

**Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie  
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz**

**Eingereicht über das Institut für Biochemie und Endokrinologie  
der Justus Liebig-Universität Gießen**

**Photodynamische Therapie (PDT)  
mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA):  
Einfluss von inspiratorischer Hypoxie  
und Hyperoxie auf die  
Behandlungseffektivität und das  
metabolische Mikromilieu**

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Eingereicht von  
STEPHAN KRAUS**

**Gießen 2004**

**Verlag: DVG Service GmbH**

## **Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;  
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2004

© 2004 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen  
Printed in Germany

ISBN 3-938026-05-7

Verlag: DVG Service GmbH  
Frankfurter Straße 89  
35392 Gießen  
Tel. 0641/24466  
Fax 0641/25375  
[geschaeftsstelle@dvg.net](mailto:geschaeftsstelle@dvg.net)  
[www.dvg.net](http://www.dvg.net)

**Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie  
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz**

**Eingereicht über das Institut für Biochemie und Endokrinologie  
der Justus Liebig-Universität Gießen**

**Photodynamische Therapie (PDT) mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA):  
Einfluss von inspiratorischer Hypoxie und Hyperoxie auf die  
Behandlungseffektivität und das metabolische Mikromilieu.**

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Eingereicht von  
STEPHAN KRAUS**

**Gießen 2004**

**Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie  
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz  
Betreuer: Prof. Dr. O.Thews**

**Eingereicht über das Institut für Biochemie und Endokrinologie  
der Justus Liebig-Universität Gießen  
im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. E. Eigenbrodt**

**Photodynamische Therapie (PDT) mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA):  
Einfluss von inspiratorischer Hypoxie und Hyperoxie auf die  
Behandlungseffektivität und das metabolische Mikromilieu.**

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Eingereicht von  
STEPHAN KRAUS  
Tierarzt aus Fulda (Hessen)**

**Gießen 2004**

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
Der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Dekan:** Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann, Gießen

---

**1. Berichterstatter:** Prof. Dr. E. Eigenbrodt, Gießen

**2. Berichterstatter:** Prof. Dr. O. Thews, Würzburg

**Tag der mündlichen Prüfung:** 02.07.2004

## **Inhalt**

<b>1. <u>Einleitung</u></b> .....	1
<b>1.1. Historischer Überblick über die Photodynamische Therapie</b> .....	1
<b>1.2. Photodynamische Therapie</b> .....	2
1.2.1. Grundprinzip der Photodynamischen Therapie.....	2
1.2.2. Sauerstoffabhängigkeit der Photodynamischen Therapie.....	4
<b>1.3. Photosensitiser</b> .....	7
1.3.1. 5-Aminolävulinsäure.....	7
1.3.2. Lipophile Photosensitiser.....	10
<b>1.4. Wirkmechanismen der Photodynamischen Therapie</b> .....	11
<b>1.5. Metabolisches Mikromilieu</b> .....	14
<b>1.6. Zytosolische Enzyme Pyruvatkinase, Laktatdehydrogenase         und Nukleosiddiphosphat-Kinase</b> .....	16
<b>1.7. Fragestellung dieser Arbeit</b> .....	21
<b>2. <u>Material und Methoden</u></b> .....	23
<b>2.1. Versuchstiere</b> .....	23
<b>2.2. Tumormodell</b> .....	23
<b>2.3. Messungen des Sauerstoffpartialdrucks im Tumorgewebe         und Leber</b> .....	24
2.3.1. Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe.....	24
2.3.2. Sauerstoffpartialdruck in der Leber.....	27
<b>2.4. Messungen der durch Protoporphyrin IX induzierten         Fluoreszenz in Tumorzellen</b> .....	28
<b>2.5. Photodynamische Therapie mit 5-Aminolävulinsäure</b> .....	30
<b>2.6. Parameter des Tumorstoffwechsels</b> .....	33
2.6.1. Gewebegewinnung und Aufarbeitung.....	33
2.6.2. Bestimmung der Glukose- und Laktatkonzentrationen.....	33
2.6.3. Bestimmung der Konzentrationen der Adenosinphosphate.....	34

<b>2.7. Zytosolische Enzyme Pyruvatkinase, Laktatdehydrogenase und Nukleosiddiphosphat-Kinase</b> .....	36
2.7.1. Gewebegewinnung und Aufarbeitung.....	36
2.7.2. Bestimmung der Aktivität der Enzyme.....	37
<b>2.8. Statistische Auswertung</b> .....	39
<b><u>3. Ergebnisse</u></b> .....	40
<b>3.1. Sauerstoffpartialdruckmessung</b> .....	40
3.1.1. Sauerstoffpartialdruckmessungen im Tumorgewebe.....	40
3.1.2. Sauerstoffpartialdruckmessungen im Lebergewebe.....	42
<b>3.2. Messung der von Protoporphyrin IX induzierten Fluoreszenz in Leber- und Tumorzellen</b> .....	43
<b>3.3. Tumorwachstum nach der Photodynamischen Therapie in Abhängigkeit von der inspiratorischen Sauerstofffraktion</b> .....	44
<b>3.4. Parameter des Tumorstoffwechsels (ATP, ADP, AMP, Laktat, Glukose)</b> .....	47
<b>3.5. Zytosolische Enzyme Pyruvatkinase, Laktatdehydrogenase und Nukleosiddiphosphat-Kinase</b> .....	49
<b><u>4. Diskussion</u></b> .....	50
<b>4.1. Diskussion der PDT und der Methodik</b> .....	51
4.1.1. PDT.....	51
4.1.2. Methodik.....	52
<b>4.2. Diskussion der Messergebnisse</b> .....	54
4.2.1. Sauerstoffpartialdruckmessung.....	54
4.2.1.1. Messung der Tumoroxygenierung.....	54
4.2.1.2. Messung der Leberoxygenierung.....	56
4.2.2. Messung der durch Protoporphyrin IX induzierten Fluoreszenz in Leber- und Tumorzellen.....	57

4.2.3. Tumorwachstum nach der Photodynamischen Therapie in Abhängigkeit der inspiratorischen Sauerstofffraktion.....	61
4.2.4. Messung der metabolischen und bioenergetischen Parameter.....	66
4.2.5. Messung der Aktivität der zytosolischen Enzyme.....	70
<b>4.3. Vergleich zu anderen Studien.....</b>	<b>74</b>
<b>4.4. Ausblick.....</b>	<b>75</b>
<b><u>5. Zusammenfassung.....</u></b>	<b>79</b>
<b><u>6. Literatur.....</u></b>	<b>81</b>

## Verwendete Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ALA	Aminolävulinsäure
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BPD	Benzoporphyrinderivat
DC	dendritische Zellen
DTT	Dithiothreitol
EC	Energy Charge (Energieladung)
EC-Nummer	Enzyme Comission-Nummer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immune sorbet assay
FG	Feuchtgewicht
GABA	Gammaaminobuttersäure
HF (0 - 2,5)	Anteil hypoxischer pO <sub>2</sub> -Meßwerte zwischen 0 und 2,5 mmHG
HF (0 - 5)	Anteil hypoxischer pO <sub>2</sub> -Meßwerte zwischen 0 und 5 mmHG
HpD	Hämatoporphyrinderivat
HPLC	High Pressure Liquid Chromatoraphy (Hochdruck-Flüssigkeits Chromatographie)
i.p.	intraperitoneal
IRA-Strahler	Infrarot-A-Strahler
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
KP-Puffer	Kalium-Phosphatpuffer
LDH	Laktatdehydrogenase
MABP	Mean Arterial Blood Pressure (mittlerer arterieller Blutdruck)
NAD(H)	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NDPK	Nukleosiddiphosphat-Kinase
NSE	Neuronenspezifische Enolase
NTP	Nukleosidtriphosphate
PBS	Phosphate Buffer Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
pCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
PDT	Photodynamische Therapie

PEP	Phosphoenolpyruvat
PGM	Phosphoglycero-Mutase
PK	Pyruvatkinase
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PPIX	Protoporphyrin IX
ProGRP	Pro-Gastrin-Releasing-Peptid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SD	Sprague-Dawley (Ratten)
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
TBF	Tumor Blood Flow (Tumordurchblutung)
TDP	Thymin-Diphosphat
TNF	Tumornekrosefaktor
TRA	Triethanolaminhydrochlorid
TTP	Thymin-Triphosphat
UKCCCR	United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research
V	Volumen
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

## **1. Einleitung**

In der Statistik ist die Todesursache Krebs seit 1900 von der siebten auf die zweite Stelle vorgerückt. Dieser Trend schlägt sich auch in der Zahl der Sterbefälle durch bösartige Neubildungen in der Bundesrepublik Deutschland nieder. Im Jahr 2000 starben 210738 Menschen (25,1% von allen Todesursachen) an den Folgen von Krebs, eine Zahl, die nur durch Krankheiten des Kreislaufsystems mit 395043 Todesfällen (47,1%) übertroffen wurde [Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2002].

Die Tumorthherapie stützt sich im Wesentlichen auf Chirurgie, Radio- und Chemotherapie. Seit einigen Jahren ist die Photodynamische Therapie (PDT) in der klinischen Entwicklung, ein Verfahren, das auf der Applikation einer nicht toxischen, photosensibilisierenden Substanz und anschließender Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge beruht.

### **1.1. Historischer Überblick über die Photodynamische Therapie**

Bereits 1400 v. Chr. wurde in Indien zur Therapie der Vitiligo Psoralene eingesetzt, die Hindus aus dem Samen der Pflanze *Psoralea conylifolia* gewannen. Um das 12. Jahrhundert v. Chr. verwendeten die Ägypter Psoralen aus der am Nilufer wachsenden Pflanze *Amni majus* zur Behandlung der Leukodermie. Doch durch Untergang dieser antiken Kulturen gerieten diese Therapieformen für 2000 Jahre in Vergessenheit bis sie gegen Ende des 19. Jahrhunderts zufällig wieder entdeckt wurden. Im Jahr 1900 erkannte Oscar Raab [1900], ein Schüler des Münchner Professors Hermann von Tappeiner, dass es im Rahmen der Interaktion des Farbstoffs Akridin mit Licht unter Anwesenheit von Sauerstoff zur Abtötung von Paramezien kommt. 1903 führte H. von Tappeiner und A. Jesionek [1903] erste Behandlungsversuche mit Eosin als photoaktiver Substanz bei Hautkrebs, Lupus vulgaris und genitalen Kondylomen durch, und 1907 formulierte dann von Tappeiner erstmals die Bezeichnung „Photodynamische Therapie“ [von Tappeiner und Jodlbauer 1907]. 1911 entdeckten sowohl W. Hausmann [1911] als auch H. Pfeiffer [1911] durch experimentelle Untersuchungen die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins, welches 1955 von Schwarz als vielfältiges Gemisch aus

therapeutisch wirksamen sowie unwirksamen Porphyrinen identifiziert wurde. Daraufhin synthetisierte er ein Gemisch, das er als Hämatorporphyrinderivat (HpD) bezeichnete und das eine höhere Wirksamkeit und Tumorspezifität aufwies [Schwarz *et al.* 1955] Dies bestätigte Lipson in den 60er Jahren und publizierte 1967 erstmals Daten über den therapeutischen Nutzen von HpD [Lipson *et al.* 1967]. In den 70er Jahren behandelte Dougherty erstmals mittels Photodynamischer Therapie (PDT) 25 Patienten mit Karzinomen verschiedener Lokalisationen und anderen Geschwulsten erfolgreich [Dougherty *et al.* 1978].

## 1.2. Photodynamische Therapie

### 1.2.1. Grundprinzip der Photodynamischen Therapie

Die Photodynamische Therapie (PDT) gilt mittlerweile als anerkannte Behandlungsmodalität bei verschiedenen malignen Tumoren und wird zur Behandlung sowohl von Blasen-, Lungen- und Oesophaguskrebs als auch bei verschiedenen Hauterkrankungen eingesetzt. Bei der PDT wird zunächst ein nichttoxisches Pharmakon (Photosensitizer) appliziert, das bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge im Organismus seine zytotoxische Wirkung entfaltet. Der Vorteil dieses Therapieverfahrens besteht darin, dass die zytotoxische Wirkung auf die bestrahlte Region des Malignoms beschränkt bleibt und so eine Schädigung des Normalgewebes auf ein Minimum reduziert werden kann, im Vergleich etwa zu einer systemischen Chemotherapie.

Durch die Lichteinwirkung geht der Photosensitizer durch Aufnahme eines Photons von seinem Grundzustand  $S_0$  in den angeregten Singulettzustand  $S_1$  über. Die so aufgenommene Energie kann nun durch Übergang des angeregten Photosensibilisators vom Singulettzustand wieder in seinen Grundzustand in Form von Wärme oder Licht als Fluoreszenzstrahlung abgegeben werden, oder er geht nicht Strahlungs-emittierend in den langlebigeren Triplettzustand  $T_1$  über [Laustriat 1986]. Durch die höhere Stabilität dieses Triplettzustandes wird somit ein Energietransfer auf andere Moleküle wahrscheinlicher.

Von Bedeutung für die zytotoxische Wirkung der PDT sind die photooxidativen Reaktionen vom Typ I und II, bei denen das Vorhandensein von Sauerstoff

notwendig ist sowie vom Typ III, die keinen Sauerstoff benötigt [Sibata *et al.* 2000]. Bei der photooxidativen Reaktion vom Typ I kommt es zur Reduktion von Sauerstoff unter Bildung von Superoxidradikalen. Hierbei sind als Ursache der Zellschädigung Redoxreaktionen und Radikalkettenreaktionen, die durch Elektronentransfer ausgelöst werden, anzusehen [Henderson und Dougherty 1992]. Bei der phototoxischen Reaktion vom Typ II entsteht durch Elektronentransfer auf molekularen Sauerstoff Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), der daraufhin mit dem Gewebe reagiert. Singulett-Sauerstoff ist hoch reaktiv und äußerst zytotoxisch gegenüber biologischen Molekülen [Moan 1990] und oxydiert Aminosäuren, Nukleinsäuren, ungesättigte Fette und Fettsäuren. Die Reaktion vom Typ III findet in hypoxischen bzw. anoxischen Areale statt. Der angeregte Sensitizer gibt Elektronen ab, die direkt mit Proteinen reagieren können und so deren Struktur und Funktion beeinflussen [Laustriat 1986]. Typ I, Typ II und Typ III-Reaktionen laufen während der PDT nebeneinander ab, wobei das Verhältnis dieser Reaktionen zueinander stark vom Photosensitizer, vom Gewebe, von dem Sauerstoffpartialdruck als auch von der Konzentration der photoaktiven Substanz im Gewebe abhängt. Vieles deutet jedoch darauf hin, dass die Produktion von Singulett-Sauerstoff im Rahmen der Typ II-Reaktion hauptverantwortlich für die Zytotoxizität der PDT ist [Moan 1990]. Die Interaktion von Singulett-Sauerstoff mit dem Photosensitizer führt zu dessen Inaktivierung oder „Lichtbleichung“ (photobleaching). In der Haut und im Normalgewebe ist die Anreicherung des Photosensitizers deutlich geringer als im Tumorgewebe, so dass es im Normalgewebe bei Bestrahlung zu einer Inaktivierung des Sensitizers kommt bevor durch die PDT irreparable Schäden auftreten [Peng *et al.* 1997a].

Durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Rahmen der PDT kann es zur direkten Zellschädigung, Nekrose oder Schädigung von Tumorgefäßen kommen und so das Tumorstadium lokal beeinflusst werden [Dalla Via und Magno 2001, Dougherty *et al.* 1998, Sibata *et al.* 2000, 2001]. Die dabei erzielte Effektivität wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Einerseits hängt sie von der Empfindlichkeit des Tumorgewebes gegenüber ROS ab, andererseits muss eine ausreichende Konzentration des Photosensitizers vorhanden sein und Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Aktivierung. Für die Typ I bzw. Typ II-Reaktion bei der PDT ist ferner die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff für die Generierung von ROS im Tumorgewebe notwendig. Dagegen ist für einige kationischen

Photosensitizer, die über Typ III-Reaktionen das Gewebe schädigen, bekannt, dass sie ihre zytotoxische Wirkung unabhängig von Sauerstoff entfalten [Oseroff *et al.* 1986].

### 1.2.2. Sauerstoffabhängigkeit der Photodynamischen Therapie

*In-vitro*-Bedingungen belegen, dass die PDT sowohl mit Hämatoporphyrinderivaten als auch mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) als Sensitizer in Abwesenheit von O<sub>2</sub> keinen oder nur einen schwachen anti-tumoralen Effekt zeigt [Busch *et al.* 2000, Fingar *et al.* 1992, Fuchs und Thiele 1998, Henderson und Fingar 1987,1989, Herzog *et al.* 1994] und dass hypoxische Tumorzellen resistent bezüglich einer PDT-Behandlung sind. Die Tumoroxygenierung von solide wachsenden Tumoren ist im Vergleich zum Wirtsgewebe zumeist schlechter. So ist der mittlere Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe deutlich niedriger und der Anteil hypoxischer bzw. anoxischer Regionen in Tumoren höher als in Normalgeweben, in denen sich Hypoxie unter Ruhebedingungen kaum nachweisen lässt. Menschliche Tumoren zeigen in 30-60% der Fälle mehr oder weniger ausgeprägte Bereiche, in denen O<sub>2</sub>-Mangel nachweisbar ist [Höckel und Vaupel 2001, Vaupel und Höckel 1999]. Grund dafür ist eine „chaotische“ Durchblutung, die keine Regelmäßigkeit wie normales Gewebe zeigt. So weisen die im Rahmen der Neoangiogenese im Tumorgewebe gebildeten Gefäße sowohl strukturelle Veränderungen als auch funktionelle Störungen auf [Konerding *et al.* 1999], so dass bereits bei kleinen Tumoren die Sauerstoffversorgung unzureichend sein kann. Hierbei lassen sich sinusoidale und lakunäre Gefäßstrukturen, blind endende oder stark gewundene Gefäße und solchen mit großen Kalibersprüngen nachweisen. Häufig fehlt die normale Gefäßhierarchie, und es treten arteriovenöse Shuntverbindungen auf [Konerding *et al.* 1989a, 1989b, Vaupel *et al.* 1998]. Durch den zunehmenden Abstand zwischen den Gefäßen können aufgrund der geringen Diffusionsstrecke von Sauerstoff im Gewebe nicht mehr alle Bereiche des Tumors ausreichend versorgt werden und somit entsteht ein Missverhältnis zwischen der Sauerstoffversorgung und dem O<sub>2</sub>-Verbrauch. Diese Art der Hypoxie bezeichnet man auch als „*chronische*“ *Hypoxie*, die von der „*akuten*“ abzugrenzen ist. Die „*akute*“ *Hypoxie* entsteht, weil in Tumorgefäßen temporär die Durchblutung (bis zu einer Stase) stagniert und eine

verzögerte Reperfusion folgt [Chaplin und Hill 1995, Kimura *et al.* 1996]. Andererseits kann die PDT selbst eine bestehende Gewebehypoxie verstärken, da für die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies  $O_2$  verbraucht wird. Ferner kann es durch die Wirkung auf das Gefäßsystem zu einer Thrombenbildung, zu einer Vasokonstriktion sowie zum Kollaps der Gefäße und zu einer Stase des Blutstroms kommen. Diese Effekte führen zu einer Minderdurchblutung des Tumors unter der PDT und somit zu einer noch schlechteren Sauerstoffversorgung. Daher ist die Photodynamische Therapie nicht nur abhängig von der Anwesenheit von molekularem  $O_2$  sondern kann auch einen Einfluss auf den intratumoralen Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) haben [Chen *et al.* 1996a, 1996b, Hetzel und Chopp 1989, Reed *et al.* 1998].

