

Aus der Urologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Direktor: Professor Dr. med. C.G. Stief

**Experimentelle Untersuchungen zur photodynamischen Therapie  
mit 5-Aminolävulinsäure im CAM-Modell**

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

vorgelegt von

Markus Jürgen Bader

aus  
München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. R. Waidelich

Mitberichterstatter: PD Dr. med. M. Dellian  
PD Dr. med. C. Berking

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. R. Baumgartner

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2005

Meinen Eltern Gisela und Jürgen Bader

Meiner Frau Felizitas

# **Experimentelle Untersuchungen zur photodynamischen Therapie mit 5-Aminolävulinsäure im CAM-Modell**

1.	Einführung .....	3
1.1.	Das Urothelkarzinom der Harnblase.....	3
1.2.	Die 5-Aminolävulinsäure (5-ALS) .....	6
1.2.1.	Grundlagen der 5-ALS induzierten Fluoreszenz .....	6
1.2.2.	5-ALS in der photodynamischen Diagnostik und Therapie .....	9
1.3.	Das Modell der Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühnereis (CAM-Modell).10	
1.3.1.	Allgemeine Verwendung des CAM-Modells .....	10
1.3.2.	Untersuchung von photodynamischen Effekten mit dem CAM-Modell.....	11
1.3.3.	Die Morphologie der CAM.....	12
2.	Arbeitsziele .....	15
3.	Material und Methoden.....	16
3.1.	Präparation der CAM.....	16
3.2.	Fluoreszenzkinetische Untersuchungen.....	17
3.2.1.	Aufbau zur Anregung und Messung der Fluoreszenz.....	17
3.2.2.	Mathematische Auswertung der gemessenen Spektren.....	19
3.3.	Festlegung der PDT-Parameter.....	20
3.3.1.	Die verwendeten Lichtquellen .....	20
3.3.2.	Durchführung der PDT .....	21
3.3.3.	Dunkeltoxizität und therapeutisches Fenster der 5-ALS-Konzentration .....	22
3.3.4.	Variation der Bestrahlungsstärken.....	24
3.3.5.	Kontrollgruppen.....	25
3.3.6.	Versuchsvariable / Versuchskonstante .....	25
3.4.	Erfassung des photodynamischen Schadens.....	26
3.4.1.	Das makroskopische Beurteilungsschema (Makroskopischer Score) .....	26
3.4.2.	Das mikroskopische Beurteilungsschema.....	28
3.5.	Statistische Auswertung.....	28
4.	Ergebnisse.....	29
4.1.	Fluoreszenzkinetik .....	29
4.1.1.	Fluoreszenzspektrum der nativen CAM .....	29
4.1.2.	Pharmakokinetik von 5-ALS-induziertem PpIX .....	29
4.1.3.	Pharmakokinetik der wasserlöslichen Porphyrine .....	29
4.1.4.	Quantitative Analyse der entstehenden Porphyrine.....	30
4.1.5.	Fluoreszenzdokumentation auf der CAM.....	32

---

4.1.6.	Photosensibilisierung des Hühnerembryos .....	33
4.2.	Makroskopisch detektierbare PDT-induzierte CAM-Veränderungen .....	34
4.2.1.	Kontrollgruppen .....	34
4.2.2.	PDT-induzierte CAM-Gefäßschäden .....	35
4.2.3.	PDT-induzierte Schädigung der CAM-Matrix .....	39
4.3.	Konzentrationsermittlung von 5-ALS .....	39
4.4.	Dynamik der PDT-induzierten Schäden im CAM-Modell .....	46
4.4.1.	Dynamik des makroskopischen Scores: Weißlichtbestrahlung in Abhängigkeit von der Energiedichte (Bestrahlung) .....	46
4.4.2.	Dynamik des makroskopischen Scores: Laserbestrahlung in Abhängigkeit von der Energiedichte (Bestrahlung) .....	51
4.4.3.	Vergleich Bestrahlung mit Weiß- und Laserlicht .....	55
4.5.	Mikroskopisches Beurteilungsschema .....	58
4.6.	Mikroskopisch messbare Nekrose in Abhängigkeit vom makroskopischen Score und der verwendeten Bestrahlung .....	60
5.	Diskussion .....	65
5.1.	Klinischer Hintergrund .....	65
5.2.	Photodynamische Therapie (PDT) .....	65
5.3.	Das CAM-Modell .....	66
5.4.	Makroskopisches Beurteilungsschema .....	68
5.4.1.	PDT-induzierte Gefäßschäden .....	68
5.4.2.	PDT-induzierte Schäden des CAM-Embryo-Systems: Makroskopischer Score I bis III .....	69
5.4.3.	PDT-induzierte Schäden des CAM-Embryo-Systems: Makroskopischer Score IV ...	69
5.5.	Bewertung der mikroskopischen Schädigung .....	71
5.6.	Die Grenzen des CAM-Modells für den vergleichenden Versuchsansatz .....	74
6.	Zusammenfassung .....	75
7.	Anhang .....	79
8.	Literaturverzeichnis: .....	80
9.	Danksagung .....	88
10.	Lebenslauf .....	90

# 1. Einführung

Photodynamische Diagnostik (PDD) und Photodynamische Therapie (PDT) zählen zu den klinischen Forschungsschwerpunkten in der Erkennung und Behandlung neoplastischer Veränderungen in verschiedensten medizinischen Fachbereichen wie z.B. der Urologie, der Dermatologie, der Neurochirurgie, der Gynäkologie und der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde.

Beide Verfahren beruhen auf der Absorption von Licht geeigneter Wellenlänge durch eine tumorselektiv angereicherte lichtempfindliche Substanz, dem so genannten Photosensibilisator.

Die Fluoreszenz dieses Photosensibilisators wird bei der PDD zur Tumorerkennung genutzt.

Bei der PDT führt das Zusammenwirken von Photosensibilisator, Licht und Sauerstoff im Gewebe zur selektiven Zerstörung von Tumorzellen.

Seit 1992 wird durch 5-Aminolävulinsäure induziertes Porphyrin IX im Hinblick auf seinen Einsatz als Photosensibilisator zur photodynamischen Therapie beim Harnblasenkarzinom untersucht [5].

## 1.1. Das Urothelkarzinom der Harnblase

### *Epidemiologie*

Das Harnblasenkarzinom steht in der Reihenfolge der häufigsten malignen Erkrankungen weltweit an 4. Stelle. In der Bundesrepublik Deutschland erkranken jährlich ca. 160.000 Personen an einem Harnblasenkarzinom [42].

In über 95% der Fälle handelt es sich dabei um ein Urothelkarzinom, wobei 75 bis 85% der Patienten bei Diagnosestellung ein nicht-muskelinvasives Tumorstadium aufweisen, d.h. die neoplastischen Veränderungen sind auf die Mucosa (Carcinoma in situ Cis, Ta), respektive Submucosa (T1), beschränkt [29, 42, 59].

Abbildung 1 zeigt die Tumorstadien des Harnblasenkarzinoms.

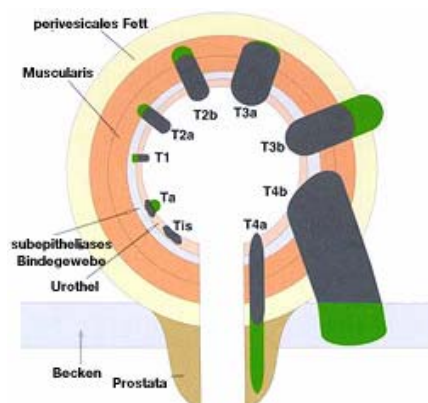


Abbildung 1: Tumorstadien des Urothelkarzinoms der Harnblase

Die Standardtherapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms ist die transurethrale Elektroresektion der Harnblase (TUR-B) unter Weißlichtendoskopie [29, 42, 59].

Trotz adäquater initialer Therapie mittels TUR-B erleiden 50 bis 70% der Patienten mit nicht-muskelinvasiven Tumoren, abhängig von Tumorstadium und Differenzierungsgrad, in einem Zeitraum von 2 Jahren nach Erstbehandlung ein oder mehrere Rezidive, was einerseits auf eine maligne Prädisposition des gesamten Urothels, andererseits auf Implantationsmetastasen oder übersehene Resttumore bei der transurethralen Elektroresektion zurückgeführt wird [29, 42].

Flache Urothelläsionen, wie hochgradige Dysplasien oder Carcinomata in situ (Cis), die sich häufig in unspezifisch entzündlich veränderter Schleimhaut, aber auch in unauffällig erscheinender Mukosa finden, sind teilweise sehr schlecht unter Weißlichtendoskopie erkennbar. Aber gerade das Auftreten dieser Tumorentitäten ist von entscheidender Bedeutung für die Prognose des Patienten.

Die Progressionsrate des nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinoms der Harnblase liegt bei 10 bis 20% [39, 42, 61].

Vor allem aus Dysplasien oder dem stets gering differenzierten Carcinomata in situ können sehr schnell unter Umgehung des papillären Tumorwachstums muskelfiltrierende Urothelkarzinome entstehen:

Während hochdifferenzierte Tumore nur in 0-6% eine Invasion der Lamina propria und damit eine Progression aufweisen, zeigen 22-52% der mittelgradig differenzierten Tumore und 5 bis 82% der gering differenzierten Tumore im Verlauf nach transurethraler Resektion ein muskelinvasives Wachstum [10, 13, 42].

Aufgrund des hohen Risikos, unter Umgehung des papillären Wachstums muskelfiltrierende Urothelkarzinome zu bilden, ist es von entscheidender Bedeutung, die flachen Neoplasien frühest möglich zu diagnostizieren und zu therapieren.

### ***Photodynamische Diagnostik (PDD)***

Bei der photodynamischen Diagnostik (PDD) werden Läsionen durch die Fluoreszenz eines in diesen Läsionen angereicherten Photosensibilisators detektiert.

Mit dieser Methode gelingt es auch, weißlichtendoskopisch schwer erkennbare, flache Schleimhautveränderungen, wie Dysplasien und Carinomata in situ, sichtbar zu machen [4, 5 62].

### ***Das nicht-muskelinvasive Urothelkarzinom der Harnblase: Adjuvante Therapie***

Mit der Zielsetzung Rezidiv und Progressionsraten zu verringern wird beim nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinom der Harnblase eine intravesikale Instillationstherapie durchgeführt [10, 13, 42].

Lediglich primäre monofokale Tumore im Stadium pTa G1 bedürfen aufgrund der niedrigen Rezidiv- und Progressionswahrscheinlichkeit keiner adjuvanten Therapie [42].

In Deutschland kommen bei der intravesikalen Therapie Zytostatika (z.B.: Mitomycin C, Epirubicin und Doxorubicin) sowie die intravesikale Instillation von Bacillus Calmette-Guerin (BCG) zum Einsatz.

Die Zeit bis zum Tumorrezidiv lässt sich durch intravesikale Instillationstherapie signifikant verringern, bislang konnte jedoch kein signifikanter Einfluss der Chemoprophylaxe auf die Tumorprogression nachgewiesen werden [10, 11, 29, 42].

Die intravesikale Instillationstherapie zeichnet sich durch ein hohes Nebenwirkungsprofil aus. So erleiden 60 bis 80% der mit BCG behandelten Patienten zum Teil schwerwiegende Nebenwirkungen wie eine iatrogene Zystitis mit therapiebedürftigen Miktionsbeschwerden und Makrohämaturie [10, 29, 37].

Systemische Nebenwirkungen wie persistierendes Fieber und generalisierte Erscheinungen wie Arthritis, Hautausschlag oder Reiter-Syndrom sind in 5% der Fälle, schwerwiegende Sepsisfälle mit Todesfolge in 0,4% beschrieben [10, 29, 37].

Die Entwicklung einer narbigen Schrumpfbhase wurde bei 0,2% und Harnleiterstrikturen bei 0,3% der Patienten beobachtet. [10, 29, 37].

### ***Das therapierefraktäre nicht-muskelinvasive Urothelkarzinom der Harnblase: Operative Therapie:***

Beim BCG-refraktären, rezidivierenden, nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinom der Harnblase besteht die Indikation zur radikalen Zystektomie (mit kontinenter oder nicht-kontinenter Harnableitung in ein Darmsegment) [42], da Strahlentherapie oder systemische Chemotherapie ineffektiv für die Behandlung des Carcinoma in situ sind [60].

Für Patienten, bei denen die intravesikale Instillationstherapie aufgrund massiver Nebenwirkungen abgebrochen werden musste, oder die einer Zystektomie aufgrund internistischer Begleiterkrankungen mit deutlich erhöhtem Risiko der peri- und postoperativen Morbidität und Mortalität nicht zugeführt werden können, steht als experimentelle, alternative Therapieoption die photodynamische Therapie der Harnblase zu Verfügung.

### ***Photodynamische Therapie (PDT)***

Drei Komponenten sind für photochemische Sensibilisierung und den konsekutiven Tumorzelltod nach Bestrahlung notwendig: Ein tumorselektiv angereicherter Farbstoff (Photosensibilisator), Licht im Wellenbereich der Absorption des Photosensibilisators und Sauerstoff im Gewebe [4, 5].



Bereits 1975 wurde erstmals eine PDT beim Harnblasenkarzinom durchgeführt [30].

Aus den primär fokalen endoskopisch durchgeführten Bestrahlungsbehandlungen entwickelte sich die integrale PDT der gesamten Blasenschleimhaut.

Für die integrale Bestrahlung der Harnblase wurden bislang ausschließlich Laserquellen eingesetzt, da eine Einkoppelung von Licht der benötigten hohen Leistung in Fasersysteme mit ausreichend kleinem Durchmesser ein technisches Problem darstellte.

Die hohen Investitionskosten, aufwendige Apparaturen und eine komplizierte Lichtdosimetrie stellten ein Hindernis hinsichtlich der klinischen Verbreitung der Laser-PDT dar.

Seit es technisch möglich ist, von einer Xenon-Kurzbogenlampe erzeugtes inkohärentes Licht der erforderlichen hohen Leistung in dünnlumige Glasfasern einzukoppeln, steht eine mobile, leistungsstarke und kostengünstige alternative Bestrahlungsapparatur für die PDT zu Verfügung.

### ***Photosensibilisatoren***

Bislang wurden für die meisten klinischen Studien synthetische Porphyrine (z.B. Photofrin II) als Photosensibilisatoren eingesetzt.

Synthetische Photosensibilisatoren müssen systemisch appliziert werden und verursachen eine kutane Phototoxizität, mit resultierend postinterventioneller und mehrwöchiger Lichtempfindlichkeit der Patienten.

Nach Gabe von synthetischen Porphyrinen und nachfolgender integraler Bestrahlung der Harnblase besteht bei nahezu allen Patienten eine langanhaltende irritative Symptomatik mit Drangsymptomen, Algurie, brennendem Missempfinden und Mikro- als auch Makrohämaturie. Zudem kommt es bei bis zu 40% der Patienten zu einer nicht tumorselektiven Gewebsschädigung mit resultierender Blasenschrumpfung, die trotz erfolgreicher Tumorthherapie eine Zystektomie notwendig macht.

## **1.2. Die 5-Aminolävulinsäure (5-ALS)**

### **1.2.1. Grundlagen der 5-ALS induzierten Fluoreszenz**

Unter den Photosensibilisatoren der so genannten „2. Generation“ mit verbessertem Wirkungs-Nebenwirkungsprofil nimmt die 5-Aminolävulinsäure (5-ALS) (Abbildung 2) eine herausragende Stellung ein. 5-ALS ist das Ausgangsprodukt der Hämbiosynthese und führt nach exogener Applikation zu einer Anreicherung von endogen photoaktiven Substanzen, vornehmlich des Protoporphyrin IX (PpIX) (Abbildung 3) [41, 61].

Mit Ausnahme der ausgereiften Erythrozyten besitzen alle Zellen die Fähigkeit, Häm zu synthetisieren. Häm wird, ausgehend von Succinyl-CoA, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus und der Aminosäure Glycin, in insgesamt 7 Reaktionsschritten und Oxidierungsprozessen gebildet. Der erste und der letzte Schritt der Hämbiosynthese finden im Mitochondrium statt (Abbildung 4).

Im ersten Schritt wird, katalysiert durch die 5-ALS-Synthetase, 5-ALS aus Glycin und Succinyl-CoA kondensiert. Die 5-ALS-Synthetase stellt das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Hämbiosynthese dar und unterliegt einer Rückkopplungshemmung durch freies Häm. Im vorletzten Reaktionsschritt entsteht, katalysiert durch die Protoporphyrinogen-Oxidase, unter Bildung von drei zusätzlichen Doppelbindungen, aus Protoporphyrinogen Protoporphyrin IX. Erst dieser Reaktionsschritt ermöglicht die Bildung des delokalisierten  $\pi$ -Elektronensystems, das für die starke Fluoreszenz von PPIX im roten Spektralbereich verantwortlich ist. PpIX liegt als konjugiertes Tetrapyrrolysystem mit 11 konjugierten Doppelbindungen vor (Abbildung 3).

PpIX ist ein rot fluoreszierender, natürlicher Farbstoff mit Emissionsmaxima bei 635nm und 704nm.

Die Ferrochelatase katalysiert den letzten Schritt, den Einbau von  $\text{Fe}^{2+}$  in das Protoporphyrinogen IX, so dass sich letztlich Häm bildet [28].

Der Einbau des Eisenions führt zum Verlust der Fluoreszenzeigenschaften.

Wird der Rückkoppelungsmechanismus der 5-ALS-Synthetase umgangen, indem exogen 5-ALS angeboten wird, so ist die Ferrochelatase in vielen Fällen der die Geschwindigkeit bestimmende Schritt [6, 7, 44].

Es kommt in den Zellen in Abhängigkeit vom Stoffwechsel zur Akkumulation von PpIX [3, 44, 61].

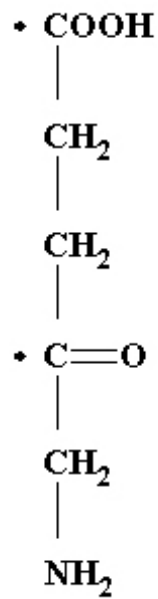


Abbildung 2: Chemische Formel von 5-Aminolävulinsäure

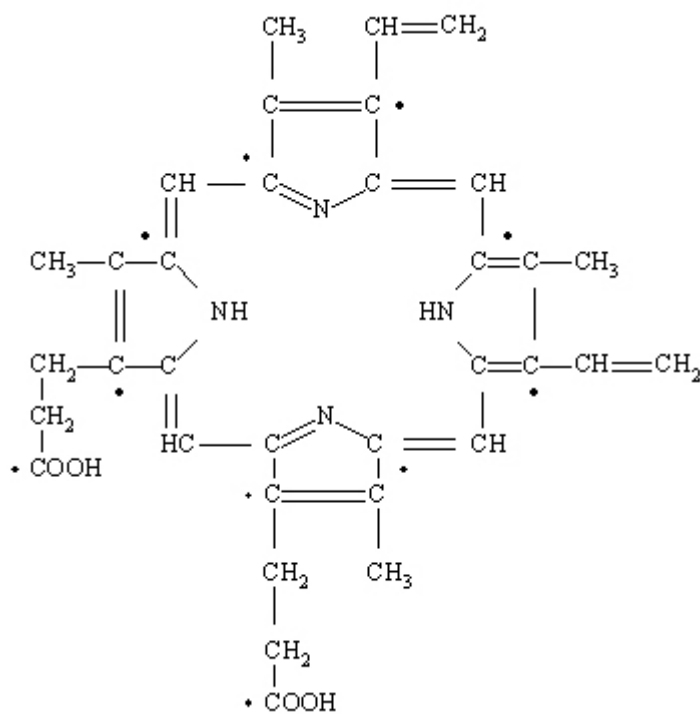


Abbildung 3: Chemische Formel von Protoporphyrin IX

Da die meisten kernhaltigen Zellen die enzymatische Ausstattung zur Häm biosynthese besitzen, kann davon ausgegangen werden, dass sie zur Synthese von PpIX befähigt sind.

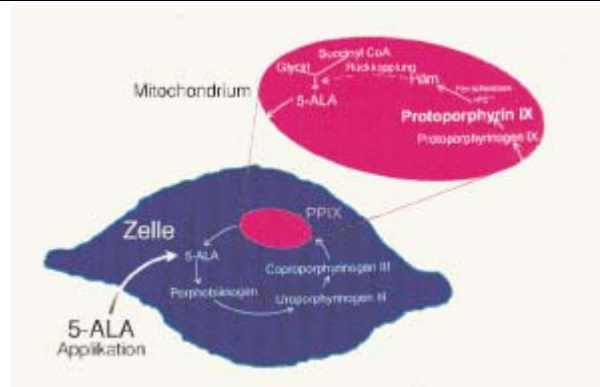


Abbildung 4: Die PpIX – Biosynthese als Teil der Hämbiosynthese

### 1.2.2. 5-ALS in der photodynamischen Diagnostik und Therapie

Über die Möglichkeit, die Rückkopplungshemmung der Hämbiosynthese durch die Gabe von 5-ALS zu umgehen und damit die Akkumulation von endogenen Porphyrinen, in erster Linie des potenziell phototoxischen Protoporphyrin IX, zu induzieren, wurde erstmalig 1965 berichtet [6, 7].

5-ALS zeigt eine deutliche Gewebe und Tumorselektivität:

Die Tumorselektivität der PpIX-Anreicherung konnte erstmals in Versuchen mit Leukämiezellreihen demonstriert werden [40, 41]. 5-Aminolävulinsäure führt zu einer 3-69-fach höheren Anreicherung in Tumoren verglichen mit Normalgewebe [33, 34].

5-ALS entspricht dem Anforderungsprofil an einen experimentell sowie klinisch gut einsetzbaren Photosensibilisator für die Diagnostik, sowie auch für die Therapie:

- Die Substanz ist chemisch rein, einfach zu synthetisieren, führt nach Applikation zu einer signifikanten Anreicherung eines photosensibilisierenden Metaboliten (PpIX) im Tumorgewebe und weist eine vernachlässigbare Dunkeltoxizität auf [4, 35, 57, 63].
- Da 5-ALS selbst kein Fluorochrom ist, bewirkt eine systemische Verteilung von 5-ALS keine unspezifische Fluoreszenz, die zu einer Verringerung des Kontrastes zwischen Tumor und Normalgewebe führen kann [4, 35, 57, 63].
- Die zur Auslösung einer PpIX-Akkumulation benötigte 5-ALS Dosis ist für mesodermales Gewebe (Bindegewebe und Muskelgewebe) höher als für epitheliales Gewebe, deshalb ist auch keine unspezifische PpIX-Fluoreszenz aus der Gewebetiefe zu berücksichtigen, die zu einer Verschlechterung des Fluoreszenzkontrastes führen könnte.
- Eine Schädigung der Muskulatur ist durch fehlende Anreicherung von PpIX ausgeschlossen [4, 35, 57, 63].

Die Unterschiede in der biosynthetischen Kapazität von mesodermalen und epitheliale Gewebe sind vermutlich auf den unterschiedlichen Metabolismus der Gewebe zurückzuführen, der sich in differierendem Bedarf an zur Zellatmung benötigtem Häm ausdrückt. Auch die erhöhte PpIX Synthese in Tumoren wird mit dem gesteigerten Zellmetabolismus erklärt [57, 58].

In eukaryotischen Zellen wird 5-ALS durch einen aktiven Transportmechanismus in die Zelle aufgenommen, wahrscheinlich über ein Transportmembranprotein, die Diffusion von 5-ALS konnte ausgeschlossen werden [8].

Zudem gibt es Hinweise auf tumorspezifische Aufnahme- und Effluxmechanismen sowie Variationen der Transportkapazität durch die Zellmembranen oder einen erhöhter Transmembrantransport durch verstärkte Vaskularisation in neoplastischem Gewebe [19].

5-ALS induziertes PpIX zeigt als Kompromiss aus hoher Absorption und hoher Eindringtiefe eine wellenlängenabhängige Phototoxizität:

Um einen photochemisch zytotoxischen Effekt zu erzielen, muss die Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes den Absorptionsmaxima des Photosensibilisators entsprechen.

Protoporphyrin IX wird am effektivsten von Licht des Wellenlängenmaximums 410nm angeregt und in absteigender Effektivität von Wellenlängenmaxima 505nm, 540nm, 575nm und 635nm.

In der klinischen Anwendung für die PDT werden vor allem Lasersysteme, die vornehmlich rotes Licht der Wellenlängen 630-635nm emittieren, eingesetzt.

Kohärenz und Monochromasie des Laserlichtes sind für das Erzielen photodynamischer Effekte nicht notwendig, zudem absorbieren Porphyrine in breiten Banden, während Lasersysteme in schmalen Banden emittieren.

Eine erhebliche phototoxische Wirkung lässt sich durch Bestrahlung mit inkohärenten Lampensystemen (Weißlicht) erzielen. [51]

### **1.3. Das Modell der Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühnereis (CAM-Modell)**

#### **1.3.1. Allgemeine Verwendung des CAM-Modells**

Das CAM-Modell ist ein in der klinischen, biologischen und embryologischen Forschung etabliertes in-vivo Modell.

Es bietet den Vorteil, auf der einen Seite unabhängig von Zellkulturen zu sein und auf der anderen Seite nicht mit der Durchführungsproblematik eines Tierversuches konfrontiert zu sein.

Als tierversuchsnahes Modell fällt es, solange die Versuche bis zum 18. Bebrütungstag durchgeführt werden, nicht unter die Tierversuchsbestimmungen [22, 23].

Dieses kostengünstige, gut zugängliche und leicht reproduzierbare in-vivo Modell erfuhr seine erstmalige Verwendung für die Isolation, Vermehrung und quantitative Bestimmung verschiedenster Virengruppen wie Herpes, Influenza und Parainfluenza noch vor Einführung der Zellkultur [59].

Bakterien und Viren, Transplantate von auto-, iso-, homo- oder heterologen Organanlagen, Organen oder Tumorzellen / Tumortransplantate lassen sich auf der CAM für längere Zeit züchten und ihre Veränderungen in ektopter Lage untersuchen [20].

### **1.3.2. Untersuchung von photodynamischen Effekten mit dem CAM-Modell**

Das CAM-Modell etablierte sich für Experimente zur Phototoxizität und im Besonderen zum besseren Verständnis der primären Mechanismen der photodynamischen Therapie [22, 23, 24].

Die Transparenz der Chorioallantoismembran erlaubt die Bestrahlung mit allen absorbierten Wellenlängen, abhängig vom verwendeten Photosensibilisator, da keine Limitierung durch Gewebspenetration vorliegt [22, 23, 24].

So können PDT-Effekte auf die Vaskularisation und die umgebende CAM-Matrix in Echtzeit beobachtet und dokumentiert werden.

Aufgrund der guten Zugänglichkeit der CAM für Bestrahlung können auch andere Lichtquellen außer Laser, wie inkohärentes Weißlicht, Verwendung finden.

Nach Beendigung der Versuche besteht die Möglichkeit die Bestrahlungseffekte nach Entnahme der CAM auch histologisch zu untersuchen.

Des Weiteren können Fluoreszenzmessungen zu den verwendeten Photosensibilisatoren durchgeführt werden [24, 25, 26].

Die vielseitige Verwendbarkeit des CAM-Modells zum Verständnis photodynamischer Fragestellungen wurde in einer Reihe von Experimenten unter Beweis gestellt:

Untersuchungen von PDT-Effekten auf die Vaskularisation [52], Tumorwachstum auf der CAM [2] und Synergismus von Hyperthermie und PDT [31].

### 1.3.3. Die Morphologie der CAM

#### *Die Entwicklung der CAM*

Die Verschmelzung von Chorion und Allantois zur Chorioallantoismembran wurde von Füllhorn 1895 erstmals beschrieben.

Die funktionelle Vereinigung einer embryonalen Hülle (Chorion) mit einer sackförmigen Ausstülpung des Enddarms (Allantois) führt zur Bildung eines Respirationsorgans, der Chorioallantoismembran (CAM) [20, 38].

Bis zum Schlüpfen des Hühnerkeimlings ersetzt die Chorioallantoismembran die Funktion der noch nicht funktionstüchtigen embryonalen Lungen zu 100%.

Zusätzlich zur Funktion als Respirationsorgan (Sauerstoff und Kohlendioxid Gasaustausch) ist die CAM Teil eines Transportsystems, das Natrium und Chlorid aus dem Allantoissack und Calcium aus der Eischale in das embryonale Gefäßsystem schleust [20, 54].

Als Teil der allantoidalen Ausstülpung übernimmt die CAM auch Ausscheidungsfunktionen durch Aufnahme der embryonalen Exkremente und Exkrete der embryonalen Nieren [20, 54].

Die CAM ist am 5. Bebrütungstag erstmalig sichtbar, wobei die Fläche von  $1,5 \pm 0,4 \text{ cm}^2$  2% der Gesamtoberfläche des Eies entspricht [20, 54].

Zwischen dem 6. und 11. Bebrütungstag erfolgt eine nahezu lineare Zunahme des Flächenwachstums.

Am 11. Bebrütungstag beträgt die CAM-Fläche  $60,8 \pm 3,0 \text{ cm}^2$  was 94% der Ei-Gesamtoberfläche entspricht [20].

