka, R.; Stepp, H. Fluorescence and Treatment Light Monitoring for Interstitial Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **2020**, *96*, 388–396. [[CrossRef](#)]
52. Stummer, W.; Tonn, J.C.; Mehdorn, H.M.; Nestler, U.; Franz, K.; Goetz, C.; Bink, A.; Pichlmeier, U. Counterbalancing risks and gains from extended resections in malignant glioma surgery: A supplemental analysis from the randomized 5-aminolevulinic acid glioma resection study. Clinical article. *J. Neurosurg.* **2011**, *114*, 613–623. [[CrossRef](#)]
53. Magill, S.T.; Han, S.J.; Li, J.; Berger, M.S. Resection of primary motor cortex tumors: Feasibility and surgical outcomes. *J. Neurosurg.* **2018**, *129*, 961–972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Chang, S.M.; Parney, I.F.; McDermott, M.; Barker, F.G., 2nd; Schmidt, M.H.; Huang, W.; Laws, E.R., Jr.; Lillehei, K.O.; Bernstein, M.; Brem, H.; et al. Perioperative complications and neurological outcomes of first and second craniotomies among patients enrolled in the Glioma Outcome Project. *J. Neurosurg.* **2003**, *98*, 1175–1181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hoover, J.M.; Nwojo, M.; Puffer, R.; Mandrekar, J.; Meyer, F.B.; Parney, I.F. Surgical outcomes in recurrent glioma: Clinical article. *J. Neurosurg.* **2013**, *118*, 1224–1231. [[CrossRef](#)]
56. Flieger, M.; Ganswindt, U.; Schwarz, S.B.; Kreth, F.W.; Tonn, J.C.; la Fougere, C.; Ertl, L.; Linn, J.; Herrlinger, U.; Belka, C.; et al. Re-irradiation and bevacizumab in recurrent high-grade glioma: An effective treatment option. *J. Neuro-Oncol.* **2014**, *117*, 337–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Lee, J.; Ahn, S.S.; Chang, J.H.; Suh, C.O. Hypofractionated Re-irradiation after Maximal Surgical Resection for Recurrent Glioblastoma: Therapeutic Adequacy and Its Prognosticators of Survival. *Yonsei Med. J.* **2018**, *59*, 194–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Weller, M.; Tabatabai, G.; Kästner, B.; Felsberg, J.; Steinbach, J.P.; Wick, A.; Schnell, O.; Hau, P.; Herrlinger, U.; Sabel, M.C.; et al. MGMT Promoter Methylation Is a Strong Prognostic Biomarker for Benefit from Dose-Intensified Temozolomide Rechallenge in Progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. *Clin. Cancer Res. An Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2015**, *21*, 2057–2064. [[CrossRef](#)]
59. Wick, W.; Meisner, C.; Hentschel, B.; Platten, M.; Schilling, A.; Wiestler, B.; Sabel, M.C.; Koeppen, S.; Ketter, R.; Weiler, M.; et al. Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. *Neurology* **2013**, *81*, 1515–1522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Li, F.; Cheng, Y.; Lu, J.; Hu, R.; Wan, Q.; Feng, H. Photodynamic therapy boosts anti-glioma immunity in mice: A dependence on the activities of T cells and complement C3. *J. Cell. Biochem.* **2011**, *112*, 3035–3043. [[CrossRef](#)]
61. Hübner, M.; Strauss, G.; Effinger, D.; Pohla, H.; Kreth, F.-W.; Kreth, S. IMPS-15PDT-TREATED GBM CELLS INCREASE EFFECTOR FUNCTIONS OF HUMAN CD8+ T-CELLS. *Neuro-Oncology* **2015**, *17*, v116. [[CrossRef](#)]
62. Etmann, N.; Peters, C.; Lakbir, D.; Bünemann, E.; Börger, V.; Sabel, M.C.; Hänggi, D.; Steiger, H.J.; Stummer, W.; Sorg, R.V. Heat-shock protein 70-dependent dendritic cell activation by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment of human glioblastoma spheroids in vitro. *Br. J. Cancer* **2011**, *105*, 961–969. [[CrossRef](#)]
63. Cramer, G.M.; Moon, E.K.; Cengel, K.A.; Busch, T.M. Photodynamic Therapy and Immune Checkpoint Blockade(†). *Photochem. Photobiol.* **2020**, *96*, 954–961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

---

## B. INTERRELATION BETWEEN SPECTRAL ONLINE MONITORING AND POSTOPERATIVE T1-WEIGHTED MRI IN INTERSTITIAL PHOTODYNAMIC THERAPY OF MALIGNANT GLIOMAS

---

**Maximilian Aumiller**, Christian Heckl, Stefanie Quach, Herbert Stepp, Birgit Ertl-Wagner, Ronald Sroka, Niklas Thon, Adrian Rühm, “*Interrelation between Spectral Online Monitoring and Postoperative T1-Weighted MRI in Interstitial Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas*”, *Cancers* (Basel), (2021), 14 (1), doi:10.3390/cancers14010120, **JIF**: 6,639

### **Kurzfassung:**

Ziel dieser Untersuchung war es zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen gemessenen Änderungen in den erhobenen spektralen Online-Monitoring (SOM) Daten und einer T1-Hyperintensität in der posttherapeutischen MRT-Bildgebung in der nativen T1-Wichtung besteht.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden Daten der interstitiellen photodynamischen Therapie (iPDT) bei Patienten mit neu diagnostizierten, unbehandelten malignen Gliomen der Gattung Glioblastom (WHO2016-Grad IV) retrospektiv analysiert (n = 11; 8/3 männlich/weiblich; mittleres Alter: 68 Jahre, Bereich: 40-76 Jahre).

Bei der iPDT wurde 5-Aminolävulinsäure verabreicht, welches sich nach oraler Gabe selektiv im Tumor anreichert und zu Protoporphyrin IX (PpIX) metabolisiert wird. Die Bestrahlung erfolgte im Rahmen eines stereotaktischen Eingriffs mit interstitiell positionierten, zylindrisch abstrahlende Lichtdiffusoren (Anzahl Lichtdiffusoren 2-10, Diffusorlänge 2-3 cm, Leistung 200 mW/cm, Wellenlänge 635 nm, Bestrahlungsdauer 60 min). SOM erfolgte zur Messung von Lichttransmission und PpIX-Fluoreszenz zwischen den Lichtdiffusoren in Echtzeit während der iPDT. Für die Bewertung des Behandlungsergebnisses wurden MRT-Aufnahmen (Median 26 h nach iPDT) erstellt. Patientenindividuell wurde sowohl eine intraoperative Änderung der Lichttransmission zwischen Lichtdiffusorpaaren als auch das Auftreten einer lokalen intrinsischen T1-Hyperintensität in der T1-gewichteten, nicht Kontrastmittel-verstärkten MRT-Bildgebung beobachtet. Die beobachteten intrinsischen T1-Hyperintensitäten konnten jeweils mit dem Behandlungsvolumen in Verbindung gebracht werden. Zudem weisen sie auf das Vorkommen von Methämoglobin hin, welches möglicherweise als iPDT-induzierter Effekt entstanden ist. Die mediane Überlapp (Overlap/OV-Koeffizient) zwischen dem Tumolvolumen und der T1-Hyperintensität betrug 61%, wobei im Median nur 5% des Tumolvolumens direkt beeinflusst wurden.

Zur Analyse wurde, basierend auf den SOM-Daten, der optische Absorptionskoeffizient  $\mu_a$  und dessen Veränderung  $\Delta\mu_a$  während der iPDT-Bestrahlung für die jeweilige ein Lichtdiffusorpaar umgebende Geweberegion für die iPDT-Wellenlänge berechnet (Median  $\mu_a = 0,068 \text{ mm}^{-1}$  IQR: [0,045 0,093]; Wertebereich von  $\Delta\mu_a$ : [-0,021 0,35]  $\text{mm}^{-1}$ ).

Der räumliche Vergleich zwischen den Lichtdiffusorpositionen und der Lokalisation der intrinsischen T1-Hyperintensität ergab, dass das Auftreten einer T1-Hyperintensität mit einer Erhöhung des optischen Absorptionskoeffizienten korreliert ( $p = 0,003$ ). Weiterhin wurde im Falle fehlender PpIX-Fluoreszenz zu Beginn der iPDT ein tendenziell geringerer Anstieg der Absorption und vermindertes Auftreten der intrinsischen T1-Hyperintensität beobachtet.

Diese Ergebnisse belegen einen Zusammenhang zwischen der Veränderung der SOM-Daten infolge der iPDT und dem Auftreten einer T1-Hyperintensität in diesen Bereichen. Sie stehen im Einklang mit In-vitro Experimenten und legen eine PDT-induzierte Deoxygenierung

---

von Hämoglobin und eine mögliche Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin nahe. Zur genauen Untersuchung dieses Vorgangs sind weitere Untersuchungen und Daten erforderlich, welche insbesondere die Änderung der SOM-Signale über die Bestrahlungsdauer ermöglichen und so schließlich den zeitlichen Beginn der Änderung der optischen Gewebeeigenschaften erkennen lassen. Dies kann als Basis für die Entwicklung optimierter iPDT-Bestrahlungsprotokolle dienen und die Implementierung von fraktionierten Bestrahlungsschemata oder Anpassung der Bestrahlungsdauer an die Änderung der optischen Gewebeeigenschaften noch während der iPDT-Bestrahlung ermöglichen.

**Der Anteil von Maximilian Aumiller an dieser Arbeit über 11 iPDT's an zuvor unbehandelten (De-novo) malignen Gliomen beinhaltete zunächst die Etablierung und Anwendung der Methodik zur Registrierung der prä- und postoperativen MRT-Bilder, sowie der im Rahmen der stereotaktischen Bestrahlungsplanung definierten Lichtdiffusor-Koordinaten.**



**M. Aumiller entwickelte die dieser Arbeit zugrunde gelegten neuen Verfahren zur Berechnung und dreidimensionalen Repräsentation von Lichtpropagationszonen zwischen zwei Lichtdiffusoren. Darauf aufbauend erstellte M. Aumiller Verfahren zur dreidimensionalen Überlagerung von segmentierten Strukturen in den MRT-Bildern, den Lichtdiffusor-Positionen, und den berechneten Lichtpropagationszonen, sowie die quantitative Berechnung der entsprechenden Volumina und Schnittvolumina.**

**M. Aumiller untersuchte die Zusammenhänge zwischen den geometrischen Daten der T1-Bildgebung und den aus den SOM-Daten abgeleiteten spektralen Charakteristika (insbesondere Intensitätsverhältnisse und Änderungen des optischen Absorptionskoeffizienten) und führte die statistischen Analysen durch.**

**M. Aumiller war federführend bei der Verfassung des Manuskripts und überarbeitete dieses in Zusammenarbeit mit den Ko-Autoren.**

## Article

# Interrelation between Spectral Online Monitoring and Postoperative T1-Weighted MRI in Interstitial Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas

Maximilian Aumiller <sup>1,2,\*</sup> , Christian Heckl <sup>1,2</sup>, Stefanie Quach <sup>3</sup>, Herbert Stepp <sup>1,2</sup> , Birgit Ertl-Wagner <sup>4</sup>, Ronald Sroka <sup>1,2</sup>, Niklas Thon <sup>3</sup> and Adrian Rühm <sup>1,2</sup>

- <sup>1</sup> Laser-Forschungslabor, LIFE Center, University Hospital, LMU Munich, 82152 Planegg, Germany; christianheckl1@web.de (C.H.); herbert.stepp@med.uni-muenchen.de (H.S.); ronald.sroka@med.uni-muenchen.de (R.S.); adrian.ruehm@med.uni-muenchen.de (A.R.)
- <sup>2</sup> Department of Urology, University Hospital, LMU Munich, 81377 Munich, Germany
- <sup>3</sup> Department of Neurosurgery, University Hospital LMU Munich, 81377 Munich, Germany; Stefanie.Quach@med.uni-muenchen.de (S.Q.); Niklas.Thon@med.uni-muenchen.de (N.T.)
- <sup>4</sup> Department of Medical Imaging, The Hospital for Sick Children, University of Toronto, Toronto, ON M5G 1X8, Canada; birgitbetina.ertl-wagner@sickkids.ca
- \* Correspondence: max.aumiller@med.uni-muenchen.de; Tel.: +49-89-44000



**Citation:** Aumiller, M.; Heckl, C.; Quach, S.; Stepp, H.; Ertl-Wagner, B.; Sroka, R.; Thon, N.; Rühm, A. Interrelation between Spectral Online Monitoring and Postoperative T1-Weighted MRI in Interstitial Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas. *Cancers* **2022**, *14*, 120. <https://doi.org/10.3390/cancers14010120>

Academic Editor: Fiona Lyng

Received: 8 November 2021

Accepted: 22 December 2021

Published: 27 December 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** Treatment monitoring is highly important for the delivery and control of brain tumor therapy. For interstitial photodynamic therapy (iPDT), an intraoperative spectral online monitoring (SOM) setup was established in former studies to monitor photosensitizer fluorescence and treatment light transmission during therapy. In this work, data from patients treated with iPDT as the initial treatment for newly diagnosed glioblastoma ( $n = 11$ ) were retrospectively analyzed. Observed changes in treatment light transmission were assessed, and changes in optical tissue absorption were calculated out of these. In addition, magnetic resonance imaging (MRI) data were recorded within 48 h after therapy and showed intrinsic T1 hyperintensity in the treated area in non-contrast-enhanced T1-weighted sequences. A 3D co-registration of intrinsic T1 hyperintensity lesions and the light transmission zones between cylindrical diffuser fiber pairs showed that reduction in treatment light transmission corresponding to increased light absorption had a spatial correlation with post-therapeutic intrinsic T1 hyperintensity ( $p \leq 0.003$ ).

**Abstract:** In a former study, interstitial photodynamic therapy (iPDT) was performed on patients suffering from newly diagnosed glioblastoma ( $n = 11$ ; 8/3 male/female; median age: 68, range: 40–76). The procedure includes the application of 5-ALA to selectively metabolize protoporphyrin IX (PpIX) in tumor cells and illumination utilizing interstitially positioned optical cylindrical diffuser fibers (CDF) (2–10 CDFs, 2–3 cm diffusor length, 200 mW/cm, 635 nm, 60 min irradiation). Intraoperative spectral online monitoring (SOM) was employed to monitor treatment light transmission and PpIX fluorescence during iPDT. MRI was used for treatment planning and outcome assessment. Case-dependent observations included intraoperative reduction of treatment light transmission and local intrinsic T1 hyperintensity in non-contrast-enhanced T1-weighted MRI acquired within one day after iPDT. Intrinsic T1 hyperintensity was observed and found to be associated with the treatment volume, which indicates the presence of methemoglobin, possibly induced by iPDT. Based on SOM data, the optical absorption coefficient and its change during iPDT were estimated for the target tissue volumes interjacent between evaluable CDF-pairs at the treatment wavelength of 635 nm. By spatial comparison and statistical analysis, it was found that observed increases of the absorption coefficient during iPDT were larger in or near regions of intrinsic T1 hyperintensity ( $p = 0.003$ ). In cases where PpIX-fluorescence was undetectable before iPDT, the increase in optical absorption and intrinsic T1 hyperintensity tended to be less. The observations are consistent with in vitro experiments and indicate PDT-induced deoxygenation of hemoglobin and methemoglobin formation. Further investigations are needed to provide more data on the time course of the observed changes, thus paving the way for optimized iPDT irradiation protocols.

**Keywords:** malignant glioma; glioblastoma; photodynamic therapy; interstitial photodynamic therapy; 5-ALA; protoporphyrin IX; online monitoring; fluorescence; T1 hyperintensity; methemoglobin

## 1. Introduction

The standard of care for treating newly diagnosed malignant gliomas comprises surgical resection, when feasible, followed by radiochemotherapy. Unfortunately, the median survival for patients suffering from high grade gliomas continues to be low [1,2]. In an attempt to improve this dismal prognosis, the feasibility of photodynamic therapy (PDT) has been investigated since the 1980s [3,4]. So far, several clinical trials using different photosensitizers have been published (for an overview, see [5]). Several clinical studies have explored the use of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) as a photosensitizer precursor [6–10], which has some intriguing advantages over other photosensitizers for treating high grade gliomas:

- There is much less concern about unspecific photosensitization during circulation and tissue distribution, as 5-ALA itself is not photoactive [11].
- Clinically approved, 5-ALA is also widely used for protoporphyrin IX (PpIX)-based fluorescence-guided resection of malignant gliomas [11–13].
- The photosensitizer PpIX is produced in the mitochondria of malignant glioma cells with a high selective accumulation compared to adjacent tissue [11].
- Due to the relatively fast photobleaching of PpIX, any low PpIX concentration metabolized in adjacent tissue will be used up before cell death is induced [14–16].

There are two different approaches to deliver 5-ALA-based PDT for malignant gliomas: as an adjuvant treatment after surgical resection in order to destroy residual PpIX-containing diffusely infiltrating glioma cells [17,18] or as a primary treatment in a stereotactic interstitial approach by inserting cylindrical diffuser fibers (CDF) into the glioma tissue, named interstitial PDT (iPDT) [6,10,14].

In any approach, sufficient light needs to be delivered throughout the relevant tissue volumes. Light penetration depends on the wavelength-dependent optical tissue parameters governing light absorption and scattering. Utilizing Monte Carlo simulations, it was shown that inside the tissue the light fluence rate around a CDF used during iPDT typically decays exponentially to  $1/e$  (37%) within less than 3 mm for red light [6,19]. At 635 nm, the iPDT treatment wavelength used for excitation of the 5-ALA-induced PpIX, blood is still the dominant absorber. Therefore, the absorption depends, critically, also on the blood oxygenation level, as the absorption coefficient of deoxygenated blood is about 8.5 times higher than that of oxygenated blood at this specific wavelength [20]. As PDT consumes tissue oxygen, the oxygenation status of hemoglobin—and thus its absorption coefficient—may dynamically vary during treatment as reported [21,22]. It can be hypothesized that intracerebral hemorrhages induced by the implantation procedure may, therefore, have a rather complex impact on treatment success. To elucidate the involved processes, the effects of 5-ALA-PDT on hemoglobin absorption were experimentally assessed in an artificial liquid tissue phantom model in a prior study [23]. In artificial samples containing intact erythrocytes, almost no change in optical parameters was observed when the illumination started and PpIX photobleaching occurred continuously. If lysed erythrocytes were used in the liquid phantom, however, a change in treatment light transmission was observed immediately after initiating treatment. Comparing these two experiments shows that some time is needed for the erythrocyte cell membrane to rupture under laser irradiation, plus further time for the hemoglobin to be deoxygenated. Once the erythrocyte cell membrane ruptured, rapid deoxygenation of the hemoglobin occurred, and, in addition, met-hemoglobin (MetHb) was formed. As the absorption of deoxy-hemoglobin (Hb) and, even more so, of MetHb at 635 nm is much stronger than the absorption of oxy-hemoglobin (HbO<sub>2</sub>) (about 8.5 and 33 times higher, respectively), this has an immediate effect on the light distribution [23].