Um die PDT-bedingte Verschlechterung der Tumoroxygenierung zu beeinflussen, wurden verschiedene Therapiemodalitäten untersucht. So wird teilweise die PDT fraktioniert durchgeführt. Dies bedeutet, dass die Bestrahlung in einem definierten Hell-Dunkel Zyklus erfolgt [Curnow *et al.* 2000, Tromberg *et al.* 1990]. Ziel dieser Modifikation ist es, in der Dunkelphase eine Reoxygenierung des Tumorgewebes zu ermöglichen und damit den Sauerstoffverbrauch durch die PDT-bedingten photooxidativen Reaktionen zu kompensieren. Eine andere Modalität beruht auf der Reduzierung der Flussrate des Lichtes, so dass der Sauerstoffverbrauch vermindert und somit eine bereits bestehende Hypoxie nicht zusätzlich verstärkt wird [Foster *et al.* 1991, 1993, Henderson *et al.* 2000, Sitnik *et al.* 1993]. Der Nachteil dieser Therapiemodalitäten liegt darin, dass die Bestrahlungszeiten verlängert werden müssen, um eine ausreichende Lichtdosis für einen optimalen Therapieeffekt zu erhalten. Um die Effektivität der PDT zu steigern, kann diese auch mit einer lokalen Hyperthermie kombiniert werden. *In-vitro* und *in-vivo*-Studien zeigen, dass die Kombination beider Therapiemodalitäten zu einer gesteigerten Effektivität führen [z.B. Christensen *et al.* 1984, Henderson *et al.* 1985, Kimel *et al.* 1992, Rasch *et al.* 1996]. Die Hyperthermie steigert die Tumordurchblutung. Jedoch scheinen noch andere Wirkmechanismen der Hyperthermie die Effektivität zu steigern. Kelleher *et al.* [2003] erreichten in Experimentaltumoren eine Heilungsrate von 61% der Photodynamischen Therapie mit 5-ALA (5-ALA-PDT) bei der Kombination mit einer lokalen Hyperthermie im Vergleich zu 14,5% bei alleiniger 5-ALA-PDT.

Eine weitere Möglichkeit, die Tumoroxygenierung zu verbessern, besteht darin, durch Atmung von normo- oder hyperbaren hyperoxischen Gasgemischen den arteriellen

Sauerstoffpartialdruck zu steigern und dadurch die Tumorphoxie zu reduzieren [Müller-Klieser und Vaupel 1983]. Thews *et al.* [2002] konnten zeigen, dass durch Modulation der inspiratorischen O<sub>2</sub>-Fraktion die Tumoroxygenierung in experimentellen Rattentumoren deutlich verbessert werden kann.

Die Auswirkungen einer Tumorphoxie auf die Effektivität verschiedener Krebstherapien, besonders auf die Radiotherapie, wird seit Jahren diskutiert [Gray *et al.* 1953, Degner und Sutherland 1988, Kunugita *et al.* 2001]. Klinische Studien haben in den letzten Jahren gezeigt, dass die Effektivität der Radiotherapie durch die Gabe von hyperbarem Sauerstoff während der Behandlung signifikant gesteigert werden kann. [Berry *et al.* 1979, Droller 2000]. In Anlehnung an diese Ergebnisse und unter Einbeziehung der oben angeführten theoretischen Überlegungen erscheint auch eine Erweiterung einer PDT durch Kombination mit Hyperoxie Erfolg versprechend. *In-vitro*-Studien deuten bereits darauf hin, durch eine höhere Sauerstoffkonzentration während der Behandlung eine effektivere Schädigung von Tumorzellen erzielen zu können [Henderson und Fingar 1987, 1989, Moan und Sommer 1985, Tromberg *et al.* 1990]. Chen *et al.* [2002] konnten bereits die Effektivität der PDT *in-vivo* signifikant durch die Gabe von Sauerstoff steigern. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie verwendeten sie jedoch Photofrin® (siehe Tabelle 1) als Sensitiser und einen Argon-Laser als Bestrahlungsquelle. Die Untersuchungen erfolgten unter normobarer Normoxie, normobarer und hyperbarer Hyperoxie und unter anoxischen Bedingungen, indem der Blutfluss des tumortragenden Fußes mittels einer Klemme unterbunden wurde. Unter anoxischen Bedingungen konnten sie keine Beeinflussung des Tumorwachstums beobachten, durch normobare Hyperoxie erreichten sie eine höhere Heilungsrate (80%) als mit hyperbarer (60%). In klinischen Studien kombinierten bereits Maier *et al.* [2000] bei Oesophagus-Karzinomen und Tomaselli *et al.* [2001] bei Bronchial-Karzinomen die Photodynamische Therapie mit einer hyperbaren (2 atm) Hyperoxie. Beide Studien belegen durch diese Therapiemodalität eine gesteigerte Effektivität der PDT (siehe Kapitel 4.3.).

### 1.3. Photosensitizer

In der Photodynamischen Therapie werden als Photopharmaka Purpurine, Texafrine, Chlorine und Porphyrine eingesetzt [Wilson 2002], wobei letztere wohl am besten bezüglich ihrer Eignung für die PDT untersucht sind. In Tabelle 1 sind die zurzeit in klinischen Studien verwendeten Photosensitizer zusammengefasst.

Bei den Porphyrinen handelt es sich um Produkte des Hämstoffwechsels. Sie zeigen ein spezifisches Absorptionsverhalten sowohl im sichtbaren als auch im ultravioletten Spektralbereich, wobei eine hohe Lichtabsorption bei etwa 400 nm auffällig ist und als Soret-Bande bezeichnet wird. Diese Bande macht man sich für die *Photodynamische Diagnostik* zunutze, da sich die Porphyrine bevorzugt in neoplastischem Gewebe anreichern und bei Beleuchtung mit UV-Licht (Schwarzlicht) eine sichtbare Fluoreszenz im roten Spektralbereich in den Tumorzellen induziert wird, nicht jedoch im Normalgewebe.

Die Eindringtiefe von Licht in das Gewebe verhält sich proportional zu seiner Wellenlänge. Um einen ausreichenden photodynamischen Effekt erreichen zu können, sollten Wellenlängen über 500 nm verwendet werden [Henderson und Dougherty 1992]. Die Eindringtiefe bei einer Wellenlänge von 600-700 nm beträgt zwischen 5 und 10 mm [Driver *et al.* 1991, Wilson 1986].

#### 1.3.1. 5-Aminolävulinsäure

Bei dem in der vorliegenden Studie verwendeten Photosensitizers 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) handelt es sich um ein Zwischenprodukt in der Häm-Biosynthese der Säugetiere. Dabei ist 5-ALA selbst keine photoaktive Substanz sondern muss erst zu dem phototoxischen Protoporphyrin IX (PPIX) metabolisiert werden. Das typische Absorptionsspektrum von Protoporphyrin IX ist in Abbildung 1 dargestellt.

Der erste Schritt in der Porphyrinbiosynthese ist die Kondensation von Glycin, einer essentiellen Aminosäure, mit Succinyl-CoA aus dem Zitratzyklus zu 5-ALA (Abb. 2). Diese Reaktion wird von der 5-ALA-Synthase in den Mitochondrien katalysiert. Anschließend kondensieren zwei Moleküle 5-ALA zu Porphobilinogen. Diese Wasserabspaltungsreaktion wird von der 5-ALA-Dehydratase, die im Zytosol

Wirkgruppe	Präparatename (Wirkstoff)	Indikation
HpD	Photofrin®/Photosan®	Tracheobronchiale Obstruktionen durch Lungen-Karzinome [Maier <i>et al.</i> 2002, Diaz-Jimenez <i>et al.</i> 1999] Peritoneale Neoplasien [Bauer <i>et al.</i> 2001, Menon <i>et al.</i> 2001] Mamma-Karzinome [Allison <i>et al.</i> 2001] Oesophagus-Karzinome [Luketich <i>et al.</i> 2000, Maier <i>et al.</i> 2000] Hypophysen-Adenome [Marks <i>et al.</i> 2000] Kaposi's Sarkom [Bernstein <i>et al.</i> 1999]
HpD	Levulan® (5-Aminolävulinsäure)	Actino Keratosis [Pariser <i>et al.</i> 2003] Neoplasien der Zervix [Barnett <i>et al.</i> 2003, Keefe <i>et al.</i> 2002] Photodynamische Diagnose von Dysplasien der Zervix [Duska <i>et al.</i> 2002, Keefe <i>et al.</i> 2001] Blasen-Karzinome [Shackley <i>et al.</i> 2002] Neoplasien der Vulva [Fehr <i>et al.</i> 2002] Bronchale Stenosen infolge von Tumoren [Maier <i>et al.</i> 2002] Psoriasis [Bissonnette <i>et al.</i> 2002] Acne vulgaris [Itoh <i>et al.</i> 2001] Basalzell-Karzinome, Bowen's Disease, Sonnen-Keratose [Varma <i>et al.</i> 2001] Actino Keratosis, Bowen's Disease, Basalzell-Karzinome [Dijkstra <i>et al.</i> 2001] Adenokarzinome des Oesophagus [Tan <i>et al.</i> 1999]
Chlorin	Purlytin® (Tin Etiopurpurin, SnET2)	Kutane Brustkrebs-Metastasen [Mang <i>et al.</i> 1998] Basalzell-Karzinome und kutane Brustkrebs-Metastasen [Razum <i>et al.</i> 1996] Bowen's Disease [Wilson und Mang 1995]
Chlorin	Foscan® (Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin, mTHPC)	Pleurale Mesotheliome [Friedberg <i>et al.</i> 2003] Adenokarzinome des Pancreas [Bow net <i>et al.</i> 2002] Prostata-Karzinome [Nathan <i>et al.</i> 2002] Barret's Oesophagus und Oesophagus-Karzinome [Javaid <i>et al.</i> 2002] Plattenepithel-Karzinome der Lippe [Kubler <i>et al.</i> 2001] Diagnostik von Gehirn-Tumoren [Zimmermann <i>et al.</i> 2001] Kutane Brustkrebs-Metastasen [Wyss <i>et al.</i> 2001] Basalzell-Karzinome [Baas <i>et al.</i> 2001]]
Chlorin	NPe6® (N-Aspartyl Chlorin e6)	Adenokarzinome der Brust, Basalzell-Karzinome, Plattenepithel-Karzinome [Taber <i>et al.</i> 1998] Macula-Degeneration [Gragoudas <i>et al.</i> 1997]
BPD	Verteporfin® (Benzoporphyrin Derivat-Monoazid-Ring A, BPD-MA)	Choroidale Hämangiome [Jurklies <i>et al.</i> 2003] Adenokarzinome der Brust, Basalzell- und Plattenepithel-Karzinome [Taber <i>et al.</i> 1998]
Texaphyrin	Lutrin® (Motexafin Lutetium)	Mamma-Karzinome [Dimofte <i>et al.</i> 2002] Atherosclerose [Chou <i>et al.</i> 2002, Rockson <i>et al.</i> 2000] Brustkrebs-Metastasen, maligne Melanome, Basalzell- und Plattenepithel-Karzinome [Renschler <i>et al.</i> 1997]
Phthalocyanin	Chloraluminium-Phthalocyanin Tetrasulfonat (AIPcTS)	Basalzell-Karzinom, Kopsi's Sarkom, Lungen-Karzinome[Sokolov <i>et al.</i> 1996]

Tabelle 1: Übersicht der sich in klinischen Studien befindlichen Photosensitizern

In präklinischen Studien befinden sich Porphycene, synthetische Isomere von Porphyrinen, Chlorophyll-A-Derivat-Photosensitiser HPPH-23, Bakterienchlorine, Anthraquinone, kationische Porphyrine, Hypericin, Rhodamin 123, Xanthine und verschiedene Aminolävulinsäure-Ester.

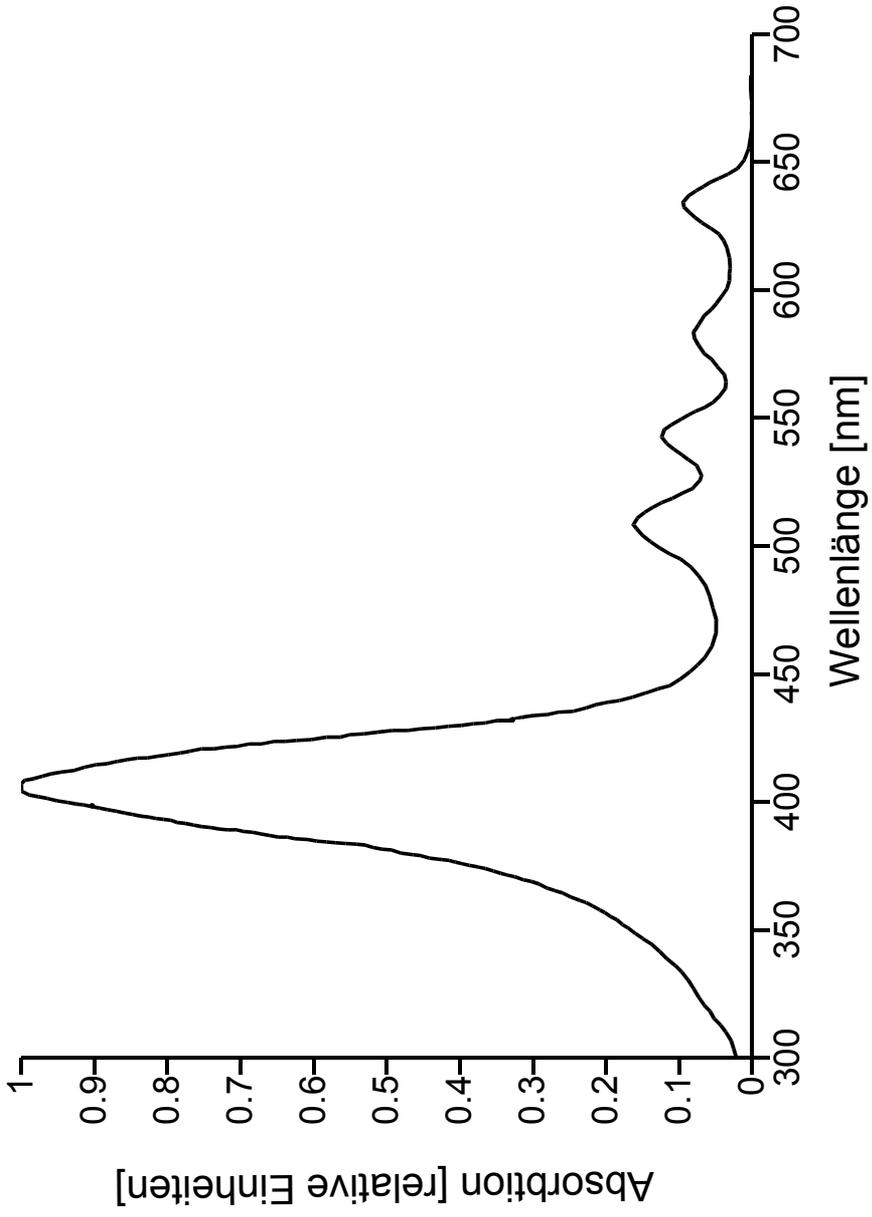
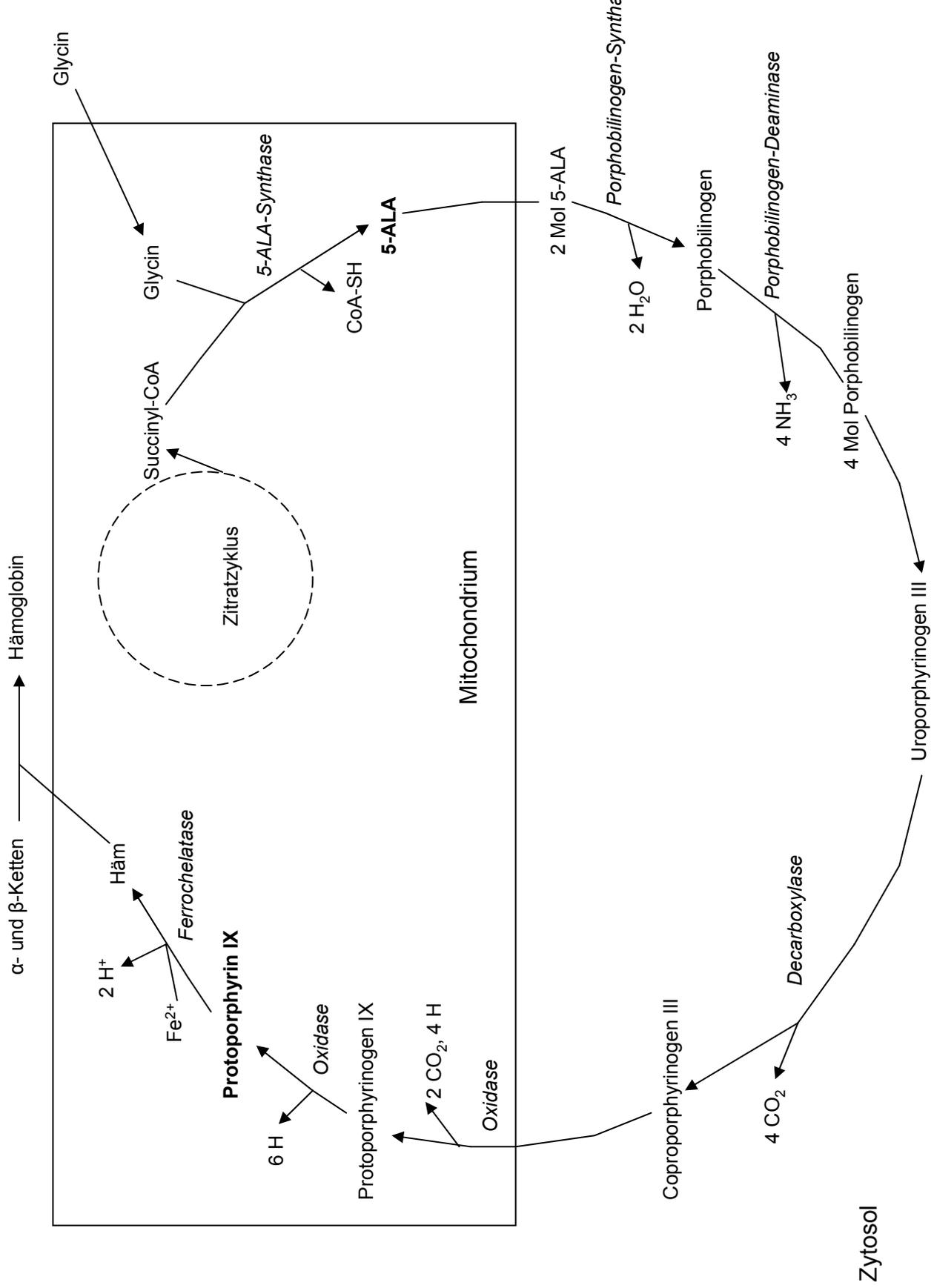