Zwischen Bebrütungstag 12 ( $61,9 \text{ cm}^2 \pm 2,5 \text{ cm}^2$ ) und dem 20./21. Bebrütungstag ( $63,5 \text{ cm}^2 \pm 2,5 \text{ cm}^2$ ) beträgt der flächenmäßige Zuwachs der CAM nur noch 2,5% des Gesamtoberfläche des Eies [20].

Die am 5. Bebrütungstag beginnende Fusion von Chorion und Allantois führt zu einer Verschmelzung der dieser Epithelien unterlagernden Stützgewebsschichten. Blutgefäße der wachsenden Allantois treten in direkte Beziehung zum Chorionepithel und durchsetzen dieses im Laufe der weiteren Entwicklung ab dem 11. Bebrütungstag vollständig [20].

Am 8. bis 9. Bebrütungstag liegt der Kapillarsinus unmittelbar unter der Basalmembran des Chorionepithels [20, 21].

In der Zeitspanne vom 10. bis zum 12. Bebrütungstag erfolgt die Aufnahme des Kapillarnetzes zwischen die Chorionzellen, so dass sich vom 12. Bebrütungstag an eine ein- bis dreischichtige Lage von Chorionepithelzellen unter dem nun vollständig intraepithelial liegenden Kapillarnetz nachweisen lässt.

Das jetzt intraepithelial liegende Gefäßsystem ist von den Chorionzellen durch eine Basalmembran getrennt. Dem Chorionepithel kommt die Aufgabe der Stützung des ausgedehnten sinusoidalen Netzes, welches sich zwischen ihm ausbreitet, zu [20, 21, 38].

Die Umbauveränderungen des Kapillarnetzes und des Chorionepithels tragen dem erhöhten Sauerstoffbedarf des Fötus Rechnung (=Reduktion der Luft-Blut-schranke) [20, 21, 54].

Am 12. Bebrütungstag ist das Wachstum der CAM weitgehend abgeschlossen [20, 38, 54].

Die Ausbreitung der Chorioallantois und die Organogenese im Embryo verlaufen zeitlich parallel [20].

Erst wenn die CAM die innere Eifläche weitestgehend umhüllt tritt der Hühnerfoetus in eine Phase des gesteigerten Wachstums ein [20].

Das Blutvolumen des Keimlings beträgt am 12. Bebrütungstag 2 ml, die Dicke der CAM misst ab dem 12. Bebrütungstag 0,005cm [54].

### ***Das CAM-Kapillarnetz***

Die CAM als oberflächliches, zweidimensionales Gebilde setzt sich aus drei Schichten zusammen [20, 21, 46, 54]:

1. Eine oberste Schicht, bestehend aus Endothelzellen, die vom Chorionektoderm abstammen,
2. eine mittlere Mesodermschicht, entstanden durch die Fusion der Mesodermanteile von Chorion und Allantois, bestehend aus mesenchymalem Gewebe und
3. eine untere Schicht Epithelzellen aus dem allantoidalen Endoderm, die sich aus epithelialen Zellen zusammensetzt.

Die Gefäßstruktur der CAM besteht aus einem oberflächlichen, zweidimensionalen Netzwerk aus dicht gelegenen Kapillaren, durchsetzt mit aus der Tiefe ziehenden prä- und postkapillären Gefäßen, die eine Verbindung zu den tiefer liegenden extraembryonalen Gefäßen darstellen [20, 21, 38, 46].

Die präkapillären, allantoidalen Arteriolen ziehen, ausgehend von extraembryonalen Gefäßen, durch das Mesoderm direkt in das chorio-allantoide Kapillarnetz.

Postkapilläre Drainage wird durch ein aus postkapillären Venolen gebildetes, durch das Mesoderm in die Tiefe ziehendes, kleines, venöses Sinussystem gewährleistet [20, 21, 38].

Aus der Verbindung des zweidimensionalen CAM-Gefäßsystems mit den tiefer liegenden, größeren extraembryonalen Arteriolen und Venolen entsteht ein dreidimensionaler Gefäßbaum [21].



Die das CAM-Gefäßsystem bildenden Gefäße lassen sich ihrer Größe nach in 3 Gruppen einteilen [14, 25, 26]:

- Gefäße der Gruppe I sind definiert als die kleinsten sichtbaren Arteriolen und Venolen mit einem Durchmesser von  $\sim 50\mu\text{m}$ .
- Gefäße der Gruppe II haben einen Durchmesser von  $\sim 50$  bis  $\sim 70\mu\text{m}$ .
- Die größten das CAM-Gefäßsystem bildenden Gefäße haben einen Durchmesser von  $\sim 70$  bis  $\sim 110\mu\text{m}$  und bilden die Gruppe III.

Über die Arterien und Venen der Allantois ist das Gefäßnetzwerk der CAM mit dem Gefäßsystem des Embryos verbunden [21, 26, 48].

Die Luft-Blutshranke wird definiert als der Abstand der intraepithelial liegenden Sinuskapillaren von der Schalenhaut [20, 38].

Eine massive Reduktion der Luft-Blutshranke, bei welcher das allantoide Kapillarnetz zunächst in das Chorionepithel aufgenommen und schließlich unmittelbar unter die Schalenhaut verlagert wird, sichert den ungehinderten Gasaustausch in der Phase des stärksten Wachstums des Keimlings [20]. Das chorio-allantoide Gefäßnetz liegt am 8. Bebrütungstag subepithelial, am 11. Bebrütungstag intraepithelial und ab dem 12. Bebrütungstag intra- bis supraepithelial [38, 46]. Das Sinuslumen ist ab dem 12. Bebrütungstag nur noch von einer dünnen zellulären Schicht bestehend, aus Gefäßendothel und darüber liegenden Chorionzellfortsätzen, von der Schalenhautgrenzschicht getrennt [38, 47, 49].

Die intra bis supraepithelial liegenden Kapillaren bleiben von den Chorionepithelzellen stets durch eine Basalmembran getrennt [38].

Die Dicke der Luft-Blutshranke liegt am 8. Bebrütungstag bei  $4,3 \pm 1,4\mu\text{m}$  [20].

Eine signifikante Reduktion der Schrankendicke lässt sich vom 10. Bebrütungstag ( $3,3 \pm 1,4\mu\text{m}$ ) auf den 12. Bebrütungstag ( $0,8 \pm 0,5\mu\text{m}$ ) beobachten [20].

Im Verlauf der weiteren Fetalentwicklung ändert sich die mittlere Schrankendicke kaum mehr (20./21. Bebrütungstag:  $0,6 \pm 0,2\mu\text{m}$ ) [20].

Da der Ausdehnung der CAM im Ei natürliche Grenzen gesetzt sind, wird ein ungehinderter Gasaustausch während der verstärkten Wachstumsphase des Keimlings durch diese erhebliche Reduktion der Luft-Blutshranke gewährleistet [20, 50].

### ***Die CAM-Matrix***

Der Stützgewebsanteil der CAM besteht aus polymorphen Zellen, die in lockerer Verteilung in einer flüssigkeitsreichen Grundsubstanz liegen [20, 38].

Die Grundsubstanz setzt sich aus Fibronectin, Laminin und Kollagen Typ IV zusammen [46].

Innerhalb dieser Grundsubstanz liegt das sinusoidale CAM- Gefäßsystem.

## 2. Arbeitsziele

Ziele der experimentellen Grundlagenuntersuchungen am tierversuchsnahen Modell der Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühnereies (CAM-Modell) waren folgende, für weitere experimentelle Untersuchungen und den klinischen Einsatz der photodynamischen Diagnostik (PDD) und photodynamischen Therapie (PDT) mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALS), relevante Fragestellungen:

- (1) Fluoreszenzkinetische Dokumentation der nach topischer Applikation von 5-ALS entstehenden Porphyrine.
- (2) Erstellung eines makroskopischen, semiquantitativen Auswertungsscores, der PDT-induzierte Schäden nach topischer Applikation von 5-ALS auf der Chorioallantoismembran bewertet.
- (3) Abhängigkeit der PDT-induzierten Schäden nach topischer Applikation von 5-ALS von der 5-ALS-Konzentration, Energiedichte des eingestrahlt Lichtes und Bestrahlungsquelle (Weißlicht, Laserlicht).
- (4) Zeitlicher Verlauf der PDT-induzierten Schäden nach topischer Applikation von 5-ALS in Abhängigkeit von der 5-ALS-Konzentration, Energiedichte des eingestrahlt Lichts und der Bestrahlungsquelle (Weißlicht, Laserlicht).
- (5) Ermittlung des für die Untersuchungen von PDT-induzierten Schäden nach topischer Applikation von 5-ALS geeigneten „therapeutischen Fensters“:
  - Dunkeltoxizität von 5-ALS
  - Subletale Schädigung des CAM-Modells in Abhängigkeit von der Energiedichte und Konzentration von 5-ALS
- (6) Histologische Untersuchungen PDT-induzierten Schäden nach topischer Applikation von 5-ALS in Abhängigkeit von der 5-ALS-Konzentration, Energiedichte des eingestrahlt Lichts und der Bestrahlungsquelle (Weißlicht, Laserlicht).
- (7) Vergleich des Ausmaßes der histologisch nachgewiesenen, PDT-induzierten Schäden nach topischer Applikation von 5-ALS mit dem semiquantitativen makroskopischen Score.
- (8) Wertigkeit des CAM-Modells im Hinblick auf seine Einführung für vergleichend experimentelle Untersuchungen zur PDT mit 5-ALS.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Präparation der CAM

Für Versuche mit dem CAM-Model ist ein Zeitfenster zwischen Bebrütungstag 10 (wenn die CAM vollständig entwickelt ist) und Bebrütungstag 18 (um Störungen durch immunologische Vorgänge durch den immunkompetent gewordenen Embryo auszuschließen) vorgegeben [22, 25].

Experimente, die primär Veränderungen der Mikrozirkulation untersuchen, können ab dem 10. Bebrütungstag durchgeführt werden [22, 23, 25].

Alle Bestrahlungsversuche wurden am 11. Bebrütungstag durchgeführt um innerhalb des verwendeten Beobachtungsrahmens von 96 Stunden (=15. Bebrütungstag) die möglichen Interaktionen mit dem wachsenden Hühnerfötus so gering wie möglich zu halten.

2 Tage alte bebrütete Hühnereier (White Leghorn / Geflügelzuchtanstalt der LMU München) wurden mit 80% Ethanol gewaschen und senkrecht mit dem schmalen Eiapex nach oben in einen Brutschrank (60% Luftfeuchtigkeit, Temperatur 38°C) eingelagert.

Am 4. Bebrütungstag wurde nach Desinfektion mit 80% Ethanol mit einem Bohrer ein kleines Loch in die Schale des schmalen Eiapex gebohrt und die Schalenhaut durchstoßen um durch Bildung einer „Luftkammer“ eine Absenkung des Keimlings und das ihn umgebende Gewebe und damit das Absenken der CAM unter die Schalenhaut zu erreichen.

Am 9. Bebrütungstag, nach Absenkung der CAM, wurde eine zirkuläre Öffnung (Durchmesser ca. 2cm) aus dem Eiapex geschnitten und die Schalenhaut entfernt.

Danach wurde die Öffnung mit Paraffinfilm verschlossen und die Bebrütung fortgesetzt [22, 23, 25].

Am 11. Bebrütungstag wurde auf ein gut vaskularisiertes, zentrales CAM-Areal ein Silikonring mit einem inneren Durchmesser von 6mm aufgebracht.

Die dadurch markierte CAM-Fläche betrug damit etwa 30mm<sup>2</sup>.

Abbildung 5 zeigt das präparierte Ei mit dem Gefäßsystem der Chorioallantoismembran.



Abbildung 5: Präpariertes Hühnerei mit freiliegendem Gefäßsystem der CAM

## 3.2. Fluoreszenzkinetische Untersuchungen

### 3.2.1. Aufbau zur Anregung und Messung der Fluoreszenz

Zur fluoreszenzkinetischen Untersuchung wurden die Eier nach oben beschriebener Präparation in einen Wärmeblock, der mit Wasser einer konstanten Temperatur von 24°C umspült wurde, gebracht und 30µg 5-ALS Lösung (0,1ml) topisch auf die CAM appliziert.

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

#### *Fluoreszenzanregung*

Zur Anregung der Fluoreszenz wurde eine Xenon-Lampe, (300W, D-Light, Storz, Tuttlingen, Deutschland) verwendet.

Das Licht der Weißlichtquelle wurde mit Hilfe eines Kondensators fokussiert.

Ein entsprechendes Filtersystem blockte den störenden Infrarotanteil ab.

Für die Fluoreszenzdiagnostik wurde das weiße Lampenlicht durch das Einschwenken eines Blaufilters zwischen Kondensator und Infrarotfilter so gefiltert, dass nur noch Licht des Wellenlängenbereichs 375nm bis 440nm, d.h. Licht im violett-blauem Spektralbereich, am Lampenausgang in ein Lichtleiterkabel eingekoppelt wurde.

Ein externer Fußschalter ermöglichte das Umschalten zwischen Weißlicht und blauem Anregungslicht für die Fluoreszenzdetektion (Fluoreszenzmodus).

Für eine möglichst verlustfreie Lichtleitung wurde ein Flüssigkeitslichtleiter mit einem Durchmesser von 4,8mm (495 FR, Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland) verwendet.

Am Ende des Lichtleiters standen bis zu 0,9W des violett-blauen Anregungslichtes zu Verfügung.

### ***Dokumentation der Fluoreszenz***

Zur Dokumentation der fluoreszenzkinetischen Veränderungen auf der CAM wurde eine modifizierte Farb-CCD-Kamera (Tricam SL PDD PAL, Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland) eingesetzt.

Das Fluoreszenzsignal wurde durch die Kamera mittels Bildintegration verstärkt.

Die Belichtungszeiten waren von 1/10000 Sekunden bis 2 Sekunden verstellbar.

Für die Weißlicht und Fluoreszenzbeobachtung waren in der Kamera zwei unabhängige Weißabgleiche integriert.

Im Fluoreszenzmodus wurde der Rotkanal automatisch relativ zu den anderen Kanälen (grün und blau) verstärkt, um die Rotsensitivität zu intensivieren. Das Ausgangssignal der Kamera wurde an einen Videorecorder weitergeleitet, die Veränderungen auf der CAM in Echtzeit videodokumentiert.

### ***Spektrale Analyse der Fluoreszenz***

Zur spektralen Untersuchung der Fluoreszenz wurde der Beobachtungsstrahlengang auf einen weiteren Kameratubus umgeleitet, der über ein Faserbündel mit einem optischen Vielkanalanalysator (O-SMA III, Princeton Instruments, Trenton NY, USA) verbunden war.

Das Anregungslicht wurde dabei mittels eines 450nm Langpassfilters unterdrückt.

Die Spektren wurden mit einer Integrationszeit von 4 Sekunden und einer Spaltbreite von 250 $\mu$ m aufgezeichnet.

### ***Das O-SMA-System***

Eine spektrale Analyse des Fluoreszenzlichtes wurde mit Hilfe eines optischen Vielkanalanalysators (Optical Multichannel Analyser, O-SMA, Princeton Instruments, Trenton, NY, USA) vorgenommen.

Es setzt sich zusammen aus einem Gitterspektrometer in der sogenannten Czerny-Turner-Anordnung (Gekreuzte Lichtwege) und einer am Ausgang des Spektrometers liegenden, restlichtverstärkenden Diodenzeile [18].

Das durch den Eintrittsspalt durchtretende Licht wurde durch einen Kollimatorspiegel auf ein Beugungsgitter abgebildet, dort in seine spektralen Anteile zerlegt und über einen zweiten Spiegel auf die Detektorebene fokussiert.

Durch ein Microchannel-Plate-System als Restlichtverstärker wurden die eintreffenden Photonen vervielfacht an eine Diodenzeile weitergegeben.

Durch die Eichung des Systems mit Spektrallinien bekannter Wellenlänge kann jeder Diode ein bestimmter Wellenlängenbereich zugeordnet werden.

Die Photonenzahl pro Diode wird orts aufgelöst in ein elektrisches Signal transferiert und gibt die der jeweiligen Wellenlängenposition entsprechenden Lichtintensität wieder.

Nach entsprechender Kalibrierung des Systems kann so, abhängig von Strichzahl und Winkeleinstellung des verwendeten Gitters, das einfallende Licht simultan über einen entsprechenden Spektralbereich analysiert werden. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Gitter (300 Linien/mm) konnte ein Spektralbereich von 430nm bis 750nm bei einer spektralen Auflösung von +/- 2nm abgedeckt werden.

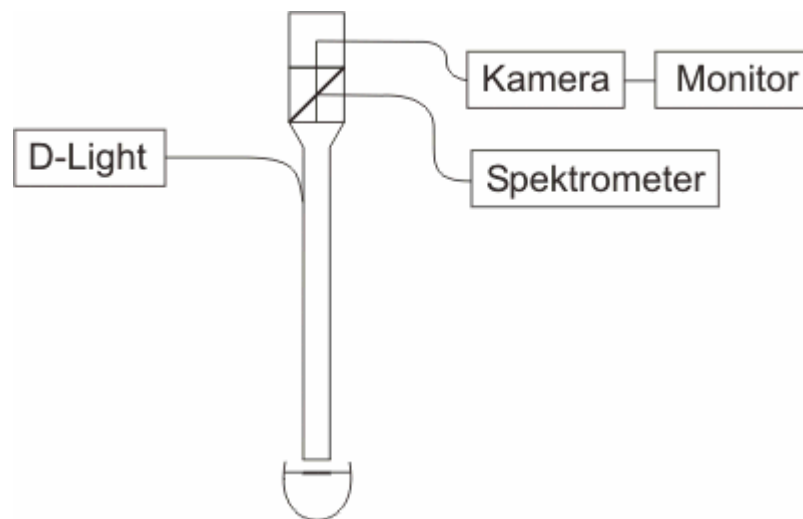


Abbildung 6: Versuchsanordnung – Fluoreszenz

### 3.2.2. Mathematische Auswertung der gemessenen Spektren

Das charakteristische Emissionsspektrum von PpIX mit Maxima bei 635nm und 705nm wurde in situ überlagert von der strukturlosen Autofluoreszenz des Gewebes.

Um beide Signalanteile getrennt voneinander darzustellen, wurde vor 5-ALS-Applikation ein Spektrum der Autofluoreszenz aufgenommen und das Integral über die Intensitäten  $\lambda = 635 \pm 5$  nm und  $540 \pm 5$  nm gebildet.

Da das Verhältnis der Gewebeautofluoreszenz und dem Emissionsspektrum von PpIX aufgrund der alleinigen Gewebespezifität entsprechend unabhängig von der 5-ALS-Applikation ist, konnte der Anteil der Autofluoreszenz zum Gesamtsignal bei 635nm auch nach der 5-ALS induzierten Synthese von PpIX berechnet und entsprechend abgezogen werden.

Zur Einbeziehung der Autofluoreszenz in die Auswertung wurden die integralen Intensitäten bei 540 +/-5nm bestimmt und der oben genannte Peakwert für PpIX auf die jeweilige Autofluoreszenzintensität normiert.

Zur Erstellung der Hauptkinetiken wurde die spezifische Fluoreszenzintensität von PpIX gegen die Zeit aufgetragen.

Über einen Beobachtungszeitraum von 180 Minuten wurden alle 40 Minuten Kinetiken erstellt (siehe Abbildung 8).

### 3.3. Festlegung der PDT-Parameter

#### 3.3.1. Die verwendeten Lichtquellen

Lichtquelle	Wellenlänge [nm]	Ausgangsleistung [Watt]
Sulforhodamin-B-Farbstofflaser (Dye-Laser-Modell 599, Coherent USA)	633	4
Storz-D-Light (Karl Storz , Tuttlingen, Deutschland)	375 bis 440	0,9

**Tabelle 1: Die verwendeten Lichtquellen**

#### ***Kohärente Lichtquelle: Laserlicht***

Ein Argon-Ionen Laser (Coherent Sabre Inova), dessen Linien im Wesentlichen bei 488nm und 514nm liegen, pumpte mit einer Ausgangsleistung bis 20W als Energiequelle für einen Sulfonamin B-Farbstofflaser (Coherent Dye-Laser Modell 599) mit einem Wellenlängenbereich von 600nm bis 700nm, verstellbar in 3nm Schritten und einer Halbwertsbreite von 6nm. Die Ausgangsleistung betrug bis 4W.

Das Laserlicht wurde in einen 600µm HCS-Lichtwellenleiter eingespeist und über eine Linse auf das Bestrahlungsfeld abgebildet.

#### ***Inkohärente Lichtquelle: Weißlicht***

Zur Weißlichtbestrahlung sowie zur Fluoreszenzanregung wurde das Storz D-Light verwendet. Das D-Light ist eine inkohärente Xenon-Kurzbogenlampe, basierend auf einem 300W Hochleistungsbrenner mit einer Ausgangsleistung von über 10W Weißlicht der Farbtemperatur

6000K. Mit Hilfe eines eingebauten Filtrerrades können zwei doppelseitig beschichtete Kurzpassfilter in den Strahlengang geschwenkt werden und somit die Emissionsbandbreite der Lichtquelle auf ein spektrales Fenster zwischen 375 und 440nm festgelegt werden.

Das „blocking“ der Kurzpassfilter lag im sichtbaren Spektralbereich bei  $> 10^4$  und war somit für spektroskopische Untersuchungen ausreichend.

Ein externer Fußschalter ermöglichte das Umschalten zwischen Weißlicht, benutzt zu Therapiezwecken und blauem Anregungslicht für die Fluoreszenzdetektion.

### **3.3.2. Durchführung der PDT**

#### ***Bestrahlungsparameter***

Die Leistungsdichte (Bestrahlungsstärke) für die PDT-Versuche betrug sowohl für die Bestrahlung mit Laserlicht, als auch mit Weißlicht konstant  $100\text{mW}/\text{cm}^2$ . Die jeweilige Lichtdosis (Bestrahlung) von 5, 15, 30 und  $60\text{J}/\text{cm}^2$  wurde durch Variation der Bestrahlungszeiten (50, 150, 300 und 600 Sekunden) erreicht.

#### ***Leistungsüberwachung***

Zur Überprüfung der Ausgangsleistung der jeweiligen Lichtquelle wurde vor den Bestrahlungsversuchen ein Powermeter (Labmaster, Coherent, USA) verwendet.

#### ***Bestrahlungsdurchführung***

Der Lichtstrahl der jeweilig verwendeten Lichtquelle wurde auf eine kreisförmige Fläche von 8,8mm Durchmesser abgebildet um das gesamte durch den Latexring markierte CAM-Areal von 6mm innerem Durchmesser und 1,4mm Rand zu bedecken.

Durch die optische Abbildung mittels einer Linse wurde eine homogene Ausleuchtung der Kreisfläche erreicht.

#### ***Versuchsaufbau Bestrahlung***

Die Versuchsanordnung zur Bestrahlung, die im Aufbau der zur Durchführung der Fluoreszenzversuche ähnelt, ist schematisch in Abbildung 7 dargestellt.



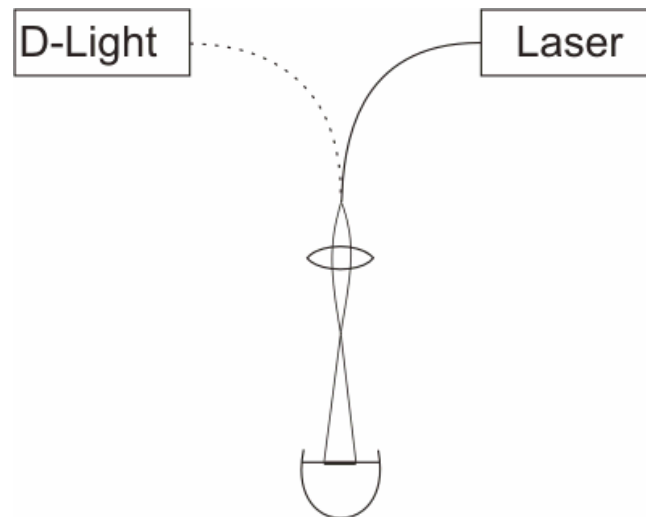


Abbildung 7: Bestrahlungsanordnung

### 3.3.3. Dunkeltoxizität und therapeutisches Fenster der 5-ALS-Konzentration

#### *Topische Applikation von 5-ALS*

Für die Versuche wurde 5-ALS der Firma Medac GmbH (Wedel, Deutschland) verwendet.

Als Lösungsmittel fungierte eine PBS-Lösung (PBS = Phosphat-Buffered Saline), der pH-Wert der jeweiligen 5-ALS-Lösungen betrug  $\sim$  pH 7.

Die 5-ALS-Lösung wurde für jede Versuchsreihe frisch zubereitet und bis zur Applikation lichtgeschützt aufbewahrt.

Der Photosensibilisator sollte topisch auf ein durch einen Silikonring markiertes CAM-Areal gebracht werden.

Die gewählte Applikationsform und die Eingrenzung des Inkubationsareal durch den Silikonring (Durchmesser: 6mm, Höhe: 2mm) bestimmten das Applikationsvolumen.

Um nur das markierte Areal mit 5-ALS zu inkubieren und das Überlaufen der 5-ALS-Lösung auf umgebende CAM-Bereiche so weit wie möglich zu vermeiden, war eine Reduktion der 5-ALS-Lösung auf ein Volumen von 0,1ml notwendig.

Die entsprechende Konzentration von 5-ALS (in  $\mu$ g) wurde in 0,1ml PBS gelöst und mit einer Eppendorffpipette topisch auf die markierte CAM-Fläche gegeben.

Das Ei wurde für die Dauer der 5-ALS-Inkubation bis zur Lichtbestrahlung mit Paraffinfilm verschlossen und wieder in den Brutschrank verbracht.

***Inkubationszeit von 5-ALS***

Analog zu den in klinischen Studien mit 5-ALS eingesetzten Inkubationszeiten wurden die Bestrahlungsversuche nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten nach topischer 5-ALS Gabe durchgeführt.

Die Wahl der Dauer der Inkubationszeit von 120 Minuten deckt sich auch mit den Ergebnissen der Versuche zur Fluoreszenzkinetik von 5-ALS induziertem Protoporphyrin IX auf der CAM, bei denen die maximale Fluoreszenzintensität von Protoporphyrin IX nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten zu beobachten ist (siehe 4.1.4).

***Ermittlung einer nicht toxischen 5-ALS-Konzentration ohne Bestrahlung (Dunkeltoxizität):***

Für die Experimente zur Festlegung der Dunkeltoxizität und zur Ermittlung der 5-ALS-Konzentration, die die größte subletale Bestrahlungsvariation ermöglicht, wurden 3, 30, 300 und 3000 $\mu$ g 5-ALS verwendet.

Um eine Interaktion der jeweiligen Photosensibilisatorkonzentrationen mit dem CAM-System (Schädigung der CAM-Matrix oder des CAM-Gefäßsystems = Dunkeltoxizität) auszuschließen, wurden die verschiedenen 5-ALS-Konzentrationen hinsichtlich ihres Einflusses auf die nicht bestrahlte CAM getestet.

Zur Ermittlung der Dunkeltoxizität wurden je 7 Eier mit 5-ALS in der Konzentration von 3 30, 300 und 3000  $\mu$ g/0,1 ml inkubiert.

Entsprechend dem Körpergewicht des Hühnerembryos am 12. Bebrütungstag von ca. 10g entsprachen diese Konzentrationen 0,3, 3, 30 und 300 $\mu$ g5-ALS/g KG (siehe Tabelle 2).

Dosis 5-ALS ( $\mu$ g/0,1 ml]	Konzentration 5-ALS ( $\mu$ g/g KG)	Anzahl CAM (n=)
3	0,3	7
30	3	7
300	30	7
3000	300	7

**Tabelle 2: Dosis / Konzentrationsangaben zur Bestimmung der Dunkeltoxizität von 5-ALS**

***Ermittlung des therapeutischen Fensters der 5-ALS-PDT im CAM-Modell***

Es sollte eine 5-ALS-Konzentration gefunden werden, die die größtmögliche Bestrahlungsvariation mit verifizierbaren PDT-Effekten auf der CAM in der Weißlicht sowie der Lasergruppe erlaubte.

Ausgehend von den in der Literatur verwendeten Bestrahlungen im CAM-Modell von 5 bis 20 J/cm<sup>2</sup> [25, 26] wurden die Versuche zur Festlegung der geeigneten Photosensibilisatorkonzentration mit 15J/cm<sup>2</sup> Weißlicht begonnen.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Weißlicht-PDT mit den verschiedenen 5-ALS-Konzentrationen wurden mit 30 und 300 und 3000µg 5-ALS/0,1ml Bestrahlungen mit Laser 15J/cm<sup>2</sup> durchgeführt (siehe Tabelle 3).