Clinically, intercranial hemorrhages are visualized and controlled using CT and MRI. In case of an intracerebral hemorrhage, the MRI signal characteristics depend on the cellular location and the different types of hemoglobin produced during the breakdown and removal of blood [24]. Typically, in the acute setting after intracerebral hemorrhage, intracellular HbO<sub>2</sub> or, later, Hb appears largely isointense to the surrounding brain parenchyma in non-enhanced T1-weighted MR imaging. Two to three days after PDT illumination, the formation of intracellular Methb is usually seen as intrinsic signal hyperintensity on T1-weighted images [24–28]. Whether and how these changes are seen after PDT treatment, and whether and how they may be related to the PDT procedure, has not been systematically investigated so far.

Therefore, in this investigation, intraoperative changes in treatment light transmission and PpIX fluorescence are assessed, based on measurements before and after iPDT according to the spectral online monitoring (SOM) procedure described in [7,10,29], retrospectively analyzed for a number of patients with high grade glioma undergoing iPDT [8]. A further aim was the investigation of potential relations between changes in light absorption within the tissue and intrinsic T1 hyperintensity visible on early postoperative MRI within 48 h after treatment. To this end, the appearance, strength, as well as 3D positional relations of increased light absorption within the tissue and intrinsic T1 hyperintensity in early postoperative MRI data were analyzed.

## 2. Materials and Methods

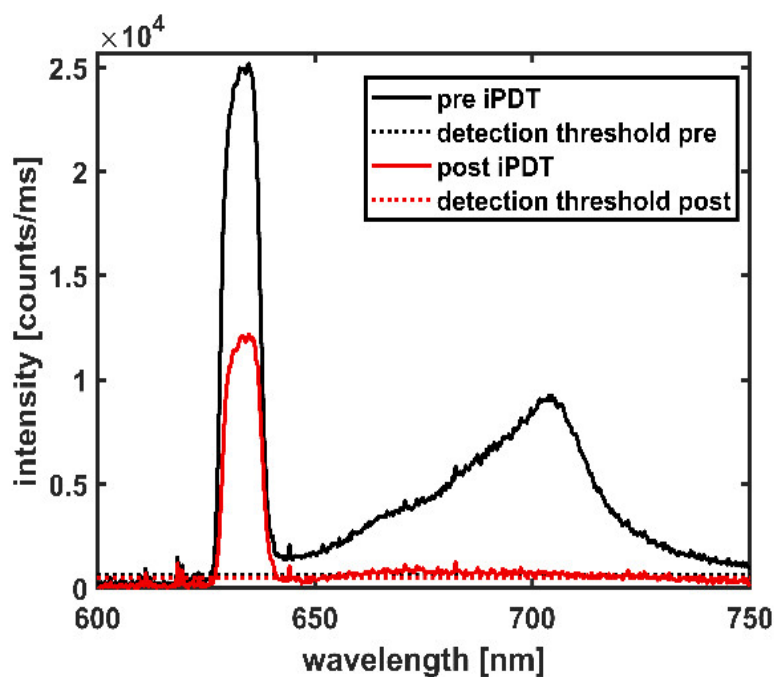
### 2.1. Data Acquisition

Ethical approval for the retrospective analysis of the collected data was obtained from the institutional review board (University Hospital LMU Munich ethics protocol: UE no. 335–16). SOM and MRI data were obtained from patients suffering from de novo GBM treated with salvage iPDT [8] and were analyzed retrospectively ( $n = 11$ ; 8/3 male/female; median age: 68, range: 40–76). Relevant irradiation and spectral online monitoring characteristics are listed in Table 1. In one case, the entire tumor could not be treated in one single treatment session due to its localization. Therefore, iPDT was applied in two successive treatment sessions: iPDT cases #4a and #4b. The iPDT treatment was performed as earlier described [6,8]. The number of CDFs and the insertion coordinates for stereotactic placement of the fibers were determined by careful 3D treatment planning (target 1.19 software, Brain LAB AG, Munich, Germany), with the number of CDFs employed per iPDT ranging from 2 to 10. Parallel placement of the CDFs is favored but not always possible due to the shape of the target volume or other restrictions to be considered during the treatment planning. Treatment light with a wavelength of 635 nm was delivered by a 4-port diode laser system (Ceralas PDT Diode Laser, biolitec AG, Jena, Germany). The CDFs (outer diameter 1.56 mm; Light Guide Optics, Rheinbach, Germany) with a 20 or 30 mm diffuser length were connected to the laser ports via short connecting fibers. To perform SOM measurements, all treatment fibers, except the one for illumination and excitation for the desired measurement, were temporarily disconnected from the short connecting fibers and instead connected to the inputs of a fiber switch (MPM-2000, Mikropack, Ostfildern, Germany) [10,29]. The output of the fiber switch was guided to a spectrometer (USB2000+, Ocean Insight, former Ocean Optics, Ostfildern, Germany) with a long pass inline filter (RG645, Schott Glas, Mainz, Germany) at the spectrometer entrance. PDT illumination was conducted with a 200 mW/cm diffuser length for 1 h as standard-setting [30], if not indicated otherwise in Table 1. It was shown that, for comparable scenarios, this power setting limits the tissue heating to below 42 °C [6]. A minimum target light dose of 18.7 J/mm<sup>2</sup> was used for treatment planning, as previously calculated based on the concept of “complete” photobleaching [31]. In cases where interfiber distances below 9 mm had to be chosen due to restrictions in the treatment planning (e.g., blood vessels near the trajectories), the power was reduced and the irradiation time prolonged to prevent thermal damage. SOM was performed twice, immediately before (pre) and after (post) iPDT illumination, thus receiving the pre and post iPDT spectra, exemplarily illustrated in Figure 1. The

transmitted treatment light is visible in the wavelength range of 626–642 nm. The PpIX fluorescence signal is in the range of 650–750 nm. In total, 320 spectra (pre plus post iPDT) were recorded and analyzed (range: 2–36 per iPDT case, median: 24), representing about 41% of all possibilities of measurable spectra (784 for 392 CDF-pair combinations).

**Table 1.** Irradiation and spectral online monitoring characteristics, displaying the number of measured spectra and used cylindrical diffuser fibers (CDFs) with the irradiation parameters during the treatment.

iPDT Case	Total Number of Measured Spectra	CDFs Used	Median Interfiber Distance	CDF Power	Irradiation Time	Total Applied Light Dose
			[mm]	[mW/cm]	[s]	[J]
1	12	4	10.0	200	3600	8640
2	28	7	13.2	200	5400	20,520
3	30	6	10.5	200	3600	8640
4a	12	4	10.2	200	3600	8640
4b	2	2	10.0	200	3600	2880
5	20	5	11.0	100	7200	7200
6	20	5	12.3	150	7200	10,800
7	42	7	10.6	200	3600	12,960
8	72	9	13.0	200	3600	15,120
9	30	6	11.0	200	3600	12,960
10	32	10	13.2	200	3600	18,720
11	20	5	11.4	133	5400	8694



**Figure 1.** Spectral online monitoring data of a CDF-pair shown at iPDT start (pre iPDT, solid black line) and iPDT end (post iPDT, solid red line). Dotted lines indicate the detection thresholds.

## 2.2. Spectral Data Assessment

The spectra measured during the SOM procedure were assessed regarding treatment light transmission around 635 nm and PpIX fluorescence around 705 nm (see Figure 1). The transmitted treatment light was analyzed concerning its integral signal intensity  $I_t$

(in counts/ms), recorded within the wavelength interval of 626–642 nm according to Equation (1).

$$I_t = \int_{626 \text{ nm}}^{642 \text{ nm}} I(\lambda) d\lambda \quad (1)$$

where  $I(\lambda)d\lambda$  is the intensity measured within a wavelength interval  $d\lambda$ . The PpIX fluorescence was assessed by fitting a normalized pure PpIX fluorescence spectrum  $I_{\text{PpIX}}(\lambda)$  and a normalized auto-fluorescence spectrum  $I_{\text{auto}}(\lambda)$  to the recorded data  $I_{\text{rec}}(\lambda)$  in the wavelength range of 650–750 nm:

$$I_{\text{rec}}(\lambda) = a I_{\text{PpIX}}(\lambda) + b I_{\text{auto}}(\lambda) \quad (2)$$

with adjustable weighting factors  $a$  and  $b$ . The first addend in Equation (2) represents the fitted PpIX spectrum contained in the recorded spectra. This fluorescence was analyzed based on its maximum signal intensity value  $I_f$  (in counts/ms) recorded within the wavelength range 702–708 nm:

$$I_f = \max\{a I_{\text{PpIX}}(\lambda) \mid 702 \text{ nm} \leq \lambda \leq 708 \text{ nm}\} \quad (3)$$

The signal intensities  $I_t$  and  $I_f$  given by Equations (1) and (3) were considered detectable (above detection threshold) if the maximum signal intensities  $I(\lambda)$  within the specified wavelength intervals were higher than three times the noise level, which was determined individually for each spectrum from the spectral range of 500–550 nm, outside the ranges of transmitted treatment light and fluorescence. To obtain a measure for the change of treatment light transmission during iPDT, the intra-operative pre versus post iPDT treatment light transmission ratio  $R_{\text{pre/post}}$  is calculated using Equation (4):

$$R_{\text{pre/post}} = \frac{I_{t,\text{pre}}}{I_{t,\text{post}}} \quad (4)$$

If  $I_{t,\text{pre}}$  was below the detection threshold,  $R_{\text{pre/post}}$  was defined as 0. Multiple measurements on tissue phantoms showed that the statistical uncertainty of the signal intensities  $I_t$  and  $I_f$  given by Equations (1) and (3) was not more than 8%. Propagation of uncertainty with the variance formula yields an uncertainty <20% for  $R_{\text{pre/post}}$ .

### 2.3. Calculation of Intensities and Optical Tissue Properties

Diffusion approximation was used for all calculations to derive the absorption coefficient  $\mu_a$  of the tissue at the treatment wavelength of 635 nm using the measured treatment light transmission signal intensities  $I_t$  between the CDF-pairs. It was assumed that the CDFs emit and detect light homogeneously. The active CDF-sections were approximated as linear arrays of isotropically emitting point sources or isotropically collecting point detectors (five sources or detectors per mm diffuser length, each contributing with the same weight). The photon fluence rate  $\Phi_{ij}$  generated for each photon emitted from one point source  $i$  on the emitting CDF at the location of one point detector  $j$  on the detecting CDF is given by [32,33]:

$$\Phi_{ij}(r_{ij}, \mu_a, \mu'_s) = \frac{1}{4\pi r_{ij}} 3(\mu_a + \mu'_s) \exp\left(-r_{ij} \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)}\right) \quad (5)$$

where  $r_{ij}$  is the distance between an emitting and a detector point and  $\mu'_s$  the reduced scattering coefficient of the tissue. The double sum over Equation (5) for all emitting points  $i$  and detector points  $j$  includes all point-to-point combinations between the two CDFs and is proportional to the theoretically expected value of the transmitted treatment light intensity  $I_{t,\text{theo}}$  for the CDF-pair [34]. As for constant emission power per active CDF length,

the total power emitted by a CDF scales with the length of its light-emitting section;  $L_E$ ,  $I_{t,theo}$  is described by Equation (6):

$$I_{t,theo} = \frac{P_0 \cdot L_E}{N} \sum_i \sum_j \Phi_{ij}(r_{ij}, \mu_a, \mu'_s) \quad (6)$$

where  $N$  is the number of point combinations. The constant calibration factor  $P_0$  (in cm-counts/ms) includes the emitted photon rate per cm diffuser length and the conversion factor from photon fluence rate at the detecting CDF-section to measured intensity. To note, Equation (6) is independent of the length of the active CDF section of the detector, which relies on the assumptions that the detection efficiency is homogeneous and the total detection efficiency is independent of the diffuser length.  $P_0$  was determined experimentally by fitting Equation (6) to transmitted laser intensities acquired from measurements with the iPDT SOM setup in liquid artificial tissue phantoms with pre-characterized optical properties made from ink (brilliant black, Pelikan 4011, Pelikan Group GmbH, Berlin, Germany), Lipovenös® (Lipovenös MCT 20%, Fresenius, Bad Homburg, Germany), and distilled water. The measurements were performed between CDF-pairs with various active diffuser lengths in a distance-dependent manner.

To determine an average absorption coefficient  $\mu_a$  at 635 nm for the tissue volume surrounding the CDF-pair in the clinical case, the integral transmitted treatment light intensity  $I_t$  obtained from the spectral measurements is compared to  $I_{t,theo}(\mu_a, \mu'_s)$  (see Equation (6)). During this comparison, the absorption coefficient  $\mu_a$  in Equation (6) is adjusted, and the reduced scattering coefficient  $\mu'_s$  is kept constant at  $2 \text{ mm}^{-1}$  [6]. The distance values  $r_{ij}$  inserted in Equations (5) and (6) were calculated using the coordinates of the active CDF-sections defined in the treatment plan. These coordinates further define the coordinates of the emitter and detector points of each CDF-pair. From these calculations, the minimum distance was derived as a distance classifier for each CDF-pair, as the CDFs often cannot be placed perfectly in parallel to each other. For each CDF-pair, a lookup table of intensity values  $I_{t,theo}(\mu_a)$  according to Equation (6) was calculated for a set of  $\mu_a$  values from  $0.0001$  to  $0.75 \text{ mm}^{-1}$  with a resolution of  $0.0001 \text{ mm}^{-1}$ . The  $\mu_a$  value leading to the best match between the calculated intensity  $I_{t,theo}(\mu_a)$  and the intraoperatively measured intensity  $I_t$  was selected and defined as the representative absorption coefficient for the tissue volume surrounding the specified CDF-pair.

For CDF-pairs with no transmission (transmitted treatment light intensity below detection threshold) pre or post iPDT, the minimally needed  $\mu_a$  to obtain a signal intensity equal to the detection threshold was determined, using the same procedure. From the  $\mu_a$  values obtained from the pre and post iPDT spectra, the difference  $\Delta\mu_a$  induced during the iPDT illumination was calculated. For iPDT case #1,  $\Delta\mu_a$  was calculated based on  $R_{pre/post}$ , but not the two  $\mu_a$  values themselves, because an individual optical filter was used, which was different from the filter used for the SOM procedure in all other iPDT cases, so the predetermined  $P_0$  value was not suitable.

In addition, forward calculations were performed with Equation (6) to examine the influence of different blood volume fractions (bvf) and hemoglobin species in tumor tissue on  $I_t$ . As blood is the main absorber in tissue at 635 nm [35], the  $\mu_a$  values inserted into Equation (6) were set to those of the respective hemoglobin species multiplied with the assumed bvf, while the absorption of all other tissue constituents was assumed to be neglectable. The following absorption coefficients at 635 nm were used for the different pure hemoglobin species:  $\text{HbO}_2$ :  $\mu_a = 0.2477 \text{ mm}^{-1}$ ;  $\text{Hb}$ :  $\mu_a = 2.1149 \text{ mm}^{-1}$  and  $\text{MetHb}$ :  $\mu_a = 8.1073 \text{ mm}^{-1}$  [20,36]. The average oxygen saturation of normal capillary blood is assumed to be 85% [37]. Therefore, a mixture of 85%  $\text{HbO}_2$  and 15%  $\text{Hb}$  is used in the calculations for this case. To sum up, this resulted in the following absorption coefficients of the tissue per % bvf:  $0.0053 \text{ mm}^{-1}/\%$  for capillary blood,  $0.0211 \text{ mm}^{-1}/\%$  bvf for  $\text{Hb}$ , and  $0.0811 \text{ mm}^{-1}/\%$  bvf for  $\text{MetHb}$ .

#### 2.4. CT and MRI-Protocol

A contrast-enhanced CT was acquired for treatment planning after the induction of anesthesia and assembly of the stereotactic frame. MR images were acquired within 14 days before iPDT for treatment planning and on the day after iPDT for treatment assessment (median: 22 h after the end of therapy; range: 15–29 h). Pre- and postoperative MRI was performed with a GE SIGNA HDxt 3T scanner (GE Healthcare, General Electric, Chicago, IL, USA). T1-weighted sequences (Repetition time TR = 6.5 ms; Echo time TE = 3.15 ms) were recorded before (3D; resolution  $0.4297 \times 0.4297 \times 3.5 \text{ mm}^3$ ) and after (3D; resolution  $0.4297 \times 0.4297 \times 0.7 \text{ mm}^3$ ) administration of a Gadolinium-based contrast agent (GBCA).

#### 2.5. MRI Analysis

By affine transformation using mutual information, MR images were co-registered with the CT scan in the stereotactic frame [38]. For this purpose, all images were resampled to the lowest image resolution ( $0.4297 \times 0.4297 \times 0.5 \text{ mm}^3$ ) via 3D extrapolation. The resampling and automatic co-registration of the MR and CT images were performed using Advanced Normalization Tools (ANTs; version 2.3.2, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA and University of Iowa, Iowa City, IA, USA) [39]. The co-registration was visually verified and, if necessary, adjusted manually using ITK-Snap (version 3.8, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA) [40]. The tumor volume was defined in the pre-therapeutic contrast-enhanced T1-weighted MR images. The T1 hyperintensity structure was segmented in the post-therapeutic non-contrast enhanced T1-weighted MRI. T1 hyperintensity structures were defined as regions where the intensity was higher than in the directly surrounding tissue in the post-therapeutic dataset but not in the pre-therapeutic dataset. The segmentation of all structures was performed manually and was independently reviewed by two medical doctors (S.Q., neurosurgeon with more than 5 years experience; and B.E-W., neuroradiologist with more than 15 years of post-fellowship experience in interpreting MRI). To characterize the spatial relation of the tumor volume ( $V_T$ ) and the intrinsic T1 hyperintensity ( $V_{hyp}$ ) structures, the Dice similarity coefficient (DSC, Equation (7)), and the Jaccard similarity coefficient (JSC, Equation (8)), as well as the overlap volume (OV, Equation (9)), were calculated [41–44]).

$$DSC = \frac{2 |V_T \cap V_{hyp}|}{|V_T| + |V_{hyp}|} \quad (7)$$

$$JSC = \frac{|V_T \cap V_{hyp}|}{|V_T \cup V_{hyp}|} \quad (8)$$

$$OV = \frac{|V_T \cap V_{hyp}|}{\min(|V_T|, |V_{hyp}|)} \quad (9)$$

A DSC or JSC value of 1 indicates identical volumes in shape, localization, and size. An OV of 1 indicates that the smaller volume is fully included in the larger volume. DSC, JSC, and OV values of 0 all indicate disjunct volumes without any overlap. In addition to the overlap parameters, the volume ratios  $V_{hyp}/V_T$  and  $(V_T \cap V_{hyp})/V_T$  were calculated.