Abb. 1: Absorptionsspektrum von PPIX in der Haut nach Juzeniene et al. [2002]

Abb.2: Übersicht über die Porphyrinbiosynthese



lokalisiert ist, katalysiert. Vier Porphobilinogene kondensieren dann in einer „Kopf-Schwanz“-Reaktion und bilden so ein lineares Tetrapyrrol, eine von der Porphobilinogen-Deaminase katalysierte Reaktion. Das enzymgebundene lineare Tetrapyrrol zyklisiert anschließend zum Uroporphyrinogen III, das eine assymetrische Anordnung der Seitenketten aufweist, wobei für diese Reaktion eine Cosynthase benötigt wird. Nun findet die Ausbildung des Porphyrinskeletts statt, aufeinander folgende Reaktionen verändern die Seitenketten und den Sättigungsgrad des Porphyrinrings. Durch Decarboxilierung der Acetatseitenketten entsteht das Coproporphyrinogen III. Protoporphyrin IX wird durch Einführung von Doppelbindungen in den Porphyrinring und Umwandlung zweier Propionatseitenketten in Vinylgruppen gebildet. Den Einbau des Eisens in das PPIX und somit die Bildung des Häm katalysiert die Ferrochelatase. Das Häm übt ein negatives Feedback auf die 5-ALA-Synthase aus, da die mRNA dieser Synthase ein hämsensibles regulatorisches Protein bindet. Außerdem wird der Transport des Enzyms in die Mitochondrien blockiert, wenn viel Häm vorhanden ist. PPIX wird in der normalen Haut entweder schnell zu nichtfluoreszierenden Häm bzw. Bilirubin metabolisiert oder wieder abgegeben und über den Blutweg zur Leber transportiert. PPIX und Häm bzw. Bilirubin werden schließlich weiter metabolisiert und mit den Fäces ausgeschieden [Peng *et al.* 1997b].

Die tumorspezifische Aufnahme von 5-ALA und die Anreicherung von PPIX im Tumorgewebe sind nicht bis ins Detail geklärt, wobei zum Teil deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Tumorentitäten bestehen. Einerseits beeinflusst die 5-ALA-Konzentration im Blut die Aufnahme in die Zelle und andererseits spielt die Zeit zwischen Applikation und Bestrahlung, die für die Metabolisierung von 5-ALA zu PPIX nötig ist, eine wichtige Rolle [Peng *et al.* 1993]. Es wird vermutet, dass nach der Applikation die Aufnahme des Sensitisers passiv über Diffusion erfolgt und nach ca. 15 Minuten ein aktiver Transportmechanismus einsetzt, der pH-abhängig ist [Bermudez Moretti *et al.* 1993, 2002]. Rud *et al.* [2000] konnten *in-vitro* an einem humanen Adenokarzinom zeigen, dass vermutlich ein Kotransport von Na<sup>+</sup> und 5-ALA besteht, durch den 3 Na<sup>+</sup>-Ionen und ein 5-ALA-Molekül in die Zelle transportiert werden. So führte die Absenkung der Na<sup>+</sup>-Konzentration zu einer verminderten Aufnahme von 5-ALA in die Zelle. Ferner konnte in der Studie gezeigt werden, dass die Aufnahme sowohl durch  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA),  $\beta$ -Aminosäuren,  $\beta$ -Alanin als auch Taurin gesenkt werden kann. Die Autoren

vermuten einen Beta-Transporter, der  $\text{Cl}^-$ -abhängig ist und der ein  $\text{Cl}^-$ -Ion und ein 5-ALA-Molekül transportiert. Außerdem konnte die 5-ALA-Aufnahme durch die zusätzliche Gabe verschiedener Aminosäuren gesenkt werden. Zu gleichen Ergebnissen kamen Bermudez Moretti *et al.* [2002], die ebenfalls die 5-ALA-Aufnahme durch GABA,  $\beta$ -Aminosäuren,  $\beta$ -Alanin und Taurin in einem Mamma-Adenokarzinom *in-vitro* hemmen konnten. Ferner zeigten sie, dass die Aufnahme sowohl energieabhängig ist, indem sie durch Ouabain und Dimethylamilorid den  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - und den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Transporter hemmten und so die Aufnahme von 5-ALA vermindert wurde. Außerdem wird die Aufnahme auch vom pH-Wert (Optimum bei pH 5) beeinflusst. Weitere Thesen besagen eine Aufnahme über die epithelialen Di- und Tri-Peptid-Transporter PEPT1 und PEPT2 in die Tumorzelle [Döring *et al.* 1998, Whitaker *et al.* 2000].

Für die Anreicherung von PPIX in der Tumorzelle wird die veränderte Aktivität von verschiedenen Enzymen verantwortlich gemacht. Einerseits soll die Aktivität der Porphobilinogen-Deaminase erhöht sein [Kondo *et al.* 1993, Leibovici *et al.* 1988]. Dies führt zu einer vermehrten Anreicherung von Uroporphyrinogen III und allen weiteren Metaboliten. Andererseits ist die Aktivität der Ferrochelatase erniedrigt [El-Sharabasy *et al.* 1992, van Hillegersberg *et al.* 1992], so dass der letzte Schritt der Häm-Biosynthese, also die Umwandlung von PPIX durch Einbau von Eisen zu Häm, langsamer abläuft. Außerdem ist die  $\text{Fe}^{++}$ -Konzentration im Tumorgewebe verringert, was ebenfalls einen limitierenden Schritt für die Metabolisierung darstellt [Morgan und Oseroff 2001].

Einige Enzyme in der Häm-Biosynthese sind sowohl sauerstoffabhängig wie die Coproporphyrinogen- und die Protoporphyrinogen-Oxidase [Moore *et al.* 1987] als auch pH-abhängig, wobei das Optimum zwischen 7 und 7,5 liegt. *In-vitro*-Studien an Tumorzellen belegen, dass die Metabolisierung von 5-ALA zu PPIX  $\text{O}_2$ -abhängig ist. Wyld *et al.* [1998] zeigten, dass unter hypoxischen Bedingungen mit einem  $\text{O}_2$ -Anteil von 0-5% die intrazelluläre PPIX-Konzentration im Vergleich zu einer Begasung mit 7,5% und 10%  $\text{O}_2$  signifikant vermindert war.

### 1.3.2. Lipophile Photosensitiser

Lipophile Photosensitiser wie z.B. Hämatoporphyrinderivate werden ebenfalls von nahezu allen Zellen aufgenommen, besonders aber von Tumorzellen und schnell proliferierenden Zellen [Henderson und Dougherty 1992, Lui und Anderson 1993]. Für diesen Mechanismus bestehen einige Theorien, die jedoch nicht bis ins Detail geklärt sind. Einerseits binden lipophile Sensibilisatoren an low-density-Lipoproteine (LDL). Viele schnell wachsende Zellen exprimieren LDL-Rezeptoren in hoher Dichte, wodurch eine Aufnahme des an das LDL-gebundene Photosensitisers vermittelt wird [Allison *et al.* 1990, 1991, 1994]. Weiterhin geht man davon aus, dass aufgrund eines niedrigen pH-Wertes im Tumorgewebe die Lipophilität von Sensibilisatoren steigt und diese so leichter aufgenommen bzw. zurückgehalten werden können [Barret *et al.* 1990]. Weitere Hypothesen vermuten eine erhöhte Permeabilität der Blutgefäße und einen verminderten Abtransport des Photosensibilisators bedingt durch eine schlechte lymphatische Anbindung maligner Tumoren [Pass 1993]. Als weiterer wichtiger Faktor der Akkumulation im Tumorgewebe wird eine verstärkte Aufnahme durch Makrophagen und tumorassoziierte Monozyten vermutet [Bugelski *et al.* 1981, Korbelik *et al.* 1991]. In wieweit eine veränderte Gefäßpermeabilität, ein verminderter lymphatischer Abtransport sowie eine verstärkte Aufnahme durch Makrophagen und Monozyten für eine verstärkte Akkumulation von 5-ALA im Tumorgewebe eine Rolle spielen, ist nicht geklärt.

Die Vorteile von 5-Aminolävulinsäure gegenüber anderen Photosensitisern wie z.B. Hämatoporphyrinderivaten (HpD) liegen darin, dass die Behandlungskosten bei 5-ALA deutlich geringer sind, da das Medikament an sich billiger ist. 5-ALA wirkt in therapeutischen Dosen wenig toxisch und zeigt keine Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten [Peng *et al.* 1997a]. In höheren Dosen (über 30 mg/kg KG i.v. bzw. 60 mg/kg KG oral) wurde jedoch eine neurotoxische Wirkung von 5-ALA beobachtet. Es ist aber nicht geklärt, ob 5-ALA selbst oder ein Zwischenprodukt der Häm-Biosynthese hierbei toxisch wirkt. Einige Studien belegen, dass 5-ALA die Blut-Hirn-Schranke penetrieren und das ZNS selbst Porphyrine aus exogen zugeführten 5-ALA synthetisieren kann [Prince *et al.* 1994, Juknat *et al.* 1995]. Als neurotoxische Symptome können Schwindel und Erbrechen auftreten, bei einigen Patienten wurde auch eine gestörte Leberfunktion beobachtet [Kennedy *et al.* 1996, Webber *et al.*

1997]. Das Zeitintervall zwischen Applikation und Bestrahlung beträgt für 5-ALA drei bis 8 Stunden und ist somit deutlich kürzer als bei HpD, bei denen dies je nach Indikation 24 bis 144 Stunden beträgt. Außerdem ist die Gefahr einer Photosensibilisierung der Haut 24 Stunden nach der Applikation durch Tageslicht gering, da 5-ALA innerhalb dieser Zeit vollständig metabolisiert wird [Peng *et al.* 1992, 1993], wohin gegen bei HpD noch bis 4-6 Wochen nach der Applikation die Gefahr einer Photosensibilisierung besteht.

Als Nachteil des Photosensitisers 5-ALA ist anzusehen, dass bei topischer Anwendung eventuell eine Lokalanästhesie notwendig sein kann. Weiterhin zeigt 5-ALA bei Basalzell-Karzinomen eine geringere Effektivität als z.B. HpD [Peng *et al.* 1997].

#### 1.4. Wirkmechanismen der Photodynamischen Therapie

Die Zellschädigung durch die Photodynamischen Therapie beruht auf verschiedenen biochemischen und molekularen Reaktionen, die letzten Endes zu einer Gewebeerstörung sowohl im makro- als auch im mikrostrukturellen Bereich führen. Die Mechanismen der Zytotoxizität sind jedoch noch nicht bis ins Detail geklärt. Eine wichtige Rolle spielen die direkte Zellzerstörung, die Gefäßschädigung, Entzündungsreaktionen und eine Stimulation des Immunsystems [Gomer *et al.* 1988, Stern *et al.* 1993]. Dabei scheinen alle Effekte, die sich gegenseitig beeinflussen, notwendig, um das Tumorwachstum langfristig kontrollieren zu können. Aufgrund der geringen Diffusionsstrecke von  $^1\text{O}_2$  (ca. 0,1  $\mu\text{m}$ ) liegen die primären Zielstrukturen in unmittelbarer Nähe des Photosensitisers zum Zeitpunkt seiner Aktivierung [Moan 1990]. Die Lokalisation ist dabei abhängig von der intrazellulären Aufnahme und der Verteilung in der Zelle, wobei die meisten zur Zeit eingesetzten photoaktiven Substanzen keine bevorzugte Lokalisation der Anreicherung aufweisen und sämtliche subzellulären Strukturen schädigen können [Dougherty *et al.* 1998]. Für Protoporphyrin IX (PPIX) konnte fluoreszenzmikroskopisch eine starke Anreicherung in den Mitochondrien und perinukleär nachgewiesen werden. Im Zytoplasma und in Plasmamembranen reicherte sich PPIX nur gering an [Iinuma *et al.* 1994].

Innerhalb kurzer Zeit nach der PDT können mikroskopisch und elektronenmikroskopisch Schäden an den Zellmembranen, an den Membranen des

Zellkerns, der Mitochondrien, der Lysosomen, des Golgi-Apparates und des endoplasmatischen Retikulums beobachtet werden [Pass 1993]. Die Photoperoxidation von Membranen und ungesättigter Fettsäuren führt zu einer veränderten Permeabilität der Membranen, einer Quervernetzung von Proteinen und zu einer Inaktivierung von membranassoziierten Enzymen und Rezeptoren [Girotti 1990]. Einige Stunden nach der Behandlung sind die Bildung von „blebs“, blasenartige Ausstülpungen der Plasmamembran, erkennbar, wodurch eine Zellteilung unmöglich wird und der Untergang der Zelle folgt.

Da die Synthese von PPIX in den Mitochondrien erfolgt, sind diese die primären Zielstrukturen der 5-ALA-PDT. Die Inaktivierung von membrangebundenen Enzymen der Mitochondrien, besonders der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Adenosintriophosphatase (ATPase) und der  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase [Gibson *et al.* 1988], führt zu einem Zusammenbruch der Atmungskette und somit zu einem verminderten Energiestatus. Durch die Schädigung der Mitochondrien kann der Photosensitizer in das Zytoplasma gelangen und weitere subzelluläre Strukturen und zytosolische Enzyme schädigen [Morgan *et al.* 2000]. Morgan und Oseroff [2001] konnten zeigen, dass aufgrund der Lokalisation der meisten Photosensitizer die Mitochondrien eine zentrale Rolle bei der Zerstörung der Tumorzellen spielen.

Ferner wird auch die DNA in Form von Einzelstrangbrüchen, Austausch zwischen Schwesterchromatiden und Chromosomenaberration geschädigt, wobei vermutet wird, dass diese Effekte für die Zytotoxizität nicht ausschlaggebend sind [Eversen und Moan 1982, Eversen *et al.* 1988, Gomer *et al.* 1983, Jori und Spikes 1984]. Ebenfalls werden Gene durch die Bestrahlung aktiviert, (z.B. für Heat-Shock-Proteine und Glukose-regulierende Proteine), die eventuell die Empfindlichkeit der Zellen bezüglich der PDT beeinflussen. Die Schädigung der subzellulären Strukturen führt letzten Endes zur Apoptose oder Nekrose der Tumorzelle, wobei gerade für die 5-ALA-PDT gezeigt werden konnte, dass das Verhältnis zwischen diesen beiden Formen des Zelltods stark vom betrachteten Zelltyp aber auch von der Lichtdosis abhängt [Noodt *et al.* 1996].

Neben der direkten Schädigung der Tumorzellen spielt die Wirkung der PDT auf das Gefäßsystem eine wichtige Rolle für die Kontrolle des Tumorwachstums [Dougherty *et al.* 1998, Henderson und Dougherty 1992]. PPIX reichert sich in Endothelzellen der Kapillaren an und führt durch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch die Bestrahlung zur Gefäßschädigung und somit zum Verlust der

Schrankenfunktion [Peng *et al.* 1997b]. Ferner wird die Anlagerung und Aktivierung von Thrombozyten und von polymorphkernigen Leukozyten verstärkt, die schließlich unter anderem Thromboxane freisetzen [Fingar *et al.* 1993, 1997]. So kann kurz nach einer PDT-Therapie eine Vasokonstriktion der Kapillaren [Nelson *et al.* 1988, Roberts *et al.* 1994], die Bildung von Thromben und eine Stase in der Blutzirkulation beobachtet werden. Daraus resultiert eine vorübergehende oder andauernde Hypoxie bzw. Anoxie im Tumorgewebe [Chen *et al.* 1996a, Henderson und Fingar 1987]. Dies kann zu einer verminderten Versorgung in diesem Bereich und so zu einer indirekten Schädigung des Tumorgewebes führen. Die Ausbildung eines Ödems und eines Erythems sind hierbei die ersten makroskopisch erkennbaren Folgen einer PDT-Behandlung [Henderson und Dougherty 1992].

Die Freisetzung von Phospholipiden im Rahmen der photooxidativen Schädigung von Zellmembranen führt unter anderem zur Bildung von verschiedenen Entzündungsmediatoren, wie den Arachidonsäuremetaboliten Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und PGI<sub>2</sub> [Korbelik 1996a, Ochsner 1997]. Zusätzlich bewirkt die Gefäßschädigung im Rahmen der PDT eine Aktivierung von Akut-Phase-Protein, Proteinase, Peroxidasen, Komplementfaktoren und Zytokinen [Fingar 1996]. Aufgrund der Freisetzung dieser Entzündungsmediatoren kommt es schon während der Bestrahlung zu einer verstärkten Invasion von neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen [Gollnick *et al.* 1997, Korsl *et al.* 1995]. Durch die Degranulation der Neutrophilen und die Freisetzung von toxischen Sauerstoffradikalen, lysosomalen Enzymen und chemotaktischen Mediatoren kommt es zusätzlich zu einer Zerstörung des Tumorgewebes und zum Einwandern weiterer Abwehrzellen. Es konnte dabei gezeigt werden, dass durch eine Reduktion der neutrophilen Granulozyten in tumortragenden Mäusen durch Blockade der  $\beta$ -Integrine, die die Bindung von neutrophilen Granulozyten an die Basalmembran vermitteln, die Heilungsrate nach einer PDT-Behandlung vermindert wurde [Korbelik 1996a, 1996b]. Ferner führen Makrophagen zu einer unspezifischen Immunantwort, in deren Rahmen sie behandelte Tumorzellen phagozytieren und weitere Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel TNF $\alpha$  freisetzen können.