Dosis 5-ALS (mg/0,1ml)	Weißlicht 15J/cm <sup>2</sup>	Laserlicht 15J/cm <sup>2</sup>
3	n=7	n=0
30	n= 23	n=18
300	n=10	n=8
3000	n=12	n=8

**Tabelle 3: 5-ALS Konzentrationssuche (Weißlicht und Laser 15J/cm<sup>2</sup>)**

**3.3.4. Variation der Bestrahlungsstärken**

Ausgehend von der Bestrahlung mit 15J/cm<sup>2</sup> Weißlicht, die bei der für die weiteren Versuche festgelegten 5-ALS-Konzentration von 30µg/0,1ml einen mittleren makroskopischen Score induziert hatte, wurden die nachfolgend verwendeten Bestrahlungsstärken in beiden Gruppen durch Verdopplung auf 30 und 60J/cm<sup>2</sup> und im niedrigen Dosisbereich auf 5J/cm<sup>2</sup> festgelegt.

Lichtquelle	Bestrahlungsstärke (J/cm <sup>2</sup> )
Weißlicht	5 / 15 / 30 / 60 J/cm <sup>2</sup>
Laser	5 / 15 / 30 / 60 J/cm <sup>2</sup>

**Tabelle 4: Festlegung der Bestrahlungsstärken in der Weißlicht- und Lasergruppe**

### 3.3.5. Kontrollgruppen

Kontrollgruppen wurden gebildet zur Untersuchung von Effekten des topisch applizierten Photosensibilisators ohne nachfolgende Bestrahlung (=Dunkeltoxizität, siehe 3.3.3) und in den jeweiligen Bestrahlungsgruppen für die verwendeten Bestrahlungsstärken (5, 15, 30 und 60J/cm<sup>2</sup>) bei einer einheitlichen Leistungsdichte von 100mW/cm<sup>2</sup> ohne vorherige 5-ALS-Inkubation(=Lichtsensitivität).

Kontrollen: nur 5-ALS, keine Bestrahlung (dark toxicity) = Dunkeltoxizität (n=28)
Kontrollen: kein 5-ALS, nur Licht (light sensitivity) = Lichtsensitivität (n=40)

**Tabelle 5: Kontrollgruppen für Dunkeltoxizität und Lichtsensitivität**

### 3.3.6. Versuchsvariable / Versuchskonstante

Im Versuchsrahmen stellten sich die konstanten Versuchsparameter wie folgt dar:

a) 5-ALS-Konzentration: 30µg 5-ALS, gelöst in 0,1 ml PBS
b) Leistungsdichte 100mW/cm <sup>2</sup>
c) Bestrahlungszeitpunkt: 11. Bebrütungstag (11. B.T.)
d) Inkubationszeit: 120 Minuten
e) Beobachtungszeitpunkte: post (11. B.T.), 24h (12. B.T.), 48h (13. B.T.), 72h (14. B.T.), 96h (15. B.T.)
f) Zeitpunkt der Entfernung der CAM zur histologischen Aufarbeitung: 96 Stunden nach Bestrahlung (15. B.T.)

**Tabelle 6: Konstante Versuchsparameter**

Die variablen Versuchsparameter wurden wie folgt gewählt:

a) Lichtquelle	Weißlicht Laser
b) Bestrahlung	Weißlicht: 5 / 15 / 30 / 60J/cm <sup>2</sup> Laser: 5 / 15 / 30 / 60J/cm <sup>2</sup>

**Tabelle 7 :Variable Versuchsparameter**

### *Ausgewertete Bestrahlungsversuche*

Die Anzahl der in die Auswertung eingeflossenen PDT-Versuche mit topisch applizierter 5-ALS, die entweder mit Laser oder Weißlicht bestrahlt wurden, sind in Tabelle 8 aufgelistet.

(Die Anzahl der in den Kontrollgruppen befindlichen CAMs siehe 3.3.5.)

Leistungsdichte	Anzahl CAMs: Laserlicht	Anzahl CAMs: Weißlicht
5J/cm <sup>2</sup>	n=13	n=6
15J/cm <sup>2</sup>	n=18	n=23
30J/cm <sup>2</sup>	n=14	n=17
60J/cm <sup>2</sup>	n=9	n=14

**Tabelle 8: Anzahl ausgewerteter Bestrahlungsversuche (PDT) mit topisch applizierter 5-ALS**

## **3.4. Erfassung des photodynamischen Schadens**

### **3.4.1. Das makroskopische Beurteilungsschema (Makroskopischer Score)**

PDT-induzierte Veränderungen der CAM-Matrix und des CAM-Kapillarsystems wurden unmittelbar nach Bestrahlung und zu festgelegten Beobachtungszeitpunkten (24h, 48h, 72h und 96h nach Bestrahlung) dokumentiert.

Die Beurteilung erfolgte mit Hilfe einer optischen Lupe (M420, Leitz, Wetzlar, Deutschland) mit einer Vergrößerung bis zu 250x.

Das durch den Silikonring markierte CAM-Areal wurde zum jeweiligen Beobachtungszeitpunkt photodokumentiert.

Zur semiquantitativen Beurteilung der makroskopisch detektierbaren PDT-Effekte wurde der bestehende makroskopische Score [24, 25] weiter modifiziert:

Die Dokumentation erfolgte durch eine Auswertung der PDT-Effekte auf die CAM und das CAM-Gefäßsystem mit einer 4-Punkteskala, in der die Veränderungen:

- der Gefäßmorphologie
  - der CAM-Blutzirkulation
- und der CAM-Matrixmorphologie berücksichtigt wurden.

**Grad 0--Keine CAM-Veränderungen**

Blutfluss intakt

Keine Unterbrechungen der Zirkulation

Keine CAM-Veränderungen

**Grad I--Leichte CAM-Veränderungen**

Blutfluss stellenweise unterbrochen

Kapillardefekte: Vasokonstriktion der Arteriolen

Vasodilatation der Venolen

Leichte CAM-Veränderungen (Austrocknung)

**Grad II--Mittelschwere CAM-Veränderungen:**

Blutfluss stellenweise unterbrochen

Kapillardefekte / Defekte größerer Blutgefäße

Stellenweise Einblutung in die CAM

CAM-Denaturierung

**Grad III--Schwere CAM-Veränderungen:**

Blutfluss in großen CAM-Arealen unterbrochen

Irreversible Hämostase

Zerstörte Blutgefäße

Einblutungen in die CAM

Nekrose der CAM

**Grad IV--Tod des Embryos**

Tabelle 9. Makroskopischer Bewertungsscore

### **3.4.2. Das mikroskopische Beurteilungsschema**

96 Stunden nach Bestrahlung, entsprechend dem 15. Bebrütungstag, wurde die CAM mit dem durch den Silikonring markierten Bestrahlungsareal zirkulär bis auf einen schmalen, der Eischale anliegenden Rand von umgebendem und darunter liegendem Gewebe gelöst, mit Nadeln auf einem Korkplättchen fixiert und sofort in eine Formalinlösung verbracht. Das Präparat wurde für 48 Stunden in Formalinlösung fixiert.

Nach der Fixation wurde die CAM in einen Paraffinblock eingebettet. Mit einem Mikrotom (Leica, Deutschland) wurden 50µm dicke, horizontale Schnitte des CAM-Präparates gefertigt. Diese wurden auf einen Objektträger aufgezogen und mit Haematoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die so gewonnenen histologischen Schnitte wurden unter einem Mikroskop hinsichtlich ihrer morphologischen Veränderungen untersucht.

Mit der histologischen Aufarbeitung der CAM sollte eine möglicherweise bestrahlungsinduzierte Nekrose dokumentiert und deren Ausdehnung gemessen werden. Zur Messung der Nekroseausdehnung diente ein Rechner mit einer Bildverarbeitungssoftware (Optimas 6.2, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

### **3.5. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung und Signifikanzanalyse wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Dies ist der am häufigsten verwendete Test bei zwei unabhängigen Stichproben.

Mit dem Mann-Whitney-U-Test wird überprüft, ob zwei beprobte Grundgesamtheiten die gleiche Lage besitzen.

Eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung wurde bei  $p < 0,05$  angenommen.

Die Beobachtungen aus beiden Gruppen werden kombiniert und in eine gemeinsame Rangfolge gebracht, wobei im Falle von Rangbindungen der durchschnittliche Rang vergeben wird.

Als Software wurde das Statistikprogramm SPSS 10.0 (SPSS. Inc. Chicago, Illinois, USA) verwendet.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Fluoreszenzkinetik**

#### **4.1.1. Fluoreszenzspektrum der nativen CAM**

Das Fluoreszenzspektrum der nativen CAM ohne Gabe von 5-ALS zeigte schon in der Autofluoreszenzmission ( $t=0$ ) charakteristische Emissionsspektren von PpIX mit dem Maximum bei 635nm, außerdem zwei weitere auffällige Banden mit Emissionsmaxima bei 620nm und 680nm, was den Emissionsspektren der wasserlöslichen Porphyrine Uro- und Coproporphyrin entspricht (Abbildung 8).

#### **4.1.2. Pharmakokinetik von 5-ALS-induziertem PpIX**

Nach topischer 5-ALS-Gabe war im Verlauf der Messung ( $t=0$  bis 180 Minuten) eine Intensitätszunahme des typischen 635nm Spektrums und auch der 700nm Bande zu beobachten. Zu frühen Beobachtungszeitpunkten ( $t=40$ min und  $t=60$ min) entstand nahezu ausschließlich PpIX. Der größte Unterschied in der Entwicklung der Fluoreszenzintensität findet sich zwischen  $t=40$ min und  $t=60$ min statt (Abbildung 8).

60 Minuten nach topischer 5-ALS-Inkubation waren nur noch kleine Intensitätszunahmen bis zum Beobachtungsendpunkt ( $t=180$ min) zu erkennen (Abbildung 8).

Durch topische 5-ALS-Gabe auf die Chorioallantoismembran wurde somit eine signifikante Protoporphyrin IX-Produktion induziert.

#### **4.1.3. Pharmakokinetik der wasserlöslichen Porphyrine**

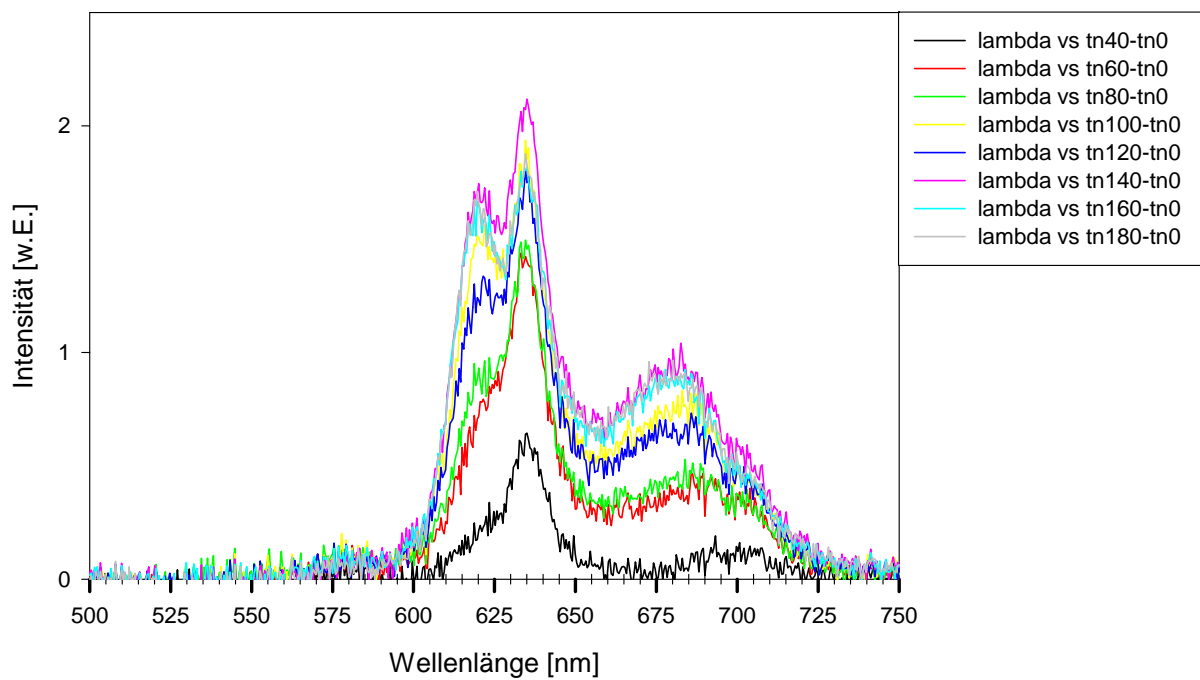
Schon im Fluoreszenzspektrum der nativen CAM waren die für die wasserlöslichen Porphyrine Uro und Coproporphyrin charakteristischen Emissionsspektren bei 620nm sowie bei 680nm zu erkennen (Abbildung 8).

Im frühen Spektralverlauf ( $t=40$ min,  $t=60$ min) zeigte sich der kurzwellige Anteil der 620 nm Bande wenig ausgeprägt, nach 80 Minuten sah man jedoch einen kontinuierlichen Anstieg bis zum Beobachtungsendpunkt ( $t=180$ min).

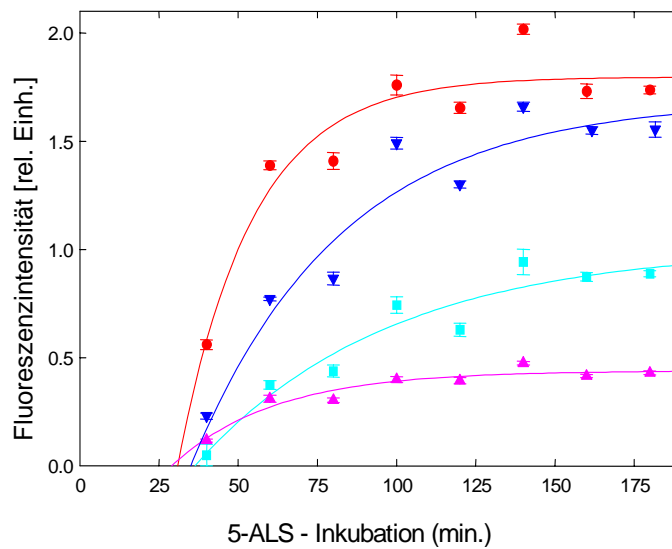
Der langwellige Anteil von 680nm nahm kontinuierlich über den Beobachtungszeitraum zu, wenn auch in geringerem Maße als der kurzwellige Anteil (Abbildung 8).







**Abbildung 8: Kinetik der PpIX-Synthese in der CAM unter Berücksichtigung der Gewebeatoffluoreszenz (a) und nach Subtraktion der Gewebeatoffluoreszenz (b)**



**Abbildung 9: Fluoreszenzkinetik für PPIX (rot und lila) und wasserlösliche Porphyrine (blau und türkis)**

---

#### 4.1.5. Fluoreszenzdokumentation auf der CAM

Die Änderungen des dokumentierbaren Fluoreszenzmusters nach topischer Applikation von 5-ALS auf die CAM ließen sich auch durch die simultan stattfindende Videodokumentation darstellen.

Abbildung 10 zeigt die Entwicklung der Fluoreszenz zu bestimmten Beobachtungszeitpunkten ( $t=0$ , d.h. direkt nach topischer 5-ALS-Inkubation der CAM, und  $t=40$ , 100 und 180 Minuten) nach 5-ALS-Inkubation.

Während bei den fluoreszenzkinetischen Messungen auf der nativen CAM Fluoreszenzsignale der wasserlöslichen Porphyrine, sowie in schwacher Intensität auch von Protoporphyrin IX nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 8), war auf der nativen CAM und direkt nach topischer Applikation von 5-ALS mit dem verwendeten Bildverarbeitungssystem keine Fluoreszenz auf der CAM darstellbar.

40 Minuten nach der 5-ALS-Applikation konnte ein fluoreszenzpositives Areal der Größe der Innenfläche des zur 5-ALS-Gabe auf die CAM aufgetragenen Silikonringes beobachtet werden. Abbildung 10 zeigt die sich im weiteren Verlauf entwickelnden, sich streifenförmig intra und paravasal über die CAM ausbreitenden Fluoreszenzpositiven-Areale nach 40, 100 und 180 Minuten.

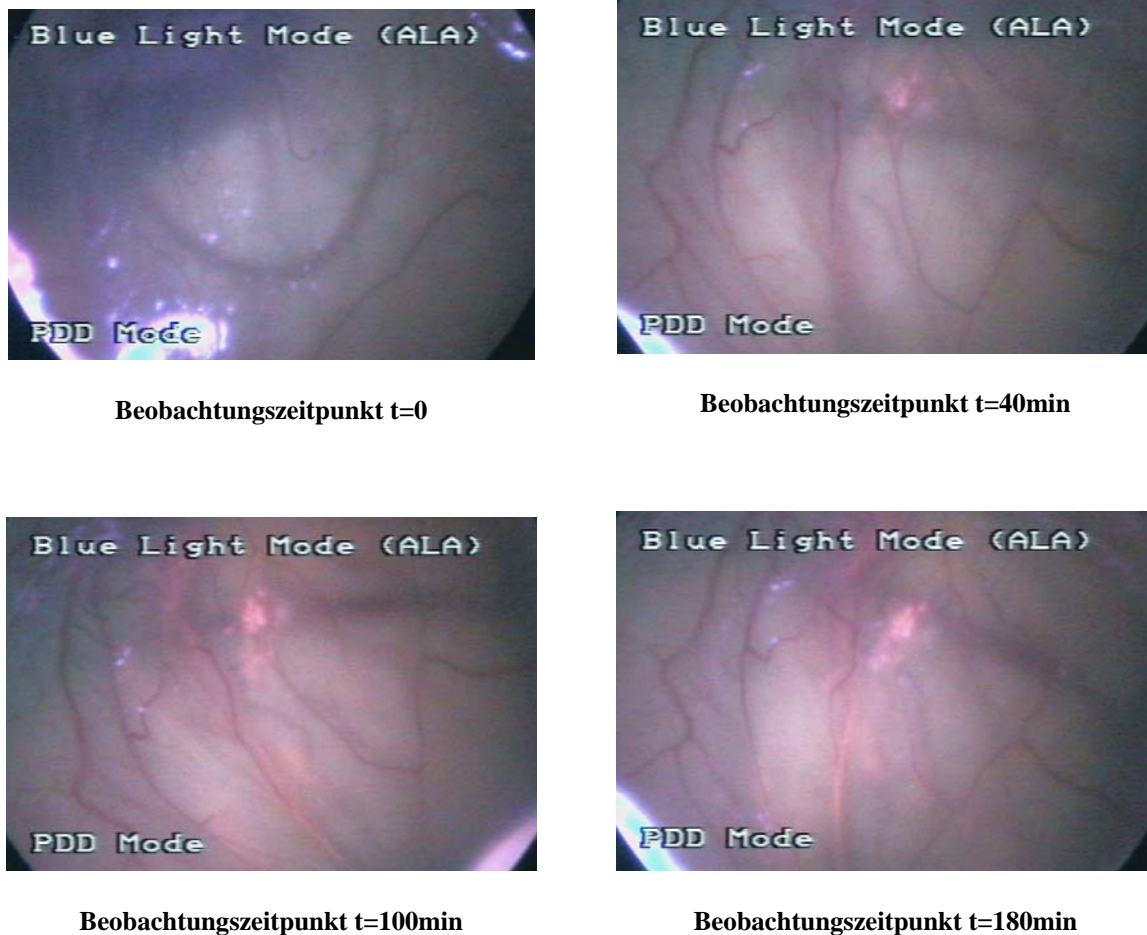


Abbildung 10: CAM unter Fluoreszenzanregung : 0, 40, 80 und 100 Minuten nach Applikation von 5-ALS

#### 4.1.6. Photosensibilisierung des Hühnerembryos

Das Fluoreszenzspektrum der mit 5-ALS inkubierten CAM zeigte typische Emissionsmaxima für wasserlösliche Porphyrine wie Uro und Koproporphyrin die vom Hühnerembryo über die CAM, welche auch als Ausscheidungsorgan fungiert, ausgeschieden werden (Abbildung 8).

Die Fluoreszenzzunahme der wasserlöslichen Porphyrine nach topischer 5-ALS-Applikation auf die CAM zeigte, dass 5-ALS über das CAM-Gefäßsystem aufgenommen, zum Hühnerembryo gelangt und dort zu PpIX umgesetzt wird.

Wenn 5-ALS über den CAM-Kreislauf in den Embryo gelangt, muss auch eine Photosensibilisierung des Embryos angenommen werden:

Um die Photosensibilisierung des Embryos nach topischer 5-ALS-Applikation zu verifizieren, wurden in einer Versuchsgruppe bestehend aus 8 Eiern, 4 CAMs mit der für die Bestrahlungsversuche verwendeten 5-ALS-Konzentration 30 µg/0,1 ml inkubiert.

4 Eier erhielten als Kontrollgruppe kein 5-ALS.

Nach der Inkubationszeit von 120 Minuten wurden die Hühnerembryonen entnommen und fluoreszenzdiagnostisch untersucht.

Es zeigte sich hierbei die typische PpIX-Fluoreszenz der Embryonen deren CAM 5-ALS-inkubiert wurde, während bei den Embryonen der nicht inkubierten CAMs keine PPIX-Fluoreszenz nachweisbar war (Abbildung 11).

Bei der Präparation der fluoreszierenden Embryonen wiesen vor allem das Gehirn und die inneren Organe wie Leber, Milz und Nieren hohe Fluoreszenzintensitäten auf (Abbildung 11).

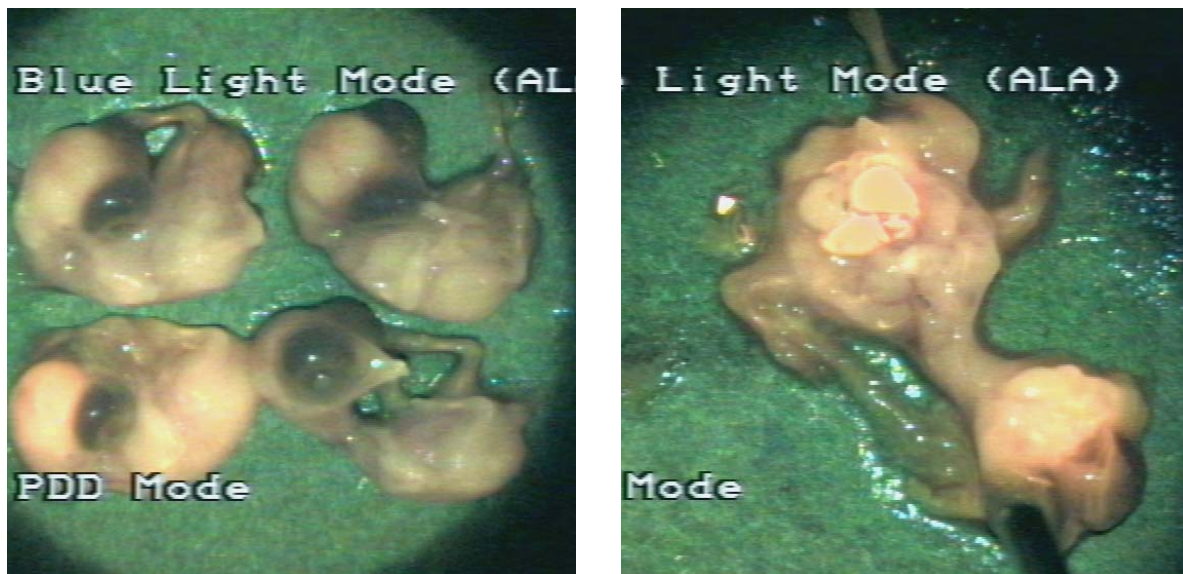


Abbildung 11 (a) und (b): Hühnerembryonen unter Fluoreszenzanregung mit (a) und ohne (b) 5-ALS-Inkubation der CAM

## 4.2. Makroskopisch detektierbare PDT-induzierte CAM-Veränderungen

Makroskopisch sichtbare PDT-induzierte Veränderungen des CAM-Gefäßsystems und der CAM-Matrix wurden zu den jeweiligen Beobachtungszeitpunkten mittels des semiquantitativen Beurteilungsscores beschrieben und gewertet (siehe Tabelle 9).

### 4.2.1. Kontrollgruppen

Weder die untersuchten 5-ALS-Konzentrationen (0, 3, 30, 300 und 3000 $\mu$ g/0,1ml) noch die Kontrollgruppe der bestrahlten CAMs ohne 5-ALS mit den im Versuchsrahmen verwendeten Bestrahlungsstärken (5, 15, 30 und 60J/cm<sup>2</sup>) in der Weißlicht sowie in der Lasergruppe zeigten makroskopische sowie mikroskopische Effekte auf der Chorioallantoismembran.

Thermische Schädigung des CAM- Kapillarnetzes sowie der umgebenden Matrix konnten so in der Laser sowie in der Weißlichtgruppe ausgeschlossen werden.

#### **4.2.2. PDT-induzierte CAM-Gefäßschäden**

Im bestrahlten CAM-Areal konnten PDT-induzierte Veränderungen der Gefäßmorphologie abhängig vom jeweiligen Gefäßtyp beobachtet werden.

So kam es durch den thrombembolischen Verschluss und/oder durch bestrahlungsinduzierte Vasokonstriktion kleiner Arteriolen nach PDT zu deren Abdunklung (Abbildung 18).

Die Entleerung durch Vasodilatation kleiner Venolen nach PDT führte zu deren Ausbleichung (Abbildung 18).

Jedoch stellt der Gefäßtyp (arteriell, venös), in Übereinstimmung mit der Literatur, einen weniger entscheidenden Faktor für einen möglichen PDT-Schaden dar als die tatsächliche Gefäßgröße [9].

PDT induzierte Gefäßschäden sind in 70% gleichermaßen im arteriellen und im venösen Anteil des CAM-Kapillarsystems zu beobachten [9].

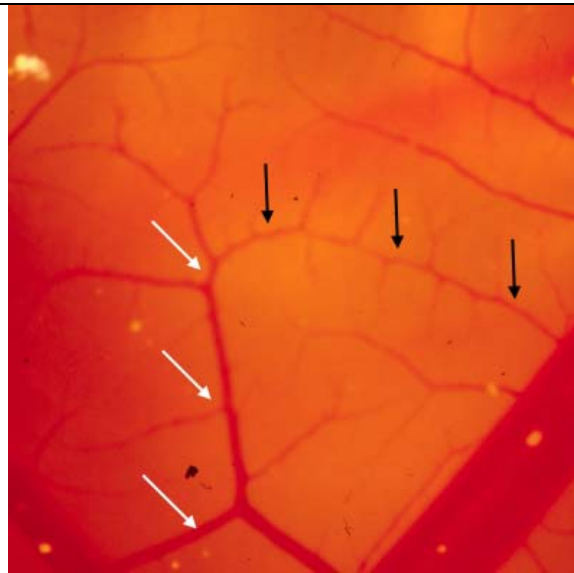
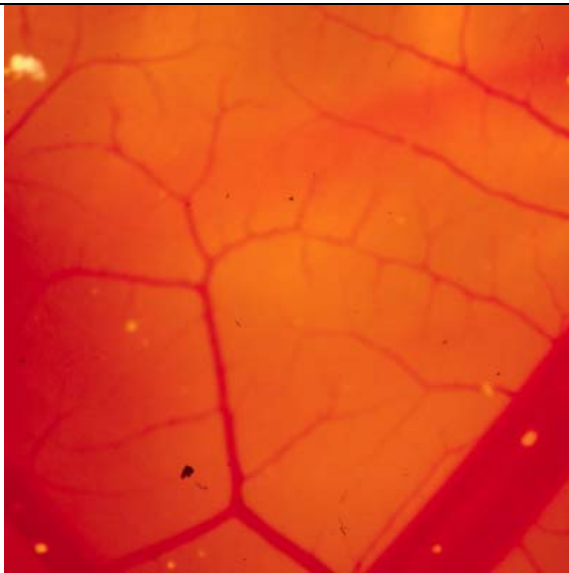
Deshalb wurden der arterielle und der venöse Schenkel des Gefäßnetzes als eine Einheit betrachtet, d.h. die makroskopisch sichtbaren Gefäßschäden flossen unabhängig vom beobachteten Gefäßtyp in die Schadensbewertung ein [9].

Dokumentierbare Gefäßschäden konnten bei den kleinen und mittelgroßen Gefäßdurchmessern (kleiner gleich  $70\mu\text{m}$ ) in beiden (arterieller und venöser) Schenkeln des Kapillarsystems beobachtet werden.

Phototoxisch induzierte Schäden an den großen, aus der Tiefe den CAM-Gefäßsinus drainierenden Gefäßen ( $>120\mu\text{m}$ ) konnten bei den verwendeten Versuchsparametern nicht beobachtet werden.

Die durch PDT hervorgerufenen Gefäßschädigungen führten zur Störung, bzw. zum Sistieren des CAM-Blutflusses.

Hämostase und Thrombenbildung in den bestrahlten Gefäßen (Abbildung 15, Abbildung 16) und, abhängig vom Durchmesser des Gefäßes und der Bestrahlungsdauer, auch Gefäßzerstörung mit Leakage und perivasalem Extravasat (Abbildung 17, Abbildung 18) sind typische PDT-induzierte Folgen auf der Chorioallantoismembran.