For the intrinsic T1 hyperintensity analysis, a normalized value of the MRI signal intensity within the intrinsic T1 hyperintensity region ( $I_{T1}$ ) is calculated.  $I_{T1}$  provides at least a rough estimate of the degree of T1 hyperintensity. It further considers different gain settings of the images, allowing comparability between the different iPDT cases.

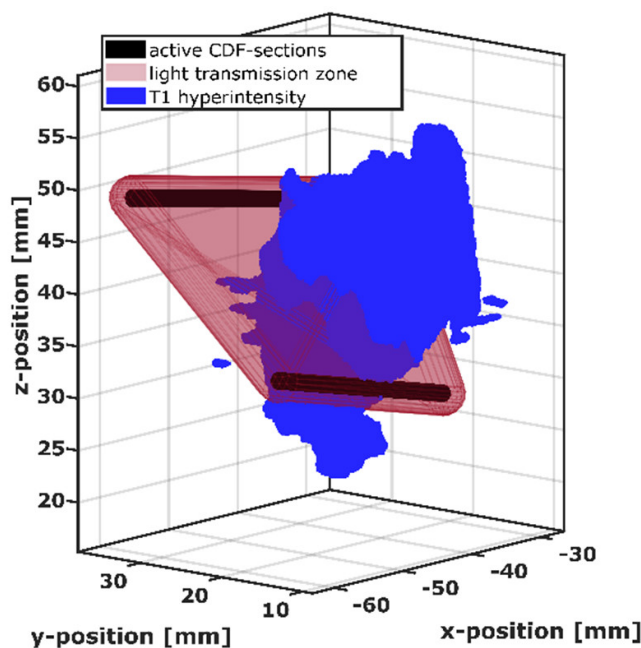
$$I_{T1} = \frac{\bar{I}_{T1}}{\bar{I}_{WM}} \quad (10)$$

According to Equation (10),  $I_{T1}$  is defined as the ratio of the mean image intensity within the intrinsic T1 hyperintensity ( $\bar{I}_{T1}$ ) and the mean image intensity of white matter regions ( $\bar{I}_{WM}$ ). For this purpose, seven isotropic spheres (diameter 8 mm) containing only white matter were drawn in the brain hemisphere unaffected by the tumor, and their overall mean image intensity was calculated. In this calculation, background intensity was neglected, as it was less than 1% of the image intensity.

### 2.6. Overlap Calculation between T1 Hyperintensity and CDF-Pairs

For further assessment of the obtained MRI and SOM results, the spatial relation between intrinsic T1 hyperintensity and the positions of the CDFs placed in the tumor was examined. To determine whether the T1 hyperintensity is located between a CDF-pair and how much it may have affected the light transmission, a 3D volume of simple geometrical shape (see Figure 2) was defined around the active sections of each CDF-pair. That volume roughly represents the region in which most light propagation occurs from one to the other CDF. This “light transmission zone” is a volume with standardized shape which was intersected with the intrinsic T1 hyperintensity, as shown in Figure 2. For the positional analysis, the coordinates of the stereotactic CDF trajectory were transformed to CT image coordinates, using a linear coordinate transformation, and the image coordinates of the active CDF-section along the trajectory were determined. Based on these coordinates, the predominant light transmission zone surrounding a CDF-pair was defined by fluence calculations between two parallel line sources placed at a 10 mm distance. Assuming tumor-like tissue optical properties ( $\mu_a = 0.02 \text{ mm}^{-1}$ ,  $\mu_s' = 2 \text{ mm}^{-1}$  [6]), Equations (5) and (6) were used to determine the two light fluence rates that would be generated in every voxel (size  $0.1 \times 0.1 \times 0.1 \text{ mm}^3$ ) of a large discretized volume surrounding the CDF-pair if one or the other active CDF-section would emit light, respectively. By multiplication of these fluence rates (Equation (11)), an estimate measure for the contribution of a voxel with coordinates  $(x, y, z)$  to the treatment light transmission signal expected for this CDF-pair is obtained.

$$I_{\text{voxel}}(x, y, z) \sim \Phi_1(x, y, z) \cdot \Phi_2(x, y, z) \quad (11)$$



**Figure 2.** Visualization of the intersection between the light transmission zone (red) of the active cylindrical diffuser fiber (CDF) sections of one CDF-pair (black) and the intrinsic T1 hyperintensity volume (blue).

Using this estimation, the light transmission zone was defined by combining the voxels with the strongest contributions, up to a total contribution of 2/3 (67%) compared to the sum over all voxels. The size of this combined volume corresponds to a convex hull surrounding two capsules of radius 2.1 mm constructed around the two active sections of the CDF-pair. The definition of the light transmission zone was standardized in this way for all CDF-pairs, i.e., by the construction of capsule-shaped volumes with radius 2.1 mm around the active CDF-sections and the subsequent construction of the convex hull around these two capsule-shaped volumes. For the 3D analysis, the capsule-shaped volumes are built up employing a computer aided design program (FreeCAD version 0.18.16117 © Juergen Riegel, Werner Mayer, Yorik van Havre 2001–2019), and the convex hull around them is computed automatically with Matlab R2018b (MathWorks Inc., Natick, MA, USA) during the intersection process. For the positional analysis of the volumes illustrated in Figure 2, the T1 hyperintensity volume was transformed into a tetrahedral mesh with an average tetrahedron size of 0.02 mm<sup>3</sup> (min: 0.0004 mm<sup>3</sup>, max: 0.06 mm<sup>3</sup>) using a mesh tool based on the computational geometry algorithms library (CGAL) [45]. For each tetrahedron, it was checked whether it was within the light transmission zone of a CDF-pair, and the overlap volume was determined by summing those tetrahedron volumes. In case of a non-zero overlap volume, the CDF-pair was regarded as affected by T1 hyperintensity.

### 2.7. Data Evaluation and Statistics

Descriptive p-values were calculated using the Mann–Whitney U test and the two-sided Spearman test (alpha = 0.05; power = 0.8). Statistical comparisons were performed using IBM SPSS Statistics for Windows, version 25 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Mathematical calculations and data fitting procedures were implemented in MATLAB R2018b (MathWorks Inc., Natick, MA, USA). The 3D visualizations and further 3D analysis were completed using Paraview version 5.6.0 (Kitware, Inc., Clifton Park, NY, USA, [46]).

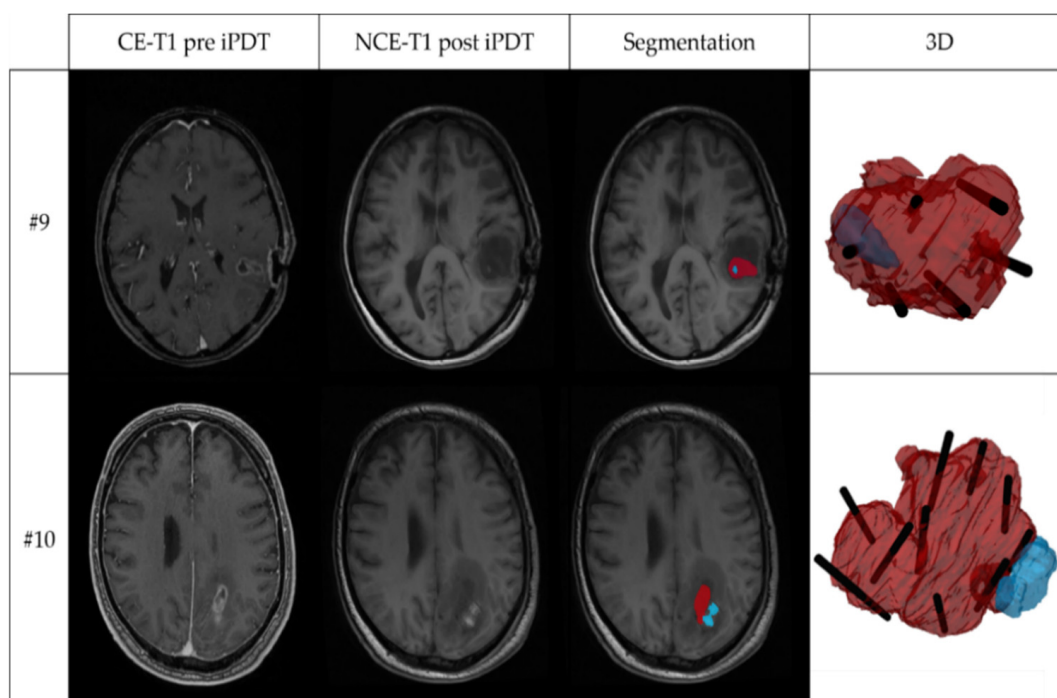
## 3. Results

### 3.1. T1 Hyperintensity in Early Postoperative MRI and 3D Superimposition

Intrinsic T1 hyperintensity was visible in early postoperative MRI (median: 22 h after the end of therapy; range: 15–29 h) after iPDT. The calculated geometric and overlay measures of the tumor volume ( $V_T$ ) and the intrinsic T1 hyperintensity volume ( $V_{hyp}$ ) are listed in Table 2. While the median T1 hyperintensity volume ( $V_{hyp}$ ) was 790.1 mm<sup>3</sup>, there was one case with  $V_{hyp}$  less than 100 mm<sup>3</sup> and two cases with  $V_{hyp}$  larger than 1500 mm<sup>3</sup>. The maximum diameter of the intrinsic T1 hyperintensity ranged between 3 mm and 19.1 mm (median: 8.45 mm). The comparison between  $V_{hyp}$  and the tumor volume  $V_T$  based on  $V_{hyp}/V_T$  shows that in 7/12 patients, the intrinsic T1 hyperintensity volume after treatment was larger than 5% of the tumor volume. In only three cases was it larger than 30%. With regard to  $(V_{hyp} \cap V_T)/V_T$ , in only 5/12 cases more than 5% (max 28%) of the tumor volume was covered by T1 hyperintensity. In 11/12 cases  $V_{hyp}$  was smaller than  $V_T$  so that  $OV = (V_{hyp} \cap V_T)/V_{hyp}$ . Thereof, in 7/11 cases, at least 60% of the intrinsic T1 hyperintensity are localized within the tumor (median: 0.61). In 3/12 cases, the volume of intrinsic T1 hyperintensity was almost completely located within the tumor volume ( $OV > 0.90$ ). This is demonstrated in Figure 3, showing in the upper panel the T1-weighted MR images and segmentations for case #9 with the largest overlap,  $OV = 0.99$ . The 3D superimposition shows that the intrinsic T1 hyperintensity region (blue) is almost completely located within the contrast enhancing tumor region (red) and crossing one of the CDF sections (black). In the lower panel of Figure 3, case #10 with the smallest overlap,  $OV = 0.02$ , is shown. Here, the 3D superimposition shows that the intrinsic T1 hyperintensity volume is located almost entirely outside the segmented tumor volume, but next to two CDFs.

**Table 2.** Tumor volume ( $V_T$ ) and properties of the intrinsic T1 hyperintensity volume ( $V_{hyp}$ ) of the different iPDT cases and the calculated Overlap (OV), Dice (DSC), and Jaccard (JSC).

iPDT Case	$V_T$ ( $\text{mm}^3$ )	$V_{hyp}$ ( $\text{mm}^3$ )	Max. Diameter $V_{hyp}$ (mm)	$I_{T1}$ a.u.	$\frac{V_{hyp}}{V_T}$ (%)	$\frac{V_{hyp} \cap V_T}{V_T}$ a.u.	OV a.u.	DSC a.u.	JSC a.u.
1	1382	50	4.6	0.67	3.7	0.02	0.42	0.03	0.02
2	8574	3928	19.1	1.45	45.8	0.28	0.62	0.39	0.24
3	1955	544	9.6	0.80	27.8	0.01	0.03	0.01	0.01
4a	2269	1740	12.0	0.56	76.7	0.22	0.29	0.25	0.14
4b	537	978	15.0	0.91	182.1	0.03	0.03	0.02	0.01
5	4079	137	4.5	0.59	3.4	0.02	0.66	0.04	0.02
6	6920	152	4.4	0.71	2.2	0.02	0.96	0.04	0.02
7	11,020	361	3.0	0.73	3.3	0.03	0.94	0.06	0.03
8	13,650	1374	10.0	0.81	10.1	0.08	0.79	0.14	0.08
9	7176	115	5.1	0.73	1.6	0.02	0.99	0.03	0.02
10	15,340	1065	13.1	1.19	6.9	0.00	0.02	0.00	0.00
11	3990	603	7.3	0.74	15.1	0.09	0.60	0.16	0.09
median	6064	790	8.45	0.74	12.8	0.05	0.61	0.09	0.05

**Figure 3.** Two examples of MRI and 3D superimposition visualization, showing: contrast-enhanced T1-weighted MRI before iPDT (CE-T1 pre iPDT); non-contrast-enhanced T1-weighted MRI after iPDT (NCE-T1 post iPDT); segmentation of the tumor volume (red) and intrinsic T1 hyperintensity (blue) based on the CE-T1 pre iPDT and NCE-T1 post iPDT images; and 3D superimposition of tumor volume (red), intrinsic T1-hyperintensity volume (blue), and planned localization of irradiating tips of cylindrical diffuser fibers (black). The upper panel shows iPDT case #9 with the largest overlap coefficient (OV = 0.99); the lower panel iPDT case #10 with smallest overlap coefficient (OV = 0.02).

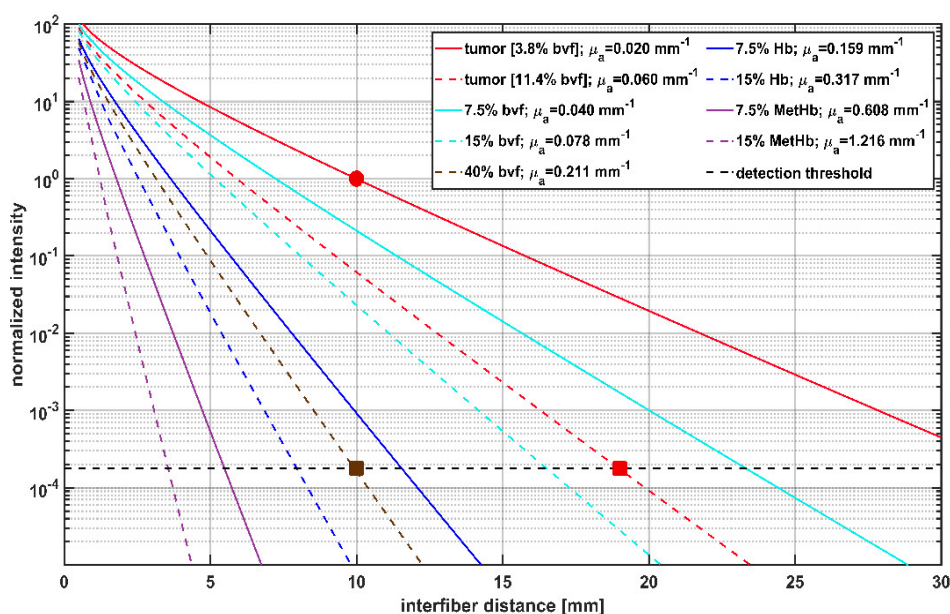
In total, 5/11 patients had an OV < 0.5, but the volume of intrinsic T1 hyperintensity was still located in close proximity to the contrast-enhancing tumor region. DSC and JSC show the positional agreement between tumor and T1 hyperintensity to be 0.39 or 0.24 at most, respectively (median: 0.09/0.05). A higher OV than DSC or JSC further indicates the high volume differences between  $V_T$  and  $V_{hyp}$ . Further comparison of the intrinsic



T1 hyperintensity and the position of CDF-pairs demonstrated that 298/392 CDF-pairs (76%) had a local intrinsic T1 hyperintensity involvement within the light transmission zone surrounding the CDF-pair. The residual 94/392 CDF-pairs (24%) showed no local intrinsic T1 hyperintensity involvement. Of all CDF-pairs, 108/392 (27.6%, or 36.2% of all 298 CDF-pairs with T1 hyperintensity) had >5% T1 hyperintensity volume in the light transmission zone surrounding the CDF-pairs.

### 3.2. Effects of Different Blood Volume Fractions on Laser Light Transmission at 635 nm

As intrinsic T1 hyperintensity in early postoperative MRI may be associated with blood degradation products, theoretical calculations were made to illustrate the effects of increasing blood volume fraction (bvf) and different hemoglobin species on the detected light intensities. The results shown in Figure 4 represent the calculated dependency of the treatment light transmission on the interfiber distance between two parallel CDFs with 20 mm diffuser length. The shown intensity values are normalized to the intensity in tumor tissue with optical parameters  $\mu_a = 0.02 \text{ mm}^{-1}$ ;  $\mu'_s = 2 \text{ mm}^{-1}$  (bvf = 3.8%, red solid line) at 10 mm interfiber distance indicated by a red circle in Figure 4. These values are compared to the detection threshold of the SOM setup obtained from the intraoperative data marked by a horizontal dashed line. A slightly increased bvf (7.5% or 15%, cyan curves), potentially induced by a hemorrhage, would reduce the signal intensity. However, transmitted laser light would still be detectable at interfiber distances up to at least 17 mm. In case the bvf increases further, e.g., if a hemorrhage is induced during fiber placement before iPDT illumination, the absorption increases further and leads to a steeper signal decay (brown dashed curve). According to the calculations and assumptions, a bvf of at least 40% accounts for absorption, making it impossible to detect a transmitted light signal for interfiber distances larger than 10 mm (brown square). In addition, with changes in bvf, spectral changes of the absorbing molecules may occur. For example, with ongoing iPDT and deoxygenation of the blood, Hb might become the relevant absorber. With Hb as the absorber, the effect of the increase on  $\mu_a$  would rise by a factor of four, resulting in a further reduction of transmitted light intensity, as shown by the dark blue lines (Hb = 7.5%/15%). A fraction of about 10% Hb would have a similar effect as a hemorrhage with 40% bvf. The occurrence of methemoglobin would lead to a further drastic reduction of signal intensity (violet curves). A MetHb fraction of 15% in tissue ( $\mu_a$  (15% MetHb) =  $1.2 \text{ mm}^{-1}$ ) would lead to a complete loss of detectable laser light for CDF separations larger than 4 mm (violet dashed curve). Calculations show that 1% bvf of MetHb would lead to an absorption of  $\mu_a \sim 0.08 \text{ mm}^{-1}$ , which is four times higher than the preset 'normal' tumor absorption of  $\mu_a = 0.02 \text{ mm}^{-1}$  with a bvf of 3.8%. Thus two different changes must be considered for interpretation of measured SOM data: changes in the bvf and changes in the absorption spectrum due to photo-induced molecular processes.