Für die Ausbildung einer spezifischen Immunantwort sind ebenfalls Makrophagen und dendritische Zellen (DC) verantwortlich, indem sie Antigene der phagozytierten Tumorzellen präsentieren. Nach deren Erkennung durch antigenspezifische CD<sub>4</sub>-Helferzellen werden diese durch zusätzliche Mediatoren der DC stimuliert und

tragen einen wesentlichen Teil der durch die PDT induzierten Immunantwort. Zusätzlich wird vermutet, dass auch B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen für die Ausprägung einer Immunantwort mit verantwortlich sind, wobei die Rolle dieser Zellen noch nicht vollständig geklärt ist [Dougherty *et al.* 1998]. Somit kann die PDT eine Immunantwort induzieren, auch wenn die Tumoren selbst nur geringe immunogene Eigenschaften aufweisen [Korbelik 1996a].

### 1.5. Metabolisches Mikromilieu

Sowohl die Tendenz einer Neoplasie zu invasivem Wachstum und zur Ausbildung von Metastasen als auch die Wirksamkeit verschiedener Therapiemodalitäten hängen von verschiedenen genetischen und pathophysiologischen Parametern ab. In den letzten Jahren wurden erhebliche Fortschritte in der Tumorbioogie-Forschung gemacht, wobei unter anderem das so genannte metabolische Mikromilieu in den Mittelpunkt des Interesses gerückt ist. Das metabolische Mikromilieu ist durch eine Vielzahl von Faktoren charakterisiert, die eng miteinander gekoppelt sind und in denen sich Tumoren deutlich von Normalgeweben unterscheiden. Die wichtigsten Unterschiede liegen hierbei in Vaskularisierung, einer veränderten Mikrozirkulation, einer unzureichenden Gewebeoxygenierung mit dem Auftreten hypoxischer Gewebeareale, eine ausgeprägte lokale Azidose und ein vom Ursprungsgewebe abweichender metabolischer Status. Diese das metabolische Mikromilieu charakterisierenden Eigenschaften sind oft sehr heterogen im Tumorgewebe verteilt. Überschreitet ein Tumor eine bestimmte Größe (ca.  $10^6$  Zellen), kann er nicht mehr durch Diffusion aus dem Normalgewebe ernährt werden, sondern benötigt eine eigene Gefäßversorgung. Zunächst übernimmt er, wenn möglich, bereits vorhandene Gefäße des Wirtsgewebes, aber bald kommt es zur Neovaskularisierung. Die vom Tumor selbst gebildeten Gefäße weisen jedoch strukturelle und funktionelle Defizite auf [Konerding *et al.* 1999], so dass bereits bei relativ kleinen Tumoren die Versorgung unzureichend sein kann. So treten avaskuläre Areale, sinusoidale und lakunäre Strukturen, blind endende oder stark gewundene Gefäße und solche mit großen Kalibersprüngen auf, wobei eine normale Gefäßhierarchie fehlt. Große Gefäße besitzen oft keine endotheliale Auskleidung und/oder keine glattmuskulären Wandelemente, andere bestehen nur aus Endothel und umgebenen Bindegewebe

und Tumorzellen [Vaupel *et al.* 1989a]. Eine bedarfsorientierte Durchblutungsregulation und somit eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Substraten findet nicht statt. Dieses strukturelle Chaos und funktionelle Störungen im Gefäßsystem führen zu einer außergewöhnlich heterogenen Versorgung des Tumorgewebes, so dass schlecht mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgte Areale und relativ gut versorgte Gewebeabschnitte irregulär über das gesamte Tumorgewebe verteilt sind [Vaupel *et al.* 1989a].

Die Verteilung des Sauerstoffpartialdrucks im Tumorgewebe, die sog. Tumoroxygenierung, ist ein Aspekt des metabolischen Mikromilieus, der besondere Aufmerksamkeit verdient. Aus klinischen und experimentellen Daten geht hervor, dass das Vorhandensein hypoxischer und/oder anoxischer Areale eine Schlüsselrolle in der Tumorpathophysiologie spielt. Malmgren und Flanigan [1955] entdeckten indirekt in Versuchen mit Tetanussporen die Existenz hypoxischer Gewebeanteile in soliden Tumoren. Im gleichen Jahr beschrieben Thomlinson und Gray [1955] hypoxische Mikroregionen in detaillierten histopathologischen Studien an Adeno-Karzinomen der Lunge. Erste polarographische Messungen des O<sub>2</sub>-Partialdrucks in menschlichen gut- und bösartigen Tumoren wurden von Urbach [1956] durchgeführt. Diesen Forschungsergebnissen wurden einige Aufmerksamkeit zuteil, da Gray *et al.* [1953] die Rolle der Gewebeoxygenierung für die Effektivität einer Strahlentherapie erkannte. Mittlerweile ist die Existenz von hypoxischen Arealen in einer Vielzahl menschlicher Tumoren nachgewiesen worden. Ferner haben Patienten mit Tumoren, die hypoxische Areale aufweisen, eine deutlich schlechtere Prognose [z.B. Höckel *et al.* 1993, 1996].

Im anaeroben Glukosestoffwechsel entsteht Milchsäure, deren Abtransport aus dem Gewebe bei unzureichender Durchblutung erschwert wird. So kommt es zu einer ausgeprägten lokalen Gewebeazidose [Vaupel 1985]. Walenta *et al.* [1997, 2000] und Brizel *et al.* [2001] konnten in Studien an Patienten mit Zervix-Karzinomen und Tumoren der Kopf-Hals-Region zeigen, dass hohe Laktatkonzentrationen im Gewebe mit einer hohen Metastasierungsrate und schlechter Prognose korreliert sind.

Die Faktoren wie der extrazelluläre pH-Wert, der bioenergetische Status, die Laktatkonzentration und die Durchblutung können somit die Proliferation des Tumors, den Zellzyklus der Tumorzelle, das Ansprechen auf Pharmaka sowie deren Biodistribution beeinflussen, was wiederum Auswirkungen auf die Therapieeffektivität hat. Ferner wird das metabolische Mikromilieu selbst durch eine Tumorthherapie

beeinflusst, entweder direkt durch Wirkung auf die Tumorzellen und das Gefäßsystem oder die Induktion von Entzündungsreaktionen und die Stimulation des Immunsystems. So belegen verschiedene Studien, dass schon innerhalb der ersten Minuten einer PDT-Behandlung die Tumoroxygenierung stark abnimmt [Curnow *et al.* 2000, Kelleher *et al.* 2003, Sitnik *et al.* 1998]. Thews *et al.* [1999] zeigten, dass durch eine Radiotherapie die ATP-Konzentration im Tumorgewebe stark sinkt und die Laktatkonzentration ansteigt.

Gelingt es, einen Tumor bezüglich der Parameter des Mikromilieus zu beschreiben, verbessert sich die Grundlage für eine individualisierte Prognoseabschätzung und Therapieplanung [Vaupel und Höckel 1999, Walenta *et al.* 2000]. Ferner können auf der Grundlage solcher Forschungsergebnisse neue Behandlungskonzepte für verschiedene Malignome entworfen werden.

### **1.6. Zytoplasmatische Enzyme Pyruvatkinase, Laktatdehydrogenase und Nucleosiddiphosphat-Kinase**

Die Pyruvatkinase (PK, EC-Nummer 2.7.1.40) ist ein Enzym der Glykolyse, das die letzte Reaktion innerhalb der Glykolyse von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat unter der Bildung von einem Mol ATP pro Mol PEP katalysiert. Dabei erfolgt eine irreversible Übertragung einer Phosphatgruppe vom Phosphoenolpyruvat auf ADP (Abb. 3).

Im Organismus treten je nach Gewebe verschiedene Isoenzyme der Pyruvatkinase auf. Die Pyruvatkinase Typ M2 (M2-PK) kommt verstärkt in Geweben mit einer hohen Nucleinsäure-Synthese-Rate vor. Dies sind alle proliferierenden Zellen wie embryonale Zellen, Stammzellen und Tumorzellen. Die PK Typ M1 wird in Geweben mit hohem Energieverbrauch und einem geringen Anteil an Phosphometaboliten wie Muskel und Gehirn exprimiert. Die PK vom Typ L ist charakteristisch für glukoneogenetische Gewebe wie die Leber und Niere, und der Typ R wird von Erythrozyten exprimiert. Die unterschiedlichen Isoenzyme der PK reagieren auf verschiedene Metabolite [Eigenbrodt *et al.* 1994]. Die Isoenzyme werden mit Hilfe spezifischer Proteinkinasen phosphoryliert und sind mit verschiedenen anderen Enzymen und Proteinen ohne glykolytische Funktion verbunden wie Aktin, Tubulin oder Band 3-Proteinen [Eigenbrodt *et al.* 1994]. Die Regulation der PK über andere

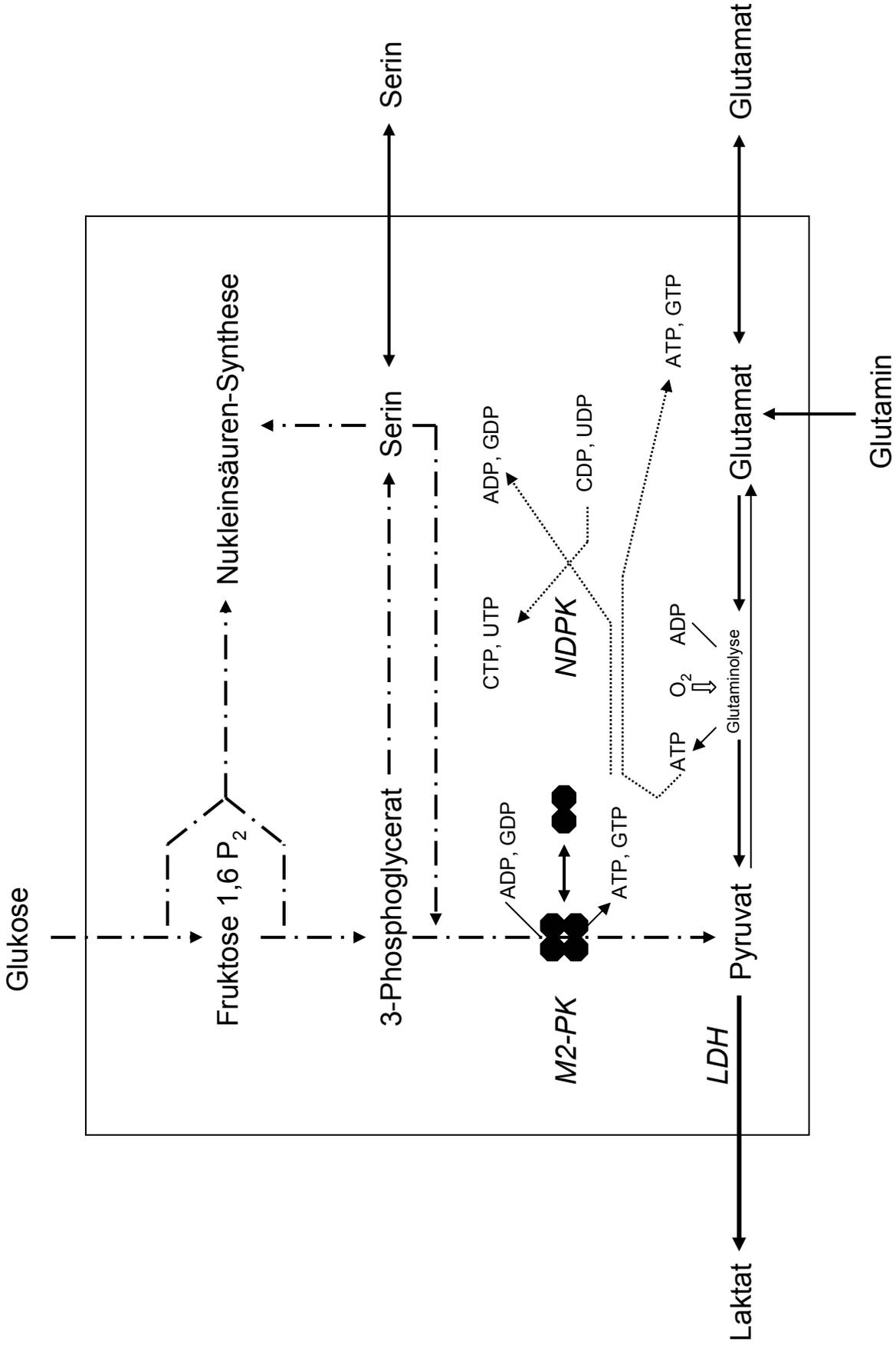


Abb. 3: Schematische Darstellung der Ansatzpunkte der Enzyme Pyruvatkinase (PK), Laktatdehydrogenase (LDH) und Nucleosiddiphosphatkinase (NDPK)

Enzyme scheint phylogenetisch ein altes Phänomen zu sein, da Chopade *et al.* [1997] in Bakterien zeigen konnte, dass das E-ras-Protein und die Nukleosiddiphosphat-Kinase selektiv an die PK binden und das ATP : ADP- und das GTP : GDP-Verhältnis modulieren. Auch in Säugetierzellen konnte eine Assoziation von verschiedenen Glykolyse-Enzymen mit anderen regulatorischen Proteinen nachgewiesen werden. Um dieses Phänomen zu zeigen, werden Methoden wie die Co-Immunopräzipitation oder die Two-Hybrid-Technik angewandt [Zwerschke *et al.* 1999]. Mazurek *et al.* [1996, 2001] konnten zeigen, dass nicht nur glykolytische Enzyme sondern auch RNA, Oncoproteine und Komponenten der Proteinkinase-Kaskade in dem so genannten Glykolyse-Enzym-Komplex assoziiert sind. Dieser Komplex ist überwiegend perinukleär aber auch am Zytoskelett, an Mitochondrien oder im Nukleus gebunden [Breiter-Hahn *et al.* 1998, Mazurek *et al.* 1997a, b, Popanda *et al.* 1998]. Je nach Zusammensetzung der Enzyme hat der Glykolyse-Enzym-Komplex Auswirkungen auf den Pool von Phosphometaboliten und die Interaktion zwischen Glykolyse, Glutaminolyse und Serinolyse [Mazurek *et al.* 2001].

Die M2-PK kommt in einer hoch aktiven tetrameren Form, die eine hohe Affinität zu ihrem Substrat Phosphoenolpyruvat (PEP) zeigt, und in einer weniger aktiven dimeren Form mit einer geringen PEP-Affinität vor. Nur die tetramere Form ist in den Glykolyse-Komplex eingebunden [Mazurek *et al.* 1997b, Zwerschke *et al.* 1999]. Die dimere Form der M2-PK ist unter physiologischen PEP-Konzentrationen nahezu inaktiv. Fruktose-1,6-Bisphosphat (FBP) fördert die Reassoziierung der dimeren M2-PK in die aktive tetramere Form. In der tetrameren Form wird Glukose unter Energiegewinnung zu Laktat abgebaut. Wenn die FBP-Spiegel unter eine bestimmte Konzentration fallen, dissoziiert die tetramere M2-PK wieder in die dimere Form.

In Tumorzellen dominiert die dimere Form der Pyruvatkinase und wird deshalb auch als *Tumor-M2-PK* bezeichnet [Eigenbrodt *et al.* 1992]. Der Nachweis der *Tumor-M2-PK* im EDTA-Plasma kann zur Routine-Diagnostik von Tumorerkrankungen mittels ELISA eingesetzt werden und ist als Tumor-Verlaufskontrolle bei Lungen-Karzinomen [Schneider *et al.* 2000a, 2000b], bei Pankreas-Karzinomen [Oremek *et al.* 1997], bei Kolon-Karzinomen [Eigenbrodt *et al.* 1997] und bei Nierenzell-Karzinomen und ihren Metastasen [Brinck *et al.* 1994] geeignet.

Die Umwandlung der tetrameren Form in die dimere wird durch verschiedene Oncoproteine wie die pp60<sup>v-src</sup>-Kinase, welche die M2-PK am Tyrosin phosphoryliert, und das Oncoprotein E7 des humanen Papilloma-Virus (HPV-16 E7), das direkt an die M2-PK bindet, induziert. Liegt die M2-PK in der wenig aktiven dimeren Form vor, reichern sich die Stoffwechselprodukte der Glykolyse oberhalb der Pyruvatkinase an und werden für Syntheseprozesse wie z.B. für die Synthese von Nukleinsäuren, Phospholipiden und Aminosäuren verwendet (Abb. 3). Dieser Prozess kann zu einer Imbalance des Energiehaushaltes führen, da in der Glykolyse für die Umwandlung von Glukose zu Fruktose-1,6-Bisphosphat zuerst ATP verbraucht bevor ATP wieder in der Pyruvatkinase-Reaktion generiert wird.

Eine weitere Funktion der dimeren Form der M2-PK besteht darin, den Zelltod der Tumorzelle durch einen Glukosemangel zu verhindern. In Tumorzellen ist der mitochondriale Verbrauch von Pyruvat reduziert, und es wird vermehrt Pyruvat und Energie aus der Aminosäure Glutamin gewonnen. Der Abbau von Glutamin zu Laktat bezeichnet man als „*Glutaminolyse*“. Die Energiegewinnung über die Glutaminolyse ist im Gegensatz zur glykolytischen Energiegewinnung über die PK-Reaktion sauerstoffabhängig [Eigenbrodt *et al.* 1998a]. Auf diese Weise können Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen Energie über die Glykolyse, bei Anwesenheit von O<sub>2</sub> aber über die Glutaminolyse gewinnen.

In verschiedenen humanen Tumoren wird auch die Aminosäure Serin zu Pyruvat und Laktat abgebaut. Dabei wird Serin in 2-Phosphoglycerat umgewandelt und über Pyruvat zu Laktat unter der Bildung von ATP metabolisiert. Diesen Weg bezeichnet man in Analogie zur Glykolyse und Glutaminolyse auch als „*Serinolyse*“ [Eigenbrodt *et al.* 1998a, Mazurek *et al.* 2001].

Laktat entsteht in verschiedenen Mikroorganismen aus Pyruvat. Diese Reaktion tritt auch bei Sauerstoffmangel in den Zellen höherer Organismen auf, wenn der Sauerstoffgehalt der limitierende Faktor ist, wie z.B. im Muskel bei intensiver Beanspruchung oder in neoplastischen Gewebe. Die Reduktion des Pyruvats durch NADH zum Laktat wird von der Laktatdehydrogenase (LDH, EC-Nummer 1.1.1.27) katalysiert. An der Bildung des katalytisch aktiven tetrameren Enzyms sind vornehmlich zwei Untereinheiten, LDHA (=LDHM, "Muskel-Typ") und LDHB (=LDHH, "Herz-Typ") beteiligt, die sowohl homo- als auch hetero-tetramere Formen bilden

können. Eine dritte Untereinheit LDHC wird ausschließlich in Seminalzellen männlicher Säuger exprimiert [Bonny *et al.* 1998].