**Grad 0-Keine CAM-Veränderungen**

Blutfluss intakt

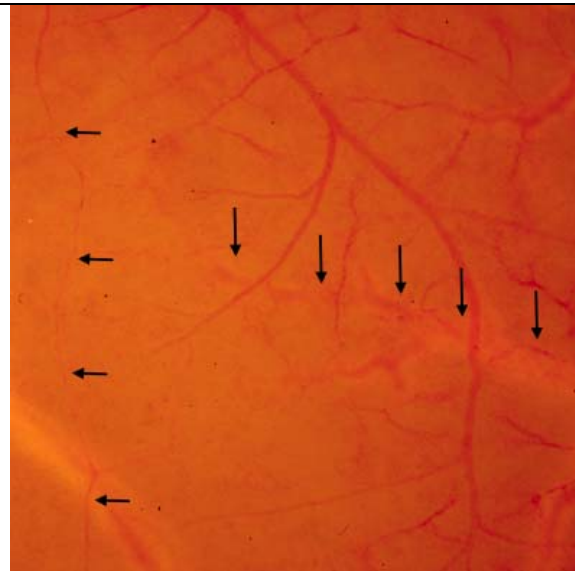
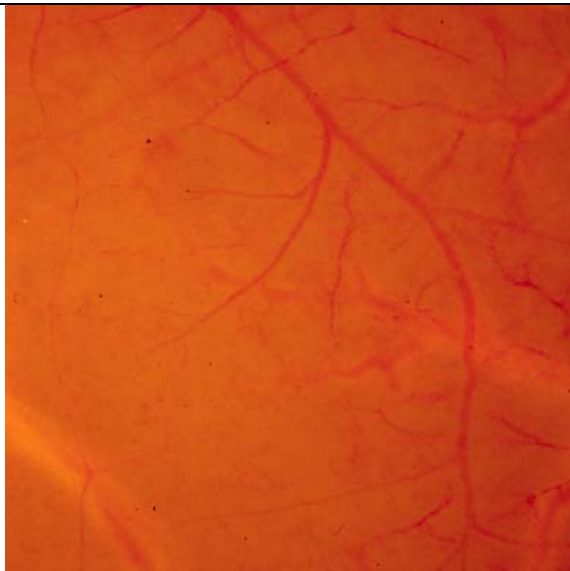
Keine Unterbrechungen der Zirkulation

Keine CAM-Veränderungen

Arterieller Anteil = weiße Pfeile

Venöser Anteil = schwarze Pfeile

**Abbildung 12: Makroskopischer Score 0**



**Grad I--Leichte CAM-Veränderungen**

Blutfluss stellenweise unterbrochen

Kapillardefekte:

Vasokonstriktion der Arteriolen

Vasodilatation der Venolen

Venöser Anteil = schwarze Pfeile

**Abbildung 13: Makroskopischer Score I**



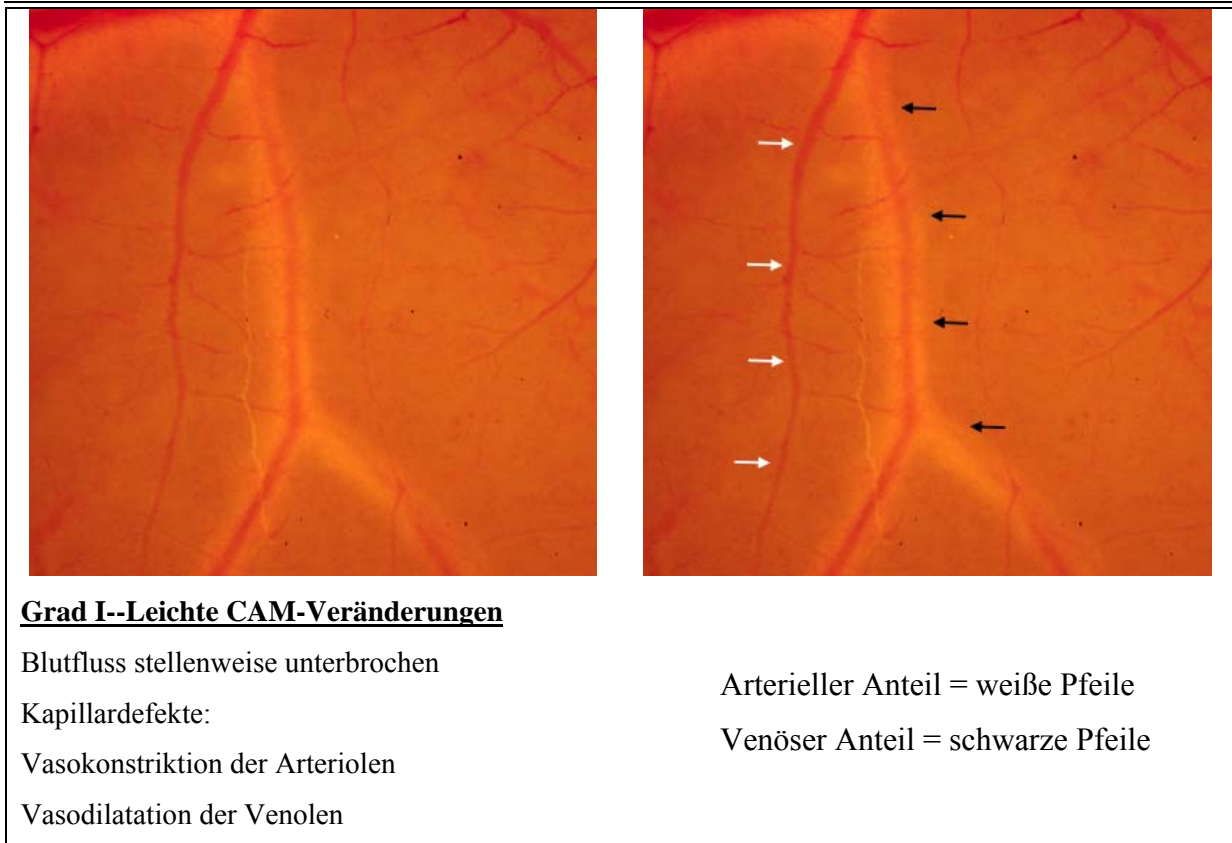


Abbildung 14: Makroskopischer Score I

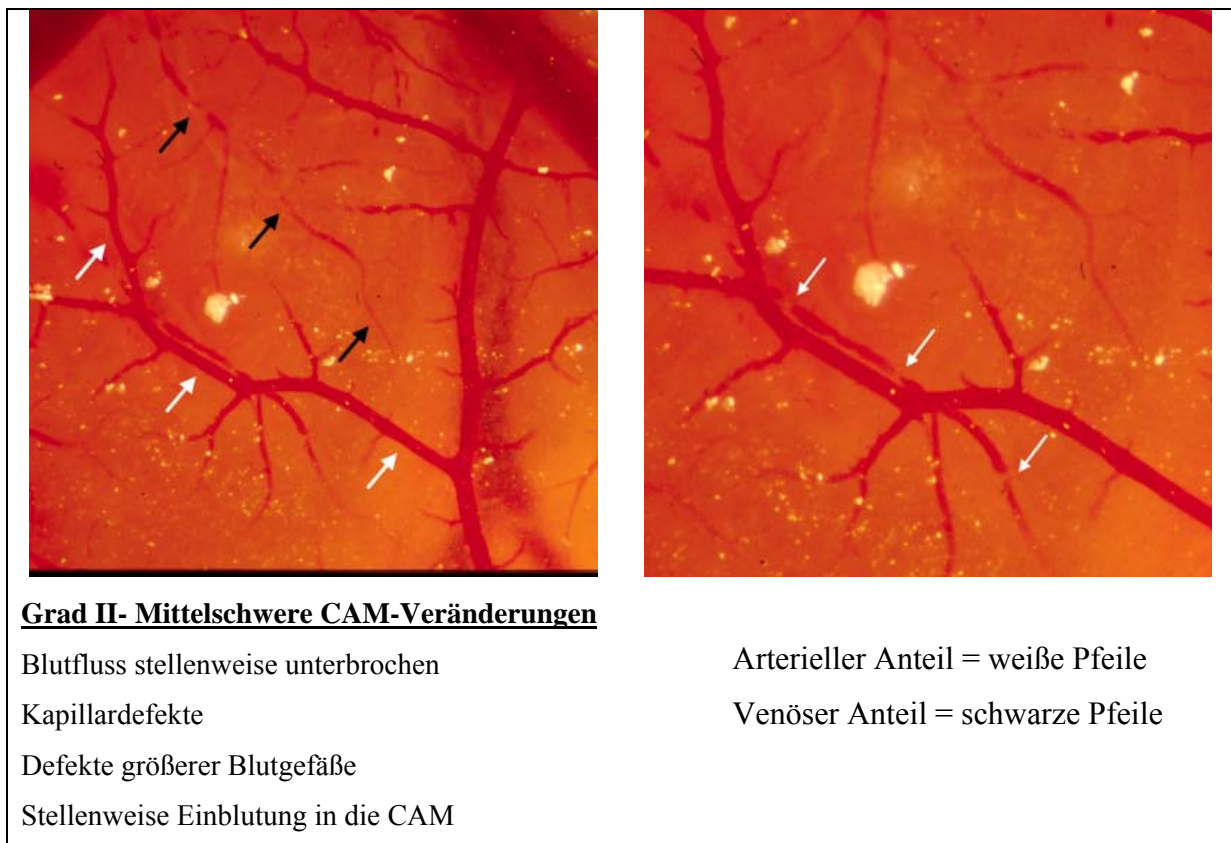
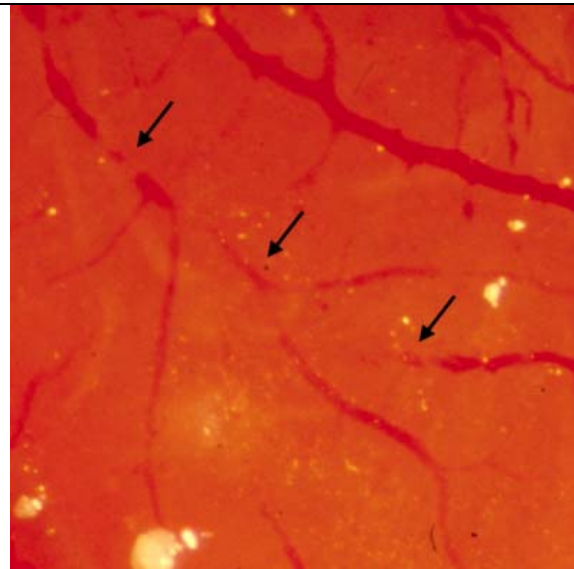
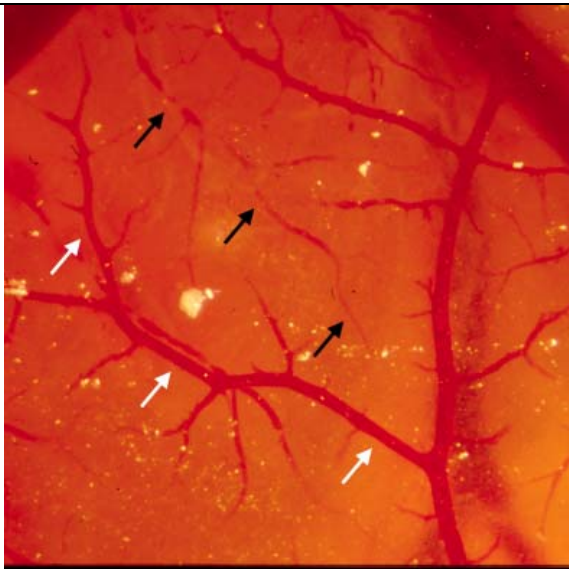


Abbildung 15: Makroskopischer Score II





**Grad II- Mittelschwere CAM-Veränderungen**

Blutfluss stellenweise unterbrochen

Kapillardefekte

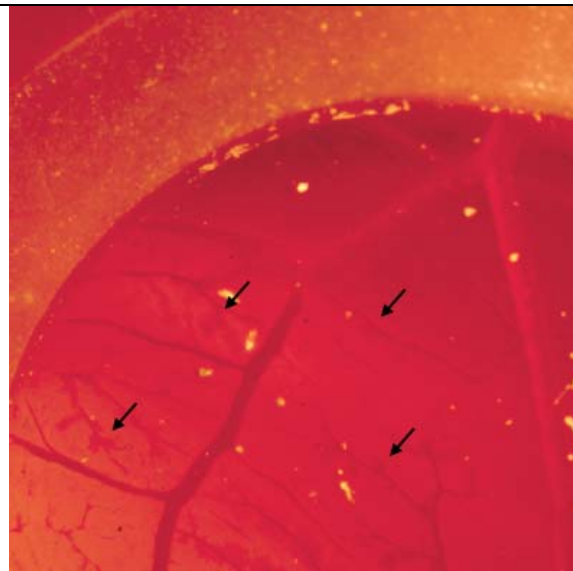
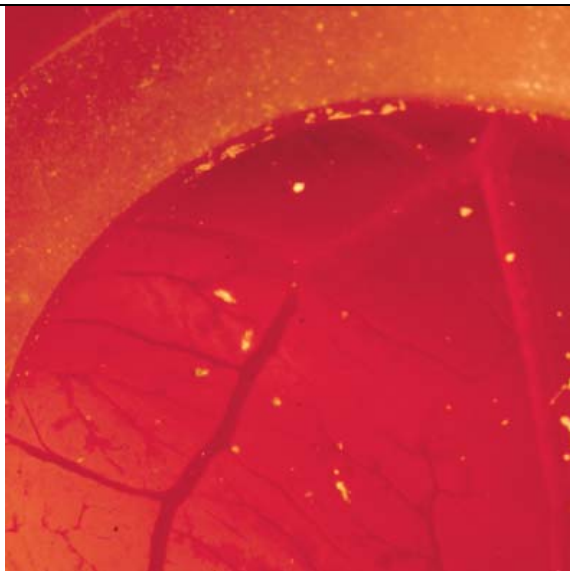
Defekte größerer Blutgefäße

Stellenweise Einblutung in die CAM

Arterieller Anteil = weiße Pfeile

Venöser Anteil = schwarze Pfeile

**Abbildung 16: Makroskopischer Score II – vergrößerte Abbildung**



**Grad II- Mittelschwere CAM-Veränderungen**

Blutfluss stellenweise unterbrochen

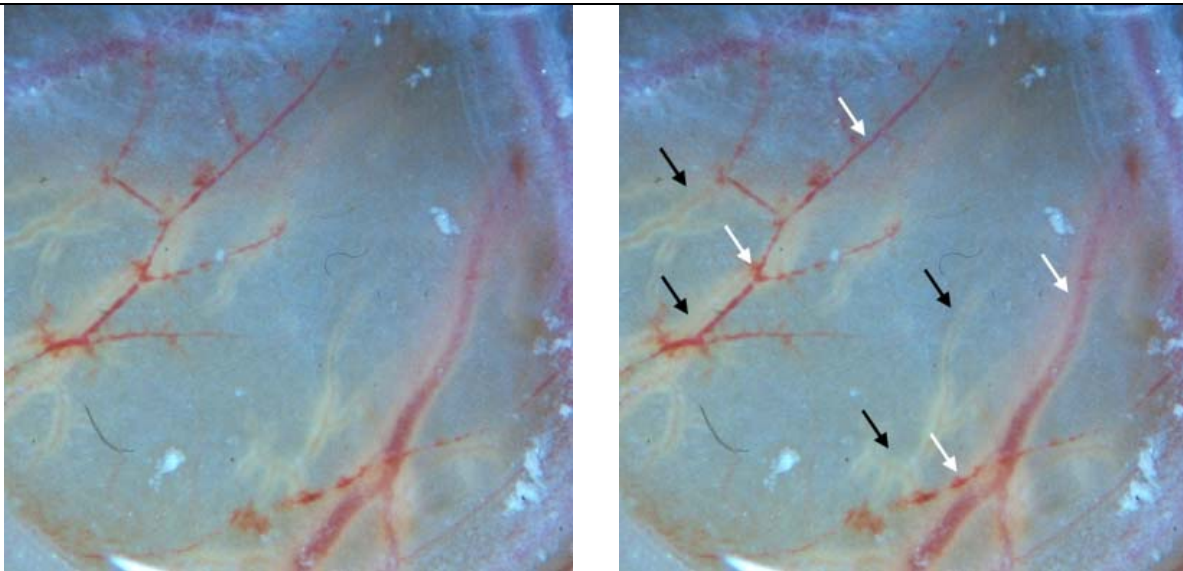
Kapillardefekte

Defekte größerer Blutgefäße

Stellenweise Einblutung in die CAM

Venöser Anteil = schwarze Pfeile

**Abbildung 17: Makroskopischer Score II**



**Grad III--Schwere CAM-Veränderungen:**

Blutfluss in großen CAM-Arealen unterbrochen  
 Irreversible Hämostase  
 Zerstörte Blutgefäße  
 Einblutungen in die CAM

Arterieller Anteil = weiße Pfeile  
 Venöser Anteil = schwarze Pfeile

**Abbildung 18: Makroskopischer Score III**

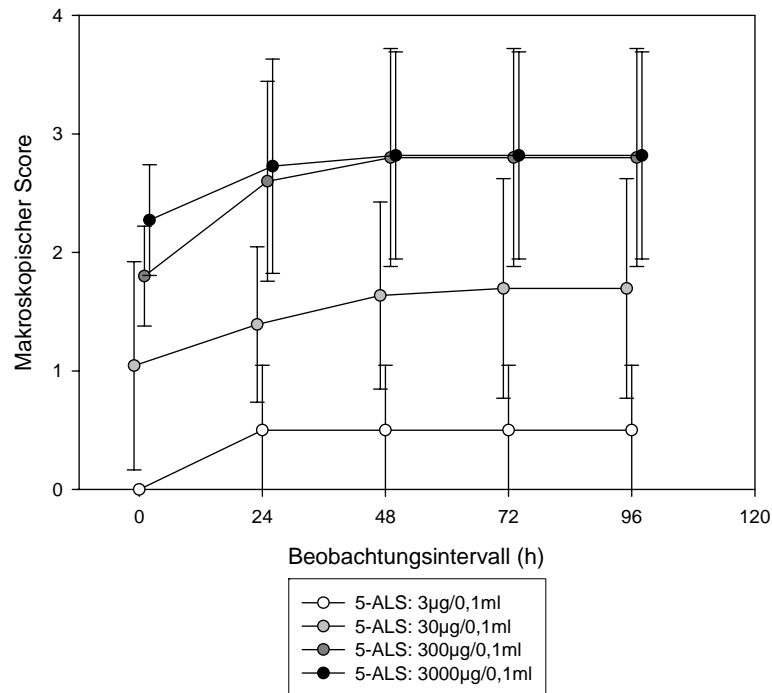
### 4.2.3. PDT-induzierte Schädigung der CAM-Matrix

Als bestrahlungsabhängige Veränderungen der das Gefäßsystem umgebender CAM-Matrix wurden, abhängig von der Bestrahlungsstärke, Austrocknung bis zu Nekrosenbildung in den bestrahlten Arealen beobachtet.

### 4.3. Konzentrationsermittlung von 5-ALS

Untersucht wurde an Hand des erstellten makroskopischen Scores die PDT-induzierte Schädigung der CAM in Abhängigkeit von der Konzentration von 5-ALS, sowie der Bestrahlungslichtquelle (Weißlicht oder Laser) und der Energiedichte des erimitierten Lichtes. Zur Ermittlung des „therapeutischen Fensters“ der 5-ALS-Konzentration, welches für Bestrahlungsversuche mit dem CAM-Modell den größtmöglichen Versuchsrahmen für die Verwendung von Weiß- und Laserlicht ermöglicht, wurden ausgehend von einer mittleren Bestrahlungsstärke von 15J/cm<sup>2</sup> Weißlicht verschiedene 5-ALS-Konzentrationen getestet. Die 5-ALS-Konzentrationen betragen 3µg, 30µg, 300µg und 3000µg/0,1ml.

Die Mittelwerte der makroskopischen Scores (Standardabweichung als Fehler) der einzelnen 5-ALS-Konzentrationen sind über den Beobachtungszeitraum von 96 Stunden (zu den festgelegten Beobachtungszeitpunkten direkt nach Bestrahlung und 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Bestrahlung) in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19: PDT-Schäden nach Weißlichtbestrahlung (15J/cm<sup>2</sup>) in Abhängigkeit der 5-ALS-Konzentration**

Beobachtungszeitpunkt	3µg/0,1ml	30µg/0,1ml	300µg/0,1ml	3000µg/0,1ml
0	0	1,04	1,80	2,27
24 Stunden	0,5	1,39	2,60	2,73
48 Stunden	0,5	1,64	2,80	2,82
72 Stunden	0,5	1,70	2,80	2,82
96 Stunden	0,5	1,70	2,80	2,82

**Tabelle 10: Konzentrationsuche: Mittelwerte des makroskopischen Scores – Weißlicht**

Unmittelbar nach Bestrahlung zeigten sich signifikante Unterschiede im mittleren makroskopischen Score zwischen folgenden 5-ALS-Konzentrationen:

5-ALS	30 µg/0,1 ml	300 µg/0,1 ml	3000 µg/0,1 ml
3µg/0,1ml	<b>p=0,014</b>	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>
30 µg/0,1ml	-----	<b>p=0,031</b>	<b>p=0</b>
300 µg/0,1ml	-----	-----	p=0,123

**Tabelle 11: Signifikanzniveau Konzentrationssuche Weißlicht 15J/cm<sup>2</sup>: Zeitpunkt t = 0**

Ein signifikanter Unterschied bestand zwischen 3µg/0,1ml 5-ALS und allen anderen Konzentrationen.

Ein ebenfalls signifikanter Unterschied war zwischen 30µg/0,1 ml 5-ALS und 300 und 3000µg/0,1ml 5-ALS zu beobachten (Tabelle 11).

Kein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen 300 und 3000µg/0,1ml 5-ALS (Tabelle 11).

5-ALS	30 µg/0,1ml	300µg/0,1ml	3000mg/0,1ml
3µg/0,1ml	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>
30 µg/0,1ml	-----	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>
300µg/0,1ml	-----	-----	p=0,511

**Tabelle 12: Signifikanzniveau Konzentrationssuche Weißlicht 15J/cm<sup>2</sup>: Zeitintervall t=48 Stunden → 96 Stunden**

Im weiteren Beobachtungsverlauf zeigte sich bei nahezu unverändertem Kurvenverlauf ab dem Beobachtungszeitpunkt 48 Stunden nach Bestrahlung bis zum Endpunkt bei 96 Stunden:

- Ein signifikanter Unterschied im Mittelwert des makroskopischen Scores zwischen 3µg/0,1ml 5-ALS und allen nachfolgenden Konzentrationen (Tabelle 12),
- ein signifikanter Unterschied im mittleren makroskopischen Score zwischen 30µg/0,1ml und 300 bzw. 3000µg/0,1ml 5-ALS (Tabelle 12),
- kein signifikanter Unterschied im Konzentrationsvergleich 300 und 3000µg/0,1 ml 5-ALS (Tabelle 12).

Die Werte für den Beobachtungszeitpunkt 48 Stunden nach Bestrahlung gelten in Näherung auch für die Vergleiche der einzelnen 5-ALS-Konzentrationen an den weiteren Beobachtungszeitpunkten (72 und 96 Stunden nach Bestrahlung), da sich ab 48 Stunden bis

zum Beobachtungsendpunkt 96 Stunden keine signifikante Änderung des makroskopische Mittelwertes mehr vollzieht (Tabelle 10 und Tabelle 13).

5-ALS [ $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ ]	Beobachtungsintervall [h]	p-Werte
3	48→96	p=1
30	48→96	p=0,859
300	48→96	p=0,796
3000	48→96	p=1

**Tabelle 13: Signifikanzniveau Test auf Sättigung im Beobachtungszeitraum 48 → 96 Stunden**

Bei den Bestrahlungsversuchen mit  $15\text{J}/\text{cm}^2$  Weißlicht zeigte sich, dass im unteren Konzentrationsbereich von  $3\mu\text{g}/0,1\text{ml}$  5-ALS kaum sichtbare Veränderungen auf der CAM, verifizierbar durch den makroskopischen Score, zu beobachten sind (Abbildung 19 und Tabelle 10).

Die Bestrahlungsfolgen bei  $30\mu\text{g}/0,1\text{ml}$  wiesen einen moderaten Schaden der CAM auf, der sich wie bei den anderen Konzentrationen auch ab 24 Stunden nach Bestrahlung nicht mehr signifikant änderte (Abbildung 19 und Tabelle 10).

Bei 5-ALS-Konzentrationen von 300 und  $3000\mu\text{g}/0,1\text{ml}$  lagen die Mittelwerte des makroskopischen Scores bei der verwendeten Bestrahlungsstärke  $15\text{J}/\text{cm}^2$  im oberen Bereich. Im Vergleich zeigten die 5-ALS-Konzentrationen 300 und  $3000\mu\text{g}/0,1\text{ml}$  keine signifikanten Unterschiede in den Werten des makroskopischen Scores und glichen sich ab 48 Stunden nach Bestrahlung an (Abbildung 19 und Tabelle 10).

Auf der Basis der Versuche mit  $15\text{J}/\text{cm}^2$  Weißlicht wurden, nach Ausschluss der 5-ALS-Konzentration  $3\mu\text{g}/0,1\text{ml}$  (da diese zu kaum nennenswerten makroskopischen Veränderungen auf der CAM führte), zum Vergleich Bestrahlungsversuche mit 30, 300 und  $3000\mu\text{g}/0,1\text{ml}$  5-ALS mit  $15\text{J}/\text{cm}^2$  Laserlicht der Wellenlänge 633nm durchgeführt (Graphische Darstellung Abbildung 20).

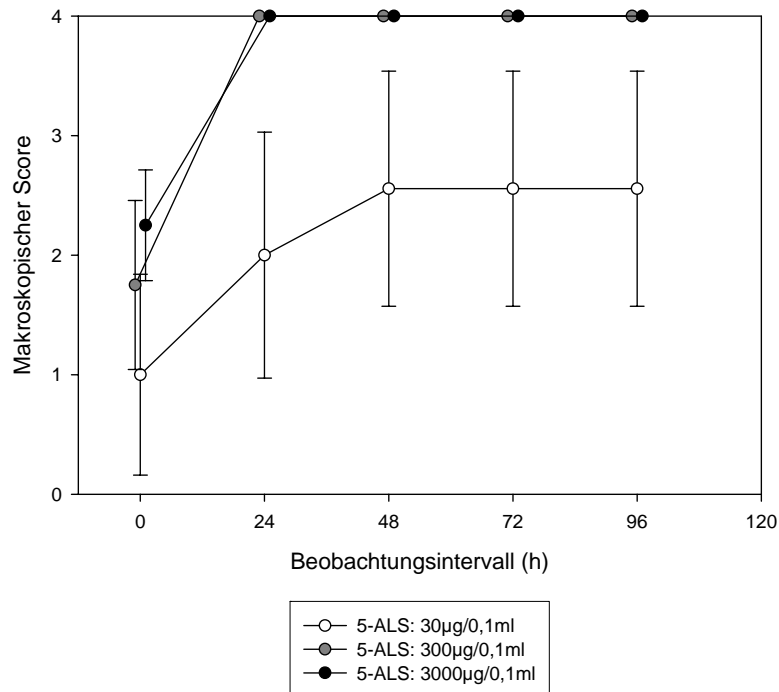


Abbildung 20: PDT-Schäden nach Laserbestrahlung (15J/cm<sup>2</sup>) in Abhängigkeit der 5-ALS-Konzentration

Beobachtungszeitpunkt	3µg/0,1ml	30µg/0,1ml	300µg/0,1ml	3000µg/0,1ml
0	-----	1,00	1,75	2,25
24 Stunden	-----	2,00	4,0	4,0
48 Stunden	-----	2,56	4,0	4,0
72 Stunden	-----	2,56	4,0	4,0
96 Stunden	-----	2,56	4,0	4,0

Tabelle 14: Konzentrationssuche: Mittelwerte des makroskopischen Scores – Laser

Zum ersten Beobachtungszeitpunkt zeigte sich ein signifikanter Unterschied im mittleren makroskopischen Score zwischen 30µg/0,1ml 5-ALS- und den Konzentrationen 300 und 3000µg/0,1ml (Tabelle 15).