**Figure 4.** Calculation of transmitted light intensity at 635 nm between cylindrical diffuser fibers (CDFs) with a 2 cm diffuser length, and its dependency on the interfiber distances for different blood volume fractions (bvf) and hemoglobin species. Blood is approximated to contain 85% HbO<sub>2</sub> and 15% Hb. Transmitted light intensities are normalized to tumor ( $\mu_a = 0.02 \text{ mm}^{-1}$ ,  $\mu_s' = 2 \text{ mm}^{-1}$ ) at 10 mm interfiber distance (red circle). The legend shows the different blood volume fractions of hemoglobin species and the resulting  $\mu_a$  assumed for the calculation with  $\mu_s'$  set constant to  $2 \text{ mm}^{-1}$ . The horizontal dashed line at  $1.9 \times 10^{-4}$  shows the estimated detection threshold of the iPDT SOM setup. The red square indicates that in case of a tumor with 11.4% bvf the detection threshold is reached at an interfiber distance of 19 mm. The brown square shows that for 40% bvf the detection threshold is already reached at an interfiber distance of 10 mm.

### 3.3. Intraoperative Transmission Intensity Change and Its Comparison to Intrinsic T1 Hyperintensity

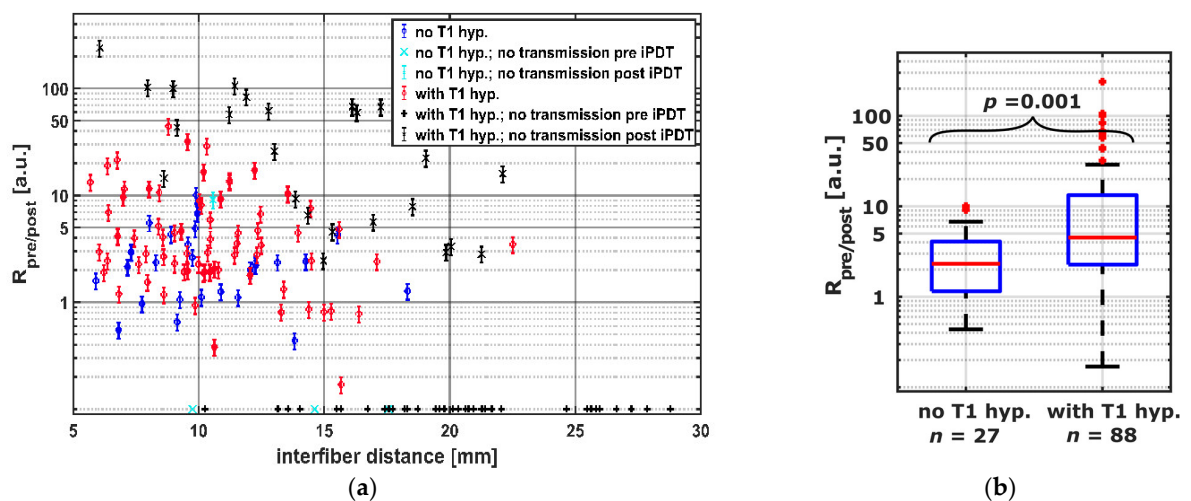
Intraoperative SOM data were acquired for 160 CDF-pairs. For 132/160 CDF-pairs, the interfiber distance was less or equal to 19 mm, the distance at which a signal should be detectable even with the highest absorption measured for undisturbed “brain adjacent tumor” tissue ( $\mu_a = 0.06 \text{ mm}^{-1}$ , red square in Figure 4) [47]. Table 3 shows the numbers of CDF-pairs with detectable transmitted laser light and PpIX fluorescence pre and post iPDT and with or without local intrinsic T1 hyperintensity in the light transmission zone surrounding a CDF-pair. As CDF-pairs with interfiber distances larger than 19 mm may have no or very low laser light transmission even at ‘normal’ optical tissue properties, only CDF-pairs with interfiber distances  $\leq 19$  mm were included in the statistical evaluations (132/160). Of these 132 CDF-pairs, 17 showed no detectable laser light transmission at iPDT start. The 17 CDF-pairs divide into 14 cases with and 3 cases without local intrinsic T1 hyperintensity in early postoperative MRI, with a significantly higher number of those with local intrinsic T1 hyperintensity ( $p = 0.008$ ). After iPDT, additional 25 CDF-pairs (increase from 39 to 64) had no detectable laser light transmission, which includes additional 20 CDF-pairs with interfiber distance  $\leq 19$  mm (increase from 17 to 37). Thereof 1 CDF-pair had no local intrinsic T1 hyperintensity, and 19 had local intrinsic T1 hyperintensity involvement. When considering CDF-pairs with interfiber distance  $\leq 19$  mm, PpIX fluorescence could be measured for 95/115 CDF-pairs pre iPDT, of which 72/95 had a local intrinsic T1 hyperintensity. After iPDT, residual PpIX fluorescence was observed in neither iPDT case nor for any CDF-pair. Two iPDT cases (#6 and #11) unite 19/20 (95%) of all CDF-pairs without detectable PpIX fluorescence pre-iPDT, corresponding to all CDF-pairs of these two cases. In Figure 5a, the calculated intra-operative pre versus post iPDT treatment light

transmission ratio  $R_{pre/post}$  is plotted against the interfiber distance. The data are grouped by CDF-pairs with local intrinsic T1 hyperintensity involvement (red and black symbols) and those without (blue and cyan symbols).  $R_{pre/post}$  values larger than 50 were observed only for CDF-pairs with detectable laser light transmission signal before but not after iPDT and with local intrinsic T1 hyperintensity in early postoperative MRI (black symbols). In total, 9/160 (6%) CDF-pairs had a  $R_{pre/post}$  smaller than 0.8 (increase of  $I_t > 20\%$ ; maximum error of  $R_{pre/post}$  is 20%). For 98/160 CDF-pairs,  $R_{pre/post}$  was larger than 1.20 (decrease of  $I_t > 20\%$ ). The comparison of CDF-pairs with detectable transmission pre iPDT in Figure 5b shows that the ratio  $R_{pre/post}$  is larger for CDF-pairs with local intrinsic T1 hyperintensity than for those without (median/interquartile range: 4.5/[2.3, 13.3] versus 2.3/[1.2, 4.1],  $p = 0.001$ ).

**Table 3.** Overview of evaluated CDF-pairs and observed detectability of treatment light transmission intensity (transmission) or PpIX fluorescence signal before (pre iPDT) and after (post iPDT) conducted iPDTs.

Number of CDF-Pairs	Total	Transmission Detectable				Fluorescence Detectable			
		Pre iPDT		Post iPDT		Pre iPDT		Post iPDT	
		yes	no	yes	no	yes	no	yes	no
All interfiber distances	160	121	39	96	64	114	46	0	160
Interfiber distance $\leq 19$ mm <sup>1</sup>	132	115	17	95	37	95 <sup>2</sup>	20 <sup>2</sup>	0	115 <sup>2</sup>
With local intrinsic T1 hyperintensity	102	88	14	69	33	72 <sup>2</sup>	16 <sup>2</sup>	0	88 <sup>2</sup>
Without local intrinsic T1 hyperintensity	30	27	3	26	4	23 <sup>2</sup>	4 <sup>2</sup>	0	27 <sup>2</sup>

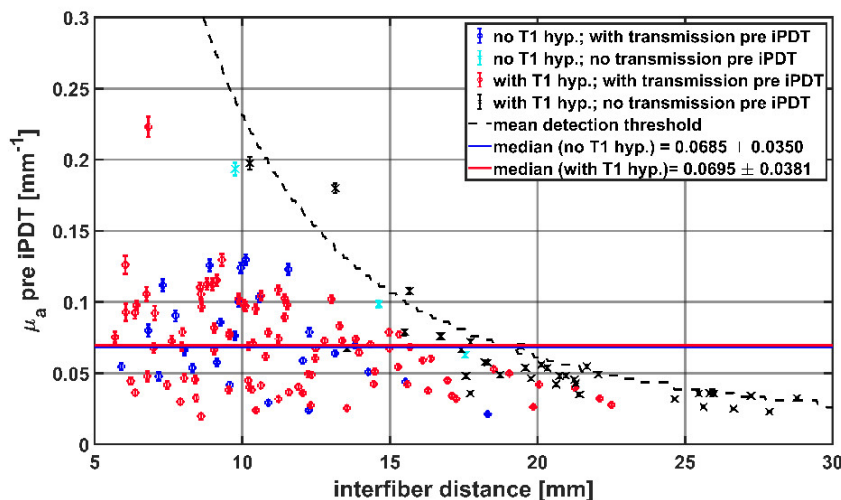
<sup>1</sup> Only CDF-pairs with interfiber distance  $\leq 19$  mm were included in statistical evaluations to avoid bias by spectra with undetectable transmission at “normal” optical tissue properties ( $\mu_a \leq 0.06$  mm<sup>-1</sup>). <sup>2</sup> Transmission signal detectable pre iPDT (in total 115 CDF-pairs).



**Figure 5.** (a) Transmission ratios  $R_{pre/post}$  for all CDF-pairs compared to interfiber distance. The colors and symbols indicate whether transmission was detectable post iPDT and whether T1 hyperintensity was observed (see legend). Crosses near the x-axis indicate CDF-pairs with no detectable treatment light transmission at iPDT start, for which  $R_{pre/post}$  is defined as 0. (b) Comparison of CDF-pairs with and without local intrinsic T1 hyperintensity, considering only CDF-pairs with detectable transmission pre iPDT and interfiber distance  $\leq 19$  mm.

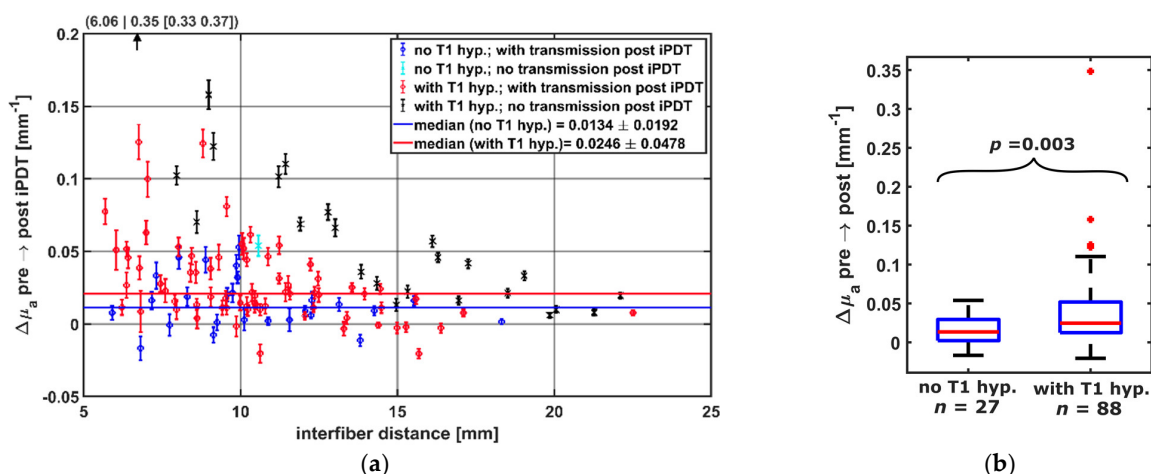
The average  $\mu_a$  of the tissue between two CDFs, calculated from the SOM measurements pre iPDT, are shown in Figure 6 as a function of the interfiber distance. The median  $\mu_a$  pre iPDT determined from all SOM measurements with detectable transmission signals

(blue and red symbols) was  $0.068 \text{ mm}^{-1}$  (interquartile range: [0.045, 0.093]). There was no significant difference between the  $\mu_a$  values for CDF-pairs with and without intrinsic T1 hyperintensity (red versus blue symbols):  $0.069 \text{ mm}^{-1}$  vs.  $0.070 \text{ mm}^{-1}$ ;  $p = 0.37$ .



**Figure 6.** Calculated  $\mu_a$  values before start of iPDT compared to interfiber distance. The colors and symbols indicate whether transmission was detectable pre iPDT and whether intrinsic T1 hyperintensity was observed (see legend). The dashed line represents the mean detection threshold of the SOM setup.

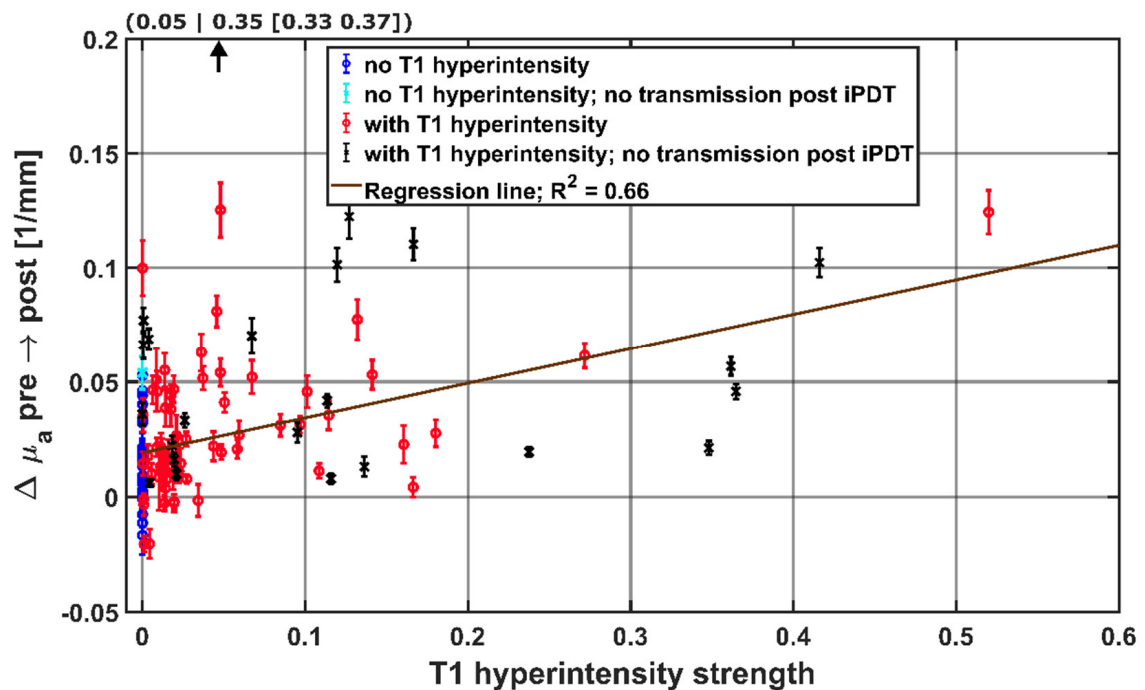
The calculation of  $\Delta\mu_a$  showed (see Figure 7a) that only for CDF-pairs with local intrinsic T1 hyperintensity involvement (red, black), a  $\Delta\mu_a$  greater than  $0.054 \text{ mm}^{-1}$  was observed. A decrease in  $\mu_a$  was seen for 12 CDF-pairs. Of these, 8 had local intrinsic T1 hyperintensity involvement. Considering only CDF-pairs with an interfiber distance  $\leq 19 \text{ mm}$ ,  $\Delta\mu_a$  was higher when intrinsic local T1 hyperintensity was observed (median/interquartile range in  $\text{mm}^{-1}$ :  $0.025/[0.012, 0.052]$  versus  $0.0134/[0.0022, 0.030]$ ,  $p = 0.003$ , Figure 7b). CDF-pairs with no detectable treatment light transmission at iPDT start were not considered, as no  $\Delta\mu_a$  could be calculated.



**Figure 7.** (a) Calculated  $\Delta\mu_a$  dependent on the interfiber distance between CDF-pairs. Colors indicate whether transmission was detectable post iPDT and whether intrinsic T1 hyperintensity was observed (see legend). For better visibility, the data point at (6.06 | 0.35) is omitted. (b) Comparison of  $\Delta\mu_a$  of CDF-pairs with and without local intrinsic T1 hyperintensity, considering only pairs with transmission pre iPDT and interfiber distance  $\leq 19 \text{ mm}$ .

### 3.4. Comparing Intrinsic T1 Hyperintensity Strength

The signal intensity of the intrinsic T1 hyperintensity and the degree of overlap between intrinsic T1 hyperintensity and light transmission zone were evaluated to investigate whether a stronger involvement of T1 hyperintensity for a given CDF-pair leads to a stronger influence on the observed absorption change  $\Delta\mu_a$ . For this purpose, the fraction of T1 hyperintensity within the light transmission zone between a CDF-pair was multiplied by  $I_{T1}$ . The resulting T1 hyperintensity strength was compared to  $\Delta\mu_a$  in Figure 8, separately for each CDF-pair and with respect to detectable laser light transmission at the end of iPDT. The linear two-sided Spearman regression ( $R^2 = 0.66$ ,  $p < 0.001$ ,  $N = 115$ ) indicates that for higher  $\Delta\mu_a$  values, a higher intrinsic T1 hyperintensity strength can be expected in the light transmission zone. From CDF-pairs without local intrinsic T1 hyperintensity (blue and cyan symbols, T1 hyperintensity strength = 0), the degree of T1 hyperintensity strength that leads to a significant increase in  $\Delta\mu_a$  can be deduced. According to Figure 8, a T1 hyperintensity strength of approximately 0.20 leads to an average  $\Delta\mu_a$  of  $0.05 \text{ mm}^{-1}$ .



**Figure 8.** Hyperintensity strength in the light propagation volume surrounding CDF-pairs, with the calculated regression line obtained by the Spearman test. For better visibility, the data point at (0.05|0.35) is not shown. The colors and symbols indicate whether transmission was detectable post iPDT and whether intrinsic T1 hyperintensity was observed (see legend).