Alle drei Gene, die für LDH kodieren, werden hinsichtlich ihrer Transkription reguliert. Die Expression von LDHA wird durch c-Myc, EGF, HIF-1, TNF $\alpha$  und Phorbol ester induziert [Nehar *et al.* 1997, Semenza *et al.* 1994, Shim *et al.* 1997]. Über die Transkriptionskontrolle von LDHB ist bekannt, dass ihre Expression durch Hypoxie reprimiert wird [Buono *et al.* 1999]. Das LDHC-Gen wird u. a. über den testesspezifischen Transkriptionsfaktor SP 1 aktiviert [Bonny *et al.* 1998]

In der Tumordiagnostik und -forschung wird die LDH hauptsächlich als Maß für die Zellschädigung eingesetzt, da LDH hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften relativ stabil ist und im Blut nur langsam abgebaut wird. Ein sog. Isoenzym-Shift, das heißt im Vergleich zu normalen bzw. benignen Stadium anteilig verstärkte Expression einer der Untereinheiten wurde lange für solide Tumoren postuliert, konnte sich aber als Malignitätskriterium bisher nicht durchsetzen. Ein signifikanter Isoenzym-Wechsel in Richtung LDHA wurde in ovariellen Neoplasien sowie bei Prostata- und Blasenkrebs festgestellt [Chow *et al.* 1991]. Ein signifikanter Wechsel in Richtung LDHB dagegen findet in Schilddrüsen-Karzinomen statt [Chow *et al.* 1991, Kopperschlager *et al.* 1996, Morita *et al.* 1994, Nishikawa *et al.* 1991, Sharief *et al.* 1994].

Die Nukleosiddiphosphat-Kinase (NDPK, EC-Nummer 2.7.4.6) wird vom Nm 23 Gen kodiert [Biggs *et al.* 1990]. Nm 23 Gene sind an der Kontrolle von Tumormetastasen beteiligt [Steeg *et al.* 1988]. Die NDPK katalysiert die Phosphorylierung von Nukleosid-5-Phosphaten zu Triphosphaten [Postel 1998]. Im ersten Schritt wird ein Phosphat vom Nukleosid-5-Triphosphat auf Histidin auf die katalytische Seite des Enzyms übertragen. Das energiereiche Phosphat wird dann auf eine Phosphatgruppe eines Nukleosid-5-Diphosphats übertragen.

Für viele Tumore besteht ein umgekehrtes Verhältnis zwischen der Höhe der Nm 23 Expression und dem metastatischen Potential eines Tumors. Eine Überexpression von Nm 23 in Zelllinien wie Maus-Melanomzellen [Baba *et al.* 1995, Kantor *et al.* 1993, Leone *et al.* 1991, Parhar *et al.* 1995], Ratten-Mamma-Adenokarzinomen [Fukuda *et al.* 1996] und menschlichen Brust-Karzinomen reduziert ihr metastatisches Potential, was darauf hin deutet, dass Nm 23 Gene eine Metastasierung unterdrücken können. Eine verstärkte Expression von Nm 23 ist mit Zellproliferation [Keim *et al.* 1992] und Zelldifferenzierung [Lakso *et al.* 1992]

verbunden. In menschlichem Gewebe werden die zwei Formen Nm 23-H<sub>1</sub> und Nm 23-H<sub>2</sub> exprimiert, wobei die Expression von Nm 23-H<sub>1</sub> mit der Unterdrückung von Metastasen korreliert ist [De la Rosa *et al.* 1995]. Die Synthese von Nukleosidtriphosphaten erklärt jedoch nicht die Rolle von Nm 23 in der Unterdrückung von Metastasen [De la Rosa *et al.* 1995]. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz ist, dass neben der Phosphorylierung von Nukleosiddiphosphaten die NDPK auch andere Substrate phosphorylieren kann. Die NDPK in der Rattenleber kann Histidin an der katalytischen Seite der ATP-Zitrat-Lyase phosphorylieren [Wagner und Vu 1995], Nm 23-H<sub>1</sub> kann Histidin der Succinat-Thiokinase phosphorylieren [Freije *et al.* 1996]. Die Transfektion mit dem wild-Typ Nm 23-H<sub>1</sub> unterdrückt die Motilität von menschlichen Brustkrebszellen [MacDonald *et al.* 1996] aber die Transfektion mit Nm 23-H<sub>1</sub><sup>P96S</sup> und Nm 23-H<sub>1</sub><sup>S120G</sup> unterdrückt die Motilität nicht. Es wurden fünf weitere Familien von Nm 23 identifiziert, wobei nur NmEZ bezüglich der Rolle in der Metastasierung getestet wurde und die Aussagen gegensätzlich sind.

Da die dimere Form der M2-PK nicht im Glykolyse-Enzymkomplex assoziiert ist, sind hohe Konzentrationen von Phosphometaboliten und eine hohe Proliferationsrate nur möglich, wenn das Enzym Phosphoglycero-Mutase (PGM, EC-Nummer 5.4.2.1) in den Komplex eingebunden ist [Mazurek *et al.* 2001]. Dadurch steigt die Bildung von 2-Phosphoglycerat aus Serin. In ausdifferenzierten Zellen erfolgt die Aktivierung der PGM durch Glycerat-2,3-bisphosphat, das jedoch in Tumorzellen nicht nachweisbar ist. Trotzdem ist die Glykolyse in Tumoren aktiv. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Phosphorylierung und Aktivierung der Phosphoglycero-Mutase durch die Nukleosiddiphosphat-Kinase (NDPK) erfolgt. Sowohl bei der NDPK als auch bei der PGM ist der Phosphatrest vorübergehend an ein Histidin des Enzyms gebunden. Die Phosphorylierung und Aktivierung der Phosphoglycero-Mutase erfolgt durch eine direkte Übertragung eines Phosphatrestes von der Nukleosiddiphosphat-Kinase. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass sich die Nukleosiddiphosphat-Kinase während des Tumorwachstums verändert [Mazurek *et al.* 1998].

### 1.7. Fragestellung dieser Arbeit

Ziel der Arbeit war es, durch Modulation der inspiratorischen Sauerstofffraktion die Tumoroxygenierung zu beeinflussen und die Auswirkung auf die Effektivität der Photodynamischen Therapie *in-vivo* am DS-Sarkom der Ratte zu untersuchen. Dabei sollten die beiden unterschiedlichen Vorgänge dieser Behandlung, für die O<sub>2</sub> eine Rolle spielen könnte, nämlich die 5-ALA-Aufnahme und Metabolisierung bzw. die Sauerstoffabhängigkeit des zytotoxischen Effekts, getrennt untersucht werden. Die Sauerstoffabhängigkeit der 5-ALA-Metabolisierung lässt sich durch eine Änderung des inspiratorischen Sauerstoffpartialdruck während der gesamten Dauer von der 5-ALA-Applikation bis zur Bestrahlung analysieren, wohingegen sich die Sauerstoffabhängigkeit des zytotoxischen Effekts durch die Generierung von O<sub>2</sub>-Radikalen durch Modulation der Sauerstofffraktion während der Bestrahlung des Tumors untersuchen lässt.

Die Klärung der Frage, ob die 5-ALA-PDT von der Tumoroxygenierung abhängig ist, ermöglicht neue Perspektiven in der verbesserten Therapiegestaltung von verschiedenen Krebserkrankungen mittels PDT.

An diesem Tiermodell sollten folgende Messungen durchgeführt werden:

- Die pO<sub>2</sub>-Verteilung in den Tumoren wurde polarographisch mittels einer Feinnadelsonde gemessen. Dabei richtete sich das Augenmerk besonders auf die Oxygenierung in Abhängigkeit von der inspiratorischen Sauerstofffraktion.
- Um die Abhängigkeit der 5-ALA-Aufnahme bzw. Metabolisierung zu PPIX beurteilen zu können, wurde 3 Stunden nach der 5-ALA-Applikation die durch PPIX induzierte Fluoreszenz in Tumorzellen mittels Durchflußzytometrie gemessen.
- Um den Einfluss der inspiratorischen Sauerstofffraktion auf die Effektivität der PDT festzustellen, wurde das Tumorwachstum täglich ermittelt.
- Ferner wurden Messungen des metabolischen Mikromilieus und des bioenergetischen Status mit Bestimmung der ATP-, ADP-, AMP-, Glukose- und Laktatkonzentrationen im Tumorgewebe durchgeführt.
- Außerdem erfolgte die Messung der Aktivität der zytosolischen Enzyme Pyruvatkinase, Laktatdehydrogenase und Nukleosiddiphosphat-Kinase im Tumorgewebe.

---

Alle Messungen wurden an Kontrolltieren, die nur solide Tumore trugen und an tumortragenden Tieren, bei denen die inspiratorische Sauerstofffraktion vor und während der Therapie verändert wurde, durchgeführt. Die Messergebnisse konnten so bezüglich der Behandlungsmodalität verglichen werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Versuchstiere**

Für alle Untersuchungen wurden männliche Sprague-Dawley Ratten vom Stamm Crl:CD (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) verwendet. Bei diesen Tieren handelt es sich um einen Auszuchtstamm der seit 1965 im Versuchstierkunde-Institut in Hannover gezüchteten HAN:SD-Ratten.

Zum Zeitpunkt der Tumorimplantation waren die Tiere ca. 5 Wochen alt und 140 bis 160 g schwer. Als Futtermittel erhielten sie eine Standarddiät (Typ 1324, Altromin, Lage) und Wasser, das auf einen pH-Wert von 2,5 bis 3 eingestellt war, *ad libitum*. Die Ratten wurden in Gruppen zu fünf bis sechs Tieren in Makrolonkäfigen Typ 4 (59cm · 38cm · 22cm, EBECO GmbH, Castrop-Rauxel) gehalten. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland von 1998, mit Genehmigung des Landesuntersuchungsamtes Rheinland-Pfalz (Koblenz) und nach den Richtlinien des UKCCCR [Workman *et al.* 1998] durchgeführt.

### **2.2. Tumormodell**

Das DS-Sarkom ist ursprünglich ein im Fütterungsversuch mit 4-Dimethylaminostilben im äußeren Gehörgang der Ratte induziertes Karzinosarkom. Im Laufe von Kulturpassagen verlor der Tumor jedoch seine Karzinommerkmale, so dass er heute als reines Sarkom angesehen werden muss. Es handelt sich hierbei um einen schnell proliferierenden Experimentaltumor, der sowohl als Einzelzellsuspension in Form eines hämorrhagischer Ascites als auch als solider Tumor in verschiedenen Geweben (z.B. subkutan, intramuskulär, Lunge, Leber) wächst. Auf Grund seiner Eigenschaften stellt das DS-Sarkom ein geeignetes Tumormodell für die Krebsforschung dar [Schmähl 1970, Vaupel 1975].

Wöchentlich wurden ca. 1 ml (ca  $10^4$  Zellen/ $\mu$ l) Ascitesflüssigkeit beidseitig intraperitoneal auf Trägartiere überimpft, die dann innerhalb einer Woche bis zu 30 ml Ascites entwickelten. Dieser ist einerseits für die Aufrechterhaltung der Zelllinie andererseits für die Implantation als solider Tumor nötig. Für die Implantation des

DS-Sarkoms als solider Tumor wurden 0,4 ml zellhaltiger Ascites (ca.  $10^4$  Zellen/ $\mu$ l) mit einer sterilen Injektionskanüle subkutan in den Fußrücken der Hinterpfote injiziert [Kallinowski *et al.* 1989a]. Die entstandenen soliden Tumoren erscheinen als glatte halbellipsoide Vorwölbungen und sind von geschlossener Epidermis überzogen.

Drei bis fünf Tagen nach der Implantation wurde die Tumorgröße täglich durch Messung der drei orthogonalen Durchmesser mit Hilfe einer Schieblehre bestimmt. Das Volumen in ml ergab sich aus der Formel  $V = l \cdot b \cdot h \cdot \pi/6$ . Da die Messung der Tumolvolumen von der Unterseite bis zur Tumoroberseite gemessen wurde, musste der tumorfreie Bereich des Fußes (3 mm) von der Höhe abgezogen werden. Bei einem Volumen zwischen 0,6 ml–0,8 ml (6-8 Tagen nach Implantation) erfolgte eine zufällige Zuteilung der Tiere zu den einzelnen Versuchsgruppen, wobei bei einer Abweichung des Wachstumsverlaufs der Tumoren in der Vorphase der Experimente die Tiere von der Versuchsserie ausgeschlossen wurden. Aufgrund der zu untersuchenden Atemgasgemische ergaben sich folgende drei Versuchsgruppen:

1. Raumluft (Pressluft, O<sub>2</sub>-Anteil 21%)
2. Hyperoxiegas (100% O<sub>2</sub>, Westfalen AG, Münster)
3. Hypoxiegas (8% O<sub>2</sub>-Anteil, 92% N<sub>2</sub>, Westfalen AG, Münster)

## **2.3. Messung des Sauerstoffpartialdrucks im Tumorgewebe und Leber**

### **2.3.1. Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe**

Im Tumorgewebe sind Sauerstoffpartialdrücke sehr heterogen verteilt. Um die Tumoroxygenierung möglichst genau charakterisieren zu können, muss man an verschiedenen Punkten Einzelmessungen durchführen. Hierzu diente der pO<sub>2</sub>-Histogramm (Model KIMOC 6650) der Firma Eppendorf, Hamburg [Kallinowski *et al.* 1990, Vaupel *et al.* 1991]. Das Messprinzip beruht auf der polarographischen Methode, bei der zwischen einer O<sub>2</sub>-Feinnadelsonde mit einer Goldkathode (Durchmesser 12 bzw. 17  $\mu$ m) und einer Referenzelektrode (Ag/AgCl-Standard-EKG-Elektrode) eine Polarisierungsspannung von -700 mV angelegt wird und so ein Strom fließt. Der Strom zwischen den beiden Elektroden (0,01-0,3 nA) ist dem

Sauerstoffpartialdruck an der Sondenspitze proportional. Vor und nach jeder Messung erfolgt eine Kalibrierung der Elektrode mit zwei Gasen. Hierzu wird in einer mit isotoner Kochsalzlösung gefüllten Kalibrierkammer die Elektrode mit N<sub>2</sub> (hieraus resultiert ein pO<sub>2</sub> ≈ 0 mmHg) bzw. Raumluft (hieraus resultiert in der Lösung ein pO<sub>2</sub> = Luftdruck · 0,209 ≈ 150 mmHg) umspült. Des Weiteren werden nach der Messung im Tumor die pO<sub>2</sub>-Werte auf die aktuelle Tumortemperatur umgerechnet.

Die Tiere wurden am Behandlungstag mit 40 mg/kg KG Natrium-Pentobarbital (Narcoren<sup>®</sup>, Merial, Halbergmoos) i.p. narkotisiert. Pentobarbital wurde als Narkotikum gewählt, weil seine Applikation keinen messbaren Einfluss auf Tumordurchblutung, O<sub>2</sub>-Versorgung und Energiestatus hat [Kelleher *et al.* 1995b, Menke und Vaupel 1988, Secomb *et al.* 1995]. Die Lagerung der Tiere erfolgte in Rückenlage auf einer geregelten Wärmeplatte, deren Temperatur so eingestellt wurde, dass die Körperkerntemperatur zwischen 37,5° und 38,5° C lag, die mittels eines Thermoelementes (Schaftdurchmesser: 250 µm, Typ 2 ABAC 025/1 BT1, Phillips, Kassel) kontinuierlich rektal kontrolliert wurde. Es erfolgte eine Kanülierung der linken Vena jugularis externa und der rechten Arteria carotis communis mit Hilfe eines Polyethylenkatheters (Innendurchmesser 0,5 mm, Außendurchmesser 1 mm). Diese wurden mit Ligaturen fixiert und, um eine Thrombosierung im Katheter zu vermeiden, mit einer Heparinlösung gefüllt (Liquemin<sup>®</sup> 25000 N, Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen). Zur Sicherung der Atmung erfolgte eine Tracheotomie auf Höhe des fünften Trachealknorpels und das Einbringen eines Polyethylenkatheters (Innendurchmesser = 1,57 mm, Außendurchmesser = 2,07 mm, Länge ca. 2 cm), der anschließend ebenfalls mit einer Ligatur fixiert wurde. Das entsprechende Gas (Durchfluss von 2 l/min, eingestellt mittels Gasflussmeter, Aalborg Instruments, Monsey, New York, USA) atmeten die Tiere spontan über einen locker dem Tracheostoma aufgesetzten Schlauch. Über den Anschluss des arteriellen Katheters an einen Statham-Druckaufnehmer (Modell SP 1400 Statham Blood Pressure Monitor und P23 Series Pressure Transducer, Firma Gould, Oxnard, CA, USA) konnte der mittlere arterielle Blutdruck (MABP) kontinuierlich kontrolliert und protokolliert werden. Nach der Kanülierung atmeten die Tiere spontan über das Tracheostoma das entsprechende Atemgas; nach einer Stabilisierungsphase von 30 min begannen die Messungen. Die Partialdrücke von Sauerstoff (pO<sub>2</sub>) und Kohlendioxid (pCO<sub>2</sub>) sowie der pH-Wert im arteriellen Blut dienten der Überwachung

vitaler Parameter des Tieres. Die Blutgasanalyse wurde in Mikroproben arteriellen Blutes vorgenommen, die über den Karotiskatheter aus der Aorta entnommen und mit einem Blutgasanalysator (Radiometer ABL™ 5, Radiometer GmbH, Willich) gemessen wurden.

Um eine Überstreckung des Fußes während der pO<sub>2</sub>-Messungen und damit eine eventuelle Beeinflussung der Durchblutung zu vermeiden, wurden die tumortragenden Hinterfüße auf Messingkeilen in einem Winkel von ca. 15° zur Unterlage fixiert. Als Referenzelektrode für die polarographische pO<sub>2</sub>-Messung diente eine Ag/AgCl-EKG-Standardelektrode, die über einen kleinen Hautschnitt direkt mit der Bauchmuskulatur in Kontakt stand.