5-ALS	30 µg/0,1 ml	300 µg/0,1ml	3000 µg/0,1ml
30 µg/0,1ml	-----	<b>p=0,001</b>	<b>p=0,001</b>
300 µg/0,1ml	-----	-----	p=0,722

Tabelle 15: Signifikanzniveau Konzentrationssuche Laser 15J/cm<sup>2</sup>: Zeitpunkt t = 0

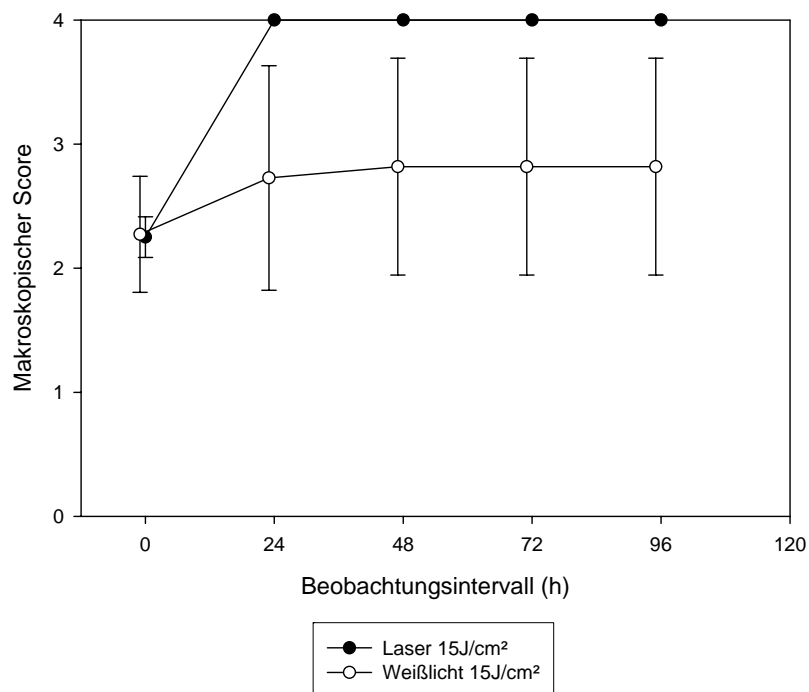
Zum Beobachtungszeitpunkt 24 Stunden nach Bestrahlung waren in den 300 und 3000 $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ -Gruppen alle Hühnerembryonen tot, in der Bewertung des makroskopischen Scores Grad 4 entsprechend.

Ein signifikanter Unterschied bestand im makroskopischen Mittelwert zwischen der 30 $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$  und der 300 bzw. 3000 $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ -Gruppe (Tabelle 14).

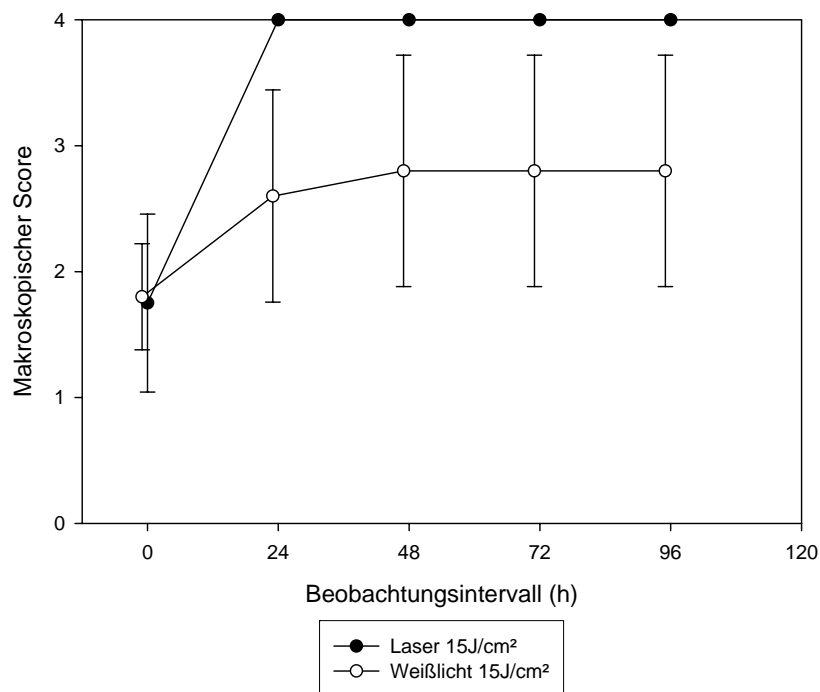
5-ALS	30 $\mu\text{g}/0,1\text{ ml}$	300 $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$	3000 $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$
30 $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$	-----	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>
300 $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$	-----	-----	p=1

**Tabelle 16: Signifikanzniveau Konzentrationssuche Laser 15J/cm<sup>2</sup>: Zeitintervall t=48 Stunden → 96Stunden**

Wie schon bei der Weißlichtbestrahlung war keine signifikante Änderung des makroskopischen Scores ab 48 Stunden nach Bestrahlung in der 30 $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ -Gruppe zu beobachten (Tabelle 16). Im Lichtquellenvergleich Weißlicht- gegen Laserbestrahlung mit der Bestrahlungsstärke 15J/cm<sup>2</sup> und den 5-ALS-Konzentrationen 300 und 3000 $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$  zeigte sich, dass bei diesen Konzentrationen ein direkter Vergleich der Bestrahlungsfolgen auf der CAM aufgrund der Bestrahlungsletalität bei den so gewählten 5-ALS-Konzentrationen in der Lasergruppe nicht möglich ist (Abbildung 21 und Abbildung 22).



**Abbildung 21: Vergleich Weißlicht 15J/cm<sup>2</sup> gegen Laser 15J/cm<sup>2</sup>: 5-ALS-Konzentration 3000 $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$**



**Abbildung 22: Vergleich Weißlicht 15J/cm<sup>2</sup> gegen Laser 15J/cm<sup>2</sup>: 5-ALS-Konzentration 300µg/0,1ml**

Ein aussagekräftiger, direkter Vergleich der bestrahlungsinduzierten, makroskopisch verwertbaren CAM-Veränderungen über den gewählten Beobachtungszeitrahmen von 96 Stunden ist bei einer 5-ALS-Konzentration von 30µg/0,1 ml möglich (Abbildung 23).

Auch im Hinblick auf die Variation der Bestrahlungsstärken der Laser und Weißlicht-Bestrahlung ist davon auszugehen, dass die Photosensibilisatorkonzentration 30µg/0,1 ml den weitest messbaren Bestrahlungsrahmen mit dem höchsten Dynamikbereich ermöglicht.



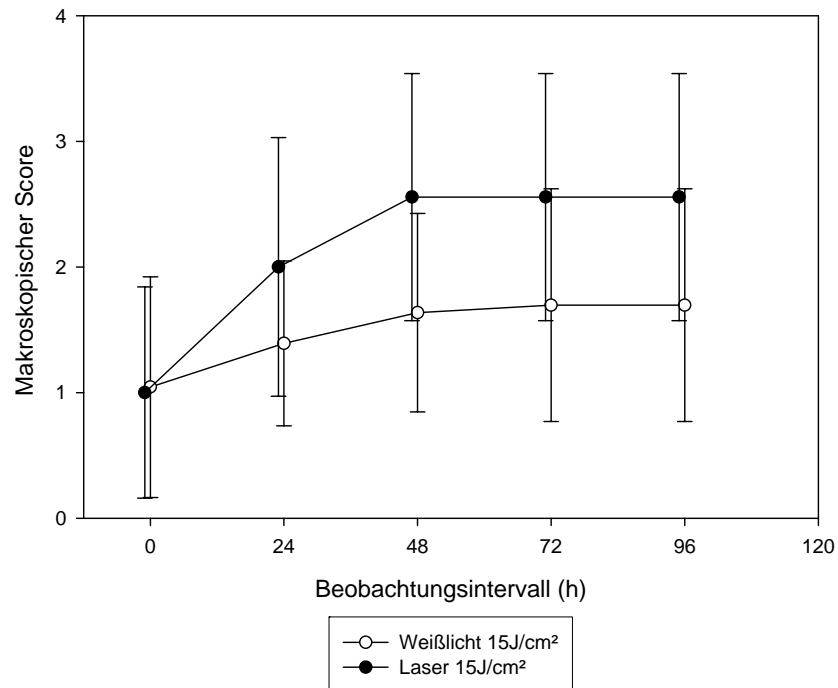


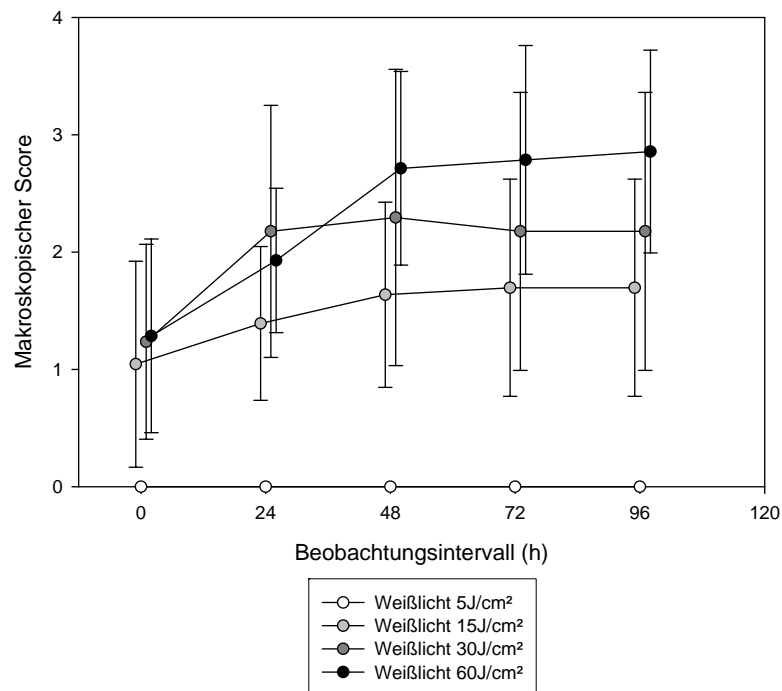
Abbildung 23: Vergleich Weißlicht 15J/cm<sup>2</sup> gegen Laser 15J/cm<sup>2</sup>: 5-ALS 30µg/0,1ml

#### 4.4. Dynamik der PDT-induzierten Schäden im CAM-Modell

Mit der im Vorexperiment ermittelten 5-ALS-Konzentration mit dem höchsten Dynamikbereich (30µg/0,1ml) wurde die Abhängigkeit der PDT-induzierten Schädigung von der Bestrahlungsstärke untersucht.

##### 4.4.1. Dynamik des makroskopischen Scores: Weißlichtbestrahlung in Abhängigkeit von der Energiedichte (Bestrahlung)

Die Dynamik des Mittelwertes des makroskopischen Scores in Abhängigkeit von der Energiedichte der einzelnen Bestrahlungsstärken (5, 15, 30, 60J/cm<sup>2</sup>) nach Weißlichtbestrahlung, unter Einbeziehung der Standardabweichung, über den Beobachtungszeitraum von 96 Stunden, bei einer Konzentration von 30µg/0,1ml 5-ALS ist für die einzelnen Beobachtungszeitpunkte in Abbildung 24 dargestellt.



**Abbildung 24: Entwicklung des makroskopischen Scores nach Weißlichtbestrahlung (Konzentration von 5-ALS: 30mg/0,1ml in Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke)**

Beobachtungszeitpunkt	5J/cm <sup>2</sup>	15J/cm <sup>2</sup>	30J/cm <sup>2</sup>	60J/cm <sup>2</sup>
0	0	1,04	1,24	1,29
24 Stunden	0	1,39	2,18	1,93
48 Stunden	0	1,64	2,29	2,71
72 Stunden	0	1,70	2,18	2,79
96 Stunden	0	1,70	2,18	2,86

**Tabelle 17: Mittelwerte des makroskopischen Scores – Weißlicht**

Bei der Beobachtung der Veränderung des makroskopischen Scores innerhalb des Beobachtungsrahmens (direkt nach der Bestrahlung und 24, 48, 72, 96 Stunden nach Bestrahlung) ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Bestrahlungsgruppen (5, 15, 30, 60Jcm<sup>2</sup>) ab 24 Stunden nach Bestrahlung erkennen, die sich bis zum Beobachtungsendpunkt nach 96 Stunden fortsetzten.

Beobachtungszeitpunkt direkt nach Bestrahlung (=0)

Bestrahlung	5J/cm <sup>2</sup>	15J/cm <sup>2</sup>	30J/cm <sup>2</sup>	60J/cm <sup>2</sup>
5J/cm <sup>2</sup>	-----	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>
15J/cm <sup>2</sup>		-----	p=0,412	p=0,412
30J/cm <sup>2</sup>			-----	p=0,863
60J/cm <sup>2</sup>				-----

**Tabelle 18: Signifikanzwerte des makroskopischen Scores unmittelbar nach Weißlichtbestrahlung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke**

Unmittelbar nach Bestrahlung lagen die Mittelwerte der einzelnen Bestrahlungsgruppen 15, 30 und 60J/cm<sup>2</sup> nicht signifikant unterschiedlich zueinander bei einem makroskopischen Scorewert um 1 (Tabelle 17 und Tabelle 18).

Da sich in der Bestrahlungsgruppe Weißlicht 5J/cm<sup>2</sup> über das Versuchsintervall der Mittelwert des makroskopischen Scores von 0 nicht veränderte, war zum Zeitpunkt nach Bestrahlung nur ein signifikanter Unterschied zwischen 5J/cm<sup>2</sup> zu den anderen Bestrahlungsgruppen zu erkennen (Tabelle 18).

Beobachtungszeitpunkt 24 Stunden nach Bestrahlung:

Bestrahlung	5J/cm <sup>2</sup>	15J/cm <sup>2</sup>	30J/cm <sup>2</sup>	60J/cm <sup>2</sup>
5J/cm <sup>2</sup>	-----	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>
15J/cm <sup>2</sup>		-----	<b>p=0,013</b>	<b>p=0,011</b>
30J/cm <sup>2</sup>			-----	p=0,625
60J/cm <sup>2</sup>				-----

**Tabelle 19: Signifikanzwerte des makroskopischen Scores 24h nach Weißlichtbestrahlung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke**

Es zeigten sich signifikante Unterschiede im Mittelwert des makroskopischen Scores zwischen der Bestrahlungsgruppe 5J/cm<sup>2</sup>, die keine Reaktion der CAM auf die Bestrahlung aufwies (Mittelwert des makroskopischen Scores =0) und allen anderen Bestrahlungen (15, 30, 60 J/cm<sup>2</sup>), die zu messbaren Veränderungen auf der CAM führten (Tabelle 19).

Signifikant war auch der Unterschied des Mittelwertes des makroskopischen Scores im Gruppenvergleich 15J/cm<sup>2</sup> und 30J/cm<sup>2</sup> sowie zu 60J/cm<sup>2</sup>.

Kein signifikanter Unterschied zum Beobachtungszeitpunkt 24 Stunden nach Bestrahlung bestand zwischen den Bestrahlungsgruppen 30J/cm<sup>2</sup> und 60J/cm<sup>2</sup> (Tabelle 19).

Beobachtungsintervall ab 48 Stunden nach Bestrahlung:

Bestrahlung	48h→72h	48h→96h
5J/cm <sup>2</sup>	p=1	p=1
15J/cm <sup>2</sup>	p=0,859	p=0,859
30J/cm <sup>2</sup>	p=1	p=1
60J/cm <sup>2</sup>	p=0,788	p=0,656

**Tabelle 20: Weißlicht: Test auf Angleichung des makroskopischen Scores in Abhängigkeit von der Bestrahlung im Beobachtungsintervall 48 → 96 Stunden**

Betrachtet man den Kurvenverlauf der einzelnen Bestrahlungsgruppen, so erkennt man einen nahezu unveränderten Verlauf ab dem Beobachtungszeitpunkt 48 Stunden bis zum Beobachtungsendpunkt 96 Stunden.

Um diesen Sättigungsverlauf auch statistisch zu erfassen, wurden die Veränderungen im Mittelwert des makroskopischen Scores für die Zeitintervalle 48 bis 72 Stunden und 48 bis 96 Stunden ermittelt.

Es zeigten sich in keiner der Weißlichtbestrahlungsgruppen signifikante Unterschiede in den untersuchten Zeitintervallen ab dem Zeitpunkt 48 Stunden nach Bestrahlung bis zum Endpunkt 96 Stunden:

- In der Weißlicht 5J/cm<sup>2</sup>-Gruppe lag der jeweilige Mittelwert des makroskopischen Scores bei 0.
- In der Weißlicht 15J/cm<sup>2</sup>-Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Mittelwerte des makroskopischen Scores 48 Stunden nach Bestrahlung zu 72 Stunden nach Bestrahlung und 96 Stunden nach Bestrahlung (Tabelle 20).
- Auch in der Weißlicht 30J/cm<sup>2</sup>-Gruppe bestanden für das Beobachtungsintervall 48 und 72 Stunden und 48 zu 96 Stunden keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 20).
- Für die Gruppe Weißlicht 60J/cm<sup>2</sup> ließen sich keine signifikanten Unterschiede in den Zeitspannen 48 Stunden bis 72 Stunden und 48 bis 96 Stunden darstellen. (Tabelle 20).

Da sich die Werte des makroskopischen Scores innerhalb der Bestrahlungsgruppen im Zeitraum zwischen 48 Stunden bis 96 Stunden nicht signifikant veränderten, wurden die Beobachtungszeitpunkte 48, 72 und 96 Stunden als eine Einheit betrachtet, d.h. für die

Vergleiche der Mittelwerte zwischen den einzelnen Gruppen in dieser Zeitspanne wurde als Referenzwert der Mittelwert des makroskopischen Scores der Zeitpunkte 48, 72 und 96 Stunden gewählt.

Gruppenvergleich zu späteren Beobachtungszeitpunkten ( 48 → 96 Stunden):

Für das Beobachtungsintervall 48 bis 96 Stunden nach Bestrahlung zeigten sich im direkten Vergleich der Bestrahlungsgruppen (5, 15, 30 und 60J/cm<sup>2</sup>) jeweils signifikante Unterschiede im direkten Gruppenvergleich.

48→96 Stunden	5J/cm <sup>2</sup>	15J/cm <sup>2</sup>	30J/cm <sup>2</sup>	60J/cm <sup>2</sup>
5J/cm <sup>2</sup>	-----	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>
15J/cm <sup>2</sup>		-----	<b>p=0,004</b>	<b>p=0</b>
30J/cm <sup>2</sup>			-----	<b>p=0,017</b>
60J/cm <sup>2</sup>				-----

**Tabelle 21: Signifikanzniveauvergleich des makroskopischen Scores nach Weißlichtbestrahlung im Beobachtungsintervall 48 → 96 Stunden**

Im Gruppenvergleich Weißlichtbestrahlung 5J/cm<sup>2</sup> zu 15J/cm<sup>2</sup> konnte man einen signifikanteren Unterschied zwischen den ermittelten Scorewerten beobachten.

Im Vergleich zwischen 15J/cm<sup>2</sup> und 30J/cm<sup>2</sup> bestand ein signifikanter Gruppenunterschied bei den Mittelwerten des makroskopischen Scores (Tabelle 21).

Dieser signifikante Unterschied zwischen den einzelnen Bestrahlungsgruppen setzte sich auch zwischen Weißlicht 30J/cm<sup>2</sup> und Weißlicht 60J/cm<sup>2</sup> fort (Tabelle 21).

Entwicklung des makroskopischen Scores innerhalb der Bestrahlungsgruppen:

Bestrahlung	t= 0 → 24h	t= 24 → 48h	t= 0 → 48h
5J/cm <sup>2</sup>	p=1	p=1	p=1
15J/cm <sup>2</sup>	p=0,236	p=0,236	<b>p=0,048</b>
30J/cm <sup>2</sup>	<b>p=0,019</b>	p=0,087	<b>p=0,012</b>
60J/cm <sup>2</sup>	<b>p=0,042</b>	<b>p=0,024</b>	<b>p=0</b>

**Tabelle 22: Signifikanzniveauveränderung des makroskopischen Scores im zeitlichen Verlauf (t=0 bis t=48 Stunden) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke (Weißlicht)**

Bei konstanter Konzentration von 5-ALS (30mg/0,1ml) zeigten sich folgende Veränderungen des makroskopischen Scores innerhalb des Beobachtungszeitraumes durch Variation der Weißlichtbestrahlung:

- Bei der Bestrahlung mit 5J/cm<sup>2</sup> bestand im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung keine signifikante Änderung des makroskopischen Scores (Tabelle 22).
- Bei 15J/cm<sup>2</sup> ließen sich signifikante Veränderungen der Score-Werte innerhalb des verwendeten Beobachtungszeitraumes nur zwischen Beobachtungszeitpunkt 0 und 48 Stunden (Tabelle 22) beobachten. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich hingegen zwischen den Mittelwerten 0 und 24 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden, sowie im weiteren Verlauf bis zum Beobachtungsendpunkt (Tabelle 22).
- Bei 30J/cm<sup>2</sup> fand sich eine signifikante Veränderung der makroskopischen Mittelwerte zwischen den Beobachtungszeitpunkten 0 und 24 Stunden und 0 und 48 Stunden. Keine signifikante Veränderung ließ sich im Intervall zwischen 24 und 48 Stunden beobachten (Tabelle 22). Auch im weiteren Verlauf ab 48 Stunden nach Bestrahlung zeigte sich keine signifikante Veränderung des Scores mehr (Tabelle 22).
- Bei 60J/cm<sup>2</sup> entwickelten sich die Score-Werte signifikant im Beobachtungszeitraum 0 bis 48 Stunden, um sich dann im weiteren Verlauf zwischen 48 Stunden und 96 Stunden wie bei den anderen Weißlichtgruppen nicht mehr signifikant zu verändern (Tabelle 22).

Es zeigte sich innerhalb der Bestrahlungsgruppen 15J/cm<sup>2</sup> und 30J/cm<sup>2</sup> keine signifikante Veränderung des makroskopischen Scores ab dem Beobachtungszeitpunkt 24 Stunden nach Bestrahlung.

In der Gruppe 60J/cm<sup>2</sup> war keine signifikante Veränderung ab 48 Stunden nach Bestrahlung mehr zu beobachten.

#### **4.4.2. Dynamik des makroskopischen Scores: Laserbestrahlung in Abhängigkeit von der Energiedichte (Bestrahlung)**

Die Dynamik der Mittelwertes des makroskopischen Scores nach Laserbestrahlung (5, 15, 30, 60J/cm<sup>2</sup>), unter Einbeziehung der Standardabweichung, über den Beobachtungszeitraum von 96 Stunden, bei einer konstanten 5-ALS Konzentration von 30mg/0,1ml, ist für die einzelnen Beobachtungszeitpunkte in Abbildung 25 dargestellt.

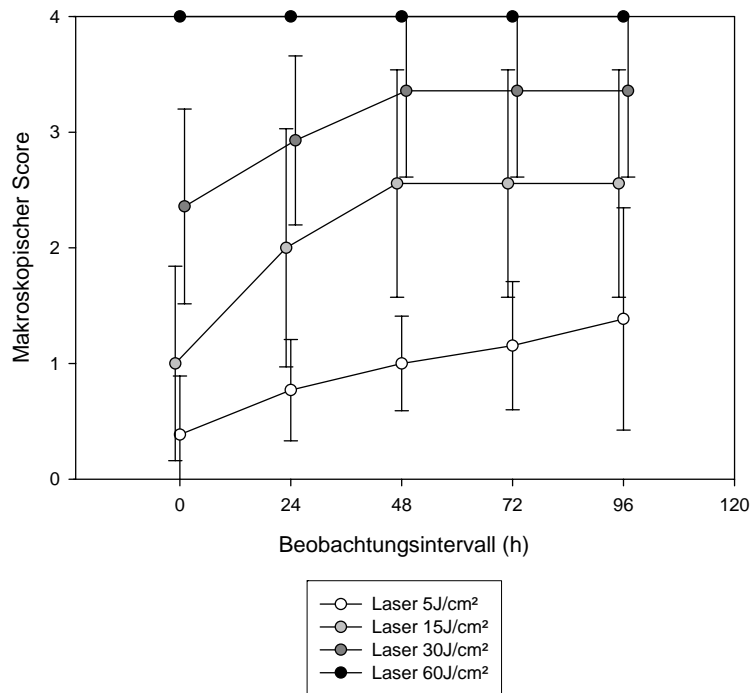


Abbildung 25: Entwicklung des makroskopischen Scores nach Laserbestrahlung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke (5-ALS-Konzentration: 30µg/0,1ml)

Beobachtungszeitpunkt	5J/cm <sup>2</sup>	15J/cm <sup>2</sup>	30J/cm <sup>2</sup>	60J/cm <sup>2</sup>
0	0,38	1,00	2,36	4,00
24 Stunden	0,77	2,00	2,93	4,00
48 Stunden	1,00	2,56	3,36	4,00
72 Stunden	1,15	2,56	3,36	4,00
96 Stunden	1,38	2,56	3,36	4,00

Tabelle 23: Mittelwerte des makroskopischen Scores - Laserbestrahlung

*Beobachtungszeitpunkt unmittelbar nach Bestrahlung (t = 0)*

Bestrahlung	5J/cm <sup>2</sup>	15J/cm <sup>2</sup>	30J/cm <sup>2</sup>	60J/cm <sup>2</sup>
5J/cm <sup>2</sup>	-----	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>
15J/cm <sup>2</sup>		-----	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>
30J/cm <sup>2</sup>			-----	<b>p=0</b>
60J/cm <sup>2</sup>				-----

Tabelle 24: Unterschied des makroskopischen Scores unmittelbar nach Laserbestrahlung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke

Im Gegensatz zur Weißlichtgruppe ließ sich in der Lasergruppe ein signifikanter Unterschied in den Mittelwerten des makroskopischen Scores schon direkt nach der Bestrahlung nachweisen.

Alle verwendeten Bestrahlungsstärken (5, 15, 30 und 60J/cm<sup>2</sup>) unterschieden sich im verwendeten Beobachtungsrahmen hinsichtlich der Score-Mittelwerte zu den jeweiligen Beobachtungszeitpunkten signifikant voneinander (Tabelle 24).

Beobachtungszeitpunkt 24 Stunden nach Bestrahlung

Bestrahlung	5J/cm <sup>2</sup>	15J/cm <sup>2</sup>	30J/cm <sup>2</sup>	60J/cm <sup>2</sup>
5J/cm <sup>2</sup>	-----	<b>p=0.011</b>	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>
15J/cm <sup>2</sup>		-----	<b>p=0,011</b>	<b>p=0</b>
30J/cm <sup>2</sup>			-----	<b>p=0,001</b>
60J/cm <sup>2</sup>				-----

**Tabelle 25: Unterschied des makroskopischen Scores 24 Stunden nach Laserbestrahlung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke**

24 Stunden nach Bestrahlung ließen sich im Gruppenvergleich Laserbestrahlung mit einer Energiedichte von 5J/cm<sup>2</sup>, 15J/cm, 30J/cm<sup>2</sup> und 60J/cm<sup>2</sup> jeweils signifikante Unterschiede in den Mittelwerten des makroskopischen Scores ableiten (Tabelle 25).

Beobachtungsintervall ab 48 Stunden nach Bestrahlung

Bestrahlung	t = 48→72h	t = 48→96h
5J/cm <sup>2</sup>	p=0,866	p=0,688
15J/cm <sup>2</sup>	p=1	p=1
30J/cm <sup>2</sup>	p=1	p=1
60J/cm <sup>2</sup>	p=1	p=1

**Tabelle 26: Laser: Test auf Angleichung des makroskopischen Scores in Abhängigkeit von der Bestrahlung im Beobachtungsintervall 48 → 96 Stunden**

Die Werte des makroskopischen Scores unterschieden sich, wie schon in der Weißlichtgruppe, innerhalb der einzelnen Bestrahlungsgruppen ab dem Zeitpunkt 48 Stunden bis zum Endpunkt 96 Stunden nicht signifikant voneinander, so dass auch in der Lasergruppe das Beobachtungsintervall 48, 72 und 96 Stunden als eine Einheit betrachtet wurde (Tabelle 26).



Gruppenvergleich zu späteren Beobachtungszeitpunkten (48 → 96 Stunden)

48→96 Stunden	5J/cm <sup>2</sup>	15J/cm <sup>2</sup>	30J/cm <sup>2</sup>	60J/cm <sup>2</sup>
5J/cm <sup>2</sup>	-----	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>
15J/cm <sup>2</sup>		-----	<b>p=0</b>	<b>p=0</b>
30J/cm <sup>2</sup>			-----	<b>p=0</b>
60J/cm <sup>2</sup>				-----

**Tabelle 27: Signifikanzniveauvergleich des makroskopischen Scores nach Laserbestrahlung im Beobachtungsintervall 48 → 96 Stunden**

Alle Bestrahlungsgruppen unterschieden sich im Intervall zwischen 48 und 96 Stunden nach Bestrahlung signifikant voneinander (Tabelle 27).

Entwicklung des makroskopischen Scores innerhalb der Bestrahlungsgruppen

Bestrahlung	t = 0 → 24h	t = 24 → 48h	t = 0 → 48h
5J/cm <sup>2</sup>	p=0,750	p=0,489	p=0,830
15J/cm <sup>2</sup>	<b>p=0,006</b>	p=0,097	<b>p=0</b>
30J/cm <sup>2</sup>	p=0,091	p=0,126	<b>p=0,003</b>
60J/cm <sup>2</sup>	p=1	p=1	p=1

**Tabelle 28: Signifikanzniveauveränderung des makroskopischen Scores im zeitlichen Verlauf (t=0 bis t=48 Stunden) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke (Laser)**

Bei konstanter Konzentration von 5-ALS (30µg/0,1ml] zeigten sich folgende Veränderungen des makroskopischen Scores durch Variation der Bestrahlungsstärke unter Laserbestrahlung:

- Bei Laser 5J/cm<sup>2</sup> war keine signifikante Veränderung des Scores innerhalb des verwendeten Bestrahlungsrahmens zu beobachten (Tabelle 28).
- In der Laser 15J/cm<sup>2</sup>-Gruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen 0 und 24 Stunden und zwischen post und 48 Stunden, jedoch keine signifikante Veränderung zwischen 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung. Im Beobachtungsintervall zwischen 48 und 96 Stunden nach Bestrahlung fand keine (signifikante) Veränderung des makroskopischen Scores mehr statt (Tabelle 28).