### 3.5. Analysis of PpIX Fluorescence

Analyzing  $\Delta\mu_a$  in relation to the occurrence of PpIX fluorescence between a CDF-pair showed, for the 20 CDF-pairs without local fluorescence before iPDT, that either an increase (11/20) or a decrease (9/20) in  $\mu_a$  could be observed ( $\Delta\mu_a$  range:  $-0.021 \text{ mm}^{-1}$  to  $0.125 \text{ mm}^{-1}$ ). A  $\Delta\mu_a < -0.005 \text{ mm}^{-1}$  only occurred for CDF-pairs with no PpIX fluorescence before iPDT. Overall, for CDF-pairs without detectable fluorescence, the median  $\Delta\mu_a$  is more than 2.7 times smaller compared to CDF-pairs with detectable fluorescence before iPDT. This indicates a possible relationship between higher  $\Delta\mu_a$  and the occurrence of fluorescence, but the difference is not statistically significant ( $0.0098 \text{ mm}^{-1}$  vs.  $0.0265 \text{ mm}^{-1}$ ,  $p = 0.063$ ). Only CDF-pairs with detectable PpIX fluorescence had intrinsic T1 hyperintensity strengths larger than 0.14.

#### 4. Discussion

Analyzing intraoperative SOM measurements from patients receiving iPDT for high grade glioma, a decrease in transmitted treatment light related to an increase in tissue absorption for 85% of the evaluated CDF-pairs could be observed for the treatment wavelength of 635 nm. On postoperative MRI, areas with intrinsic T1 hyperintensity in the treatment area were identified and analyzed with respect to their location relative to the iPDT treatment volume. A stronger increase in  $\mu_a$  correlates significantly with the occurrence of intrinsic T1 hyperintensity in the light transmission zone surrounding a CDF-pair. No correlation between tissue absorption at iPDT start and intrinsic T1 hyperintensity in early postoperative MRI was observed. Further SOM analysis demonstrated a tendency towards higher  $\Delta\mu_a$  related to if PpIX fluorescence was observed between a CDF-pair.

Intercranial intrinsic T1 hyperintensity may be caused by different substances, including MetHb, melanin, lipids, proteins, minerals, and others [48]. MetHb is a blood degradation product that could be procedure-related, produced with a potentially accelerated conversion due to iPDT [49].

High-grade gliomas form an especially pronounced capillary system with thinner vessel walls than normal blood vessels [50]. Silent, asymptomatic hemorrhages are reported in 20–60% of biopsies [51,52], albeit before MRI was readily available for trajectory planning. A small proportion of these silent hemorrhages were distant from the biopsy location itself and, therefore, described as trajectory-related. The occurrence of trajectory-related hemorrhages was confirmed by Casanova et al. [53,54], who even described injuries occurring at some distance from the trajectory. The diameters of intrinsic T1 hyperintensities found in the case of this study (3 mm to 19 mm) were of similar size to that of the silent hemorrhages found for biopsies (diameters < 5 mm to 40 mm) [51,52]. Clinically silent hemorrhages may have been treatment-related during iPDT and become visible as intrinsic T1 hyperintensity in early postoperative T1-weighted MRI due to the accelerated conversion of Hb species to MetHb by iPDT illumination. This accelerated conversion would be well consistent with findings in liquid tissue phantoms [23].

Some intrinsic T1 hyperintensity was found in every post iPDT non-enhanced T1-weighted sequence analyzed in the presented cohort. In most iPDT cases, either the overlap (OV) of the intrinsic T1 hyperintensity with the tumor volume was high (above median), or the volume of intrinsic T1 hyperintensity was very small (below median). Therefore, the observed T1 hyperintensity was mainly confined within the tumor volume or directly adjacent to the contrast enhancing tumor margin. Unfortunately, the contrast enhancement in MRI does not fully represent the actual tumor volume, as contrast enhancement is mainly related to the breakdown of the blood brain barrier but does not cover the infiltration zone [44,55]. It is known that FET-PET allows better visualization of the metabolically active tumor, and, in most cases, high-grade gliomas show a larger volume in FET-PET imaging compared to MRI [56]. This is consistent with reports stating that PpIX is also accumulated in the diffuse infiltration zone or peritumoral zone with metabolically active tumor cells [31,57]. To take into account that MRI does not display the full tumor volume, the iPDT treatment planning is carried out in such a way that the PDT effect is extended into the PpIX-accumulating infiltration zone. For this purpose, the peripheral CDFs are placed within the contrast-enhanced tumor volume but close to the tumor margin. Taking both aspects into account, it can be assumed that the OV coefficients between the T1 hyperintensity volume and the real tumor volume, including the infiltration zone not visible in contrast-enhanced MRI, are larger than those OV coefficients calculated only based on the contrast-enhanced MRI. Thus, it can be concluded that all T1 hyperintensity volumes observed in this work are located within the full tumor volume, including the infiltration zone, and within the intended iPDT treatment volume. A notable exception was iPDT case #4, which was treated twice. In the second treatment, case #4b, a four-fold smaller tumor volume was targeted compared to the first treatment. About 2/3 of the intrinsic T1 hyperintensity volume recorded after the second iPDT overlapped with the tumor volume treated in the first iPDT session. In this case, the formation of an additional

fraction of MetHb or another intrinsically T1 hyperintense substrate between the two iPDT sessions can be assumed.

The occurrence of a hemorrhage may by itself immediately cause an absorption increase due to the increased bvf in the tissue. However, as observed in the results, this would probably not lead to a complete loss of transmission between some CDF-pairs. In case of a reference interfiber distance of 10 mm, capillary blood would need to occupy 40% of the tissue volume to reduce the light transmission to below the detection limit. As a further effect, spectral changes due to potentially photo-induced molecular changes must be taken into account. If oxygen consumption by the iPDT procedure led to the formation of deoxygenated hemoglobin, a bvf of about 10% would be sufficient for a total loss of transmission. The formation of MetHb would further increase the absorption coefficient at an iPDT treatment wavelength of 635 nm, and even small bvf would have a severe effect on transmission. Deoxygenation of blood is well consistent with previous findings on liquid phantoms [23]. In addition, a directly ROS-induced MetHb formation has indeed been reported [36,58–60]. PDT-induced hemoglobin deoxygenation may be the probable cause in all instances, where a high increase in tissue absorption was observed, and ROS-induced MetHb-formation can also not be excluded.

By calculating the intrinsic T1 hyperintensity strength, better quantification of the local T1 hyperintensity volume's influence on the light propagation between a CDF-pair should be achieved to correlate it with a potentially iPDT-induced absorption change. This was only partly successful, as the conclusion that a strong and large T1 hyperintensity is only observed when the absorption increase during iPDT was high is not very well-founded with  $R^2 = 0.66$ . Furthermore, it was observed that the T1 hyperintensity strength was relatively small between many CDF-pairs, although a high  $\Delta\mu_a$  was calculated. With the observed  $\Delta\mu_a$  being higher than expected if only induced by oxygenated blood, hemoglobin deoxygenation, or even MetHb production by iPDT have to be considered.

Assuming that CDF insertion leads to an intercranial hemorrhage, this would usually be followed by a hyperacute stage, during which predominantly HbO<sub>2</sub> is expected in the tissue, followed by an acute stage, where Hb is formed within 24–48 h after onset of the hemorrhage. Only after 2–7 days, intrinsic T1 hyperintensity is usually expected as a consequence of the MetHb formation [24,61]. Due to oxygen consumption during the iPDT procedure, hemoglobin deoxygenation may occur more rapidly, and MetHb formation may be accelerated. Thus, the intrinsic T1 hyperintensity occurring already one day after iPDT could be explained.

With the observed intrinsic T1 hyperintensity and increase in tissue absorption, possible detrimental effects on the iPDT efficacy need to be addressed. With increasing tissue absorption, the initial light dosimetry may become invalid, potentially leading to under-treatment. While increased absorption leads to decreased light penetration depth, the implications for the treatment depth are not so clear because photobleaching of PpIX is a further decisive factor. Due to the high light dose applied, complete photobleaching—and, thus, induced tissue damage—can be achieved. Indeed, there is no case in the performed SOM measurements where residual fluorescence was found after iPDT—independent of CDF separation, pre iPDT absorption, or absorption change. Of course, when there is no detectable treatment light transmission signal before iPDT, a lack of fluorescence signal cannot be interpreted as a lack of PpIX. However, in all cases with a detectable treatment light transmission signal after iPDT, complete PpIX photobleaching could be confirmed. In the cases with treatment light transmission signal before but without treatment light transmission signal after iPDT, more detailed time-dependent SOM recordings would be required to unravel when during the treatment absorption increase and fluorescence decrease occurred. Overall, it can be expected that there will be an effective light dose applied throughout the entire contrast enhanced tumor volume. However, as far as penetration into the infiltration zone outside the contrast-enhanced tumor volume is concerned, higher absorption would lead to a smaller necrosis depth.

The induction of necrosis requires PpIX activation and oxygen consumption for ROS generation. One may speculate that the estimated absorption increase in tissue should be higher for CDF-pairs with detectable PpIX fluorescence signal at iPDT start and subsequent local intrinsic T1 hyperintensity. Indeed a tendency towards a stronger absorption increase in the tissue for these CDF-pairs could be observed. Furthermore, the results also indicated that for CDF-pairs with no PpIX fluorescence, the increase in tissue absorption is smaller, or even a decrease may happen. Undetectable PpIX fluorescence does not necessarily mean that no PpIX was accumulated in the tumor, as the detected PpIX fluorescence signal depends on the localization of the PpIX relative to the CDF-pair and on tissue inhomogeneities inducing inhomogeneous optical tissue properties. So, there is the possibility of a sufficient PpIX amount present in the tumor for iPDT but not causing detectable PpIX fluorescence pre iPDT.

For the quantitative analysis of optical tissue properties, absolute values of the absorption coefficient  $\mu_a$  were calculated based on the diffusion approximation of the radiative transfer equation. Unlike the directly measured treatment light transmission signals, the computed values for  $\mu_a$  are independent of interfiber separation. The applied diffusion approximation assumes homogeneous optical tissue properties, so the possibility of individual  $\mu_a$  values in different tissue regions is disregarded. Thus, only an averaged  $\mu_a$  value could be computed for the volume surrounding a CDF-pair [33]. This affects the comparability of the obtained  $\mu_a$  values (range: 0.02–0.22 mm<sup>-1</sup>) with optical properties of brain tissue (white matter, grey matter, glioblastoma) in the literature (range 0.02–0.08 mm<sup>-1</sup>) [62–64]. Therefore, the obtained results might be overestimated due to the assumption of a constant  $\mu_s' = 2$  mm<sup>-1</sup>, so differing  $\mu_s'$  values for brain tissue (range 1.0–6.0 mm<sup>-1</sup>) are neglected.

Finally, it must be mentioned that the data amount was limited due to the low number of iPDT cases. Further data had to be excluded due to sophisticated technical demands issues for this analysis, e.g., incorrectly measured spectral data or MRI sequences that were not comparable to the others. In some iPDT cases, SOM was only performed for a selection of CDF-pairs, to decrease measurement time and, therefore, minimize patient load. A revised, dedicated iPDT protocol with optimized equipment might allow to speed up the SOM data acquisition process and increase the available data amount. In addition, these technical and clinical constraints limit the statistical power of the data. The calculated p-values, even if they are low, should be carefully interpreted as only indicating tendencies. To obtain results with stronger significance, future analyses on larger patient collectives are necessary, ideally using improved automated SOM concepts.

The overall aim of the presented investigation and future work should be to derive additional information from different monitoring applications (e.g., SOM, MRI, PET) by combining them and comparing abnormalities to further improve iPDT procedure, both clinically and technically. This also contributes to gain more detailed insight into the phototoxic reactions in the target tissue. With enhanced interpretation of the recorded spectral and MRI data sets, the benefit of the patients suffering from this kind of cancer with a bad prognosis may be further improved.

## 5. Conclusions

SOM measurements enable an individual intra-operative assessment of absorption and fluorescence. With calibrated detectors, known trajectory coordinates, and laser light powers, one can calculate optical parameters of perfused viable tumor tissue in situ, at least in the form of mean values, albeit their detailed spatial distribution cannot be derived. This should lead to a much more reliable database of optical properties of GBM tissue, in particular for in vivo interventions. If optical parameters in individual patients or locations should turn out to strongly deviate from the mean values, a personalized irradiation time might at least partly compensate for this condition.

Frequently, an increase in absorption between measurements before and after iPDT was observed, which correlated with early postoperative intrinsic T1 hyperintensity in non-contrast-enhanced T1-weighted MRI data. This may indicate that clinically silent



hemorrhage was induced during cylindrical diffuser fiber insertion. During iPDT, a ROS-driven accelerated hemoglobin deoxygenation and conversion to MetHb may then occur and may impair the irradiation efficacy. However, the fraction of tumor volume affected by T1 hyperintensity was below 28% in all cases (<10% in most cases). Substantial PDT-related effects will thus be induced in the tumor region, even in non-ideal situations.

On the basis of these results, additional evaluations and research should allow for further elucidation on the mechanisms of iPDT-related changes in tissue absorption and intrinsic T1 hyperintensity.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.A., C.H., H.S. and A.R.; methodology, M.A., C.H., H.S. and B.E.-W.; software, M.A. and A.R.; validation, S.Q., B.E.-W. and A.R.; formal analysis, M.A. and B.E.-W.; investigation, M.A., C.H. and S.Q.; resources N.T. and A.R.; data curation, R.S., H.S. and A.R.; writing—original draft preparation, M.A. and H.S.; writing—review and editing, C.H., S.Q., B.E.-W., R.S., N.T. and A.R.; visualization, M.A.; supervision, R.S., N.T. and A.R.; project administration, R.S., N.T. and A.R.; funding acquisition, R.S. and A.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the German Research Foundation (DFG) in terms of the research training group (RTG) GRK2274.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany (reference number 335-16).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

**Acknowledgments:** We gratefully acknowledge Alexander Buchner for assistance with statistical questions and Christoph Barth for technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

1. Stupp, R.; Hegi, M.E.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Taphoorn, M.J.B.; Janzer, R.C.; Ludwin, S.K.; Allgeier, A.; Fisher, B.; Belanger, K.; et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* **2009**, *10*, 459–466. [[CrossRef](#)]
2. Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.B.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 987–996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Muller, P.J.; Wilson, B.C. Photodynamic therapy: Cavitory photoillumination of malignant cerebral tumours using a laser coupled inflatable balloon. *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Des. Sci. Neurol.* **1985**, *12*, 371–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kostron, H.; Fritsch, E.; Grunert, V. Photodynamic therapy of malignant brain tumours: A phase I/II trial. *Br. J. Neurosurg.* **1988**, *2*, 241–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Stepp, H.; Stummer, W. 5-ALA in the management of malignant glioma: 5-ala in malignant gliomas. *Lasers Surg. Med.* **2018**, *50*, 399–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Beck, T.J.; Kreth, F.W.; Beyer, W.; Mehrkens, J.H.; Obermeier, A.; Stepp, H.; Stummer, W.; Baumgartner, R. Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. *Lasers Surg. Med.* **2007**, *39*, 386–393. [[CrossRef](#)]
7. Johansson, A.; Faber, F.; Kniebühler, G.; Stepp, H.; Sroka, R.; Egensperger, R.; Beyer, W.; Kreth, F.-W. Protoporphyrin IX Fluorescence and Photobleaching During Interstitial Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas for Early Treatment Prognosis: Fluorescence for Treatment Prognosis in Glioma pdt. *Lasers Surg. Med.* **2013**, *45*, 225–234. [[CrossRef](#)]
8. Schwartz, C.; Stepp, H.; Rühm, A.; Tonn, J.-C.; Kreth, S.; Kreth, F.-W. Interstitial Photodynamic Therapy for De-Novo Glioblastoma Multiforme WHO IV: A Feasibility Study. In Proceedings of the 66th Annual Meeting of the German Society of Neurosurgery (DGNC), Karlsruhe, Germany, 7–10 June 2015.