Zur pO<sub>2</sub>-Messung wurde die Haut des Tumors mit einer 24-Gauge Nadel inzidiert. Mit Hilfe eines mit dem pO<sub>2</sub>-Histogrammen verbundenen Schrittmotors erfolgten die Messungen in so genannten Pilgerschritten, bei denen die Elektrode erst 1mm vorwärts in das Tumorgewebe und dann 0,3 mm zurück bewegt wurde. Es resultierte eine effektive Schrittweite von 0,7 mm. Diese Bewegungssteuerung ist nötig, um die Messergebnisse nicht durch eventuelle mechanische Kompressionen des Gewebes zu beeinflussen. Die einzelne pO<sub>2</sub>-Messung wurde automatisch nach einer Adaptationszeit von jeweils 1,3 s durchgeführt und die gemessenen Daten vom Gerät gespeichert. Danach folgte der nächste Pilgerschritt. Das Gerät war so programmiert, dass sich die Sonde maximal bis zu einer Länge von 14 mm parallel zur Tumorachse bewegte. Wenn die Sonde innerhalb dieser 14 mm die Haut des Tumors auf der gegenüber liegenden Seite erreichte, wurde die Messung unterbrochen. Das Gerät rechnete die Messwerte jedes einzelnen „Messkanals“ in pO<sub>2</sub>-Werte um und speicherte diese in Form von Histogrammen. In jedem Tumor wurden 5 bis 6 solcher Messkanäle parallel zueinander analysiert, so dass sich je nach Tumolvolumen zwischen 80 – 120 Einzel-pO<sub>2</sub>-Werte pro Tumor ergaben. Dieses Vorgehen ist in Übereinstimmung mit den Vorgaben von Thews *et al.* [1995] über die Anzahl von Messwerten, die nötig sind, um eine repräsentative Aussage über die Tumoroxygenierung machen zu können. Nach Abschluss der Messungen des Sauerstoffpartialdrucks wurde noch die Tumortemperatur mittels eines Thermoelements (Schaftdurchmesser: 250 µm, Typ 2 ABAC 025/1 BT1, Phillips, Kassel) bestimmt, das in das Zentrum des Tumors eingeschoben wurde. Da das polarographische Messverfahren stark von der aktuellen Temperatur abhängt, mussten alle pO<sub>2</sub>-Werte eines Tumors auf die gemessene Temperatur umgerechnet

werden. Anschließend erfolgte die schmerzlose Tötung der Tiere durch Überdosierung des Narkotikums.

Die gewonnenen Einzelmessungen eines Tumors wurden auf einen PC übertragen und die rechnerischen Größen (Median und Mittelwert des  $pO_2$ , der Anteil hypoxischer  $pO_2$ -Werte zwischen 0 und 2,5 mmHg und zwischen 0 und 5 mmHg) ermittelt, die zur weiteren statistischen Auswertung herangezogen wurden.

### 2.3.2. Sauerstoffpartialdruck in der Leber

Zur Erfassung des zeitlichen Verlaufs der Leberoxygenierung in Abhängigkeit der inspiratorischen Sauerstofffraktion dienten polarographische Kathoderelektroden (LICOX, GMS, Mielkendorf). Bei diesen Elektroden sind Kathode und Referenzanode in einem flexiblen sauerstoffdurchlässigen Katheter mit einem Durchmesser von 350  $\mu\text{m}$  eingebettet. In der vorliegenden Untersuchung wurden Elektroden mit einer Kathodenlänge von 5 mm (Typ C1) verwendet. Vor jeder Messung musste die Elektroden in einer thermokonstanten Kammer mit Raumluft unter Einbeziehung des aktuellen Luftdrucks kalibriert werden. Eine starke Veränderung der Kalibrierparameter deutet auf eine eventuelle Alterung der Sonden hin und macht einen Austausch nötig. Für die Messung der Leberoxygenierung wurde dieses System anstatt des  $pO_2$ -Histogrammen verwendet, da so alle drei Atemgasgemische an einem Versuchstier untersucht und die Zahl der benötigten Versuchstiere deutlich gesenkt werden konnte.

Für diese Untersuchungen wurden nicht-tumortragende Tiere den drei Versuchsgruppen zugeteilt und wie oben beschrieben narkotisiert, kanüliert und in Rückenlage fixiert. Es wurde mit einem Skalpell ein ca. 5 cm langer Hautschnitt vom Xiphoid bis in den Bereich des Nabels durchgeführt, die Bauchdecke in der Linea alba mit einer Schere eröffnet und die Leber vorgelagert. Um die Kathoderelektrode platzieren zu können, musste der entsprechende Leberlappen (Lobus hepatis dexter medialis) zunächst mit einer Braunüle (20 Gauge) transversal durchstoßen werden. Die  $pO_2$ -Elektrode wurde anschließend so in die Braunüle eingeführt, dass die Kathode in der Mitte der Leber zu liegen kam. Die Elektrode verblieb nach dem Zurückziehen der Braunüle im Lebergewebe. Ferner wurde in diesen Leberlappen weiter kaudal ein Thermoelement (Schaftdurchmesser: 250  $\mu\text{m}$ , Typ 2 ABAC 025/1

BT1, Phillips, Kassel) zur Kontrolle der Lebertemperatur platziert. Nach einer Stabilisierungsphase von 30 Minuten und konstanten  $pO_2$ -Werten erfolgte die Messung über 30 Minuten unter Raumlufbedingungen. Anschließend wurde die Leberoxygenierung bei inspiratorischer Hyperoxie (100%  $O_2$ ) über 30 Minuten untersucht. Nach einer erneuten Stabilisierungsphase von 30 Minuten unter Atmung von Raumluf erfolgte die Messung über 30 Minuten unter hypoxischen Bedingungen (8%  $O_2$ ) und danach einer erneuten Messung unter Raumlufbedingungen. Nach Abschluss der Messungen wurden die Tiere durch eine Überdosierung des Narkosemittels getötet.

#### **2.4. Messung der durch Protoporphyrin IX induzierten Fluoreszenz in Tumorzellen**

Die Messungen der durch PPIX induzierten Fluoreszenz als Maß für die Konzentration des Photopharmakons in Tumor- und Leberzellen erfolgte durchflusszytometrisch. Grundprinzip dieses Verfahrens ist es, dass in Einzelzellen aufgenommene Substanzen mit einem Laser angeregt werden. Die so aufgenommene Energie wird dann in Form von Fluoreszenzstrahlung einer bestimmten Wellenlänge abgegeben und mit einem der emittierten Wellenlänge entsprechenden Sensor detektiert. Die gemessene Fluoreszenz stellt ein direktes Maß der Konzentration der entsprechenden Substanz dar.

Um die Auswirkungen des Sauerstoffpartialdrucks im Tumorgewebe auf die Aufnahme bzw. Metabolisierung von 5-ALA zu beurteilen, atmeten die Tiere nach der Applikation von 5-ALA eines der drei folgenden Gasgemische für drei Stunden:

1. Raumluf (21%  $O_2$ )
2. Hyperoxiegas (100%  $O_2$ )
3. Hypoxiegas (8%  $O_2$  + 92%  $N_2$ ).

Am Versuchstag wurden die tumortragenden Tiere zufällig (wie oben beschrieben) in diese drei Versuchsgruppen aufgeteilt und 5-ALA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in einer Konzentration von 375 mg/kg Körpergewicht, gelöst in 1 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, KCl 0,2 g/l,  $KH_2PO_4$  0,2 g/l, NaCl 8,0 g/l,

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,15 g/l, pH-Wert 7,3 bis 7,4, eingestellt mit  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), in eine Schwanzvene injiziert. Diese Dosis wurde aufgrund von experimentellen Voruntersuchungen gewählt, die zeigten, dass diese Dosis zur stärksten Hemmung des Tumorwachstums bei einer geringen Toxizität führt. Ferner ist dies die geringstmögliche Konzentration, aus der eine maximale durch PPIX induzierte Fluoreszenz im Tumorgewebe resultiert [Kelleher *et al.* 2003].

Anschließend wurden die Tiere für drei Stunden in lichtundurchlässige Kunststoffkisten (34 cm · 22 cm · 16 cm) unter den entsprechenden Gasbedingungen gehalten. Diese Zeit ist notwendig, da 5-ALA erst zu Protoporphyrin IX metabolisiert werden muss. Zur Ermittlung der Eigenfluoreszenz von Tumor- und Lebergewebe erhielten Kontrolltiere kein 5-ALA sondern 1 ml PBS i.v. appliziert. Nach diesen drei Stunden erfolgte die tierschutzgerechte, schmerzlose Tötung der Tiere, die Exzidierung der Tumore mit Entfernung der Haut und die Entnahme des mittleren Leberlappens (Lobus hepatis dexter medialis). Tumor- und Lebergewebe wurden mit Hilfe eines Edelstahlsiebs (Porengröße 180  $\mu\text{m}$ ) mechanisch zerkleinert und in PBS aufgenommen. Um die Zellen weiter zu vereinzeln, wurde die Zellsuspension mittels einer 2 ml Einwegspritze und einer 24 Gauge-Kanüle 10mal unter Druck aufgesogen und ausgespritzt und in ein 50 ml Falcon-Tube überführt. Nach Zentrifugation bei 1200 U/min für 5 min wurde der Überstand dekantiert und verworfen und das Zellpellet mit 10 ml Erythrozyten-Lysepuffer (8,29g Ammoniumchlorid, 1g Kaliumhydrogencarbonat, 0,0372g Natrium-EDTA ad 1000 ml aqua dest., pH eingestellt auf 7,29 mit 10 M Natronlauge) resuspendiert. Nach 4 min Inkubation bei 4° C erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 1200 U/min für 5 min mit anschließender Dekantierung des Lysepuffers. Das Zellpellet wurde in 5-7 ml PBS (abh. von der Größe des Pellets) aufgenommen und 100  $\mu\text{l}$  dieser Suspension mit 1 ml PBS in einem für die Messung vorgesehenen Röhrchen verdünnt. Da PPIX bei Beleuchtung mit einer geeigneten Wellenlänge fluoresziert, wurde durchflusszytometrisch die Fluoreszenz der einzelnen Zellen bestimmt.

Die Messung in Tumor- und Leberzellen erfolgte mit einem EPICS XL-Durchflusszytometer (Beckmann-Coulter, Miami, USA). Dabei wurden die Zellen mit einem Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm bestrahlt und die Fluoreszenz mit einem Sensor bei einer Wellenlänge von 605-635 nm detektiert. Neben PPIX werden aber auch andere Porphyrin-Metabolite angeregt und fluoreszieren. Aufgrund der Anregungswellenlänge und dem Emissionsspektrum von PPIX handelt es sich

jedoch bei der detektierten Fluoreszenz maßgeblich um die von PPIX induzierte [Juzeniene *et al.* 2002]. Ausgewertet wurden je 10000 Zellen. Für die Auswertung wurde die gemessene Fluoreszenzstärke der Zellen mit Referenz-Partikeln mit definierter Fluoreszenzintensität (Immono-Bride Level 2, Beckmann-Coulter, Miami, USA) normiert.

## 2.5. Photodynamische Therapie mit 5-Aminolävulinsäure

Die Bedeutung der Oxygenierung des Tumors für die Effektivität der 5-ALA-PDT sollte durch Modulation der inspiratorischen Sauerstofffraktion untersucht werden. Hierzu atmeten die Tiere spontan hypoxische bzw. hyperoxische Gasgemische während unterschiedlicher Phasen der Behandlung wobei als Gasgemische Raumluft (Pressluft, O<sub>2</sub>-Anteil 21%), Hyperoxiegas (100% O<sub>2</sub>) und Hypoxiegas (8% O<sub>2</sub>-Anteil, 92% N<sub>2</sub>) verwendet wurden. Einerseits könnte die Anwesenheit von Sauerstoff in der 5-ALA-PDT für die 5-ALA-Aufnahme bzw. Metabolisierung in der Tumorzelle (im Tiermodell 3 Stunden) andererseits für die Generierung von Sauerstoffradikalen während der Bestrahlung von Bedeutung sein, weshalb drei unterschiedliche Beatmungsmodi untersucht wurden, aus denen sich folgende Versuchsgruppen ergaben:

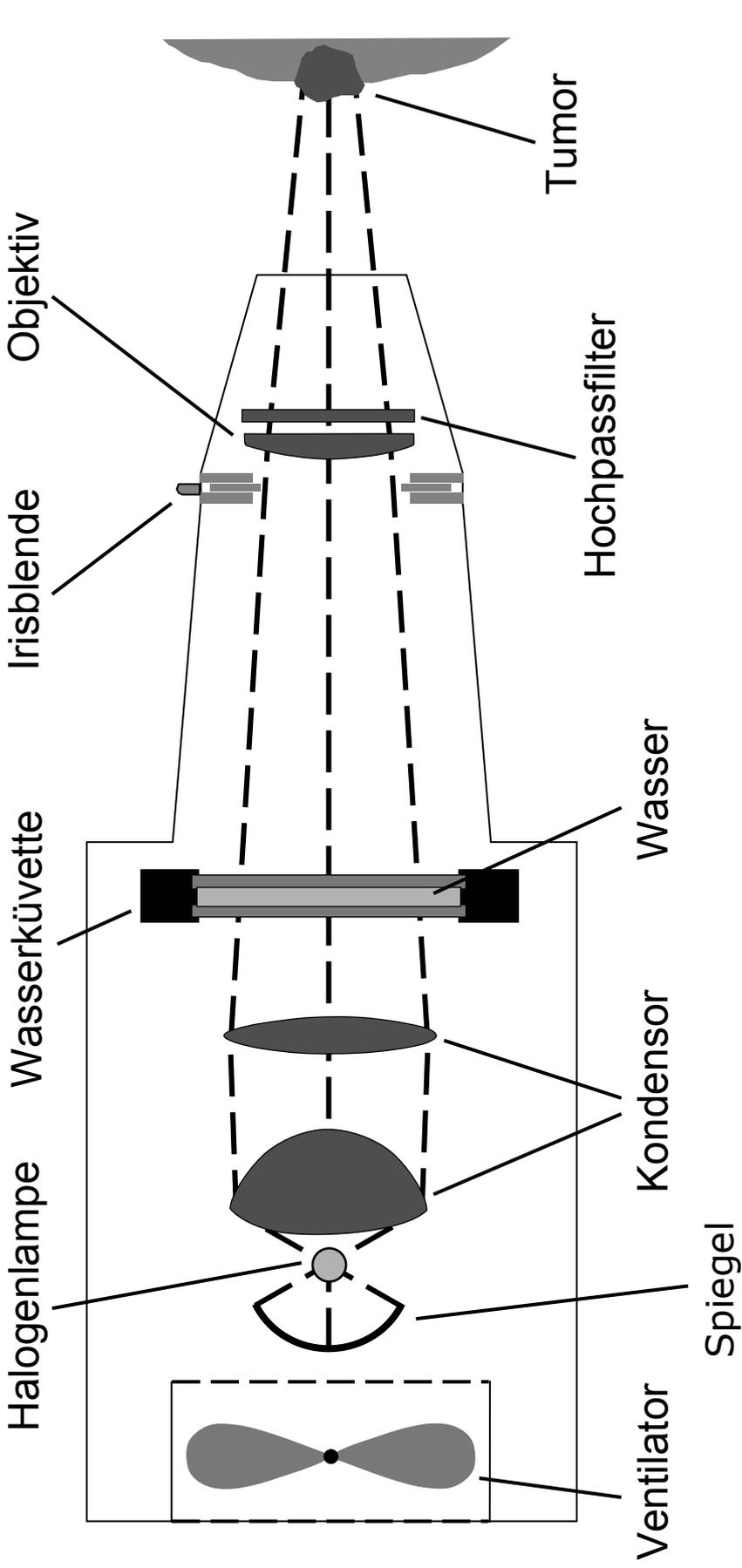
1. Unbehandelt (keine PDT-Behandlung, keine 5-ALA-Applikation)
2. Raumluft für den Zeitraum zwischen der Applikation bis zur Bestrahlung (3 Stunden) und während der Bestrahlung
3. Inspiratorische Hyperoxie (100% O<sub>2</sub>)
  - a) nur für den Zeitraum zwischen der Applikation bis zur Bestrahlung (3 Stunden)
  - b) nur während der Bestrahlung
  - c) für den Zeitraum zwischen der Applikation bis zur Bestrahlung (3 Stunden) und während der Bestrahlung

4. Inspiratorische Hypoxie (8% O<sub>2</sub>, 92% N<sub>2</sub>)

- a) nur für den Zeitraum zwischen der Applikation bis zur Bestrahlung (3 Stunden)
- b) nur während der Bestrahlung
- c) für den Zeitraum zwischen der Applikation bis zur Bestrahlung (3 Stunden) und während der Bestrahlung

Zielgröße der Untersuchung war das Wachstumsverhalten des Tumors nach PDT-Behandlung. Bei einem Tumolvolumen zwischen 0,6 ml-0,8 ml (6-8 Tagen nach Implantation) erfolgte eine zufällige Zuteilung der Tiere zu den einzelnen Versuchsgruppen. 5-ALA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) wurde in einer Konzentration von 375 mg/kg Körpergewicht in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (80mg/ml PBS) gelöst und den Tieren über eine Schwanzvene appliziert. Anschließend wurden die Tiere für drei Stunden unter den entsprechenden Gasgemischen in lichtundurchlässigen Kunststoffkisten gehalten. Je nach Behandlungsgruppe wurde während dieser Inkubationszeit die Kiste mit einem der drei Atemgasgemische durchspült. Nach drei Stunden erfolgte eine Anaesthetie mit Natrium-Pentobarbital (40 mg/kg i.p., Narcoren<sup>®</sup>, Merial, Halbergmoos). Die Lagerung der narkotisierten Tiere für die Bestrahlung erfolgte in Rückenlage auf einer geregelten Wärmeplatte, deren Temperatur so eingestellt war, dass die Körpertemperatur konstant bei 37,5° C-38,5° C lag. Der zu behandelnde Fuß wurde in einem Winkel von etwa 15° zur Unterlage auf einem Messingkeil fixiert, so dass der Fuß des Tieres nicht überstreckt und eine evtl. Beeinflussung der Durchblutung vermieden wurde. Mit Hilfe eines Thermoelements (Schaftdurchmesser: 250 µm, Typ 2ABAc 025/1 BT1, Phillips, Kassel), das nach Inzidierung der Haut des Tumors mit einer 24 Gauge-Kanüle in diesen eingeführt wurde, erfolgte die Kontrolle der Tumortemperatur im Verlauf der Bestrahlung. Während der Behandlungsdauer von 80 min atmeten die Tiere spontan das entsprechende Atemgas, das über eine locker um die Schnauze des Tieres anliegenden Maske mit einer Flussrate von 2 l/min zugeführt wurde. Für die Dauer der Behandlung mussten die Tiere mit Ausnahme des zu bestrahlenden Tumors mit einer dünnen Aluminium-Folie abgedeckt werden, um zu vermeiden, dass Streulicht während der PDT zu einer Aktivierung des Photosensitisers in anderen Körperregionen führte. Die Lagerung der Tiere erfolgte so, dass nur der Tumor und ein schmaler Rand des angrenzenden Normalgewebes im Bestrahlungsfeld lagen.