- In der Bestrahlungsgruppe Laser 30J/cm<sup>2</sup> fand eine signifikante Veränderung des makroskopischen Scores zwischen post und 48 Stunden nach Bestrahlung statt, hingegen keine signifikante Veränderung zwischen 0 und 24 Stunden und 24 und 48 Stunden. Auch glichen sich die Mittelwerte des makroskopischen Scores in dieser Gruppe im Intervall nach 48 über 72 zu 96 Stunden nach Bestrahlung aneinander an (Tabelle 28).
- Da in der Bestrahlungsgruppe Laser 60J/cm<sup>2</sup> schon zum Beobachtungszeitpunkt 0 alle bestrahlten CAMs mit Score 4, d.h. *Tod des Embryos*, gewertet wurden, waren in dieser Gruppe keine Nachbeobachtungen mehr möglich.

#### 4.4.3. Vergleich Bestrahlung mit Weiß- und Laserlicht

Die Dynamik der makroskopischen Scores der verwendeten Bestrahlungen über die einzelnen Beobachtungszeitpunkte im Beobachtungszeitraum von 96 Stunden ist im direkten Vergleich der Lichtquellen Laser und Weißlicht für 5J/cm<sup>2</sup> in Abbildung 26, für 15J/cm<sup>2</sup> in Abbildung 27, für 30J/cm<sup>2</sup> in Abbildung 28, und für 60J/cm<sup>2</sup> in Abbildung 29 dargestellt.

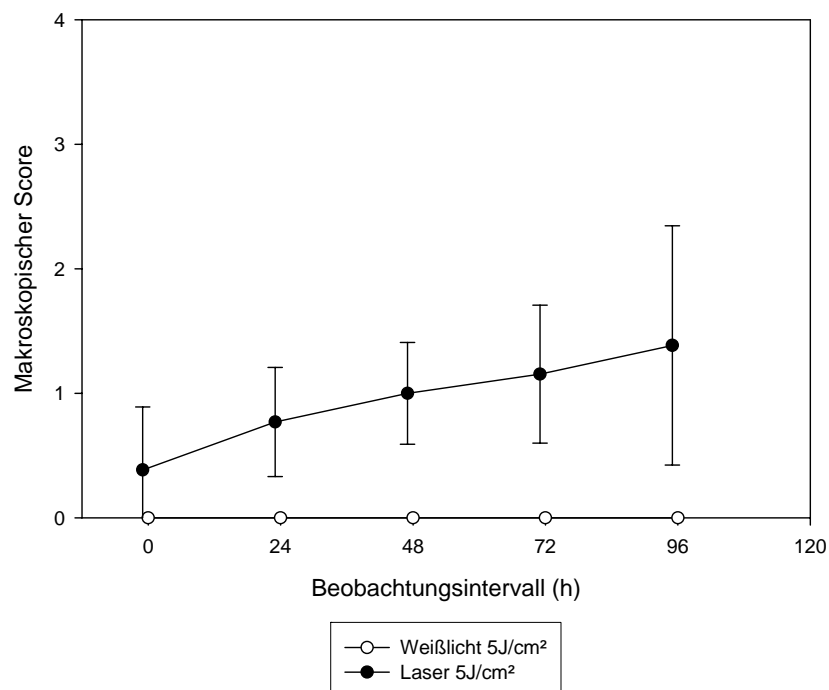
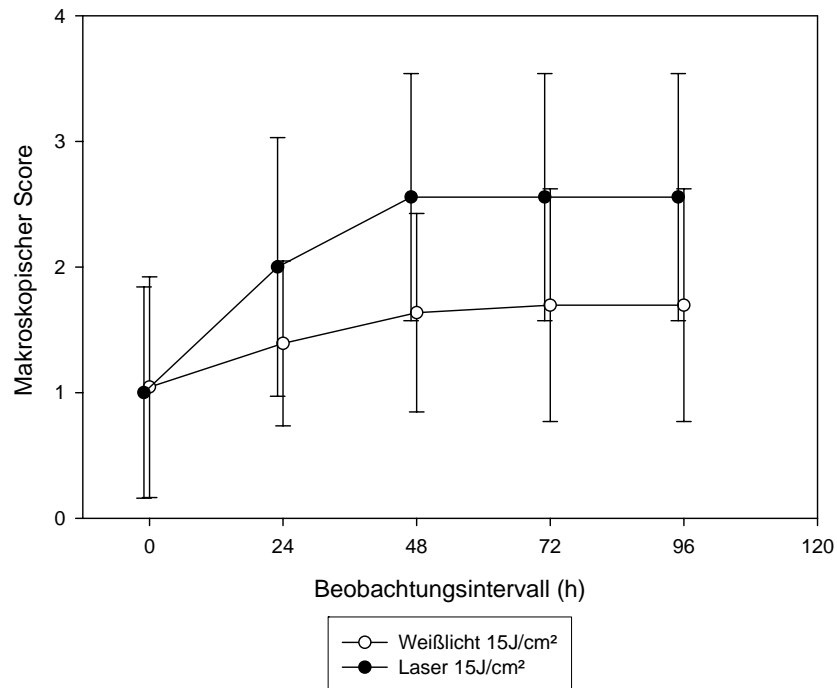


Abbildung 26: Makroskopischer Score im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung

Vergleich: Weißlicht 5J/cm<sup>2</sup> gegen Laser 5J/cm<sup>2</sup> (Konzentration 5-ALS: 30µg/0,1ml)

Es fand sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0$ ) zwischen der Weißlicht- und der Lasergruppe bei  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , da in der Weißlichtgruppe über die Zeit keine Schäden zu beobachten waren.



**Abbildung 27: Makroskopischer Score im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung**

**Vergleich: Weißlicht  $15\text{J}/\text{cm}^2$  gegen Laser  $15\text{J}/\text{cm}^2$  (Konzentration 5-ALS:  $30\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ )**

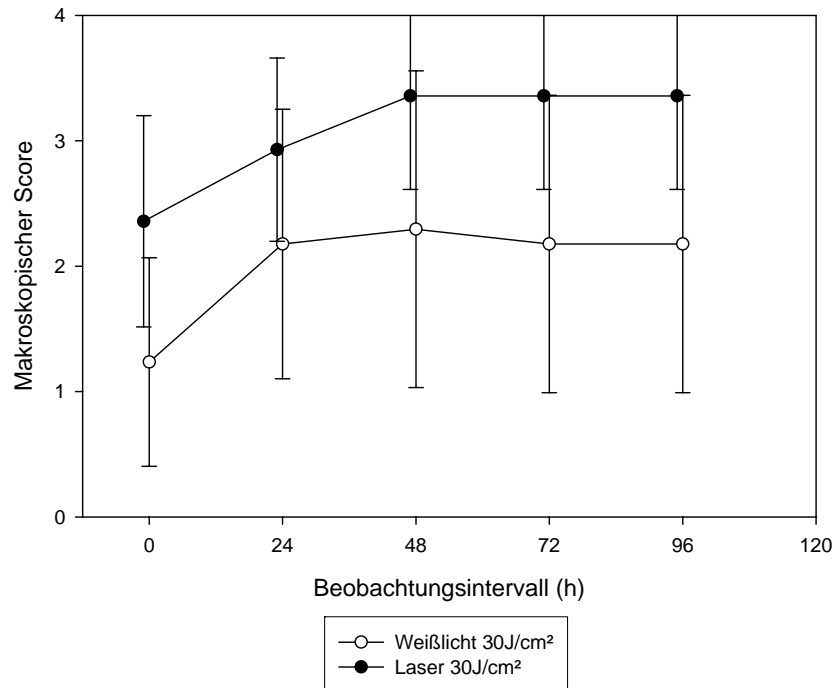
*Vergleich Mittelwert des makroskopischen Scores Weißlicht  $15\text{J}/\text{cm}^2$  und Laser  $15\text{J}/\text{cm}^2$*

0	24h	48-96h
$p=0,867$	$p=0,027$	$p=0$

**Tabelle 29: Signifikanzniveau Vergleich Weißlicht  $15\text{J}/\text{cm}^2$  gegen Laser  $15\text{J}/\text{cm}^2$**

Im direkten Vergleich der Bestrahlungsgruppen Weißlicht  $15\text{J}/\text{cm}^2$  und Laser  $15\text{J}/\text{cm}^2$  bestand kein signifikanter Unterschied in den makroskopischen Scores unmittelbar nach Bestrahlung ( $t=0$ ).

Im anschließenden Beobachtungsintervall 24 bis 96 Stunden nach Bestrahlung zeigte sich zu jedem definierten Beobachtungszeitpunkt eine signifikant höhere Wertung des makroskopischen Scores zugunsten der Lasergruppe (Tabelle 29).



**Abbildung 28: Makroskopischer Score im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung**

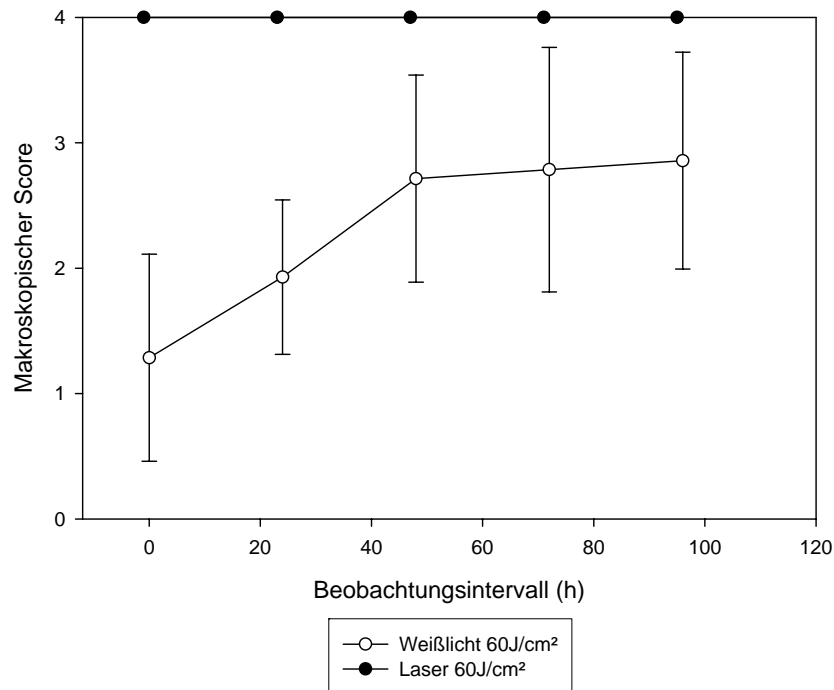
**Vergleich: Weißlicht 30J/cm<sup>2</sup> gegen Laser 30J/cm<sup>2</sup> (Konzentration 5-ALS: 30µg/0,1ml)**

*Vergleich Mittelwert des makroskopischen Scores Weißlicht 30J/cm<sup>2</sup> und Laser 30J/cm<sup>2</sup>*

0	24h	48-96h
<b>p=0,001</b>	<b>p=0,05</b>	<b>p=0</b>

**Tabelle 30: Signifikanzniveau Vergleich Weißlicht 30J/cm<sup>2</sup> gegen Laser 30J/cm<sup>2</sup>**

Im Vergleich der beiden Bestrahlungsgruppen Weißlicht und Laser 30J/cm<sup>2</sup> war schon unmittelbar nach Bestrahlung (t=0) ein signifikant höherer Mittelwert des makroskopischen Scores in der Lasergruppe, der sich bis zum Beobachtungsendpunkt 96 Stunden fortsetzte, zu erkennen (Tabelle 30).



**Abbildung 29: Makroskopischer Score im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung**

**Vergleich: Weißlicht 60J/cm<sup>2</sup> gegen Laser 60J/cm<sup>2</sup> (Konzentration 5-ALS: 30µg/0,1ml)**

Bei der Bestrahlung mit 60J/cm<sup>2</sup> war auf Grund des Todes aller bestrahlten Embryonen in der Lasergruppe schon unmittelbar nach Bestrahlung (t=0) ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen darzustellen (p=0).

#### 4.5. Mikroskopisches Beurteilungsschema

Die angefertigten histologischen Präparate wurden hinsichtlich einer möglichen, durch Bestrahlung induzierten Nekrose, deren Ausdehnung sowie der begleitenden Reaktionen auf zellulärer Ebene untersucht.

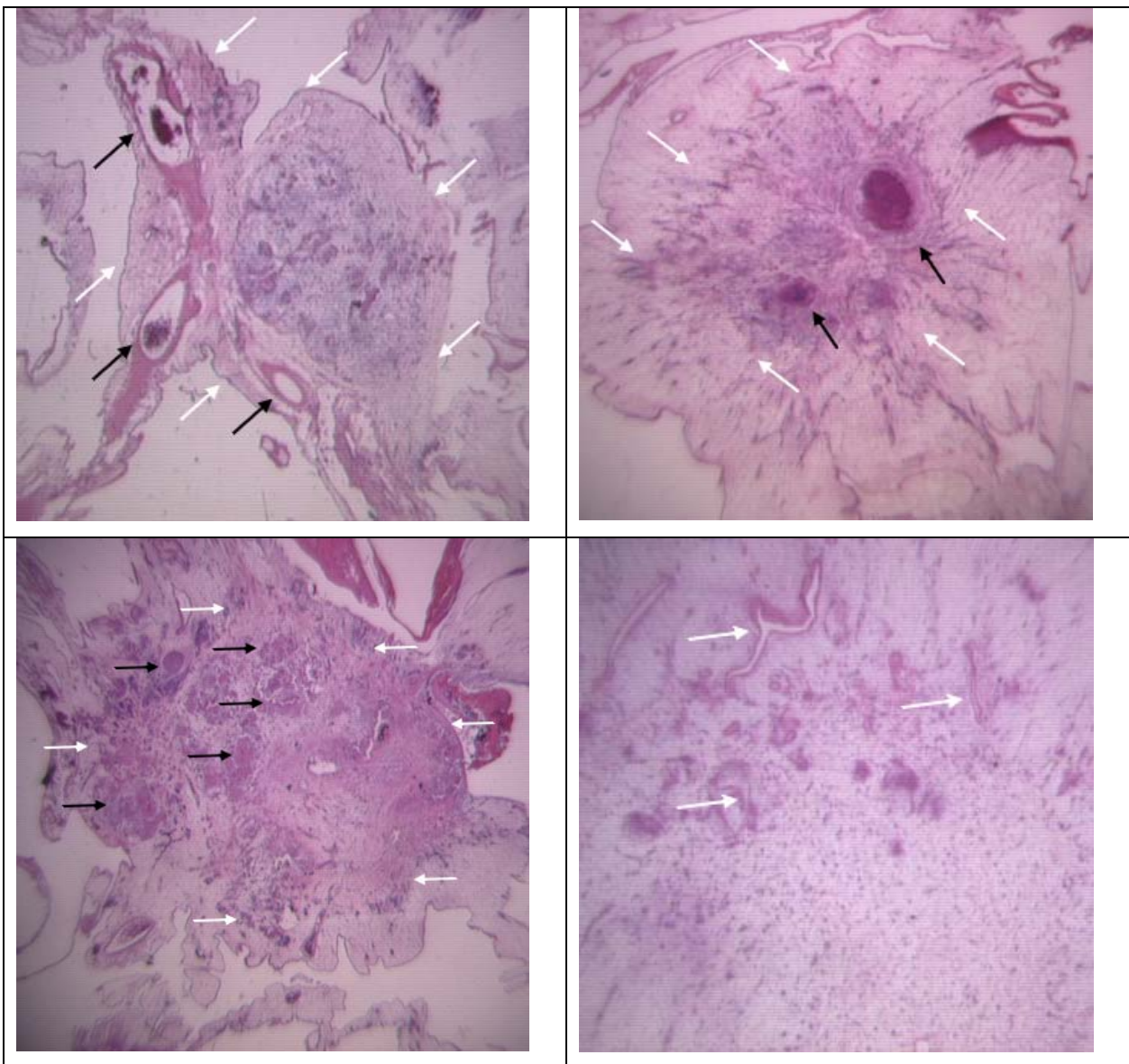
Die Nekroseausdehnung wurde mittels Bildverarbeitungssoftware (Optimas 6.2, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) gemessen.

##### ***Histologischer Aufbau:***

Bestrahlungsinduzierte Nekrosen der Chorioallantoismembran wiesen in unterschiedlicher Ausdehnung eine zentral liegende fibrinoide Nekrose, demarkiert durch umgebendes Granulationsgewebe mit ins Zentrum ziehender fischzugartiger Gefäßeinsprossung, auf.

In Abbildung 30: Markierung der Nekroseareale durch weiße Pfeile.

Das Granulationsgewebe bestand in unterschiedlicher Ausprägung aus Fibrin, Fibroblasten und Makrophagen [54]. In der Demarkationszone konnten in loser Verteilung Riesenzellen beobachtet werden. Die im Nekroseareal liegenden Gefäße des chorioallantoiden Gefäßnetzwerkes wiesen eine intravasale Thrombosierung auf und größenabhängig konnten Schäden des Gefäßendothels beobachtet werden. Intravasaler Sludge und Teil- oder Gesamtthrombosierung waren, abhängig von der Gefäßgröße und vom Gefäßanschnitt, in den CAM-Gefäßen der Gruppe 1 (~50µm) und 2 (~50 bis ~70µm) sichtbar und außerdem konnten, abhängig von der Ausdehnung des PDT-Schadens, Einblutungen in die umgebende CAM-Matrix beobachtet werden. Die Änderungen der Gefäßstruktur sind in Abbildung 30 durch schwarze Pfeile markiert. Analog zum makroskopischen Score zeigten sich auch histologisch keine Bestrahlungseffekte bei den großen Drainagegefäßen der Gruppe 3 (>120µm).



**Abbildung 30: Histologische Darstellung des PDT- Schadens**

#### 4.6. Mikroskopisch messbare Nekrose in Abhängigkeit vom makroskopischen Score und der verwendeten Bestrahlung

Die histologische Aufarbeitung der bestrahlten CAM zeigte, abhängig von der verwendeten Lichtquelle und der verwendeten Bestrahlungsstärke, morphologische Veränderungen der CAM-Grundmatrix und des darin eingebetteten Gefäßsystems. Da innerhalb des Versuchsrahmens alle CAMs am 4. Tag nach Bestrahlung (=96 Stunden) entnommen wurden, konnten auch nur die „zellulären Späteffekte“ der Bestrahlung histologisch beschrieben werden.

Die durch die Bestrahlung induzierte Nekrosefläche der CAM ließ sich auf den horizontal geführten Schnitten zentral liegend darstellen und mittels Bildverarbeitung messen.

In beiden Bestrahlungsgruppen bestand eine Abhängigkeit der Nekrosefläche von der verwendeten Bestrahlungsstärke, die mit dem makroskopischen Schädigungsscore des Beobachtungszeitpunktes  $t=96$  Stunden korreliert:

Während nur 43% der mit Score I bewerteten CAMs eine messbare Nekrose aufwiesen, waren es bereits 88% bei Score II und schließlich 100% aller mit Score III bewerteten CAMs. Jeweils beide Bestrahlungsgruppen wurden zusammen betrachtet (siehe Tabelle 31).

Makroskopischer Score (96 h)	CAMs (n)	Nekrose (% der CAMs)
0	18	0
1	21	43
2	33	88
3	23	100
4	27	-----

**Tabelle 31: Detektierbare Nekrose abhängig vom Grad des makroskopischen Scores (Weißlicht- und Lasergruppe zusammengefasst)**

Innerhalb der Bestrahlungsgruppen korreliert der Mittelwert des makroskopischen Scores zum Beobachtungszeitpunkt 96 Stunden nach Bestrahlung mit dem Mittelwert der gemessenen Nekrosefläche (Tabelle 32 und Tabelle 33), (Abbildung 31, Abbildung 32, Abbildung 33, Abbildung 34).

Der Mittelwert der gemessenen Nekroseflächen der mit Score II bewerteten CAMs war in der Bestrahlungsgruppe Weißlicht 15J/cm<sup>2</sup> kleiner als der Mittelwert der mit Score II gewerteten CAMs der Bestrahlungsgruppe Weißlicht 30J/cm<sup>2</sup>.

Diese Gruppe wiederum zeigte eine kleinere mittlere Nekrosefläche als die Bestrahlungsgruppe Weißlicht 60J/cm<sup>2</sup>.

Innerhalb der einzelnen Bestrahlungsgruppen stieg der Mittelwert der gemessenen Nekrose tendenziell mit der Höhe des zugewiesenen makroskopischen Scores (Tabelle 32 und Tabelle 33).

Im Gruppenvergleich der makroskopisch gleich gewerteten CAMs zum Zeitpunkt t=96 Stunden nach Bestrahlung zeigten sich mikroskopisch größere Nekroseareale in der Lasergruppe (Tabelle 33).

Abhängig von der verwendeten Lichtquelle und Bestrahlungsstärke ließen sich einerseits makroskopisch PDT-induzierte Veränderungen der CAM außerhalb des Bestrahlungsareals, andererseits mikroskopisch detektierbare Nekroseflächen, größer als das Ringareal (30mm<sup>2</sup>), darstellen (Tabelle 32, Tabelle 33). In der Ausdehnung des PDT-Schadens über das Bestrahlungsareal hinaus zeigte sich die Laserbestrahlung der Weißlichtbestrahlung überlegen.

Makroskopischer Score (96 h)	Weißlicht 15J/cm <sup>2</sup> mittlere Nekrose (mm <sup>2</sup> )	Weißlicht 30J/cm <sup>2</sup> mittlere Nekrose (mm <sup>2</sup> )	Weißlicht 60J/cm <sup>2</sup> mittlere Nekrose (mm <sup>2</sup> )
1	7,94 n=7	26,2 n=2	-----
2	17,9 n=7	20,0 n=6	33,4 n=6
3	39,5 n=3	46,5 n=5	84,8 n=4
4	n. m. n=1	n. m. n=2	n. m. n=4
Mittlere Nekrose Gesamt	21,78 n=17+1	30,9 n=12+2	59,0 n=10+4
Keine messbare Nekrose	n=5	n=3	n=0

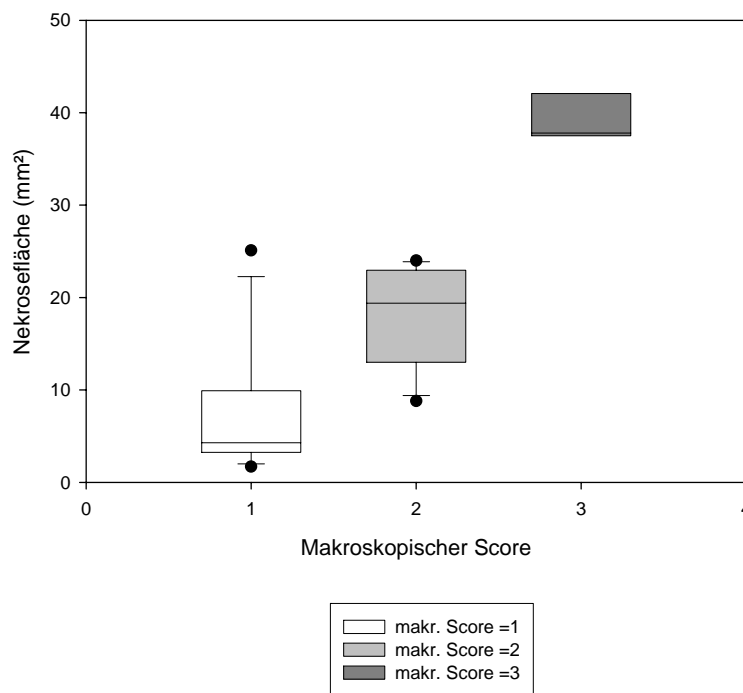
**Tabelle 32: Durchmesser der mittleren mikroskopisch detektierbaren Nekrose in Abhängigkeit zum makroskopischen Score (t=96 Stunden): Weißlicht**



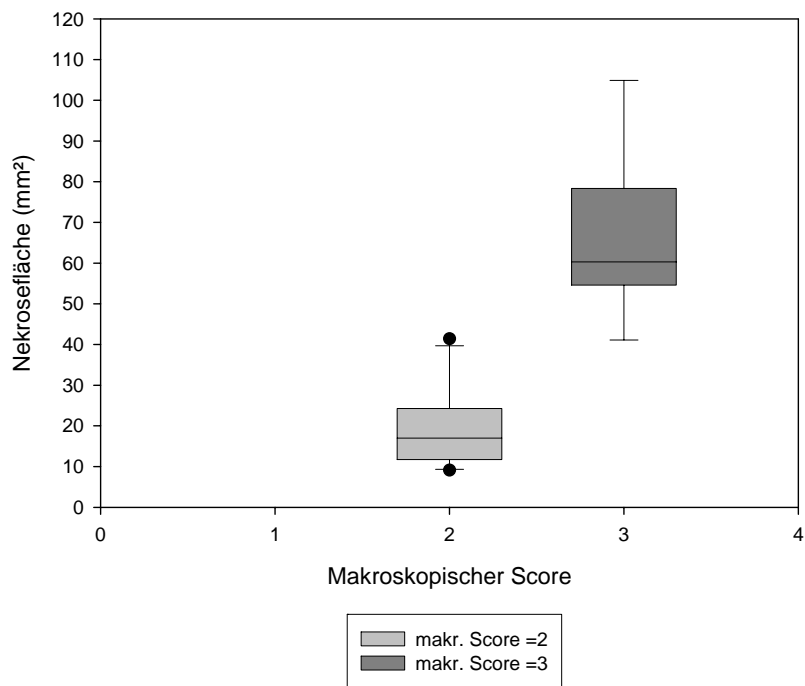
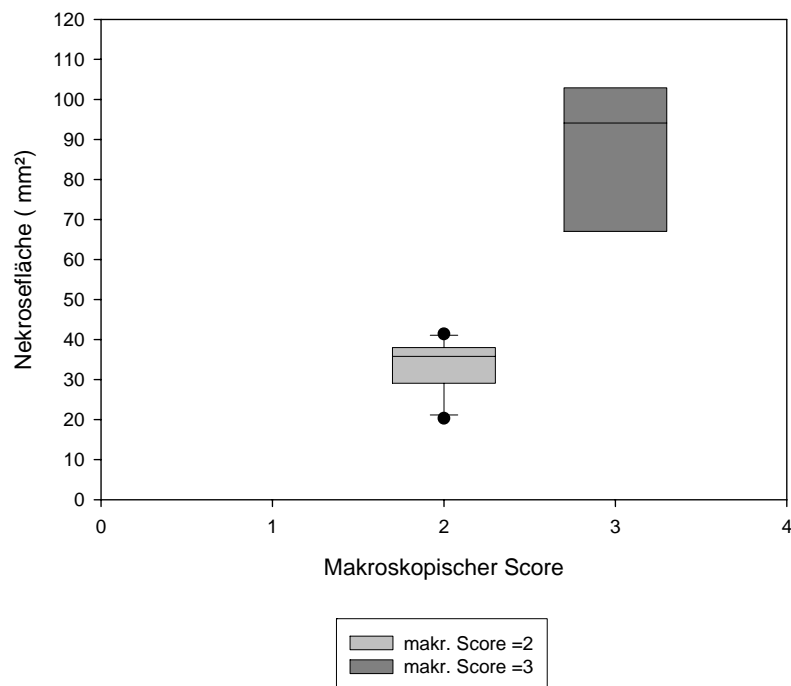
Makroskopischer Score (96 h)	Laser 15J/cm <sup>2</sup> mittlere Nekrose (mm <sup>2</sup> )	Laser 30J/cm <sup>2</sup> mittlere Nekrose (mm <sup>2</sup> )	Laser 60J/cm <sup>2</sup> mittlere Nekrose (mm <sup>2</sup> )
1	-----	-----	-----
2	19,7 n=7	46,6 n=2	-----
3	38,4 n=6	114,6 n=5	-----
4	n=3	n=7	n=9
mittlere Nekrose Gesamt	28,8 n=13+3	80,6 n=7+7	----- n=0+9
Keine messbare Nekrose	n=1	n=0	n=0

**Tabelle 33: Durchmesser der mittleren mikroskopisch detektierbaren Nekrose in Abhängigkeit zum makroskopischen Score (t=96 Stunden): Weißlicht**

WL 15 J/cm<sup>2</sup> - makroskopischer Score vs mikroskopischer Score



**Abbildung 31: Makroskopischer Score und detektierte Nekrosefläche: Weißlicht 15J/cm<sup>2</sup>**

WL 30 J/cm<sup>2</sup> - makroskopischer vs mikroskopischer ScoreAbbildung 32: Makroskopischer Score und detektierte Nekrosefläche: Weißlicht 30J/cm<sup>2</sup>WL 60 J/cm<sup>2</sup> - makroskopischer vs mikroskopischer ScoreAbbildung 33: Makroskopischer Score und detektierte Nekrosefläche: Weißlicht 60J/cm<sup>2</sup>