9. Vermandel, M.; Dupont, C.; Lecomte, F.; Leroy, H.A.; Tuleasca, C.; Mordon, S.; Hadjipanayis, C.G.; Reyns, N. Standardized intraoperative 5-ALA photodynamic therapy for newly diagnosed glioblastoma patients: A preliminary analysis of the INDYGO clinical trial. *J. Neurooncol.* **2021**, *152*, 501–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Lietke, S.; Schmutzer, M.; Schwartz, C.; Weller, J.; Siller, S.; Aumiller, M.; Heckl, C.; Forbrig, R.; Niyazi, M.; Egensperger, R.; et al. Interstitial Photodynamic Therapy Using 5-ALA for Malignant Glioma Recurrences. *Cancers* **2021**, *13*, 1767. [[CrossRef](#)]
11. Collaud, S.; Juzeniene, A.; Moan, J.; Lange, N. On the selectivity of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX formation. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2004**, *4*, 301–316. [[CrossRef](#)]
12. Stummer, W.; Pichlmeier, U.; Meinel, T.; Wiestler, O.D.; Zanella, F.; Reulen, H.J.; Group, A.L.-G.S. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: A randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* **2006**, *7*, 392–401. [[CrossRef](#)]
13. Malik, Z. Fundamentals of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy and diagnosis: An overview. *Transl. Biophotonics* **2020**, *2*, e201900022. [[CrossRef](#)]
14. Johansson, A.; Kreth, F.-W.; Stummer, W.; Stepp, H. Interstitial Photodynamic Therapy of Brain Tumors. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **2010**, *16*, 841–853. [[CrossRef](#)]
15. Potter, W.R.; Mang, T.S.; Dougherty, T.J. The theory of photodynamic therapy dosimetry: Consequences of photo-destruction of sensitizer. *Photochem. Photobiol.* **1987**, *46*, 97–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Mang, T.S.; Dougherty, T.J.; Potter, W.R.; Boyle, D.G.; Somer, S.; Moan, J. Photobleaching of porphyrins used in photodynamic therapy and implications for therapy. *Photochem. Photobiol.* **1987**, *45*, 501–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Dupont, C.; Vermandel, M.; Leroy, H.-A.; Quidet, M.; Lecomte, F.; Delhem, N.; Mordon, S.; Reyns, N. INtraoperative photo-DYnamic Therapy for GliOblastomas (INDYGO): Study Protocol for a Phase I Clinical Trial. *Neurosurgery* **2019**, *84*, E414–E419. [[CrossRef](#)]
18. Schipmann, S.; Mütther, M.; Stögbauer, L.; Zimmer, S.; Brokinkel, B.; Holling, M.; Grauer, O.; Suero Molina, E.; Warneke, N.; Stummer, W. Combination of ALA-induced fluorescence-guided resection and intraoperative open photodynamic therapy for recurrent glioblastoma: Case series on a promising dual strategy for local tumor control. *J. Neurosurg.* **2020**, *134*, 426–436. [[CrossRef](#)]
19. Baran, T.M.; Foster, T.H. New Monte Carlo model of cylindrical diffusing fibers illustrates axially heterogeneous fluorescence detection: Simulation and experimental validation. *J. Biomed. Opt.* **2011**, *16*, 085003. [[CrossRef](#)]
20. Prah, S. Optical Absorption of Hemoglobin. Available online: <https://omlc.org/spectra/hemoglobin/index.html> (accessed on 30 March 2021).
21. Johansson, A.; Johansson, T.; Thompson, M.S.; Bendsoe, N.; Svanberg, K.; Svanberg, S.; Andersson-Engels, S. In vivo measurement of parameters of dosimetric importance during interstitial photodynamic therapy of thick skin tumors. *J. Biomed. Opt.* **2006**, *11*, 34029. [[CrossRef](#)]
22. Heckl, C.; Eisel, M.; Lang, A.; Homann, C.; Paal, M.; Vogeser, M.; Rühm, A.; Sroka, R. Spectroscopic methods to quantify molecules of the heme-biosynthesis pathway: A review of laboratory work and point-of-care approaches. *Transl. Biophotonics* **2021**, *3*, e202000026. [[CrossRef](#)]
23. Heckl, C.; Aumiller, M.; Rühm, A.; Sroka, R.; Stepp, H. Fluorescence and Treatment Light Monitoring for Interstitial Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **2020**, *96*, 388–396. [[CrossRef](#)]
24. Bradley, W.G. MR appearance of hemorrhage in the brain. *Radiology* **1993**, *189*, 15–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Federica, M.; Maurizio, P.; Giancarlo, A.; Valeria, C. Neuroimaging in Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* **2014**, *45*, 903–908. [[CrossRef](#)]
26. Kidwell, C.S.; Wintermark, M. Imaging of intracranial haemorrhage. *Lancet Neurol.* **2008**, *7*, 256–267. [[CrossRef](#)]
27. Saad, A.F.; Chaudhari, R.; Fischbein, N.J.; Wintermark, M. Intracranial Hemorrhage Imaging. *Semin. Ultrasound CT MRI* **2018**, *39*, 441–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Siddiqui, F.M.; Bekker, S.V.; Qureshi, A.I. Neuroimaging of Hemorrhage and Vascular Defects. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **2011**, *8*, 28–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Rühm, A.; Stepp, H.; Beyer, W.; Hennig, G.; Pongratz, T.; Sroka, R.; Schnell, O.; Tonn, J.-C.; Kreth, F.-W. 5-ALA based photodynamic management of glioblastoma. In Proceedings of the SPIE, Optical Techniques in Neurosurgery, Neurophotonics, and Optogenetics, SPIE BiOS, San Francisco, CA, USA, 1–6 February 2014; 89280E. [[CrossRef](#)]
30. Powers, S.K.; Cush, S.S.; Walstad, D.L.; Kwock, L. Stereotactic intratumoral photodynamic therapy for recurrent malignant brain tumors. *Neurosurgery* **1991**, *29*, 688–696. [[CrossRef](#)]
31. Stepp, H.; Beck, T.; Pongratz, T.; Meinel, T.; Kreth, F.W.; Tonn, J.; Stummer, W. ALA and malignant glioma: Fluorescence-guided resection and photodynamic treatment. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **2007**, *26*, 157–164. [[CrossRef](#)]
32. Martelli, F. *Light Propagation through Biological Tissue and Other Diffusive Media: Theory, Solutions, and Software*; SPIE Press: Bellingham, WA, USA, 2009; Chapter 2–4; pp. 9–89. ISBN 978-0-8194-7658-6.
33. Wang, L.V.; Wu, H.-I. *Biomedical Optics: Principles and Imaging*; Wiley-Interscience, John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2012; Chapter 5; pp. 83–118. ISBN 978-0-471-74304-0.
34. Dupont, C.; Vignion, A.-S.; Mordon, S.; Reyns, N.; Vermandel, M. Photodynamic therapy for glioblastoma: A preliminary approach for practical application of light propagation models: Photodynamic Therapy for Glioblastoma. *Lasers Surg. Med.* **2018**, *50*, 523–534. [[CrossRef](#)]

35. Jacques, S.L. Optical properties of biological tissues: A review. *Phys. Med. Biol.* **2013**, *58*, R37–R61. [[CrossRef](#)]
36. Randeberg, L.L.; Bonesrønning, J.H.; Dalaker, M.; Nelson, J.S.; Svaasand, L.O. Methemoglobin formation during laser induced photothermolysis of vascular skin lesions: Methemoglobin Formation. *Lasers Surg. Med.* **2004**, *34*, 414–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Hennig, G.; Homann, C.; Teksan, I.; Hasbargen, U.; Hasmüller, S.; Holdt, L.M.; Khaled, N.; Sroka, R.; Stauch, T.; Stepp, H.; et al. Non-invasive detection of iron deficiency by fluorescence measurement of erythrocyte zinc protoporphyrin in the lip. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10776. [[CrossRef](#)]
38. Maes, F.; Collignon, A.; Vandermeulen, D.; Marchal, G.; Suetens, P. Multimodality image registration by maximization of mutual information. *IEEE Trans. Med. Imaging* **1997**, *16*, 187–198. [[CrossRef](#)]
39. Avants, B.B.; Tustison, N.; Johnson, H. Advanced Normalization Tools (ANTs). *Insight J.* **2009**, *2*, 1–35.
40. Yushkevich, P.A.; Piven, J.; Hazlett, H.C.; Smith, R.G.; Ho, S.; Gee, J.C.; Gerig, G. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability. *NeuroImage* **2006**, *31*, 1116–1128. [[CrossRef](#)]
41. Dice, L.R. Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. *Ecology* **1945**, *26*, 297–302. [[CrossRef](#)]
42. Jaccard, P. The Distribution of the Flora in the Alpine Zone.1. *New Phytol.* **1912**, *11*, 37–50. [[CrossRef](#)]
43. Besemer, A.E.; Titz, B.; Grudzinski, J.J.; Weichert, J.P.; Kuo, J.S.; Robins, H.I.; Hall, L.T.; Bednarz, B.P. Impact of PET and MRI threshold-based tumor volume segmentation on patient-specific targeted radionuclide therapy dosimetry using CLR1404. *Phys. Med. Biol.* **2017**, *62*, 6008–6025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lohmann, P.; Stavrinou, P.; Lipke, K.; Bauer, E.K.; Ceccon, G.; Werner, J.-M.; Neumaier, B.; Fink, G.R.; Shah, N.J.; Langen, K.-J.; et al. FET PET reveals considerable spatial differences in tumour burden compared to conventional MRI in newly diagnosed glioblastoma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2019**, *46*, 591–602. [[CrossRef](#)]
45. Cassidy, J.; Nouri, A.; Betz, V.; Lilge, L. High-performance, robustly verified Monte Carlo simulation with FullMonte. *J. Biomed. Opt.* **2018**, *23*, 1. [[CrossRef](#)]
46. Ahrens, J.; Geveci, B.; Law, C. ParaView: An End-User Tool for Large-Data Visualization. In *Visualization Handbook*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2005; pp. 717–731.
47. Beck, T.J.; Beyer, W.; Pongratz, T.; Stummer, W.; Stepp, H.; Wagner, S.; Baumgartner, R. Clinical Determination of Tissue Optical Properties in vivo by Spatially Resolved Reflectance Measurements. In Proceedings of the SPIE, European Conference on Biomedical Optics, Munich, Germany, 22 June 2003; p. 5138\_96. [[CrossRef](#)]
48. Ginat, D.T.; Meyers, S.P. Intracranial Lesions with High Signal Intensity on T1-weighted MR Images: Differential Diagnosis. *RadioGraphics* **2012**, *32*, 499–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Ginat, D.T.; Schaefer, P.W.; Moisi, M.D. Imaging the Intraoperative and Postoperative Brain. In *Atlas of Postsurgical Neuroradiology: Imaging of the Brain, Spine, Head, and Neck*; Ginat, D.T., Westesson, P.-L.A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; pp. 183–258.
50. Kane, J.R. The Role of Brain Vasculature in Glioblastoma. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 6645–6653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Kreth, F.W.; Muacevic, A.; Medele, R.; Bise, K.; Meyer, T.; Reulen, H.J. The risk of haemorrhage after image guided stereotactic biopsy of intra-axial brain tumours—A prospective study. *Acta Neurochir.* **2001**, *143*, 539–545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Kulkarni, A.V.; Guha, A.; Lozano, A.; Bernstein, M. Incidence of silent hemorrhage and delayed deterioration after stereotactic brain biopsy. *J. Neurosurg.* **1998**, *89*, 31–35. [[CrossRef](#)]
53. Casanova, F.; Carney, P.R.; Sarntinoranont, M. Effect of needle insertion speed on tissue injury, stress, and backflow distribution for convection-enhanced delivery in the rat brain. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e94919. [[CrossRef](#)]
54. Casanova, F.; Carney, P.R.; Sarntinoranont, M. In vivo evaluation of needle force and friction stress during insertion at varying insertion speed into the brain. *J. Neurosci. Methods* **2014**, *237*, 79–89. [[CrossRef](#)]
55. Wen, P.Y.; Macdonald, D.R.; Reardon, D.A.; Cloughesy, T.F.; Sorensen, A.G.; Galanis, E.; Degroot, J.; Wick, W.; Gilbert, M.R.; Lassman, A.B.; et al. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: Response assessment in neuro-oncology working group. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 1963–1972. [[CrossRef](#)]
56. Unterrainer, M.; Fleischmann, D.F.; Diekmann, C.; Vomacka, L.; Lindner, S.; Vettermann, F.; Brendel, M.; Wenter, V.; Ertl-Wagner, B.; Herms, J.; et al. Comparison of (18)F-GE-180 and dynamic (18)F-FET PET in high grade glioma: A double-tracer pilot study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2019**, *46*, 580–590. [[CrossRef](#)]
57. Schucht, P.; Knittel, S.; Slotboom, J.; Seidel, K.; Murek, M.; Jilch, A.; Raabe, A.; Beck, J. 5-ALA complete resections go beyond MR contrast enhancement: Shift corrected volumetric analysis of the extent of resection in surgery for glioblastoma. *Acta Neurochir.* **2014**, *156*, 305–312. [[CrossRef](#)]
58. Andrade, C.T.d.; Nogueira, M.S.; Kanick, S.C.; Marra, K.; Gunn, J.; Andreozzi, J.; Samkoe, K.S.; Kurachi, C.; Pogue, B.W. Optical Spectroscopy of Radiotherapy and Photodynamic Therapy Responses in Normal Rat Skin Shows Vascular Breakdown Products. In Proceedings of the Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic, Therapy XXV, SPIE BiOS, San Francisco, CA, USA, 13–18 February 2016; p. 969410. [[CrossRef](#)]
59. Hamada, R.; Ogawa, E.; Arai, T. Continuous Optical Monitoring of Red Blood Cells During a Photosensitization Reaction. *Photobiomodul. Photomed. Laser Surg.* **2019**, *37*, 110–116. [[CrossRef](#)]
60. Larsen, E.L.P.; Randeberg, L.L.; Gederaas, O.A.; Krokan, H.E.; Hjelle, D.R.; Svaasand, L.O. In Vitro Study on Methemoglobin Formation in Erythrocytes Following Hexyl-Aminolevulinic Acid Induced Photodynamic Therapy. In Proceedings of the Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XVI, San Jose, CA, USA, 20–25 January 2007; p. 642719-3. [[CrossRef](#)]

61. Anzalone, N.; Scotti, R.; Riva, R. Neuroradiologic differential diagnosis of cerebral intraparenchymal hemorrhage. *Neurol. Sci.* **2004**, *25*, s3–s5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Gebhart, S.C.; Lin, W.C.; Mahadevan-Jansen, A. In vitro determination of normal and neoplastic human brain tissue optical properties using inverse adding-doubling. *Phys. Med. Biol.* **2006**, *51*, 2011–2027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Yaroslavsky, A.N.; Schulze, P.C.; Yaroslavsky, I.V.; Schober, R.; Ulrich, F.; Schwarzmaier, H.-J. Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range. *Phys. Med. Biol.* **2002**, *47*, 2059–2073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Bevilacqua, F.; Piguët, D.; Marquet, P.; Gross, J.D.; Tromberg, B.J.; Depeursinge, C. In vivo local determination of tissue optical properties: Applications to human brain. *Appl. Opt.* **1999**, *38*, 4939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

---

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] S. Lietke *et al.*, "Interstitial Photodynamic Therapy Using 5-ALA for Malignant Glioma Recurrences," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 8, Apr 7 2021.
- [2] M. Aumiller *et al.*, "Interrelation between Spectral Online Monitoring and Postoperative T1-Weighted MRI in Interstitial Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas," *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 1, Dec 27 2021.
- [3] J. D. Weingart, M. J. McGirt, and H. Brem, "High-Grade Astrocytoma/Glioblastoma," in *Neuro-Oncology of CNS Tumors*, J.-C. Tonn, S. A. Grossman, J. T. Rutka, and M. Westphal, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006, pp. 127-138.
- [4] M. Weller *et al.*, "EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood," *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 18, no. 3, pp. 170-186, Mar 2021.
- [5] Q. T. Ostrom, G. Cioffi, K. Waite, C. Kruchko, and J. S. Barnholtz-Sloan, "CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018," *Neuro Oncol*, vol. 23, no. 12 Suppl 2, pp. iii1-iii105, Oct 5 2021.
- [6] R. Koch-Institut, "Krebs in Deutschland für 2017/2018," (in de), p. 172.
- [7] K. D. Miller *et al.*, "Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, <https://doi.org/10.3322/caac.21693> vol. 71, no. 5, pp. 381-406, 2021/09/01 2021.
- [8] B. K. Rasmussen *et al.*, "Epidemiology of glioma: clinical characteristics, symptoms, and predictors of glioma patients grade I-IV in the the Danish Neuro-Oncology Registry," *J Neurooncol*, vol. 135, no. 3, pp. 571-579, Dec 2017.
- [9] J. P. Posti *et al.*, "Presenting symptoms of glioma in adults," *Acta Neurol Scand*, vol. 131, no. 2, pp. 88-93, Feb 2015.
- [10] M. C. M. Peeters *et al.*, "Prediagnostic symptoms and signs of adult glioma: the patients' view," *J Neurooncol*, vol. 146, no. 2, pp. 293-301, Jan 2020.
- [11] T. Rice *et al.*, "Understanding inherited genetic risk of adult glioma - a review," *Neurooncol Pract*, vol. 3, no. 1, pp. 10-16, Mar 2016.
- [12] H. Ohgaki and P. Kleihues, "Epidemiology and etiology of gliomas," *Acta Neuropathologica*, vol. 109, no. 1, pp. 93-108, 2005/01/01 2005.
- [13] P. C. W. K. I. A. f. R. o. C. Kleihues, *Pathology and genetics of tumours of the nervous system*. Lyon: IARC Press, 2000.
- [14] M. Olivier *et al.*, "Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype," *Cancer Res*, vol. 63, no. 20, pp. 6643-50, Oct 15 2003.
- [15] N. Upadhyay and A. D. Waldman, "Conventional MRI evaluation of gliomas," *Br J Radiol*, vol. 84 Spec No 2, pp. S107-11, Dec 2011.

- 
- [16] W. Rachinger, S. Grau, M. Holtmannspotter, J. Herms, J. C. Tonn, and F. W. Kreth, "Serial stereotactic biopsy of brainstem lesions in adults improves diagnostic accuracy compared with MRI only," *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, vol. 80, no. 10, pp. 1134-9, Oct 2009.
- [17] D. N. Louis *et al.*, "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary," *Acta Neuropathol*, vol. 131, no. 6, pp. 803-20, Jun 2016.
- [18] D. N. Louis *et al.*, "The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary," *Neuro Oncol*, vol. 23, no. 8, pp. 1231-1251, Aug 2 2021.
- [19] D. N. Louis *et al.*, "cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading," *Brain Pathol*, vol. 30, no. 4, pp. 844-856, Jul 2020.
- [20] D. J. Brat *et al.*, "cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for "Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV"," *Acta Neuropathol*, vol. 136, no. 5, pp. 805-810, Nov 2018.
- [21] A. Wieland *et al.*, "Brain and Breast Cancer Cells with PTEN Loss of Function Reveal Enhanced Durotaxis and RHOB Dependent Amoeboid Migration Utilizing 3D Scaffolds and Aligned Microfiber Tracts," *Cancers*, vol. 13, no. 20, 2021.
- [22] K. A. van Nifterik *et al.*, "Genetic profiling of a distant second glioblastoma multiforme after radiotherapy: Recurrence or second primary tumor?," *J Neurosurg*, vol. 105, no. 5, pp. 739-44, Nov 2006.
- [23] M. E. Hegi *et al.*, "MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma," *New England Journal of Medicine*, vol. 352, no. 10, pp. 997-1003, 2005.
- [24] M. C. Mabray, R. F. Barajas, Jr., and S. Cha, "Modern brain tumor imaging," *Brain Tumor Res Treat*, vol. 3, no. 1, pp. 8-23, Apr 2015.
- [25] R. L. Wei and X. T. Wei, "Advanced Diagnosis of Glioma by Using Emerging Magnetic Resonance Sequences," *Front Oncol*, vol. 11, p. 694498, 2021.
- [26] L. B. Morgenstern and R. F. Frankowski, "Brain tumor masquerading as stroke," *J Neurooncol*, vol. 44, no. 1, pp. 47-52, Aug 1999.
- [27] A. Morotti and J. N. Goldstein, "Diagnosis and Management of Acute Intracerebral Hemorrhage," *Emerg Med Clin North Am*, vol. 34, no. 4, pp. 883-899, Nov 2016.
- [28] A. Oprisan and B. O. Popescu, "Intracranial cysts: an imagery diagnostic challenge," *ScientificWorldJournal*, vol. 2013, p. 172154, 2013.
- [29] B. M. Ellingson *et al.*, "Consensus recommendations for a standardized Brain Tumor Imaging Protocol in clinical trials," *Neuro Oncol*, vol. 17, no. 9, pp. 1188-98, Sep 2015.
- [30] P. Lohmann *et al.*, "FET PET reveals considerable spatial differences in tumour burden compared to conventional MRI in newly diagnosed glioblastoma," (in en), *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 46, no. 3, pp. 591-602, 3/2019 2019.