Zur Bestrahlung wurde ein Infrarot-A-Strahler verwendet (Abb. 4), der über ein sehr homogenes Bestrahlungsfeld verfügt. Als Lichtquelle dient eine Halogenlampe (24 V/150 W, Typ HLX 64643, Osram, München). Mit Hilfe eines Wasserfilters in Form einer Küvette (Hydrosun, Müllheim) werden die Wellenlängen des Lichtes (0,94, 1,18 und 1,38  $\mu\text{m}$ ) [Krüger *et al.* 1993, Vaupel *et al.* 1992] gefiltert, die ansonsten aufgrund des Wassergehalts im Gewebe dort absorbiert würden und zu einer übermäßigen schmerzhaften Erwärmung sowie einer Exikose des Gewebes führen könnte. Ein zusätzlicher Hochpassfilter filtert weiterhin Licht der Wellenlängen über 800 nm, die zu einer Erwärmung (Hyperthermie) der bestrahlten Region führen würden, was in dieser Studie unerwünscht war. Die Wärme, die durch Absorption des Wasserfilters entsteht, wird mit Hilfe eines Ventilators im Strahler abgeführt, damit die Wassertemperatur in der Küvette nicht über 70° C ansteigt. Ein Kondensoren im Strahler sorgt für eine homogene Verteilung der Energie über das gesamte Bestrahlungsfeld. Die Entfernung zwischen Tumoroberfläche und Hochpassfilter betrug 10 cm. Die Bestrahlung dauerte 80 Minuten, wobei einer Beleuchtungsphase von 1,3 sek. eine Dunkelphase von 2 sek. folgte, so dass sich eine effektive Bestrahlungszeit von ca. 31 Minuten ergab. Die Energieflussrate betrug 200 mW/cm<sup>2</sup>, die Energiedichte 370 J/cm<sup>2</sup>. Nach Abschluss der PDT-Behandlung wurden die Tiere einen Tag lang in einem Käfig, der mit Zellstoff ausgelegt war um eine Aspiration von Einstreu zu vermeiden, in einem abgedunkelten Raum gehalten, damit eine weitere Aktivierung von PPIX durch Tageslicht verhindert werden konnte. Anschließend wurde das Tumolvolumen täglich über 90 Tage gemessen. Die Nachbeobachtung wurde beendet, wenn der Tumor ein Volumen von 3,5 ml erreichte (dies entspricht 1,5% des Körpergewichts und gilt als ethisch vertretbar [Workman *et al.* 1998]) oder sich der Allgemeinzustand des Tieres deutlich verschlechterte (gestörtes Allgemeinbefinden, vergrößerte Inguinal-, Zervikal- bzw. Abdominallymphknoten).



$\lambda = 400-800 \text{ nm}$

Abb. 4: Infrarot-A-Strahler mit Wasserfilter

## 2.6. Parameter des Tumorstoffwechsels

### 2.6.1. Gewebegewinnung und Aufarbeitung

Die zufällige Verteilung der Tiere zu den einzelnen Versuchsgruppen und die Therapie erfolgten wie oben beschrieben. Unter tiefer Narkose wurden die Tumoren unmittelbar nach der Bestrahlung entfernt und sofort in flüssigem Stickstoff (-196° C) tiefgefroren. Die Lagerung der Tumoren erfolgte bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80° C. Für die anschließenden Messungen wurden die Tumore unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert und in einem Lyophilisator (Model 3200+CV, 13009, DKMoradSA, Aclens, Schweiz) gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Proben lagerten bis zur weiteren Aufarbeitung wiederum bei -80° C.

Zur Messung der Glukose- und Laktatkonzentrationen im Tumorgewebe wurden 10–15 mg Lyophilisat auf einer Präzisionswaage (Typ PL 1200, Fa. Mettler, Gießen) in Eppendorf Reaktionsgefäße eingewogen, mit 1 ml 0,33 M Perchlorsäure (HClO<sub>4</sub>) enteiweißt und mit Ultraschall (20 – 40 MHz, Virba Cell VC 50, Sonics & Materials Inc., Danbury, CT, USA) homogenisiert. Dazu wurde jede Probe dreimal 10 Sekunden lang unter Eiskühlung beschallt mit dazwischen liegenden 15 Sekunden langen Pausen und anschließend 2 min bei 10000U/min in der Kühlzentrifuge (Biofuge 15 R, Haereus, Hanau) bei 4° C zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert und der Rückstand verworfen. Die Glukose- und Laktatbestimmung erfolgten in dem gewonnenen Überstand.

### 2.6.2. Bestimmung der Glukose- und Laktatkonzentrationen

Die Laktatkonzentration im Testansatz wurde mit dem Testkit zur Laktatbestimmung Lactate<sup>®</sup> (Kit-Nr.: 1822837, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bestimmt. Nach Zugabe von 25 µl Probenüberstand zu 500 µl Reagenz 1 wurde bei einer Wellenlänge von 660 nm nach 1 min die Extinktion, 5 min später nach Zugabe von 100 µl Reagenz 2 die Extinktion gemessen und hieraus die Extinktionsänderung ermittelt. Aus der Laktatkonzentration im Testansatz lässt sich der Laktat-Spiegel im Gewebe aus folgender Gleichung berechnen:

Konzentration im Gewebe

$$= \text{Konzentration im Testansatz} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} / \text{Feuchtgewichtsfaktor}$$

Der Verdünnungsfaktor errechnet sich aus der Addition von Einwaage des Gewebelyophilisats und zugegebener Menge Perchlorsäure und Division dieser Summe durch die Einwaage. Der Wassergehalt, der experimentell ermittelt wurde, beträgt für das DS-Sarkom an SD-Ratten 83,2%.

Die Bestimmung der Glukosekonzentration im Tumorgewebe erfolgte mit dem Testkit Glucoquant<sup>®</sup> Glucose/HK (KIT-NR.: 1447521, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Dabei wurden 50 µl Probenüberstand und 1000 µl Reaktionsgemisch, das aus sechs Teilen Reagenz 1 und einem Teil Reagenz 2 besteht, eingesetzt und die Extinktion des Probenleerwertes und der Probe nach 5 min mittels Photometer (Ultraspec<sup>®</sup>, Pharmacia Biotech, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 365 nm bestimmt. Anschließend wurde die Differenz aus Extinktion der Probe und der Extinktion des Leerwertes gebildet. Die Glukosekonzentration im Tumorgewebe errechnet sich wie bei der Laktatbestimmung beschrieben.

### 2.6.3. Bestimmung der Konzentration der Adenosinphosphate

Die Bestimmung der Adenosinphosphate ATP, ADP und AMP erfolgt quantitativ mittels HPLC (High Pressure Liquid Chromatographie), wofür die Proben folgender Maßen aufgearbeitet wurden:

Nach Einwaage von 2–4 mg Lyophilisat wurden diese mit 500 µl eiskalter 0,33 M Perchlorsäure (HClO<sub>4</sub>) versetzt, mit Ultraschall unter Eiskühlung homogenisiert und für 2 min bei 10000 U/min in der Kühlzentrifuge bei 4° C zentrifugiert. Da die Adenosinphosphate säurelabil sind, wurde der Überstand sofort mit 84 µl 2 M Kalilauge (KOH) neutralisiert und der Rückstand verworfen. Während die Proben im Eisbad standen, fiel Kaliumperchlorat als weißer Niederschlag aus. Dieser wurde durch erneutes Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge bei 4° C (2 min bei 10000 U/min) vom Überstand getrennt und 400 µl des Überstands mit 400 µl Elutionsmittel (s.u.) verdünnt. Die Lagerung der so aufgearbeiteten Proben erfolgte für mehrere Stunden

bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Die Entfernung der beim Auftauen erneut ausfallenden Eiweißrückstände erfolgte erneut durch zentrifugieren und abpipettieren.  $100\ \mu\text{l}$  dieses Überstandes wurde in Probengefäße (Quan:500<sup>®</sup>, Firma Chromacol, Ltd, London, England) gefüllt, mit Schraubdeckeln versehen und in das Probenaufgabesystem (Autosampler 2157, Pharmacia, Freiburg) gestellt, von wo aus eine Menge von  $40\ \mu\text{l}$  Messung in die HPLC injiziert wurden. Bei der hier verwendeten HPLC handelte es sich um ein isokratisches Reverse Phase HPLC-System (Pharmacia LKB Biotechnologie, Uppsala, Schweden). Es wurde eine Reverse Phase Ionenpaarchromatographie durchgeführt. 1 l der mobilen Phase (Elutionsmittel) setzte sich wie folgt zusammen: 6,6 g Ammoniumdihydrogenphosphat ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ), 14,88 mg Tetrabutylammonium-Hydroxid, 131,9 ml Acetonitril ad 1000 ml Aqua dest., eingestellter pH-Wert = 6,37 mittels 25%  $\text{NH}_3$  bzw. Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , alle Chemikalien: Merk, Darmstadt). Die Entgasung des Elutionsmittels erfolgte durch Ultraschall (20 – 40 MHz, Virba Cell VC 50, Sonics & Materials Inc., Danbury, CT, USA). Die Proben liefen über die Vorsäule (Supersphere RP 18,  $4,0 \cdot 5\ \text{mm}$ , Knauer, Berlin) und die analytische Säule (Supersphere-100 RP 18 endc, ID  $4 \cdot 250\ \text{mm}$ , Knauer, Berlin). Die Analyse erfolgte mittels eines UV-Detektors (UV/VIS Detektor L 4250, Merck, Darmstadt, Detektionswellenlänge 254 nm). Das Signal wurde mit einem Integrator (Chromatopac C-R 6 A, Shimadzu Cooperation, Kyoto, Japan) aufgezeichnet.

Die Konzentrationsbestimmung von ATP, ADP und AMP wurde mit Hilfe eines Standards vorgenommen, der bekannte Konzentrationen (10 mM AMP, 10 mM ADP, 30 mM ATP) der zu detektierenden Substanzen enthielt. Die Programmierung erfolgte so, dass zweimal jeweils nach 60 min  $40\ \mu\text{l}$  einer Probe und nach jeder 5. Messung  $40\ \mu\text{l}$  aus dem Standard entnommen wurde. Die Retentionszeiten sind substanzspezifisch und betragen für AMP ca. 8 min, für ADP ca. 16 min und für ATP ca. 36 min bei einer Flussrate von 0.9 ml/min. Die lineare Abhängigkeit der integrierten Fläche im Absorptionsspektrum von der Konzentration wurde für den relevanten Messbereich durch die Standardverdünnung verifiziert.

Als Maß für den energetischen Status eines biologischen Systems wurde die Energieladung (energy charge, EC) nach folgender Formel berechnet [Atkinson 1977]:

$$\text{EC} = \frac{\text{ATP-Konzentration} + 0,5 \cdot \text{ADP-Konzentration}}{\text{ATP-Konzentration} + \text{ADP-Konzentration} + \text{AMP-Konzentration}}$$

## **2.7. Zytosolische Enzyme Pyruvatkinase, Laktatdehydrogenase und Nucleosiddiphosphat-Kinase**

### **2.7.1. Gewebegewinnung und Aufarbeitung**

Bei einem Tumolvolumen von 0,9-1,0 ml erfolgte die zufällige Zuteilung der Tiere in die folgenden Behandlungsgruppen:

1. Unbehandelt (keine 5-ALA-Applikation, keine Bestrahlung)
2. Raumluft (21% O<sub>2</sub>)
  - a) für 3 Stunden nach 5-ALA-Applikation und keine Bestrahlung
  - b) für 3 Stunden nach 5-ALA-Applikation und während der Bestrahlung
3. Hyperoxie (100% O<sub>2</sub>)
  - a) für 3 Stunden nach 5-ALA-Applikation und keine Bestrahlung
  - b) für 3 Stunden nach 5-ALA-Applikation und während der Bestrahlung
4. Hypoxie (8% O<sub>2</sub> + 92% N<sub>2</sub>)
  - a) für 3 Stunden nach 5-ALA-Applikation und keine Bestrahlung
  - b) für 3 Stunden nach 5-ALA-Applikation und während der Bestrahlung

Die Behandlung erfolgte wie unter 2.5. beschrieben. Da für die Bestimmung der Enzymaktivität eine größere Einwaage an Tumorgewebe notwendig war als für die Bestimmung der Parameter des metabolischen Mikromilieus, erfolgte die Behandlung bei einem Tumolvolumen von 0,9-1,0 ml. Es ist nicht davon auszugehen, dass das geringfügig größere Tumolvolumen einen signifikanten Einfluss auf die Tumoroxygenierung und das metabolische Mikromilieu hat.

Noch in Narkose wurde der Tumor drei Stunden nach der 5-ALA-Applikation und Atmung der entsprechenden Gasgemische bzw. unmittelbar nach der Behandlung exzidiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Aufbewahrung der Tumore erfolgte bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80° C. Für die Messvorbereitung wurden die Tumore mittels einer Feinwaage (PM 400, Mettler Waagen GmbH, Gießen) gewogen, mit dem Extraktionspuffer (0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer, 1 mM

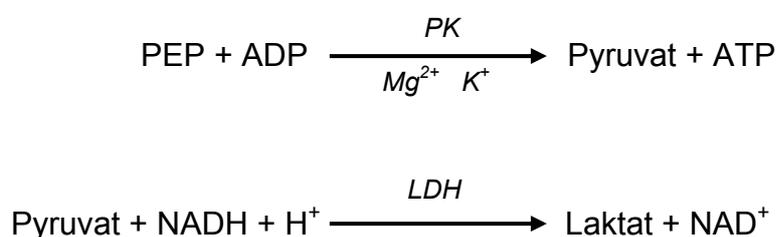
EDTA-Puffer, 1 mM Mercaptoetanol, 1 mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure, 0,2 mM PMSF, pH 7,4) im Verhältnis 1:2 (Feuchtgewicht Tumor : Extraktionspuffer) in einem Pottergefäß versetzt und mechanisch 2 Minuten lang mit Hilfe eines Pistills unter Eiskühlung homogenisiert. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 20000 U/min und 4° C (Sorvall Superspeed RC2-B, Rotor A 24.24, Hormuth-Vetter, Wiesloch) wurde das Volumen des Überstands bestimmt und zu je 300  $\mu$ l aliquotiert, das Sediment wurde verworfen. Die Aufbewahrung bis zur Bestimmung der Aktivität der PK, LDH und NDPK erfolgte bei -80° C.

### 2.7.2. Bestimmung der Aktivität der Enzyme

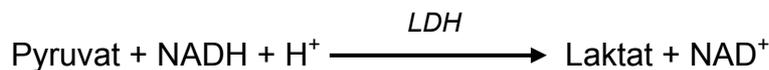
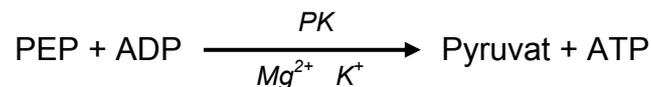
Die Messungen der Abnahme von NADH erfolgten photometrisch bei einer Wellenlänge von 334 nm (EPOS Analyzer 5060, Eppendorf, Hamburg). Die Proben wurden vor Messbeginn nochmals 1:20 mit dem Extraktionspuffer verdünnt, der Ansatz der Reaktionsgemische erfolgte automatisch durch das Gerät. Alle Messungen wurden nach den von Bergmeyer [1974] beschriebenen Messverfahren durchgeführt.

Die Reaktionsgeschwindigkeit von Enzymen nimmt mit steigender Substratkonzentration zu, bis ein Maximum erreicht wird. Dieses bezeichnet man als maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ). Durch Zugabe von 2 mM PEP kann man die  $V_{\max}$ -Aktivität der PK bestimmen. Die Messungen bei physiologischen PEP-Konzentrationen von 0,2 mM ergeben die physiologische Aktivität.

Die Messung der PK-Aktivität erfolgte aus 4  $\mu$ l Probe, 200  $\mu$ l Reaktionsgemisch (im Test: 20 mM KP-Puffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), pH 7,2, 22,4 mM KCl-Lsg., 0,63 mM NADH, 1 mM ADP, 7,6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3U/ml LDH) und 10  $\mu$ l bzw. 1  $\mu$ l Phosphoenolpyruvat (PEP, im Test: 2 mM bzw. 0,2 mM) bestand. Die Reaktion läuft nach folgendem Prinzip ab:



Zur Ermittlung der Aktivität der NDPK wurden 10 µl Probe, 200 µl Reaktionsgemisch (im Test: 0,1M TRA-Puffer, pH 7,6, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 140 mM KCl-Lsg., 3 mM ATP, 2 mM PEP, 0,3 mM NADH, 7 U/ml PK, 20 U/ml LDH) und 10 µl TDP (im Test: 0,3 mM) versetzt. Die Reaktion läuft nach folgendem Prinzip ab:



Die LDH-Aktivität im Testansatz wurde bestimmt, indem 10 µl Probe, 200 µl Reaktionsgemisch (im Test: 50 mM KP-Puffer, pH 7,2, 1 mM EDTA-Na<sub>2</sub>-Lsg, pH 7,5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>-Lsg, 0,35 mM NADH, 5 mM DTT) und 10 µl Pyruvat (im Test: 0,6 mM) versetzt wurden. Die Reaktion läuft nach folgendem Prinzip ab:



Die Aktivität der einzelnen Enzyme im Feuchtwicht ergab sich aus folgender Gleichung:

Aktivität [U/g Feuchtwicht]=

$$\frac{(\text{U/ml Probe} - \text{U/ml Leerwert}) \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Gesamt-Extraktionsvolumen [ml]}}{\text{Einwaage [g]}}$$

## 2.8. Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL XP erfasst und weiterverarbeitet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SAS Version 6.12. Die Verteilung der Messwerte wurden jeweils durch Mittelwert und Standardfehler (SEM) beschrieben. Der Vergleich von Messgrößen zwischen verschiedenen Gruppen erfolgte mittels des zweiseitigen Wilcoxon-Tests für unverbundene Stichproben. Für die Analyse des Wachstumsverhaltens der Tumoren nach der PDT-Behandlung wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass ein Tumor noch nicht ein Volumen von 3,5 ml erreicht hat. Hierzu diente das Verfahren nach Kaplan-Meier, wobei als Ereignis gewertet wurde, wenn der Tumor das Grenzvolumen erreicht hat. Wenn ein Tier vorzeitig, d.h. bevor das Zielvolumen erreicht wurde (z.B. aufgrund eines stark verminderten Allgemeinzustandes, deutlich vergrößerter Inguinal-, Zervikal- oder Abdominallymphknoten) oder nach Ablauf von 90 Tagen, aus der Studie genommen werden musste, wurde dieser Fall als „zensiert“ betrachtet. Die Beurteilung der Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen den Behandlungsgruppen erfolgte mit dem Log-Rank-Test. Alle Tests wurden auf dem Signifikanzniveau  $\alpha = 5\%$  durchgeführt. Eine  $\alpha$ -Adjustierung wurde nicht vorgenommen. Aus diesem Grund sind alle angegebenen p-Werte deskriptiv.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Sauerstoffpartialdruckmessung**

##### **3.1.1. Sauerstoffpartialdruckmessungen im Tumorgewebe**

Für die Messung des Einflusses der inspiratorischen O<sub>2</sub>-Fraktion auf den Sauerstoffpartialdruck des Tumors atmeten die Tiere spontan die Gasgemische Raumluft, 8% und 100% Sauerstoff. Anschließend erfolgte die Messung mit Hilfe von O<sub>2</sub>-sensitiven Nadelelektroden, wobei die Tiere während der gesamten Messungen weiterhin das entsprechende Atemgas ventilierten.