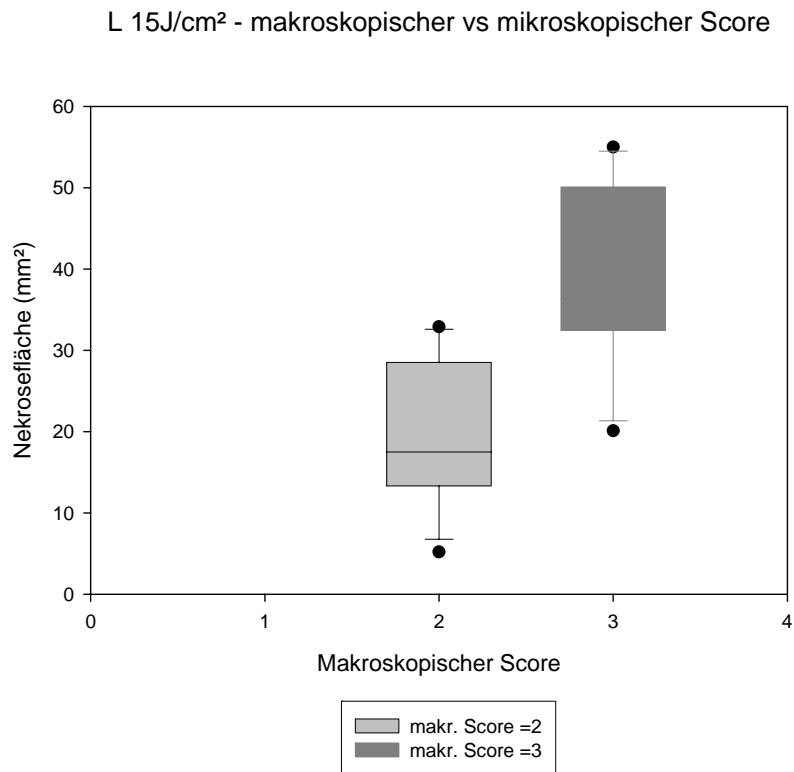


Abbildung 34: Makroskopischer Score und detektierte Nekrosefläche: Laser 15J/cm<sup>2</sup>

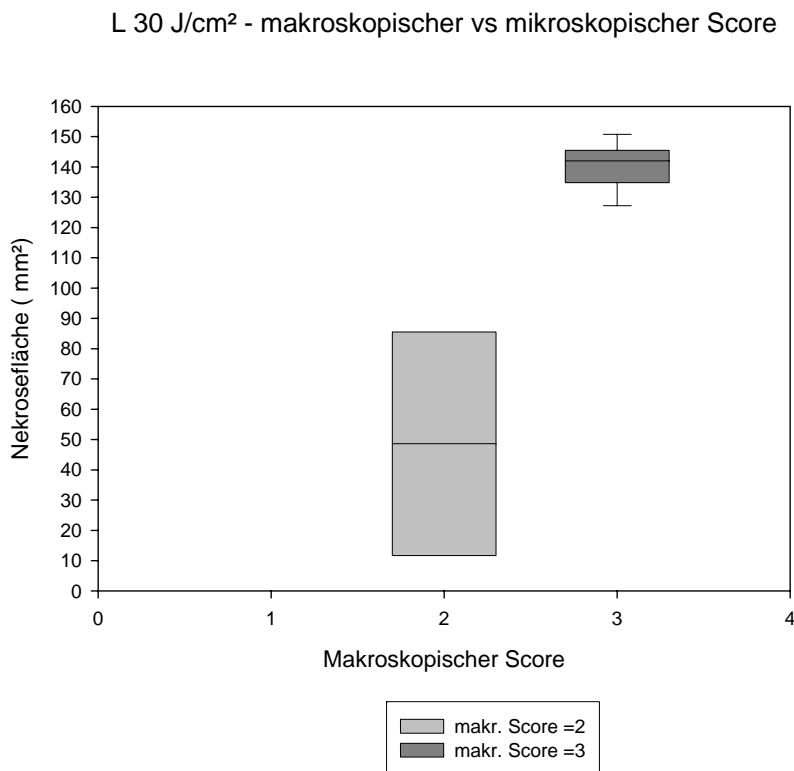


Abbildung 35: Makroskopischer Score und detektierte Nekrosefläche: Laser 30J/cm<sup>2</sup>

---

## 5. Diskussion

### 5.1. Klinischer Hintergrund

Im Zentrum des klinischen Interesses bei der Behandlung des Harnblasenkarzinoms steht, aufgrund der hohen Rezidiv- und Progressionswahrscheinlichkeit, die Therapie von flachen Schleimhautläsionen wie Carcinoma in situ und hochgradige Dysplasien, sowie das therapieresistente, BCG-refraktäre Harnblasenkarzinom.

Die Polychronotopizität des Urothelkarzinoms erfordert eine integrale Therapie der gesamten Harnblasenschleimhaut mit der Zielsetzung, Rezidive und Tumorprogress zu verhindern.

Zur integralen Therapie der Harnblase kommen derzeit Chemotherapeutika (vor allem Mitomycin C) und das Immuntherapeutikum Bacillus Calmette Guerin (BCG) intravesikal zum Einsatz [10, 11, 29, 41].

Bleibt die Instillationstherapie erfolglos oder muss sie wegen gravierender Nebenwirkungen abgebrochen werden, besteht die Indikation zur Zystektomie und künstlichen Harnableitung [42].

Kann die Zystektomie auf Grund begleitender Risikofaktoren nicht durchgeführt werden, steht mit der photodynamischen Therapie (PDT) eine organerhaltende Therapiealternative zur Verfügung [30, 34, 57, 58].

### 5.2. Photodynamische Therapie (PDT)

Um einen photodynamischen zytotoxischen Effekt zu erzielen, muss das Spektrum des eingestrahnten Lichtes innerhalb des Absorptionsspektrums des Photosensibilisators liegen. Prinzipiell kann jede Lichtquelle mit genügend hoher Leistung und Emission von Licht im Absorptionsbereich des Photosensibilisators für die PDT eingesetzt werden.

In den meisten klinischen Studien zur PDT kamen bislang Laser zum Einsatz [34, 57, 58].

Kohärenz und Monochromasie des Laserlichts sind beim Einsatz breitbandig absorbierender, biologischer Moleküle, wie dem 5-ALS induzierten Protoporphyrin IX, jedoch nicht notwendig.

Protoporphyrin IX (PpIX) absorbiert am stärksten violett-blaues Licht der Wellenlänge  $\lambda = 400\text{-}410\text{nm}$  und mit abnehmender Effektivität Banden bei  $500\text{-}505\text{nm}$ ,  $535\text{-}540\text{nm}$ ,  $565\text{-}575\text{nm}$  und  $620\text{-}635\text{nm}$ . Dieses Absorptionsspektrum wird als Soretbande bezeichnet.

Das verwendete rote Laserlicht der Wellenlänge 633nm liegt im Maximum der langwelligsten Soretbande [4, 5].

Inkohärente Weißlichtquellen wie die in den vorliegenden Untersuchungen verwendete Xenon-Hochdrucklampe strahlen breitbandig Licht im sichtbaren Spektrum ab und ermöglichen die gleichzeitige Anregung aller Absorptionsbanden des Photosensibilisators PpIX vom blauen bis zum roten Lichtanteil [4, 5].

Der Einsatz dieser Bestrahlungseinheit ist im Vergleich zum Laser technisch unkompliziert und preiswert.

Weitere Vorteile einer inkohärenten Lichtquelle sind die schnelle Adaptierbarkeit des Systems auch an zukünftige Photosensibilisatorgenerationen und die erhöhte Mobilität einer Hochleistungsweißlichtquelle im Gegensatz zu den apparativ aufwendigen und kostenintensiven Lasersystemen.

Die Faktoren, die den Wirkungsgrad der Photodynamischen Therapie beim Urothelkarzinom der Harnblase bestimmen, sind auf der einen Seite die selektive Anreicherung des Photosensibilisators in maligne transformierten Urothel, vor allem in den flachen Läsionen wie dem Carinoma in situ (Cis), und auf der anderen Seite eine geeignete Lichtquelle, angepasst an das Absorptionsspektrum des Photosensibilisators.

Gerade die flachen neoplastischen Veränderungen des Urothels (Carcinoma in situ / schwere Dysplasien) absorbieren bevorzugt den nur in geringe Tiefe (~1mm) eindringenden Violett/Grün-Anteil des inkohärenten Weißlichts [34, 57].

### **5.3. Das CAM-Modell**

Das CAM-Modell gilt als etabliertes in-vivo Modell für die Untersuchung verschiedenster PDT-Parameter, wie Vergleichsuntersuchungen einzelner Photosensibilisatoren, Darstellung deren Fluoreszenzeigenschaften, sowie vor allem für Untersuchungen zu den PDT-induzierten Bestrahlungseffekten [24, 25, 26, 31].

Es unterliegt, soweit die Versuche bis zum 18. Bebrütungstag durchgeführt werden, nicht den Tierversuchsbestimmungen und ist zudem wenig kostenintensiv.

Mit dem CAM-Modell als in-vivo System mit ausgeprägtem, nach entsprechender Präparation offen liegendem, leicht zugänglichen Gefäßsinus wurden optische (fluoreszenzkinetische) Messungen und Versuchsreihen zum direkten PDT-Lichtquellenvergleich durchgeführt.

---

**Fluoreszenzmessung**

Das Interesse der Untersuchungen zur Fluoreszenzdetektion nach topischer 5-ALS-Applikation galt primär quantitativen Ergebnissen. Deshalb wurde ein optischer Vielkanalanalysator (O-SMA) zur quantitativen Erfassung der Fluoreszenzspektren verwendet.

Die PpIX-Fluoreszenzintensität wurde relativ zur Autofluoreszenz der CAM normiert, welche sich zur Intensität des Anregungslichtes proportional verhielt (→Abbildung 8).

Die ermittelten Fluoreszenzwerte waren so, unabhängig von der Anregungsintensität, direkt vergleichbar. Es gelang die Separation der hydrophilen Porphyrine (Uro und Koproporphyrin) von dem hydrophoben Protoporphyrin IX (PpIX) durch fluoreszenzkinetischem Nachweis der spektralen Lage der Fluoreszenzbanden. Somit konnte die Synthese von Porphyrinen nach topischer Applikation von 5-ALS auf die CAM nachgewiesen und im zeitlichen Verlauf dokumentiert werden.

Die Kinetik dieser Synthesen wurde durch die zentrale Zunahme der Fluoreszenzintensitäten dargestellt, die Rohdaten beinhalten den Anteil der Autofluoreszenz.

Während die Fluoreszenzintensität von PpIX bei 633nm und 705nm 120 Minuten nach topischer 5-ALS-Applikation ein Maximum zeigte und das Emissionsspektrum sich nahezu asymptotisch einer definierten Fluoreszenzintensität annäherte, wiesen die Emissionsspektren der wasserlöslichen Porphyrine während des Beobachtungszeitraumes (175 Minuten) keine Sättigungstendenz auf (Abbildung 8).

Da die Fluoreszenzintensität von PpIX 120 Minuten nach topischer 5-ALS-Inkubation ihr Maximum erreichte, konnte so der optimale Bestrahlungszeitpunkt nach diesem Inkubationsintervall gewählt werden.

Der kontinuierliche Anstieg der Fluoreszenzintensitäten der wasserlöslichen Porphyrine lässt sich durch den Hühnerembryo-CAM-Kreislauf erklären: Die wasserlöslichen Porphyrine können aufgrund der Funktion als Ausscheidungsorgan, das die CAM während der Embryoentwicklung übernimmt, konstant nachgewiesen werden, da Uro und Koproporphyrin mit dem embryonalem Urin bzw. den embryonalen Fäces über die CAM ausgeschieden werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der spektralen Fluoreszenzanalysen, bei denen auf der nativen CAM neben den hydrophilen Porphyrinen ein PpIX-Signal nachgewiesen werden konnte (Abbildung 8), war während der Videodokumentation der fluoreszenzkinetischen Veränderungen erst zum Beobachtungszeitpunkt 40 Minuten nach topischer 5-ALS Applikation ein Fluoreszenzsignal darstellbar, das sich im weiteren Verlauf verstärkte und über die CAM ausbreitete.

Dies bedeutet, dass die Darstellung eines signifikanten Fluoreszenzsignals erst nach 5-ALS-Inkubation mit konsekutiver Umwandlung in PpIX möglich ist und die Zunahme der Fluoreszenz auf dem gesteigerten 5-ALS-Metabolismus mit nachfolgender intra / paravasaler Ausbreitung von PpIX beruht.

Die spektralen Fluoreszenzanalysen sind für den Nachweis von 5-ALS-induziertem PpIX empfindlicher und spezifischer als die verwendete Bildgebung.

## **5.4. Makroskopisches Beurteilungsschema**

Bei der Interpretation der Ergebnisse bezüglich des makroskopischen Scores war zu berücksichtigen, dass bei gleicher Photosensibilisatorkonzentration zwei Lichtquellen mit unterschiedlicher Gewebseindringtiefe zum Einsatz kamen.

Mit beiden Lichtquellen Laser (monochromatisches Licht bei 633nm) und Weißlicht (Wellenlängenbereich 350 bis 700nm) konnten, abhängig von der jeweils verwendeten Bestrahlungsstärke, PDT-induzierte Veränderungen auf dem bestrahlten CAM-Areal beobachtet und mit Hilfe des 4 Punkte umfassenden makroskopischen Scores qualitativ gewertet werden (→4.4.1 und 4.4.2).

PDT-spezifische Veränderungen wurden vor allem in Arealen mit hoher Gefäßdichte beobachtet (→ 4.2.2).

### **5.4.1. PDT-induzierte Gefäßschäden**

Auf zellulärer Ebene sind die Ziele der Gefäßschädigung Endothelzellen, Bestandteile der Gefäßbasalmembran, und die Subendothelialzone (z.B. Kollagen Typ IV und V und Microfibrillen) [24, 52]. Genauso können auch Schäden an korpuskulären Blutbestandteilen, hier vor allem von Thrombozyten und Erythrozyten, zu einer stellenweisen Unterbrechung des Blutflusses führen [24, 52].

Eine Störung der agonistischen und antiagonistischen Effekte der Endothelzellen auf die Thrombozytenaggregation ist für die Entstehung von Thromben in den Gefäßen verantwortlich [52]. Die PDT-induzierte Beschädigung von Endothelzellen setzt subendotheliale Kollagenfasern und Microfibrillen frei. Als Folge davon resultiert eine Thrombozytenaggregation und Degranulation. Dies führt schließlich zu einem Freiwerden vasoaktiver Substanzen, wie z.B. Thromboxan A<sub>2</sub>. Thromboxan A<sub>2</sub> wirkt stark thrombozytenaggregierend und vasokonstriktorisch [52].

Endothelzellen exprimieren die Bestandteile ihrer Basalmembran und der umgebenden subendothelialen Zone und sondern antikoagulatorische/fibrinolytische Stoffe ab.

Deswegen kann ein PDT-induzierter subletaler Bestrahlungsschaden aufgrund dieser Reparaturmechanismen *in vivo* zu einer Wiederherstellung der Gefäßarchitektur und Wiedererlangen des Blutflusses führen, so dass es zu einem geringeren zellulären Schaden des umgebenden Gewebes kommt.

Kurzzeitige Unterbrechung des CAM-Blutflusses, und somit keine komplette Hämostase, kann aufgrund dieser Selbstreparaturmechanismen zu einer weniger ausgedehnten bestrahlungsinduzierten CAM-Nekrose führen.

Ob der primäre Effekt der PDT auf das CAM-System durch direkte Schädigung der Gefäßendothelzellen oder durch Schädigung von korpuskulären Blutbestandteilen ausgelöst wird, ist derzeit Gegenstand von Untersuchungen.

#### **5.4.2. PDT-induzierte Schäden des CAM-Embryo-Systems: Makroskopischer Score I bis III**

Mit Scorewert I bis III wurden morphologische Veränderungen der CAM nach PDT bewertet, die für das Gesamtsystem des bebrüteten Hühnereis nicht letal waren.

Änderungen des Scorewertes, und somit morphologische Veränderungen im bestrahlten CAM-Areal, waren sowohl in der Weißlicht- als auch in der Lasergruppe nur innerhalb der Zeitspanne direkt nach Bestrahlung bis 48 Stunden nach PDT zu beobachten.

Es fand keine signifikante Änderung des Mittelwertes des makroskopischen Scores in der Zeitspanne 48 Stunden nach Bestrahlung und dem Beobachtungsendpunkt bei 96 Stunden nach Bestrahlung statt.

Im direkten Lichtquellenvergleich zeigten sich bei gleicher Bestrahlungsstärke in der Lasergruppe signifikant größere Schäden.

In beiden Bestrahlungsgruppen ließen Beobachtungen über einen Zeitraum von 96 Stunden keinen morphologisch sichtbaren Hinweis auf zelluläre Selbst – Reparaturmechanismen nach 5-ALS-PDT zu.

#### **5.4.3. PDT-induzierte Schäden des CAM-Embryo-Systems: Makroskopischer Score IV**

Gerade in der Phase des extensiven Embryonenwachstums um den Bestrahlungszeitpunkt am 11. Bebrütungstag ist die Funktionalität und Unversehrtheit der CAM als Resorptionsorgan von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung des Keimlings.



Es stellt sich die Frage, ob das im Versuchsrahmen zu beobachtende teilweise Absterben des Hühnerembryos nach Bestrahlung (dem makroskopischen Score IV entsprechend) durch einen Funktionsausfall der CAM zustande kommt, oder ob es durch einen sekundären photodynamischen Effekt durch Photosensibilisierung des Keimlings bedingt ist.

Betrachtet man das Verhältnis der im Versuchsrahmen größten mikroskopisch detektierten Nekrose (150,8mm<sup>2</sup> bei einer Bestrahlung mit 30J/cm<sup>2</sup> Laser) zur Gesamtfläche der CAM am 11. Bebrütungstag (60,8+/- 3,0cm<sup>2</sup>, entsprechend 94% der Ei-Gesamtoberfläche), so entspricht das Nekroseareal in etwa 2% der Gesamt- CAM-Oberfläche.

Verschiedenste Faktoren scheinen für die PDT-induzierten Veränderungen der CAM, die im markierten Bestrahlungsareal, aber auch, abhängig von der verwendeten Lichtquelle, sowie der Bestrahlungsstärke, in unterschiedlicher makroskopischer sowie mikroskopischer Größenausdehnung auf der restlichen CAM verifiziert werden können, verantwortlich zu sein:

### ***Faktoren, die zu PDT-induzierten Schäden im Hühnereimodell führen***

Da in den Versuchen zur Lichtsensitivität eine thermische Schädigung des CAM-Kapillarsystems sowie der umgebenden Matrix bei den verwendeten Bestrahlungsstärken in der Laser sowie der Weißlichtgruppe ausgeschlossen werden konnten, sind die beobachteten Schäden allein PDT-induziert.

Die durch PDT-induzierte Schäden des Systems des bebrüteten Hühnereis setzen sich aus 2 Komponenten zusammen:

1. Oberflächlicher PDT-Effekt = direkte Schädigung der CAM
2. Tiefer PDT-Effekt = direkte Schädigung des Embryos und indirekte Schädigung der CAM durch Rückstrahlung

Je nach verwendeter Lichtquelle, Laser oder Weißlicht, variieren die Anteile von 1. und 2. zum dokumentierten Gesamtschaden.

Es zeigte sich für alle verwendeten Bestrahlungsstärken ein im direkten Lichtquellenvergleich größerer detektierbarer Schaden in der Laser-PDT.

Folgende Faktoren erklären die im Lichtquellenvergleich höhere PDT-Effizienz der Laserbestrahlung:

### ***Laserbestrahlung:***

- Rotes Licht hat die höchste Eindringtiefe, wird von den über dem Embryo liegenden Schichten wie CAM oder Dottersack kaum absorbiert und hat auch im embryonalen Gewebe eine hohe Eindringtiefe (Abbildung 36 a).

- Durch die diffuse Rückstreuung des roten Laserlichtes an der Eischale und Lichtstreuung auch im Dottersack verstärkt das primär eingestrahlte Licht seine Wirkung im Embryo und auch auf der CAM (Abbildung 36 a).

#### **Weißlichtbestrahlung:**

- Der violett / blaue Weißlichtanteil hat eine geringe Eindringtiefe und weist eine hohe Absorption in der CAM und in tiefer liegenden Schichten wie dem Dottersack auf.
- Durch den hohen Absorptionskoeffizienten der kurzwelligeren Anteile ist ein PDT-Effekt im Embryo und Reflexionseffekte an der Eischale und dadurch sekundäre Effekt auf der CAM geringer als bei der Laserbestrahlung (Abbildung 36 b).

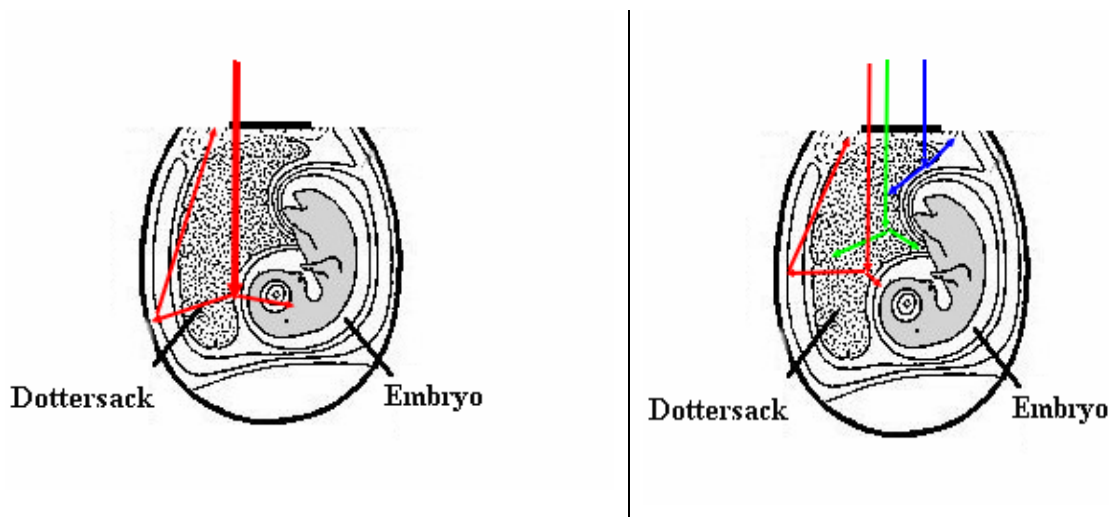


Abbildung 36 a und b: Mögliche Lichtwege von Laser (a) - und Weißlichtbestrahlung (b) im Hühnereimodel

Der höhere Anteil des tiefen PDT-Effektes führt zu den makroskopisch sowie mikroskopisch größeren detektierbaren Schäden in der Laser-PDT.

## **5.5. Bewertung der mikroskopischen Schädigung**

### ***Mikroskopisch detektierbare Nekrose***

In den bislang veröffentlichten Untersuchungen wurde der PDT-Effekt bei Versuchen mit dem CAM-Modell allein über die Gefäßaffektion nach Bestrahlung mittels makroskopischer Beurteilung dargestellt [22, 23, 24, 25, 43].

Eine mikroskopische Aufarbeitung der PDT-induzierten Schäden war bis dato noch nicht beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig ein PDT-induziertes histologisches Korrelat am CAM-Modell untersucht, nachgewiesen und dessen Größenausdehnung gemessen.

Somit konnte den bekannten makroskopischen PDT-Veränderungen ein histologisches Korrelat gegenübergestellt werden.

Nach histologischer Aufarbeitung der bestrahlten CAMs konnten, abhängig von der Bestrahlungsstärke und der verwendeten Lichtquelle und korrelierend zum zugewiesenen makroskopischen Score, Nekroseareale unterschiedlicher Flächenausprägung nachgewiesen werden:

- Es zeigte sich sowohl in der Weißlicht- als auch in der Lasergruppe bei gleichem makroskopischen Score eine jeweils größere mittlere Nekrosefläche mit Steigerung der Bestrahlungsstärke (Tabelle 32 und Tabelle 33).
- Im direkten Gruppenvergleich war die mittlere Nekrosefläche bei gleicher makroskopischer Bewertung für alle Bestrahlungsstärken in der Lasergruppe größer als in der Weißlichtgruppe.
- Die mittlere Nekrosefläche bei Weißlicht  $30\text{J}/\text{cm}^2$  ( $30,9\text{mm}^2$ ) füllte die ganze Fläche des aufgebrachtten Silikonrings aus, bei Weißlicht  $60\text{J}/\text{cm}^2$  war sie in Annäherung doppelt so groß ( $59\text{mm}^2$ ) (→Tabelle 32).
- In der Lasergruppe war bei einer Bestrahlung von  $15\text{J}/\text{cm}^2$  die Ringfläche nahezu vollständig nekrotisch ( $28,8\text{mm}^2$ ), in der Bestrahlungsgruppe Laser  $30\text{J}/\text{cm}^2$  betrug die mittlere gemessene Nekrosefläche fast das 2,5 Fache ( $80,6\text{mm}^2$ ) (→Tabelle 33).

Mehrere Faktoren sind für die Ausdehnung der PDT-induzierten Nekrose über das Bestrahlungsareal hinaus von Bedeutung:

### ***Photosensibilisierung der CAM außerhalb des Bestrahlungsareals***

Die hohe Sensitivität des proliferierenden Endothels gegenüber PDT-induzierter Bestrahlung führte über Schädigung des CAM-Kapillarnetzes zu einer Nekrose im Bestrahlungsareal, aber auch, abhängig von der verwendeten Lichtquelle und der Bestrahlungsstärke, in CAM-Bereichen, die außerhalb des markierten CAM-Areals lagen.

Der Silikonring, der das Bestrahlungsareal markierte, lag der CAM auf, verhinderte aber nicht, dass nach topischer Applikation von 5-ALS dieses aus dem Ringareal in anliegende CAM-Areale lief und es somit auch zu einer Photosensibilisierung den Ring umgebender CAM-Bezirke kam.

Die in 5.4.3 beschriebenen Effekte führen bei gleicher Bestrahlungsstärke zu einer größeren, über das primäre Bestrahlungsareal hinausgehende und sich über die Rest-CAM ausbreitende Nekrose in der Lasergruppe im Vergleich zur Weißlichtgruppe.

### ***Laser-abhängige PDT-Effekte***

Das Auftreten von Nekrosen, die in ihrer Ausdehnung größer als das primär bestrahlte CAM-Areal sind, ist auch auf die Schädigung von Gefäßen der Gruppe II (Durchmesser: 50-70µm) zurückzuführen, die durch das Bestrahlungsareal ziehen und anliegende CAM-Areale drainieren.

Die höhere Eindringtiefe des Laserlichtes führt zusätzlich über die Schädigung dieser auch tiefer liegender Anteile des CAM-Gefäßsystemes zu einer im Mittel für alle Bestrahlungsstärken geltenden größeren PDT-induzierten CAM-Nekrose in der Laser- als auch in der Weißlichtgruppe.

### ***Demarkierung der Nekrose***

Ziel der histologischen Untersuchungen war die Messung der Größenausdehnung der PDT-induzierten Nekrose und nicht die detaillierte histologische Beschreibung der Reaktionen auf zellulärer Ebene.

Deshalb werden die beobachteten PDT-Reaktionen nur beschreibend wiedergegeben.

Die nach dem Beobachtungsintervall von 96 Stunden nach PDT auf der CAM mikroskopisch detektierbaren Veränderungen setzen sich aus der primären bestrahlungsinduzierten Nekrose und sekundärem, die Nekrose demarkierendem Granulationsgewebe zusammen.

Dieses Granulationsgewebe entsteht durch PDT-induzierte Immunreaktionen, aber zumindest teilweise auch durch unspezifische Immunreaktionen auf den aufgetragenen Fremdkörper (Silikonring).

Wie bei der nichtspezifischen Immunantwort bei Säugetieren sind bei Geflügel als Effektorzellen Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten und heterophile Zellen, die den neutrophilen Granulozyten bei Säugetieren entsprechen, beteiligt [54].

Heterophile sind die ersten Zellen, die bei der unspezifischen Entzündungsreaktion auf Fremdmaterial beteiligt sind. Zusammen mit Monozyten immigrieren sie in den ersten 6 bis 12 Stunden über chemotaktische Stimuli in das Gewebe [54].

Im weiteren Verlauf der Reaktion lassen sich Makrophagen und Lymphozyten nach 48 Stunden und Riesenzellformationen ab 72 Stunden nachweisen [54].

Zusammen mit Fibroblasten und exprimiertem Fibrin bilden die Makrophagen ein Fremdmaterial umgebendes Granulationsgewebe [54].

Dieses Granulationsgewebe erschwert die dezidierte Unterscheidung zwischen reiner, PDT-induzierter Nekrose und sekundärer, bestrahlungs- und fremdkörperinduzierter Immunantwort.

## **5.6. Die Grenzen des CAM-Modells für den vergleichenden Versuchsansatz**

Mit Gefäßdurchmessern von 20 bis 120 $\mu$ m ähnelt das CAM-Gefäßsystem größenmäßig der Neovaskularisation von Tumoren [25].