- 
- [31] N. L. Albert *et al.*, "Response Assessment in Neuro-Oncology working group and European Association for Neuro-Oncology recommendations for the clinical use of PET imaging in gliomas," *Neuro Oncol*, vol. 18, no. 9, pp. 1199-208, Sep 2016.
- [32] B. R. J. van Dijken, P. J. van Laar, M. Smits, J. W. Dankbaar, R. H. Enting, and A. van der Hoorn, "Perfusion MRI in treatment evaluation of glioblastomas: Clinical relevance of current and future techniques," *J Magn Reson Imaging*, vol. 49, no. 1, pp. 11-22, Jan 2019.
- [33] D. Fussell and R. Young, "Role of MRI perfusion in improving the treatment of brain tumors," *Imaging in Medicine*, vol. 5, pp. 407-426, 10/01 2013.
- [34] A. Berger, "How does it work? Positron emission tomography," *BMJ*, vol. 326, no. 7404, p. 1449, Jun 28 2003.
- [35] A. E. Besemer *et al.*, "Impact of PET and MRI threshold-based tumor volume segmentation on patient-specific targeted radionuclide therapy dosimetry using CLR1404," (in eng), *Physics in Medicine and Biology*, vol. 62, no. 15, pp. 6008-6025, Jul 06, 2017 2017.
- [36] S. Eigenbrod *et al.*, "Molecular stereotactic biopsy technique improves diagnostic accuracy and enables personalized treatment strategies in glioma patients," *Acta Neurochir (Wien)*, vol. 156, no. 8, pp. 1427-40, Aug 2014.
- [37] C. A. Hamisch *et al.*, "Frame-based stereotactic biopsy of deep-seated and midline structures in 511 procedures: feasibility, risk profile, and diagnostic yield," *Acta Neurochir (Wien)*, vol. 161, no. 10, pp. 2065-2071, Oct 2019.
- [38] F. W. Kreth, A. Muacevic, R. Medele, K. Bise, T. Meyer, and H.-J. Reulen, "The Risk of Haemorrhage after Image Guided Stereotactic Biopsy of Intra-Axial Brain Tumours - A Prospective Study," (in en), *Acta Neurochirurgica*, vol. 143, no. 6, pp. 539-546, 2001-6-1 2001.
- [39] F. W. Kreth, P. C. Warnke, and C. B. Ostertag, "[The value of stereotactic biopsy and percutaneous radiation in therapy of glioblastoma multiforme]," *Nervenarzt*, vol. 63, no. 8, pp. 480-4, Aug 1992. Wertigkeit der stereotaktischen Biopsie und der perkutanen Radiatio in der Therapie des Glioblastoma multiforme.
- [40] D. J. Brat *et al.*, "cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas," *Acta Neuropathol*, vol. 139, no. 3, pp. 603-608, Mar 2020.
- [41] S. Han *et al.*, "IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets," *Br J Cancer*, vol. 122, no. 11, pp. 1580-1589, May 2020.
- [42] P. Nandakumar, A. Mansouri, and S. Das, "The Role of ATRX in Glioma Biology," *Front Oncol*, vol. 7, p. 236, 2017.
- [43] B. Heidenreich, P. S. Rachakonda, K. Hemminki, and R. Kumar, "TERT promoter mutations in cancer development," *Curr Opin Genet Dev*, vol. 24, pp. 30-7, Feb 2014.
- [44] S. L. Gerson, "MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics," *Nat Rev Cancer*, vol. 4, no. 4, pp. 296-307, Apr 2004.

- 
- [45] W. Stummer and H. J. Steiger, "Resection of glioblastoma," *J Neurosurg*, vol. 96, no. 4, pp. 809-10; author reply 810, Apr 2002.
- [46] A. M. Molinaro *et al.*, "Association of Maximal Extent of Resection of Contrast-Enhanced and Non-Contrast-Enhanced Tumor With Survival Within Molecular Subgroups of Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma," *JAMA Oncol*, vol. 6, no. 4, pp. 495-503, Apr 1 2020.
- [47] M. M. Grabowski *et al.*, "Residual tumor volume versus extent of resection: predictors of survival after surgery for glioblastoma," *J Neurosurg*, vol. 121, no. 5, pp. 1115-23, Nov 2014.
- [48] P. Schucht *et al.*, "5-ALA complete resections go beyond MR contrast enhancement: shift corrected volumetric analysis of the extent of resection in surgery for glioblastoma," (in en), *Acta Neurochirurgica*, vol. 156, no. 2, pp. 305-312, 2/2014 2014.
- [49] B. Suchorska *et al.*, "Complete resection of contrast-enhancing tumor volume is associated with improved survival in recurrent glioblastoma—results from the DIRECTOR trial," *Neuro-Oncology*, vol. 18, no. 4, pp. 549-556, 2015.
- [50] W. Stummer, H. J. Reulen, A. Novotny, H. Stepp, and J. C. Tonn, "Fluorescence-guided resections of malignant gliomas--an overview," *Acta Neurochir Suppl*, vol. 88, pp. 9-12, 2003.
- [51] W. Stummer *et al.*, "Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial," (in eng), *The Lancet. Oncology*, vol. 7, no. 5, pp. 392-401, May 2006 2006.
- [52] H. Stepp and W. Stummer, "5-ALA in the management of malignant glioma: 5-ALA IN MALIGNANT GLIOMAS," (in en), *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 50, no. 5, pp. 399-419, 07/2018 2018.
- [53] S. Collaud, A. Juzeniene, J. Moan, and N. Lange, "On the selectivity of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX formation," *Curr Med Chem Anticancer Agents*, vol. 4, no. 3, pp. 301-16, May 2004.
- [54] L. Lilge and B. C. Wilson, "Photodynamic therapy of intracranial tissues: a preclinical comparative study of four different photosensitizers," *J Clin Laser Med Surg*, vol. 16, no. 2, pp. 81-91, Apr 1998.
- [55] R. Stupp *et al.*, "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial," (in eng), *The Lancet. Oncology*, vol. 10, no. 5, pp. 459-466, May 2009 2009.
- [56] R. Stupp *et al.*, "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma," (in eng), *The New England Journal of Medicine*, vol. 352, no. 10, pp. 987-996, Mar 10, 2005 2005.
- [57] R. Stupp *et al.*, "Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial," *JAMA*, vol. 318, no. 23, pp. 2306-2316, Dec 19 2017.



- 
- [58] O. Rominiyi, A. Vanderlinden, S. J. Clenton, C. Bridgewater, Y. Al-Tamimi, and S. J. Collis, "Correction: Tumour treating fields therapy for glioblastoma: current advances and future directions," *Br J Cancer*, vol. 125, no. 4, p. 623, Aug 2021.
- [59] O. Rominiyi, A. Vanderlinden, S. J. Clenton, C. Bridgewater, Y. Al-Tamimi, and S. J. Collis, "Tumour treating fields therapy for glioblastoma: current advances and future directions," *Br J Cancer*, vol. 124, no. 4, pp. 697-709, Feb 2021.
- [60] E. Barbarite *et al.*, "The role of brachytherapy in the treatment of glioblastoma multiforme," *Neurosurg Rev*, vol. 40, no. 2, pp. 195-211, Apr 2017.
- [61] J. Watson *et al.*, "Long-term outcome of stereotactic brachytherapy with temporary Iodine-125 seeds in patients with WHO grade II gliomas," *Radiat Oncol*, vol. 15, no. 1, p. 275, Dec 9 2020.
- [62] B. Huang, X. Li, Y. Li, J. Zhang, Z. Zong, and H. Zhang, "Current Immunotherapies for Glioblastoma Multiforme," *Front Immunol*, vol. 11, p. 603911, 2020.
- [63] M. B. Buxton *et al.*, "GBM AGILE: A global, phase II/III adaptive platform trial to evaluate multiple regimens in newly diagnosed and recurrent glioblastoma," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 38, no. 15\_suppl, pp. TPS2579-TPS2579, 2020/05/20 2020.
- [64] F. Martelli, *Light Propagation Through Biological Tissue and Other Diffusive Media: Theory, Solutions, and Software*. SPIE Press, 2010, p. 274.
- [65] L. V. Wang and H.-i. Wu, *Biomedical Optics: Principles and Imaging*. John Wiley & Sons, 2012, p. 379.
- [66] P. Bouguer, "Essai d'optique, Sur la gradation de la lumière," *Claude Jombert*, 1729.
- [67] J. H. Lambert, "Photometria, sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae. Sumptibus Viduae," *Erberhardi Klett, Augsburg*, 1760.
- [68] A. Beer, "Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten," *Annalen der Physik*, vol. 162, pp. 78-88, 1852.
- [69] J.-L. Soret, "Analyse spectrale: Sur le spectre d'absorption du sang dans la partie violette et ultra-violette," *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, vol. 97, p. 2, 1883.
- [70] A. Jablonski, "Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes," *Nature*, vol. 131, no. 3319, pp. 839-840, 1933/06/01 1933.
- [71] T. M. Gonçalves, I. S. Martins, H. F. Silva, V. V. Tuchin, and L. M. Oliveira, "Spectral Optical Properties of Rabbit Brain Cortex between 200 and 1000 nm," *Photochem*, vol. 1, no. 2, 2021.
- [72] G. Mie, "Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen," *Annalen der Physik*, vol. 330, pp. 377-445, 1908.
- [73] S. Jaques and S. Prah. (1998, 08.09.2022). *Henry-Greenstein scattering function*.
- [74] L. G. Henry and J. L. Greenstein, "Diffuse Strahlung in der Galaxie," *The Astrophysical Journal*, vol. 93, p. 14, 1941.
- [75] W. F. Cheong, S. A. Prah, and A. J. Welch, "A review of the optical properties of biological tissues," *IEEE Journal of Quantum Electronics*, vol. 26, no. 12, pp. 2166-2185, 1990.

- 
- [76] T. J. Beck *et al.*, "Clinical Determination of Tissue Optical Properties in vivo by Spatially Resolved Reflectance Measurements," (in en), p. 10.
- [77] T. J. Beck *et al.*, "Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX," (in en), *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 39, no. 5, pp. 386-393, 06/2007 2007.
- [78] J. Cassidy, A. Nouri, V. Betz, and L. Lilge, "High-performance, robustly verified Monte Carlo simulation with FullMonte," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 23, no. 08, p. 1, 2018-8-10 2018.
- [79] M. M. Kim and A. Darafsheh, "Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy," *Photochemistry and Photobiology*, <https://doi.org/10.1111/php.13219> vol. 96, no. 2, pp. 280-294, 2020/03/01 2020.
- [80] A.-A. Yassine, W. Kingsford, Y. Xu, J. Cassidy, L. Lilge, and V. Betz, "Automatic interstitial photodynamic therapy planning via convex optimization," (in en), *Biomedical Optics Express*, vol. 9, no. 2, p. 898, 2018-02-01 2018.
- [81] M. Aumiller *et al.*, "MRI-based analysis of light dosimetry in 5-aminolevulinic acid mediated interstitial photodynamic therapy of malignant gliomas with Monte Carlo simulations," *in Preparation*.
- [82] S. W. Cramer and C. C. Chen, "Photodynamic Therapy for the Treatment of Glioblastoma," *Front Surg*, vol. 6, p. 81, 2019.
- [83] L. Ming, K. Cheng, Y. Chen, R. Yang, and D. Chen, "Enhancement of tumor lethality of ROS in photodynamic therapy," *Cancer Med*, vol. 10, no. 1, pp. 257-268, Jan 2021.
- [84] R. Kammerer *et al.*, "Induction of immune mediators in glioma and prostate cancer cells by non-lethal photodynamic therapy," *PLoS One*, vol. 6, no. 6, p. e21834, 2011.
- [85] I. Beltran Hernandez, Y. Yu, F. Ossendorp, M. Korbelik, and S. Oliveira, "Preclinical and Clinical Evidence of Immune Responses Triggered in Oncologic Photodynamic Therapy: Clinical Recommendations," *J Clin Med*, vol. 9, no. 2, Jan 24 2020.
- [86] L. Brancalion and H. Moseley, "Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy," *Lasers Med Sci*, vol. 17, no. 3, pp. 173-86, 2002.
- [87] R. Waidehlich *et al.*, "Whole bladder photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid using a white light source," *Urology*, vol. 61, no. 2, pp. 332-7, Feb 2003.
- [88] R. Waidehlich, H. Stepp, R. Baumgartner, E. Weninger, A. Hofstetter, and M. Kriegmair, "Clinical experience with 5-aminolevulinic acid and photodynamic therapy for refractory superficial bladder cancer," *J Urol*, vol. 165, no. 6 Pt 1, pp. 1904-7, Jun 2001.
- [89] R. A. Weersink *et al.*, "Techniques for delivery and monitoring of TOOKAD (WST09)-mediated photodynamic therapy of the prostate: clinical experience and practicalities," *J Photochem Photobiol B*, vol. 79, no. 3, pp. 211-22, Jun 1 2005.
- [90] J. Usuda *et al.*, "Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers," *J Thorac Oncol*, vol. 1, no. 5, pp. 489-93, Jun 2006.

- 
- [91] T. Y. Lee, Y. K. Cheon, and C. S. Shim, "Current status of photodynamic therapy for bile duct cancer," *Clin Endosc*, vol. 46, no. 1, pp. 38-44, Jan 2013.
- [92] L. Shi *et al.*, "Chinese guidelines on the clinical application of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in dermatology (2021 edition)," *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 35, p. 102340, Sep 2021.
- [93] C. Fritsch and T. Ruzicka, "Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy in dermatology from experimental state to clinic standard methods," *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, vol. 25, no. 1-2, pp. 425-39, 2006.
- [94] M. Boen, J. Brownell, P. Patel, and M. M. Tsoukas, "The Role of Photodynamic Therapy in Acne: An Evidence-Based Review," *Am J Clin Dermatol*, vol. 18, no. 3, pp. 311-321, Jun 2017.
- [95] E. Slutsky-Bank, O. Artzi, E. Sprecher, and A. Koren, "A split-face clinical trial of conventional red-light photodynamic therapy versus daylight photodynamic therapy for acne vulgaris," *J Cosmet Dermatol*, vol. 20, no. 12, pp. 3924-3930, Dec 2021.
- [96] C. Dupont *et al.*, "INtraoperative photoDYNAMIC Therapy for GliOblastomas (INDYGO): Study Protocol for a Phase I Clinical Trial," (in eng), *Neurosurgery*, vol. 84, no. 6, pp. E414-E419, 06 01, 2019 2019.
- [97] M. Vermandel *et al.*, "Standardized intraoperative 5-ALA photodynamic therapy for newly diagnosed glioblastoma patients: a preliminary analysis of the INDYGO clinical trial," *J Neurooncol*, Mar 20 2021.
- [98] P. J. Muller and B. C. Wilson, "Photodynamic therapy: cavitory photoillumination of malignant cerebral tumours using a laser coupled inflatable balloon," (in eng), *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, vol. 12, no. 4, pp. 371-373, Nov 1985 1985.
- [99] S. Schipmann *et al.*, "Combination of ALA-induced fluorescence-guided resection and intraoperative open photodynamic therapy for recurrent glioblastoma: case series on a promising dual strategy for local tumor control," (in eng), *Journal of Neurosurgery*, pp. 1-11, Jan 24, 2020 2020.
- [100] T. Kobayashi *et al.*, "Therapeutic Options for Recurrent Glioblastoma&mdash;Efficacy of Talaporfin Sodium Mediated Photodynamic Therapy," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 2, 2022.
- [101] H. Kostron, E. Fritsch, and V. Grunert, "Photodynamic therapy of malignant brain tumours: a phase I/II trial," (in eng), *British Journal of Neurosurgery*, vol. 2, no. 2, pp. 241-248, 1988 1988.
- [102] A. Johansson, F.-W. Kreth, W. Stummer, and H. Stepp, "Interstitial Photodynamic Therapy of Brain Tumors," *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 16, no. 4, pp. 841-853, July 2010 2010.
- [103] W. Stummer *et al.*, "Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report," *J Neurooncol*, vol. 87, no. 1, pp. 103-9, Mar 2008.

- 
- [104] A. Johansson *et al.*, "Protoporphyrin IX Fluorescence and Photobleaching During Interstitial Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas for Early Treatment Prognosis: FLUORESCENCE FOR TREATMENT PROGNOSIS IN GLIOMA PDT," (in en), *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 45, no. 4, pp. 225-234, 04/2013 2013.
- [105] C. Schwartz *et al.*, "Interstitial photodynamic therapy of untreated glioblastoma multiforme WHO IV," in Vorbereitung.
- [106] T. M. Baran and T. H. Foster, "New Monte Carlo model of cylindrical diffusing fibers illustrates axially heterogeneous fluorescence detection: simulation and experimental validation," (in en), *Journal of Biomedical Optics*, vol. 16, no. 8, p. 085003, 2011 2011.
- [107] T. M. Baran and T. H. Foster, "Comparison of flat cleaved and cylindrical diffusing fibers as treatment sources for interstitial photodynamic therapy: Comparing flat cleaved fibers and diffusers for iPDT," (in en), *Medical Physics*, vol. 41, no. 2, p. 022701, 2014-01-23 2014.
- [108] C. Schwartz, H. Stepp, A. Rühm, J.-C. Tonn, S. Kreth, and F.-W. Kreth, "Interstitial photodynamic therapy for de-novo glioblastoma multiforme WHO IV: a feasibility study," 2015, p. DocMI.09.07: German Medical Science GMS Publishing House.
- [109] M. T. Kruger, V. A. Coenen, C. Jenkner, H. Urbach, K. Egger, and P. C. Reinacher, "Combination of CT angiography and MRI in surgical planning of deep brain stimulation," *Neuroradiology*, vol. 60, no. 11, pp. 1151-1158, Nov 2018.
- [110] S. K. Powers, S. S. Cush, D. L. Walstad, and L. Kwock, "Stereotactic intratumoral photodynamic therapy for recurrent malignant brain tumors," *Neurosurgery*, vol. 29, no. 5, pp. 688-95; discussion 695-6, Nov 1991.
- [111] E. Kohen, R. Santus, and J. G. Hirschberg, *Photobiology*. Elsevier Science, 1995.
- [112] G. Hennig, H. Stepp, and A. Johansson, "Photobleaching-based method to individualize irradiation time during interstitial 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy," *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 8, no. 3, pp. 275-81, Sep 2011.
- [113] A. N. Yaroslavsky, P. C. Schulze, I. V. Yaroslavsky, R. Schober, F. Ulrich, and H.-J. Schwarzmaier, "Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range," (in en), *Physics in Medicine and Biology*, vol. 47, no. 12, pp. 2059-2073, 2002-6-21 2002.
- [114] M. Aumiller *et al.*, "Investigation of Changes of Optical Tissue Properties up to 50°C," in *Biophotonics Congress 2021*, Washington, DC, 2021, p. JW1A.6: Optica Publishing Group.
- [115] M. Aumiller *et al.*, "Investigations on the temperature dependence of optical tissue parameters in the range from 25°C to 50°C," in Preparation.
- [116] H. A. Leroy *et al.*, "Interstitial Photodynamic Therapy for Glioblastomas: A Standardized Procedure for Clinical Use," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 22, Nov 17 2021.