Obwohl sich das proliferierende CAM-Gefäßnetzwerk und die Neovaskularisation von Tumoren in Entwicklung, Größe und Aufbau ähneln, kann von PDT-Ergebnissen im CAM-Modell nicht unmittelbar auf Reaktionen bei der Tumor-PDT geschlossen werden.

Die Bestrahlungsstärken, die zu Reaktionen des CAM-Systems führen, sind, in Abhängigkeit der PpIX- Konzentration, niedriger als in anderen biologische Systemen, da weniger Bestrahlungsverluste durch Absorption und Streuung durch darüberliegendes Gewebe auftreten. Topische 5-ALS-Applikation stellt einerseits sicher, dass für die Versuche vergleichbare Konzentrationen an Photosensibilisator in den markierten CAM-Bereichen vorliegen. Da die CAM aber kein isoliertes optisches System darstellt, kommt es andererseits zur Interaktion des durch topisch applizierten 5-ALS induzierten PpIX mit dem Organismus des Hühnerembryos. Die Verbindung des CAM-Gefäßsinus mit dem Hühnerembryo über die in die Tiefe drainierenden Gefäße führt zu einer 5-ALS induzierten Photosensibilisierung des Embryos. Photosensibilisierung des Embryos und die höhere Eindringtiefe des roten Laserlichts, die aufgrund fehlender Absorption von tiefer liegenden Schichten des bebrüteten Hühnereis sowie durch Lichtstreuung (z. B. Dottersack und Eischale) den Embryo direkt schädigen können, sind für die im Mittel größeren PDT-Schäden der Laserbestrahlung verantwortlich zu machen.

## 6. Zusammenfassung

Durch die Interaktion eines gewebe selektiv angereicherten Photosensibilisators mit Licht geeigneter Wellenlänge führt die Photodynamische Therapie (PDT) zur selektiven Schädigung der den Photosensibilisator anreichernden Gewebeareale. Als minimal-invasives Verfahren wird die PDT in zahlreichen Fachdisziplinen zur Behandlung verschiedenster Tumorentitäten eingesetzt. Neben der Entwicklung neuer Photosensibilisatoren ist vor allem die Optimierung der Bestrahlungsparameter Gegenstand der Forschung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem tierversuchsnahen Modell der Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühnereis (CAM-Modell) experimentelle Grundlagenuntersuchungen hinsichtlich der Eignung für in-vivo Studien zur Photodynamischen Therapie mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALS) induziertem Protoporphyrin IX (PpIX) als Photosensibilisator durchgeführt.

Durch Festlegung einer standardisierten Versuchsanordnung sollte ein inter-experimentell vergleichbares Verfahren zur Bestimmung der optimalen Bestrahlungsparameter erarbeitet werden.

Die funktionelle Vereinigung einer embryonalen Hülle (Chorion) mit einer sackförmigen Ausstülpung des Enddarms (Allantois) führt zur Bildung der CAM. Bis zum Schlüpfen des Hühnerkeimlings ersetzt die CAM die Funktion der noch nicht funktionstüchtigen Lunge zu 100%. Als Teil der allantoidalen Ausstülpung übernimmt die CAM auch Ausscheidungsfunktionen durch Aufnahme der embryonalen Exkremente und Exkrete der embryonalen Nieren.

Die Transparenz der CAM erlaubt die Bestrahlung mit allen absorbierten Wellenlängen, abhängig vom verwendeten Photosensibilisator, da keine Limitierung durch Gewebspenetration vorliegt. So können PDT-Effekte auf die Vaskularisation und die umgebende CAM-Matrix in Echtzeit beobachtet und dokumentiert werden, außerdem besteht die Möglichkeit die Bestrahlungseffekte nach Entnahme der CAM auch histologisch zu untersuchen.

Zunächst wurden nach topischer 5-ALS-Applikation auf ein definiertes CAM-Areal Fluoreszenzmessungen der entstehenden Porphyrine durchgeführt.

Die spektrale Verteilung der verschiedenen, nach Gabe von 5-ALS entstehenden, Porphyrine, sowie der zeitliche Verlauf ihrer Entstehung ist für die klinische Umsetzung der PDT von entscheidender Bedeutung, da sie sowohl die Wellenlänge des einstrahlenden Lichtes als auch den optimalen Zeitpunkt der Bestrahlung definiert.

Da sowohl Fluoreszenz als auch Absorption durch die Anreicherung des Photosensibilisators bestimmt werden, korreliert das Ausmaß der Fluoreszenz mit dem Ausmaß des durch PDT induzierten Gewebeschadens.

Zur Anregung der Fluoreszenz wurde eine Xenon-Lampe (300W, D-Light, Storz, Tuttlingen Deutschland) verwendet, deren Licht mit Hilfe eines Kondensators fokussiert wurde.

Ein entsprechendes Filtersystem blockte den störenden Infrarotteil ab.

Für die Fluoreszenzdiagnostik wurde das Weißlicht durch das Einschwenken eines Blaufilters so gefiltert, dass nur noch Licht des Wellenlängenbereichs 375nm bis 440nm, d.h. Licht im violett-blauen Spektralbereich, am Lampenausgang in ein Lichtleiterkabel eingekoppelt wurde.

Eine spektrale Analyse des Fluoreszenzlichtes wurde mit Hilfe eines optischen Vielkanalanalysators (Optical Multichannel Analyser, O-SMA, Princeton Instruments, Trenton, NY, USA) vorgenommen.

Alle Bestrahlungsversuche wurden am 11. Bebrütungstag durchgeführt, um innerhalb des gewählten Beobachtungsrahmens von 96 Stunden (=15. Bebrütungstag) die möglichen Interaktionen mit dem wachsenden Hühnerembryos so gering wie möglich zu halten.

Nach entsprechender Präparation wurde auf ein gut vaskularisiertes, zentrales CAM-Areal ein Silikonring mit einem inneren Durchmesser von 6mm aufgebracht.

Die 5-Aminolävulinsäure wurde topisch appliziert, das Licht der jeweils verwendeten Lichtquellen, nach Einkopplung in entsprechende Lichtleiter, eingespeist und über eine Linse auf das durch den Silikonring vorgegebene Bestrahlungsfeld abgebildet.

Um die Dunkeltoxizität zu ermitteln wurden 28 CAMs mit 5-ALS in aufsteigender Konzentration (3, 30, 300, 3000 $\mu$ g/0,1ml) inkubiert. 40 CAMs wurden ohne vorherige Applikation von 5-ALS mit kohärentem Licht (Laserlicht  $\lambda = 633\text{nm}$ ) sowie inkohärentem Licht (Weißlicht  $\lambda = 375$  bis  $440\text{nm}$ ) in steigender Energiedichte (5, 15, 30, 60 J/cm<sup>2</sup>) bestrahlt. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden innerhalb dieses für die Untersuchungen von PDT-Effekten geeigneten „therapeutischen Fensters“ durchgeführt.

Die bestrahlungsinduzierten PDT-Schäden wurden makroskopisch und mikroskopisch gewertet und deren zeitlicher Verlauf in Abhängigkeit von der verwendeten 5-ALS-Konzentration, der Energiedichte des eingestrahnten Lichts und der verwendeten Bestrahlungsquelle (Weißlicht oder Laserlicht) beschrieben.

Die semiquantitative Beurteilung der makroskopisch detektierbaren PDT-Effekte auf die CAM und das CAM-Gefäßsystem erfolgte mit einer 4-Punkteskala, in der die Veränderungen:

- der Gefäßmorphologie
- der CAM-Blutzirkulation

und der CAM-Matrixmorphologie berücksichtigt wurden.

96 Stunden nach Bestrahlung, entsprechend dem 15. Bebrütungstag, wurde die CAM entnommen und histologisch aufgearbeitet um die Ausdehnung der bestrahlungsinduzierten Nekrose zu quantifizieren.

Vergleichende Untersuchungen wurden für verschiedene Bestrahlungsstärken innerhalb der Bestrahlungsgruppen sowie zum Lichtquellenvergleich durchgeführt.

Die experimentellen Grundlagenuntersuchungen zur Photodynamischen Therapie mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALS) am tierversuchsnahen Modell der Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühnereis (CAM-Modell) erlauben folgende zusammenfassende Schlussfolgerungen:

- Das CAM-Modell ermöglicht die Echtzeitbeobachtung der 5-Aminolävulinsäureaufnahme und Umsetzung in fluoreszierendes Protoporphyrin IX.
- Durch die Darstellung der spektralen Situation konnte die dynamische Änderung der Protoporphyrin IX-Entwicklung nach 5-ALS-Gabe dokumentiert werden.
- Durch die spektrale Lage der Fluoreszenzbanden gelang die Separation der hydrophilen Porphyrine (Uro und Koproporphyrin) von dem hydrophoben Protoporphyrin IX. Es konnte somit die Synthese aller Spezies von Porphyrinen nach topischer Applikation von 5-Aminolävulinsäure auf die CAM nachgewiesen werden.
- Die Bestrahlungseffekte auf das offen liegende Gefäßsystem und die umgebende Grundmatrix konnten über einen definierten Beobachtungszeitraum dokumentiert werden, und durch histologische Aufarbeitung der bestrahlten CAM-Areale war es möglich die Ausdehnung der PDT-induzierten Nekrose zu messen.
- Die auf der CAM durch PDT-induzierten Effekte wurden beschrieben und unter einem semiquantitativen 4 Punkte umfassenden makroskopischen Bewertungsscore subsumiert. Die Flächenausdehnung der Nekroseareale wurde an Hand von histologischen Präparaten quantitativ ausgewertet. Die semiquantitative Auswertung der makroskopisch feststellbaren PDT-induzierten Schäden wurde mit den mikroskopisch verifizierbaren Veränderungen (Flächenausdehnung der PDT-induzierten Nekrose) korreliert.



- Es war nachweisbar, dass durch die PDT Veränderungen auf der CAM sowohl mit Laserbestrahlung als auch mit Weißlichtbestrahlung induziert werden können. In den Kontrollgruppen (Dunkeltoxizität sowie Lichtsensitivität) kam es zu keinen messbaren Schäden.
- Sämtliche PDT-induzierte Schäden entwickelten sich auf der CAM innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 48 Stunden. Es wurden ab dem Beobachtungszeitpunkt 48 Stunden im weiteren Verlauf keine Spätschäden beobachtet.
- Die Auswertung sowohl der makroskopischen Veränderungen als auch der histologisch nachweisbare Schaden zeigte bei gleicher 5-ALS-Konzentration und gleicher Bestrahlungsstärke größere PDT-induzierte Schäden nach Laserbestrahlung als nach Weißlichtbestrahlung.
- Ursächlich für die größeren PDT-induzierten Schäden nach Laserbestrahlung sind die Photosensibilisierung des Embryos und die höhere Eindringtiefe des monochromatischen Laserlichts. Laserlicht kann aufgrund fehlender Absorption von tiefer liegenden Schichten des bebrüteten Hühnereis und durch Reflexion (z. B. Dottersack und Eischale) den Embryo direkt schädigen. Zusätzlich zur primären CAM-Schädigung kann es durch die diffuse Rückstrahlung auch zu sekundären CAM-Veränderungen in den Silikonring angrenzenden Arealen kommen.
- Die CAM ist kein isoliertes optisches System, die topische 5-ALS-Gabe führt deshalb nicht zu einer isolierten Photosensibilisierung der CAM.  
Durch die Verbindung des CAM-Gefäßsinus mit dem Hühnerembryo über die in die Tiefe drainierenden Gefäße kommt es zu einer Photosensibilisierung des Embryos.  
Die topische 5-ALS-Applikation stellt sicher, dass für die Versuche vergleichbare Konzentrationen an Photosensibilisator in den markierten CAM-Bereichen vorliegen.  
Die Interaktion des topisch applizierten Photosensibilisators mit dem Organismus des Hühnerembryos quantitativ zu klären ist derzeit Gegenstand weiterführender Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe.

---

## 7. Anhang

### HE-Färbung von Paraffinschnitten

#### Entparaffinierung:

Paraffinschnitte einstellen in

Xylol: 2-5 min

96% Alkohol: 2-5 min.

70% Alkohol: 2-5 min.

50% Alkohol: 2-5 min.

Aqua dest.: 2-10 min.

#### Färbung:

Harris Haematoxylin: 5 min.

Spülung in Aqua dest.

Differenzierung in HCl-Alkohol

Spülung in Aqua dest. (mikr. Kontrolle)

Aqua fließend: 5 min.

Eosin: 30 sec.

Spülung in Aqua dest.

70% Alkohol: Eintauchen

96% Alkohol: 1 min.

96% Alkohol: 5 min.

Xylol: 5 min (bis 1 Stunde)

#### Eindecken:

Glycerin-Gelantine

---

## 8. Literaturverzeichnis:

1. Aalders M., Vange N., Stewart F. et al: White light toxicity, resulting from systemically administered 5-ALA, under normal operating conditions  
(1998): 1-14
2. Ausprunk D., Knighton D., Folkmann J.: Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois  
American Journal of Pathology 24 (1975): 597-609
3. Battle del C.: Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy – a model for carcinogenesis  
Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biol. 20 (1993): 5-22
4. Baumgartner R., Kriegmair M. et al: Fluoreszenzdiagnostik des Harnblasenkarzinoms mit 5-Aminolävulinsäure-Grundlagen und Ergebnisse
5. Baumgartner R., Kriegmair M.: Intravesikuläre Instillation von Delta-Aminolävulinsäure (ALA)–Eine neue Methode zur photodynamischen Diagnostik und Therapie  
Laser-Medizin 8, 83 (1992)
6. Berlin, N. I., Neuberger, A., Scott, J.J.: The metabolism of delta-aminolaevolinic acid: Normal pathways, studied with the aid of <sup>15</sup>N.  
Biochemistry 64 (1956): 90-100
7. Berlin, N. I., Neuberger, A., Scott, J.J.: The metabolism of delta-aminolaevolinic acid: Normal pathways, studied with the aid of <sup>14</sup>C.  
Biochemistry 64 (1956): 90-100
8. Bermudez-Moretti M., Correa-Garcia S, Stella C., Ramos E., Battle A.: Delta-aminolaevulinic acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*.  
Int. J. Biochem. 25 (1993): 1917-1924
9. Bezdetnaya L., Zeghari, N., Belitchenko, I. et al.: Spectroscopic and biological testing of photobleaching of porphyrins in solutions

---

Journal of Photochemistry and Photobiology 64 (1996): 382-286

10.Böhle A., Durek C.: Der Einsatz von BCG beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom  
Urologe (A), 40 (2001): 403-411

11.Böhlke, A, Kirsten, D, Schröder, K.-H, Knipper, A, Fornara, P, Magnussen, H, Jocham, D.:  
Clinical evidence of systemic persistence of bacillus Calmette-Guerin: Long-term pulmonary.  
in FP, Preuss LE, Taylor RC

12.Cox G. S., Bobillier C., Whitten D.G. : Photooxidation and singlet oxygen sensitization of  
protoporphyrin IX and its photo-oxidation products.  
Journal of Photochemistry and Photobiology B Biol 36 (1982): 401-407

13.Cutler S.J., Heney N.M., Friedell G.W.: Longitudinal study of patients with bladder cancer.  
Factors associated with disease recurrence and progression.  
Bonney W., Prout D.R.(eds): Bladder cancer (Williams & Wilkins, Baltimore, pp35-46)

14.De Fouw D.O., Rizzo V.J., Steinfeld R., Feinberg R.N.: Mapping of the microcirculation in  
the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis  
Microvasc. Res.38 (1989): 333-336

15.Dietel W., Bolsen K., Dickson E. et al: Formation of water-soluble porphyrins and  
protoporphyrin IX in 5-aminolevulinic-acid-incubated carcinoma cells  
Journal of Photochemistry and Photobiology B 33 (1996): 225-231

16.Dietel W., Fritsch C., Pottier R.H, Wendenbrg R.: 5-Aminolaevulinic-acid-induced  
formation of different porphyrins and their photomodifications  
Lasers in Medical Science 12 (1997): 226-236

17.Divaris D., Kennedy J., Pottier R.: Phototoxic damage to sebaceous glands and hair follicles  
of mice following systemic administration of 5-aminolevulinic acid correlates with localized  
protoporphyrin IX fluorescence  
Am J. Pathology 136 (1990)

18.Eichler, H.J.: Dispersion und Absorption des Lichtes (1987): 207-324

- 
19. Elliot T.: Transportation of 5-aminolaevulinic acid by the dipeptide permease in salmonella typhimurium  
J. bacteriol 175 (1993): 325-331
20. Fitze-Gschwind: Ergebnisse der anatomischen Entwicklungsgeschichte 47: 7-52, (1977)
21. Fuchs A., Lindenbaum E.S.: The two and three-dimensional structure of the microcirculation of the chick chorioallantoic membrane  
Acta anat. 131 (1988): 271-275
22. Gottfried V., Lindenbaum E.S., Kimel S.: The chick chorioallantoic membrane (CAM) as an in vivo model for photodynamic therapy  
Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 12 (1992) 204-207
23. Gottfried V., Lindenbaum E.S., Kimel S.: Vascular damage during PDT as monitored in the chick chorioallantoic membrane  
International Journal of Radiat. Biol. Vol 60 Nos 1 / 2 (1991): 349-354
24. Gottfried V., Davidi R., Averbuj C., Kimel S.: In vivo damage to chorioallantoic membrane blood vessel by porphyrin-induced photodynamic therapy  
Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology (1995) :115-121
25. Hamer-Wilson M.J., Akian L., Espinoza J., Kimel S., Berns M.W.:  
Photodynamic parameters in the chick chorioallantoic membrane (CAM) bioassay for topically applied photosensitizers  
Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 53 (1999): 44-52
26. Hornung R., Hammer-Wilson M.J., Kimel S., Lih-Huei L., Yona T., Berns M.W.:  
Systemic Application of photosensitizers in the chick chorioallantoic membrane (CAM) model: Photodynamic response of CAM vessels and 5-aminolevulinic acid uptake kinetics by transplantable tumors  
Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 49 (1999): 41-49

- 
27. Iinuma S., Farshi S.S., Ortel B., Hasan T.: A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolevulinic-acid-induced porphyrin  
British Journal of Cancer 70 (1994): 21-28
28. Jahn D., Hungerer C., Troup B.: Unusual pathways and environmental regulated genes of bacterial heme biosynthesis  
Naturwissenschaften 83/9: (1996): 389-400
29. Kälble T.: Oberflächliches Urothelkarzinom der Harnblase – aktueller Stand der Therapie  
Urologe [B] 38 (1998): 333-338
30. Kelly J.F., Snell M.E.: Hematoporphyrin derivate: A possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder  
Journal of Urology 115 (2) (1976): 150-151
31. Kimel S., Svaasand L.O., Hammer-Wilson L.O. et al: Demonstration of synergistic effects of hyperthermia and photodynamic therapy using the chick chorioallantoic membrane model  
Lasers in Surgery and Medicine 12 (1992): 432-440
32. Kimel S., Svaasand L.O., Cao D., Hammer-Wilson L.O., Nelson S.: Vascular Response to Laser Photothermolysis as a Function of Pulse Duration, Vessel Type and Diameter: Implications for Port Wine Stain Laser Therapy  
Lasers in Surgery and Medicine 30 (2002): 160-169
33. Kriegmair M., Stepp H., Steinbach P., Lumper W., Ehsan A., Stepp H.G., Rick K., Knüchel R., Baumgartner R., Hofstetter A.: Fluorescence cystoscopy following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid: a new procedure with light sensitivity for detection of hardly visible urothelial neoplasias  
Urol. Int. (4) (1995): 190-1996
34. Kriegmair M., Waidelich R., Lumper W., Ehsan A., Baumgartner R., Hofstetter A.: Integral photodynamic treatment of refractory superficial bladder cancer  
Journal of Urology 154 49 (1995): 1339-1341
35. Kriegmair M., Baumgartner R., Knüchel R., Stepp H., Hofstadter F., Hofstetter A.:

---

A Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence

Journal of Urology 155 (1) (1996): 105-109

36.Kriegmair M., Stepp H., Baumgartner R., Hofstetter A., Knüchel R., Steinbach P., Hofstadter F.:

Fluorescence controlled transurethral resection of bladder cancer following intravesical application of 5-aminolevulinic acid

Journal of Urology 155 (1996). 665A

37.Lamm D.L., van der Meijden P.M., Morales A., Brosmann S.A., Catalona W.J., Herr H.W., Soloway M.S., Steg A., Debruyne F.M.: Incidence and treatment of complications of bacillus Calmette-Guerin intravesikal therapy in superpericial bladder cancer

Journal of Urology 153 (5) (1995a): 1444-1450,

38.Leeson T.S, Leeson C.R.: The chorio-allantois of the chick. Light and electron microscopic observations at various times of incubation

Journal of Anatomy, London 4 (1963): 585-595

39.Lutzeyer W., Rübben H., Dahm H: Prognostic parameters in superficial bladder cancer: An analysis of 315 cases

Journal of Urology 127: 250-252

40.Malik Z., Lugaci H.: Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins

Br. J. Cancer 56 (1987): 589-595

41.Malik Z., Ehrenberg B., Faraggi A.: Inactivation of erythrocytic, lymphocytic and myelocytic leukemic cells by photoexcitation of endogenous porphyrins

Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biol. 4 (1989): 195-203

42.Miller K., Weißbach L. Et al: Leitlinien zur Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU)

Urologe [A] 37 (1998): 440-457

43.Neumann N.J. Hölzle E., Lehmann P. et al: Photo hen's test: A model for phototoxicity

---

British journal of Dermatology 136 (1997): 326–330

44. Peng Q.; Berg K.; Moan J. et al: 5-Aminolevulinic acid- based photodynamic therapy:

Principles and experimental research

Journal of Photochemistry and Photobiology 65(2) (1997): 235-251

45. Pottier R., Chow Y., la Plante J., Truscott T., Kennedy J., Beiner L.: Non invasive technique for obtaining fluorescence excitation and emission

Journal of Photochemistry and Photobiology 44 (1986): 679-682

46. Ribatti, D., Nico, B. et al: Chorioallantoic membrane capillary bed: A useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo

The anatomical record 264 (2001): 317-324

47. Rizzo V., Steinfeld R., Kyriakides C., DeFouw D.O.: The microvascular unit of the 6-day chick chorioallantoic membrane: A fluorescent confocal microscopic and ultrastructural morphometric analysis of endothelial permselectivity

Microvascular research 46 (1993): 320-332

48. Rizzo V., Daekyung K., Walter N.D., DeFouw D.O.: Ontogeny of Microvascular Permeability to Macromolecules in the Chick Chorioallantoic Membrane during normal Angiogenesis

Microvascular research 49 (1995): 49-63

49. Rizzo V., DeFouw D.O.: Capillary Sprouts Restrict Macromolecular Extravasation during normal Angiogenesis in the Chick Chorioallantoic Membrane

Microvascular research 52 (1996): 47-57

50. Schlatter P., König M.F., Karlsson L.M., Burri P.H.: Quantitative study of intussusceptive capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryo

Microvascular research 54 (1997): 65-73

51. Sroka R., Beyer W., Gosser L.; et al.: Pharmacokinetics of 5-aminolävulinic acid induced porphyrins in tumor bearing mice

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 34 (1) (1996): 9-13



- 
52. Strauss W.S.L., Sailer R., Schneckenburger H. et al: Photodynamic efficacy of naturally occurring porphyrins in endothelial cells *in vitro* and microvasculature *in vivo*  
Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 39 (1997): 176-184
53. Toledano H., Edrei R., Kimel S.: Photodynamic damage by liposome-bound porphycenes: comparison between *in vitro* and *in vivo* models  
Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 42 (1998): 20-27
54. Valdes T.I., Kreutzer D., Moussy F.: The chick chorioallantoic membrane as an *in vivo* model for the testing of biomaterials  
Inc. J Biomed Mater Res 62 (2002): 273-282
55. Van der Veen N., Van Leengoed H.L.L.M., Star W.M.: *In vivo* fluorescence kinetics and photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin: Increased damage after multiple irradiations  
British Journal of cancer 70 (1994): 867-872
56. Vögeli TA, Grimm Mo, Ackermann R: Prospective study for quality control of TUR of bladder tumors by routine 2<sup>nd</sup> TUR (ReTUR)  
Journal of Urology 159: 5 Suppl (1998)
57. Waidelich, R, Stepp H, Baumgartner R, Weninger E, Hofstetter A, Kriegmair M:  
Clinical experience with 5-aminolevulinic acid and photodynamic therapy for refractory superficial bladder cancer.  
Journal of Urology 165: 1904-1907, 2001
58. Waidelich, R, Hofstetter A, Stepp H, Baumgartner R, Weninger E, Kriegmair M:  
Early clinical experience with 5-aminolevulinic acid for the photodynamic therapy of upper tract urothelial tumors.  
Journal of Urology 159: 401-404, 1998
59. Walters, R.T, Gribble, T.G, Scharz, H.C: Synthesis of haem in normal and leukemic leukocytes.  
Nature 197: 1213-1214, 1963

60. Weber G., Keller H., Durek C., Böhle A.:  
TICE BCG in der Rezidivprophylaxe und Therapie des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms  
Urologe [B] 41 (2001): 482-487
61. Witjes J.A., Kiemeny L.A., Oosterhof G.O., Debruyne F.M.:  
Prognostic factors in superficial bladder cancer: A review  
Eur. Urol. 21 (1992): 89-95
62. Wyld L., Burn JL., Brown NJ: Factors affecting aminolaevulinic acid induced generation of  
protoporphyrin IX  
British Journal of Cancer 76(6) (1997): 705-712
63. Zaak D., Stepp H., Baumgartner R., Kriegmair M., Knüchel R., Hofstetter A.:  
Endoskopie detection of urinary bladder cancer with 5-aminovulinic acid based fluorescence  
endoscopy  
Journal of Urology 161: 170 (Suppl.) (1999 b)

---

## 9. Danksagung

Nach Abschluss dieser Arbeit gilt mein Dank:

Frau Priv. Doz. Dr. R. Waidelich für die Überlassung dieses spannenden experimentellen Themas, die engmaschige Betreuung und die wertvolle Hilfestellung im Bezug auf die klinische Relevanz.

Herrn Prof. Dr. med. C. G. Stief für die kompetente Beratung und die anregenden Diskussionen während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. mult. A. Hofstetter für die Möglichkeit Experimente im Laser-Forschungslabor der Urologischen Klinik der Universität München durchführen zu können.

Herrn Dr. rer. nat. R. Baumgartner für die exzellente Betreuung dieser Arbeit, die freundschaftliche Zusammenarbeit und die uneingeschränkte Unterstützung, auch über diese Arbeit hinaus.

Herrn Dr. rer. hum. biol. R. Sroka für die ständige Hilfsbereitschaft und kompetente Hilfestellung bei allen Fragen, sowie für die zahlreichen Anregungen und die lehrreiche Diskussionen

Herrn Dr. rer. nat. H. Stepp für seine vielseitige Unterstützung weit über die Fragen zur statistischen Aufarbeitung hinaus.

Herrn Dipl. Ing. Thomas Pongratz für die Unterstützung bei der Optimierung und Anpassung der Lichtquellen und des Bildverarbeitungssystems, sowie für Rat und Tat bei der Durchführung der Versuche.

Zuletzt besonderer Dank an meine Eltern Gisela und Jürgen Bader. Für ihre Begleitung durch alle Höhen und Tiefen der vorliegenden Arbeit, durch ihre materielle und geistige Unterstützung.

Meiner Frau Felizitas für ihre Liebe und ihr Vertrauen.

Diese Arbeit entstand im Rahmen eines Promotionsvorhabens von Herrn Markus Bader an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

---

## 10. Lebenslauf

### Angaben zur Person:

Name: Markus Jürgen Bader

Wohnort: Oberseestraße 5  
81825 München – Trudering

Tel.: 089 / 43779074

Geburtstag und –ort: 25.04.1970 in München

Familienstand verheiratet

Nationalität deutsch

### Schulbildung

09.1976 – 08.1980	Grundschule
09.1980 – 06.1990	Gymnasium
29.06.1990	Abitur
11.1990 – 11.1991	Freiwilliges Soziales Jahr Krankenpflegehelfer / KH München Neuperlach

---

**Hochschulbildung:**

SoSe 1992 – SoSe 1994	Vorklinisches Studium / LMU München
WS 1994 - SoSe 1998	Klinisches Studium / LMU München
08.1998 – 11.1998	1. PJ – Tertial: KH München Großhadern – Urologie (Station G4)
11.1998 – 03.1999	2. PJ – Tertial: KH München Neuperlach – Chirurgie
03.1999 – 07.1999	3. PJ – Tertial: KH München Neuperlach – Innere
04.12.1999	3. Staatsexamen

**Berufliche Tätigkeit:**

06.12.1999 – 06.06.2001	AIP Kreiskrankenhaus München – Perlach Chirurgie
09.06.2001 – 30.11.2002	Assistenzarzt in der urologischen Abteilung des KKH FFB Drs. PD R. Pfab, S. Lander, A .Karsten
Seit 03.12.2002	Assistenzarzt in der urologischen Klinik und Poliklinik des Universitätskrankenhauses München Großhadern