- 
- [117] A.-A. Yassine, L. Lilge, and V. Betz, "Optimizing interstitial photodynamic therapy with custom cylindrical diffusers," (in en), *Journal of Biophotonics*, vol. 12, no. 1, p. e201800153, 01/2019 2019.
- [118] A. A. Yassine, L. Lilge, and V. Betz, "Optimizing Interstitial Photodynamic Therapy Planning With Reinforcement Learning-Based Diffuser Placement," *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 68, no. 5, pp. 1668-1679, May 2021.
- [119] S. K. Powers and J. Tony Brown, "Light dosimetry in brain tissue: An in vivo model applicable to photodynamic therapy," (in en), *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 6, no. 3, pp. 318-322, 1986 1986.
- [120] Q. Chen, Z. Huang, H. Chen, H. Shapiro, J. Beckers, and F. W. Hetzel, "Improvement of tumor response by manipulation of tumor oxygenation during photodynamic therapy," *Photochem Photobiol*, vol. 76, no. 2, pp. 197-203, Aug 2002.
- [121] A. Rühm *et al.*, "5-ALA based photodynamic management of glioblastoma," in *Proceedings of SPIE, Optical Techniques in Neurosurgery, Neurophotonics, and Optogenetics*, San Francisco, CA, USA, 2014, vol. 8928, p. 89280E: International Society for Optics and Photonics.
- [122] F. M. Specchia *et al.*, "Let Me See: Correlation between 5-ALA Fluorescence and Molecular Pathways in Glioblastoma: A Single Center Experience," *Brain Sciences*, vol. 11, no. 6, 2021.
- [123] J. S. Dysart, G. Singh, and M. S. Patterson, "Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mTHPC photodynamic therapy of MLL cells," *Photochem Photobiol*, vol. 81, no. 1, pp. 196-205, Jan-Feb 2005.
- [124] C. Sheng, P. J. Hoopes, T. Hasan, and B. W. Pogue, "Photobleaching-based dosimetry predicts deposited dose in ALA-PpIX PDT of rodent esophagus," *Photochem Photobiol*, vol. 83, no. 3, pp. 738-48, May-Jun 2007.
- [125] M. B. Ericson *et al.*, "Photodynamic therapy of actinic keratosis at varying fluence rates: assessment of photobleaching, pain and primary clinical outcome," *Br J Dermatol*, vol. 151, no. 6, pp. 1204-12, Dec 2004.
- [126] W. J. Cottrell, A. D. Paquette, K. R. Keymel, T. H. Foster, and A. R. Oseroff, "Irradiance-dependent photobleaching and pain in delta-aminolevulinic acid-photodynamic therapy of superficial basal cell carcinomas," *Clin Cancer Res*, vol. 14, no. 14, pp. 4475-83, Jul 15 2008.
- [127] A. Johansson, G. Palte, O. Schnell, J. C. Tonn, J. Herms, and H. Stepp, "5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels in tissue of human malignant brain tumors," *Photochem Photobiol*, vol. 86, no. 6, pp. 1373-8, Nov-Dec 2010.
- [128] B. W. Pogue *et al.*, "Protoporphyrin IX fluorescence photobleaching increases with the use of fractionated irradiation in the esophagus," *J Biomed Opt*, vol. 13, no. 3, p. 034009, May-Jun 2008.
- [129] N. A. Markwardt *et al.*, "Remission spectrometry for blood vessel detection during stereotactic biopsy of brain tumors," (in en), *Journal of Biophotonics*, vol. 10, no. 8, pp. 1080-1094, 2017 2017.

- 
- [130] M. Aumiller *et al.*, "Investigation on Treatment Light Transmission Changes During IPDT in Comparison to T1 Hyperintensity in Early Post-Therapeutic T1-Weighted MRI," in *European Conferences on Biomedical Optics 2021 (ECBO)*, Munich, 2021, p. EW1A.7: Optica Publishing Group.
- [131] E. L. P. Larsen *et al.*, "Monitoring of hexyl 5-aminolevulinate-induced photodynamic therapy in rat bladder cancer by optical spectroscopy," (in en), *Journal of Biomedical Optics*, vol. 13, no. 4, p. 044031, 2008 2008.
- [132] E. L. P. Larsen, L. L. Randeberg, O. A. Gederaas, H. E. Krokan, D. R. Hjelme, and L. O. Svaasand, "In vitro study on methemoglobin formation in erythrocytes following hexyl-aminolevulinate induced photodynamic therapy," 2007, p. 642719.
- [133] R. Hamada, E. Ogawa, and T. Arai, "Continuous Optical Monitoring of Red Blood Cells During a Photosensitization Reaction," *Photobiomodul Photomed Laser Surg*, vol. 37, no. 2, pp. 110-116, Feb 2019.
- [134] C. Andrade *et al.*, *Optical spectroscopy of radiotherapy and photodynamic therapy responses in normal rat skin shows vascular breakdown products*. 2016, p. 969410.
- [135] C. Heckl, M. Aumiller, A. Ruhm, R. Sroka, and H. Stepp, "Fluorescence and Treatment Light Monitoring for Interstitial Photodynamic Therapy," *Photochem Photobiol*, Dec 30 2019.
- [136] L. L. Randeberg, J. H. Bonesrønning, M. Dalaker, J. S. Nelson, and L. O. Svaasand, "Methemoglobin formation during laser induced photothermolysis of vascular skin lesions: METHEMOGLOBIN FORMATION," (in en), *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 34, no. 5, pp. 414-419, 06/2004 2004.
- [137] U. N. Chukwueke and P. Y. Wen, "Use of the Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) criteria in clinical trials and clinical practice," *CNS Oncol*, vol. 8, no. 1, p. CNS28, Mar 1 2019.
- [138] P. Y. Wen, S. M. Chang, M. J. Van den Bent, M. A. Vogelbaum, D. R. Macdonald, and E. Q. Lee, "Response Assessment in Neuro-Oncology Clinical Trials," *J Clin Oncol*, vol. 35, no. 21, pp. 2439-2449, Jul 20 2017.
- [139] A. W. Abbasi, H. E. Westerlaan, G. A. Holtman, K. M. Aden, P. J. van Laar, and A. van der Hoorn, "Incidence of Tumour Progression and Pseudoprogression in High-Grade Gliomas: a Systematic Review and Meta-Analysis," *Clin Neuroradiol*, vol. 28, no. 3, pp. 401-411, Sep 2018.
- [140] M. El Fahim *et al.*, "Post-therapeutic Morphological changes in MRI after interstitial photodynamic therapy," *in Preparation*.
- [141] W. G. Bradley, "MR appearance of hemorrhage in the brain," (in eng), *Radiology*, vol. 189, no. 1, pp. 15-26, Oct 1993 1993.
- [142] J. L. Ruiz-Sandoval, C. Cantu, and F. Barinagarrementeria, "Intracerebral hemorrhage in young people: analysis of risk factors, location, causes, and prognosis," *Stroke*, vol. 30, no. 3, pp. 537-41, Mar 1999.

- 
- [143] J. A. Caceres and J. N. Goldstein, "Intracranial hemorrhage," *Emerg Med Clin North Am*, vol. 30, no. 3, pp. 771-94, Aug 2012.
- [144] N. Yasui, S. Magarisawa, A. Suzuki, H. Nishimura, T. Okudera, and T. Abe, "Subarachnoid hemorrhage caused by previously diagnosed, previously unruptured intracranial aneurysms: a retrospective analysis of 25 cases," *Neurosurgery*, vol. 39, no. 6, pp. 1096-100; discussion 1100-1, Dec 1996.
- [145] F. Casanova, P. R. Carney, and M. Sarntinoranont, "Effect of needle insertion speed on tissue injury, stress, and backflow distribution for convection-enhanced delivery in the rat brain," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, p. e94919, 2014.
- [146] F. Casanova, P. R. Carney, and M. Sarntinoranont, "In vivo evaluation of needle force and friction stress during insertion at varying insertion speed into the brain," *J Neurosci Methods*, vol. 237, pp. 79-89, Nov 30 2014.
- [147] M. Federica, P. Maurizio, A. Giancarlo, and C. Valeria, "Neuroimaging in Intracerebral Hemorrhage," *Stroke*, vol. 45, no. 3, pp. 903-908, March 1, 2014 2014.
- [148] C. S. Kidwell and M. Wintermark, "Imaging of intracranial haemorrhage," (in en), *The Lancet Neurology*, vol. 7, no. 3, pp. 256-267, March 1, 2008 2008.
- [149] N. Anzalone, R. Scotti, and R. Riva, "Neuroradiologic differential diagnosis of cerebral intraparenchymal hemorrhage," (in en), *Neurological Sciences*, vol. 25, no. 0, pp. s3-s5, 2004-3-1 2004.
- [150] G. Müller-Newen and P. E. Petrides, "Blut – Hämatopoese und Erythrocyten," in *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, P. C. Heinrich, M. Müller, and L. Graeve, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014, pp. 863-876.
- [151] D. Hasan, O. Nikoubashman, R. Pjontek, A. Stockero, H. A. Hamou, and M. Wiesmann, "MRI appearance of chronic subdural hematoma," *Front Neurol*, vol. 13, p. 872664, 2022.
- [152] A. V. Kulkarni, A. Guha, A. Lozano, and M. Bernstein, "Incidence of silent hemorrhage and delayed deterioration after stereotactic brain biopsy," *J Neurosurg*, vol. 89, no. 1, pp. 31-5, Jul 1998.
- [153] S. L. Jacques, "Optical properties of biological tissues: a review," (in en), *Physics in Medicine and Biology*, vol. 58, no. 11, pp. R37-R61, 2013-06-07 2013.
- [154] F. Bevilacqua, D. Piguët, P. Marquet, J. D. Gross, B. J. Tromberg, and C. Depeursinge, "In vivo local determination of tissue optical properties: applications to human brain," (in en), *Applied Optics*, vol. 38, no. 22, p. 4939, 1999-08-01 1999.
- [155] M. Foglar *et al.*, "Longitudinal analysis of long and short-term survival after interstitial photodynamic therapy for malignant gliomas," in Vorbereitung.
- [156] M. S. Mathews, D. Chighvinadze, H. M. Gach, F. A. Uzal, S. J. Madsen, and H. Hirschberg, "Cerebral edema following photodynamic therapy using endogenous and exogenous photosensitizers in normal brain," *Lasers Surg Med*, vol. 43, no. 9, pp. 892-900, Nov 2011.

- 
- [157] S. Ito, W. Rachinger, H. Stepp, H. J. Reulen, and W. Stummer, "Oedema formation in experimental photo-irradiation therapy of brain tumours using 5-ALA," *Acta Neurochir (Wien)*, vol. 147, no. 1, pp. 57-65; discussion 65, Jan 2005.
- [158] J. Xie, Z. Qian, T. Yang, W. Li, and G. Hu, "Minimally invasive assessment of the effect of mannitol and hypertonic saline therapy on traumatic brain edema using measurements of reduced scattering coefficient ( $\mu_s'$ )," *Appl Opt*, vol. 49, no. 28, pp. 5407-14, Oct 1 2010.
- [159] V. Krishnaswamy, P. J. Hoopes, K. S. Samkoe, J. A. O'Hara, T. Hasan, and B. W. Pogue, "Quantitative imaging of scattering changes associated with epithelial proliferation, necrosis, and fibrosis in tumors using microsampling reflectance spectroscopy," *J Biomed Opt*, vol. 14, no. 1, p. 014004, Jan-Feb 2009.
- [160] J. Svensson, A. Johansson, K. Svanberg, and S. Andersson-Engels, "Tissue temperature monitoring during interstitial photodynamic therapy," in *Thermal Treatment of Tissue: Energy Delivery and Assessment III*, 2005, vol. 5698, pp. 126-136: International Society for Optics and Photonics.
- [161] J. A. Pearce, "Thermodynamic Principles Of Laser - Tissue Interaction," in *[1990] Twelfth Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 1990, pp. 1108-1110, Philadelphia, PA, USA: IEEE.
- [162] W. E. Teague, Jr. and G. P. Dobson, "Effect of temperature on the creatine kinase equilibrium," *J Biol Chem*, vol. 267, no. 20, pp. 14084-93, Jul 15 1992.
- [163] J. H. v. t. Hoff, *Études de dynamique chimique*. Amsterdam: F. Muller & Co., 1884.
- [164] S. Arrhenius, "Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren," *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, vol. 4U, no. 1, pp. 226-248, 1889.
- [165] M. G. Skinner, S. Everts, A. D. Reid, I. A. Vitkin, L. Lilge, and M. D. Sherar, "Changes in optical properties of *ex vivo* rat prostate due to heating," (in en), *Physics in Medicine and Biology*, vol. 45, no. 5, pp. 1375-1386, 2000-05-01 2000.
- [166] B. Cletus, R. Künnemeyer, P. Martinsen, and V. A. McGlone, "Temperature-dependent optical properties of Intralipid® measured with frequency-domain photon-migration spectroscopy," (in en), *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, no. 1, p. 017003, 2010 2010.
- [167] S. Jaywant *et al.*, "Temperature dependent changes in the optical absorption and scattering spectra of tissues," *SPIE Proc*, vol. 1882, 07/01 1993.
- [168] J. P. Ritz, A. Roggan, C. T. Germer, C. Isbert, G. Müller, and H. J. Buhr, "Continuous changes in the optical properties of liver tissue during laser-induced interstitial thermotherapy," (in en), *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 28, no. 4, pp. 307-312, 2001 2001.
- [169] M. Eisel, S. Ströbl, T. Pongratz, H. Stepp, A. Rühm, and R. Sroka, "Investigation of optical properties of dissected and homogenized biological tissue," (in eng), *Journal of Biomedical Optics*, vol. 23, no. 9, pp. 1-9, 09 2018 2018.



- 
- [170] S. R. Arridge, H. Dehghani, M. Schweiger, and E. Okada, "The finite element model for the propagation of light in scattering media: a direct method for domains with nonscattering regions," *Med Phys*, vol. 27, no. 1, pp. 252-64, Jan 2000.
- [171] Q. Fang, "Mesh-based Monte Carlo method using fast ray-tracing in Plücker coordinates," *Biomedical Optics Express*, vol. 1, no. 1, pp. 165-175, 2010/08/02 2010.
- [172] T. M. Baran, "Recovery of optical properties using interstitial cylindrical diffusers as source and detector fibers," (in en), *Journal of Biomedical Optics*, vol. 21, no. 7, p. 077001, 2016-07-22 2016.
- [173] A. A. Yassine, L. Lilge, and V. Betz, "Machine learning for real-time optical property recovery in interstitial photodynamic therapy: a stimulation-based study," *Biomed Opt Express*, vol. 12, no. 9, pp. 5401-5422, Sep 1 2021.



---

## VIII. DANKSAGUNG

2015 hatte ich das Vergnügen mit der Masterarbeit meinen Weg am Laserforschungslabor zu beginnen, welcher 2017 mit dem Beginn meiner Promotion weiterging. Über die Jahre hinweg durfte ich hier viele großartige Menschen kennenlernen. Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater Ronald Sroka, der mir die Möglichkeit für diese Arbeit gab, nie das Vertrauen in mich verloren und mir über einige Hürden hinweggeholfen hat. Ich möchte Adrian Rühm und Herbert Stepp danken, die mich bei meiner Arbeit betreut und mir in unzähligen langen kritischen Diskussionen und Gesprächen, Ideen und Ihre Expertise zu Teil werden ließen und mich immer bei meiner Arbeit auch in schwereren Zeiten unterstützt haben. Danke, dass Ihr mir es ermöglicht habt diese Arbeit durchzuführen.

Meinen aktuellen und ehemaligen Mitdoktorrunden, Weggefährten und Freunden am LFL, Max Eisel, Christian Heckl, Christian Freymüller, Stephan Ströbl und Alexander Lang möchte ich auch danken. Max Eisel und Christian Heckl danke ich als meinen langjährigen Zimmergenossen für die gemeinsamen Gespräche und munteren Diskussion mit denen wir uns immer bei Laune gehalten haben, sowie den Spaß bei den gemeinsamen Freizeitaktivitäten. Christian Freymüller möchte ich danken für die Diskussionen und Telefonate und vor allem die gewaltige Hilfe, wenn ich mit den verschiedenen PCs im Klinsch war. Ich wünsche Ihm viel Erfolg beim baldigen Abschluss seiner Promotion. Stephan Ströbl danke ich für seinen ansteckenden Witz und seine Ideen, mit denen er mich auch aus dem fernen Vorarlberg unterstützt hat. Alexander Lang möchte ich danken für den Input und Perspektiven auf meine Arbeit, die er mir in der Anfangsphase aufgezeigt hat.

Dank geht auch an die Kollegen vom Laserforschungslabor und LIFE-Zentrum Christian Homann, Thomas Pongratz, Cornelia Eberle und Alexander Buchner, die mir bei Fragen geduldig geholfen und mich unterstützt haben.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Stefanie Quach der Neurochirurgischen Klinik, die teils Ihre Freizeit opferte um mich bei nächtlichen Analysen zu unterstützen und mir mit fachlichen Rat immer ausgeholfen hat.

Dank gilt auch Niklas Thon von Neurochirurgischen Klinik, Birgit Ertl-Wagner vom Hospital for Sick Children in Toronto und Olaf Dietrich von der radiologischen Klinik, die mich mit Ihrem Fachwissen und Ihrer Expertise bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Großer Dank gilt auch Christina Guffanti, Christina Wasensteiner und Agathe Schmid. Ihr habt mich in einer sehr schweren Zeit meines Lebens aufgemuntert und mich im wahrsten Sinne des Wortes wieder auf meine eigenen Füße gestellt. Ohne euch würde ich jetzt wohl nicht hier sein ☺.

Zuletzt möchte ich noch meiner Familie danken. Ohne Eure Unterstützung wäre das alles nicht möglich gewesen.



---

## IX. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Untersuchungen zum Spektralen Online-Monitoring der interstitiellen photodynamischen Therapie an malignen Gliomen**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 3.03.2023

Ort, Datum

Maximilian Aumiller

Unterschrift Doktorand