Unmittelbar vor Beginn der Messperiode wurde der arterielle Blutgasstatus erhoben. In der Kontrollgruppe (n = 11) betrug der mittlere arterielle pO<sub>2</sub> 78 ± 1 mmHg, der pCO<sub>2</sub> 45 ± 1 mmHg und der pH-Wert 7,45 ± 0,01, der mittlere arterielle Blutdruck (MABP) betrug 141 ± 1 mmHg. Eine Sauerstoffatmung (n = 12) führte zu einer deutlichen Zunahme des arteriellen pO<sub>2</sub> auf 537 ± 12 mmHg (p ≤ 0,0001) und des MABP auf 158 ± 3 mmHg (p ≤ 0,0001). Eine Hypoxiegasatmung (n = 11) reduzierte hingegen den arteriellen pO<sub>2</sub> auf 42 ± 2 mmHg (p ≤ 0,0001), den arteriellen pCO<sub>2</sub> auf 34 ± 1 mmHg (p ≤ 0,0001) und den mittleren arteriellen Blutdruck auf 97 ± 3 mmHg (p ≤ 0,001, Tab. 2).

	n	MABP [mmHg]	pO <sub>2</sub> [mmHg]	pCO <sub>2</sub> [mmHg]	pH
<b>Hyperoxie</b>	12	158 ± 3	537 ± 12	47 ± 1	7,43 ± 0,01
<b>Hypoxie</b>	11	97 ± 3	42 ± 2	34 ± 1	7,53 ± 0,01
<b>Raumluft</b>	11	141 ± 2	78 ± 1	45 ± 1	7,45 ± 0,01

**Tabelle 2:** Mittlerer arterieller Blutdruck (MABP) sowie O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Partialdruck und pH im arteriellen Blut nach 30 Minuten Atmung des entsprechenden Atemgasgemisches. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n: Anzahl der untersuchten Tiere.

Der mediane Sauerstoffpartialdruck im Tumor lag unter Raumlufbedingungen ( $n = 11$ ) bei  $11,9 \pm 1,8$  mmHg und war statistisch signifikant höher ( $p \leq 0,0001$ ) als bei Hypoxiebeatmung ( $1,6 \pm 0,2$  mmHg). Bei Gabe von 100% Sauerstoff konnte der mediane Tumor- $pO_2$  deutlich gesteigert werden ( $78,8 \pm 4,2$  mmHg) und lag statistisch signifikant höher ( $p \leq 0,0001$ ) als die Werte unter Raumlufbedingungen bzw. bei Hypoxieatmung (Abb. 5).

Schon kleine Tumoren zeigten unter Raumlufbedingungen einen deutlichen Anteil hypoxischer  $pO_2$ -Messwerte  $\leq 5$  mmHg (f (0-5 mmHg)) von  $24 \pm 4\%$ . Durch die Gabe des Hypoxiegases verstärkte sich der  $O_2$ -Mangel deutlich auf  $92 \pm 2\%$ , ( $p \leq 0,0001$ ), wohingegen reine Sauerstoffatmung zu einer statistisch signifikanten verbesserten Oxygenierung führte ( $p \leq 0,0001$ ). Jedoch konnte auch durch eine inspiratorische Hyperoxie die Tumorphoxie nicht vollständig eliminiert werden (Abb. 6). In Tabelle 3 sind die wichtigsten Daten der Tumoroxygenierung zusammengefasst.

	n	Tumorvol. [ml]	Mittelwert $pO_2$ [mmHg]	Median $pO_2$ [mmHg]	f (0-2,5 mmHg) [%]	f (0-5 mmHg) [%]
<b>Hyperoxie</b>	12	$0,79 \pm 0,03$	$97 \pm 6,0$	$79 \pm 4,0$	$5 \pm 1$	$10 \pm 2$
<b>Hypoxie</b>	11	$0,79 \pm 0,02$	$2 \pm 0,3$	$2 \pm 0,2$	$67 \pm 4$	$92 \pm 2$
<b>Raumluf</b>	11	$0,81 \pm 0,04$	$15 \pm 2,0$	$12 \pm 2,0$	$11 \pm 4$	$24 \pm 4$

**Tabelle 3:** Tumoroxygenierung (beschrieben durch Mittelwert und Median des  $pO_2$  sowie durch den Anteil hypoxischer  $pO_2$ -Werte  $\leq 2,5$  mmHg und  $\leq 5$  mmHg) bei Atmung von Gasgemischen mit unterschiedlicher  $O_2$ -Fraktion. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der gemessenen Tumoren

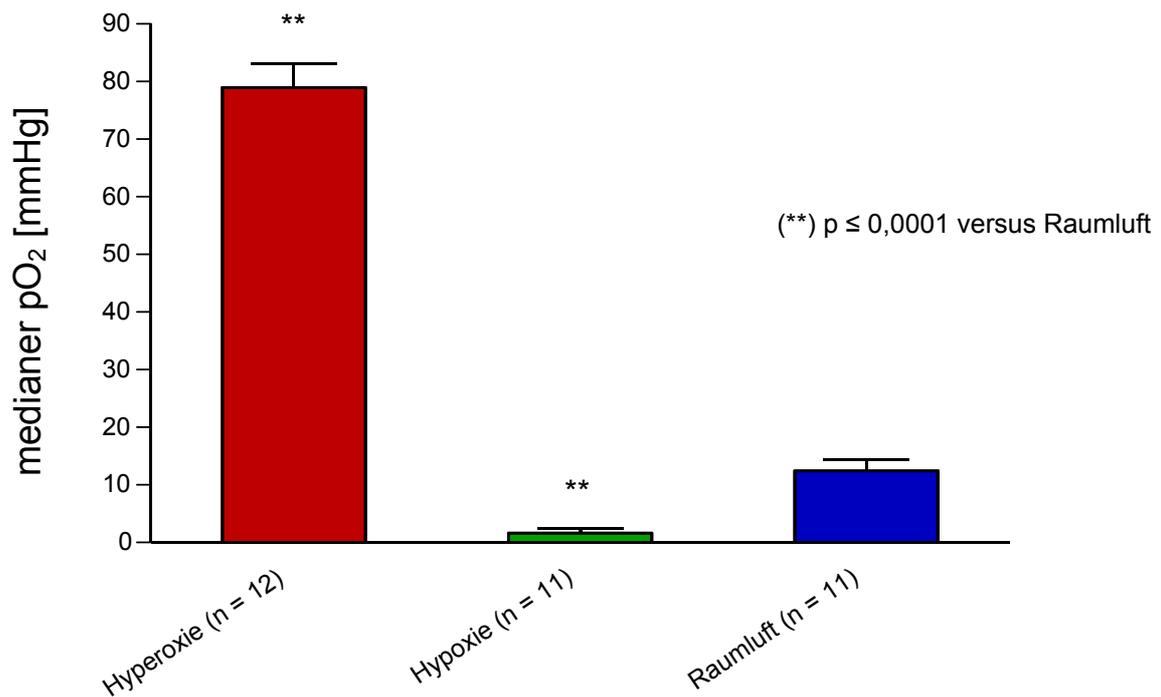


Abb. 5: Abhängigkeit des medianen Sauerstoffpartialdrucks des Tumors von der inspiratorischen Sauerstofffraktion. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren

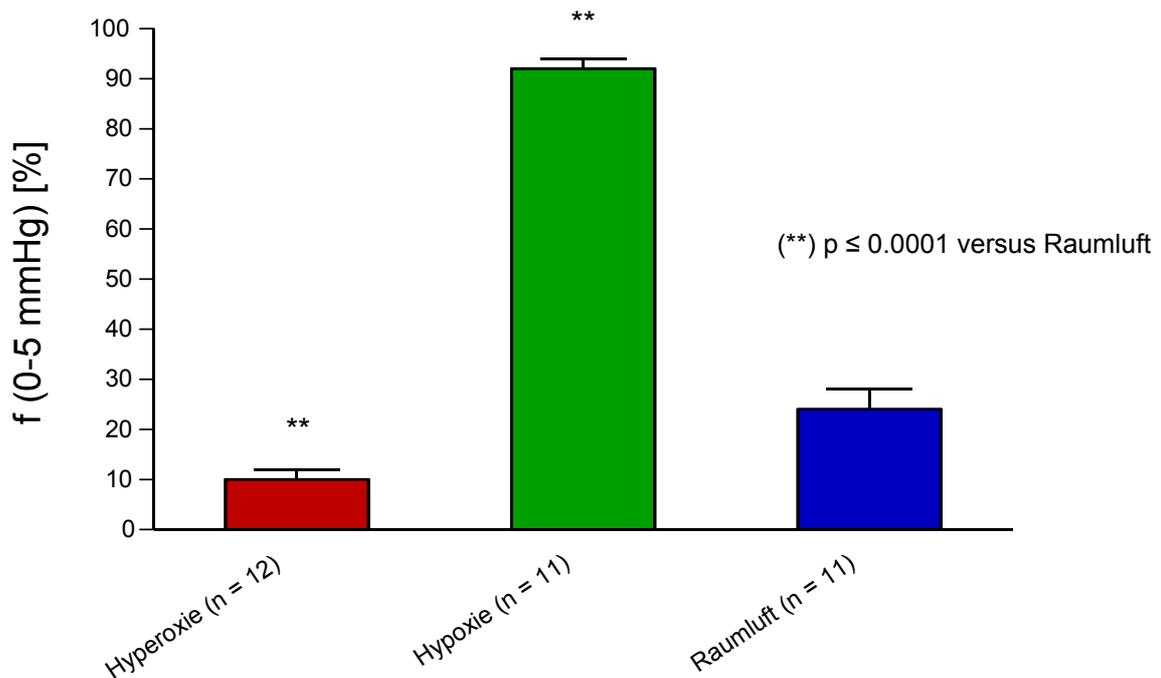
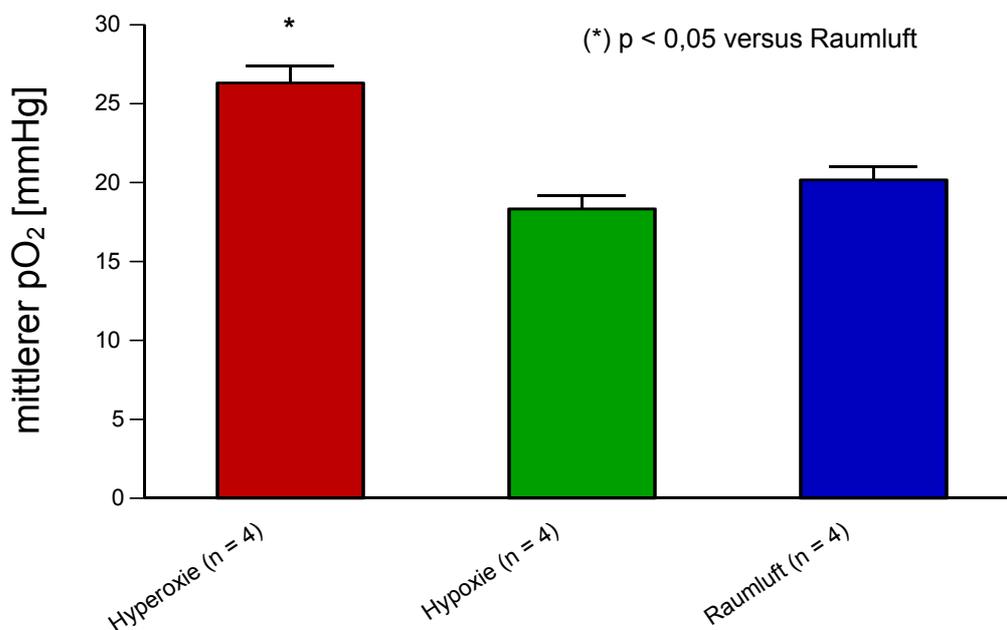


Abb. 6: Abhängigkeit des Anteils hypoxischer pO<sub>2</sub>-Messwerte ≤ 5 mmHg f(0 – 5 mmHg) im Tumor von der inspiratorischen Sauerstofffraktion. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren

### 3.1.2. Sauerstoffpartialdruckmessungen im Lebergewebe

Die Messung der Leberoxygenierung in Abhängigkeit von der inspiratorischen Sauerstofffraktion erfolgte polarographisch mittels O<sub>2</sub>-sensitiven Elektroden. Unter Raumlufbedingungen (n = 4) betrug der mittlere pO<sub>2</sub> im Lebergewebe 20 ± 0,8 mmHg (Abb. 7). In Folge der Hypoxiegas-Atmung (n = 4) sank der pO<sub>2</sub> in den ersten 6-7 Minuten auf ca. 13 mmHg und stieg danach langsam wieder an, bis er nach ca. 12 Minuten konstant bei 18 ± 0,8 mmHg lag. Durch die inspiratorische Hyperoxie (n = 4) stieg der mittlere pO<sub>2</sub> langsam an und erreichte nach ca. 6 Minuten einen konstanten Wert von 26 ± 1 mmHg. Dieser Anstieg war statistisch signifikant im Vergleich zur Raumlufatmung (p = 0,0304) und zur Hypoxiegasatmung (p = 0,0304). Die vorliegenden Daten zeigen, dass durch Reduktion der inspiratorischen Sauerstofffraktion die Leberoxygenierung nur geringfügig beeinflusst wird, eine Erhöhung des arteriellen pO<sub>2</sub> zu einer mäßigen Verbesserung des O<sub>2</sub>-Status der Leber führt.

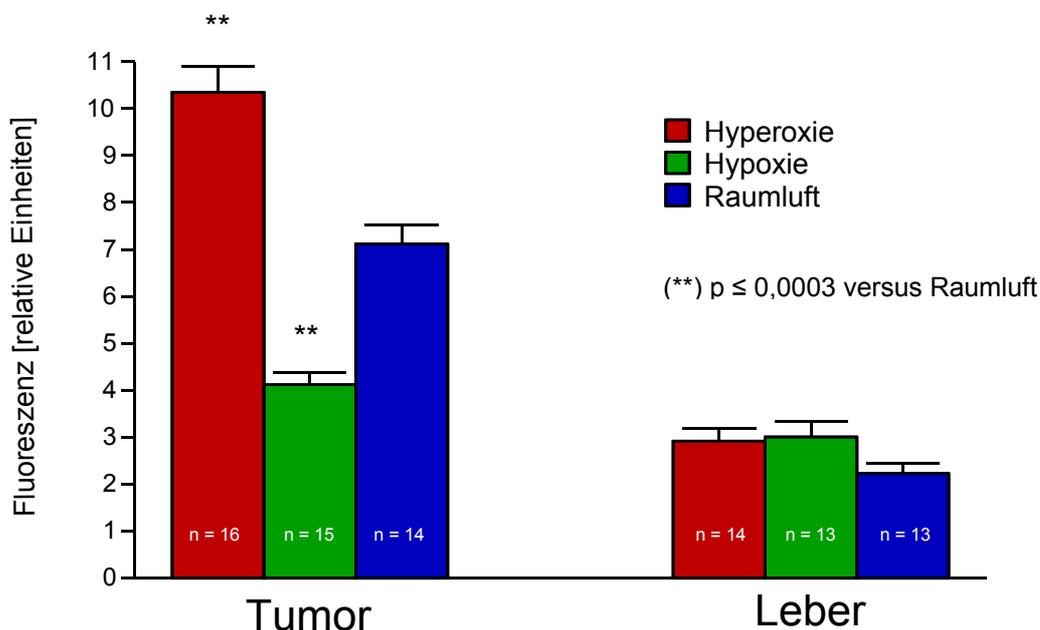


**Abb. 7:** Abhängigkeit des mittleren Sauerstoffpartialdrucks der Leber von der inspiratorischen Sauerstofffraktion. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tiere

### 3.2. Messung der durch Protoporphyrin IX induzierten Fluoreszenz in Leber- und Tumorzellen

Drei Stunden nach 5-ALA-Applikation wurden die Tumoren exzidiert und die Lebern entnommen und zu einer Einzelzellsuspension aufgearbeitet. Die Messung der Fluoreszenz von PPIX erfolgte durchflusszytometrisch.

Im Tumor konnte eine erhöhte PPIX-Konzentration bei Atmung des hyperoxischen Gasgemischs beobachtet werden (Abb. 8). Durch Hyperoxiebeatmung stieg die Fluoreszenz im Vergleich zur Raumluft um 30% ( $p = 0,0003$ ) an, wohingegen durch Atmung des Hypoxiegases die Fluoreszenz um 50% im Vergleich zur Raumluft sank ( $p = 0,0001$ ). In der Leber konnte kein Einfluss der verschiedenen Atemgase auf eine gesteigerte bzw. verminderte Anreicherung von PPIX beobachtet werden. In allen drei Gruppen lag die Fluoreszenzintensität in der gleichen Größenordnung.



**Abb. 8:** Durch Protoporphyrin IX induzierte Fluoreszenz in Tumor- und Leberzellen in Abhängigkeit von der inspiratorischen Sauerstofffraktion. Die Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die zelluläre PPIX-Konzentration. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren bzw. Lebern

Vergleicht man die Fluoreszenz zwischen Leber und Tumor, findet man eine deutlich stärkere Anreicherung in den Tumoren. Bei Gabe von 100% Sauerstoff ergibt sich eine etwa fünffach und bei Raumluft eine etwa dreieinhalbfach höhere Konzentration im Tumor. Diese Ergebnisse zeigen, dass Tumorzellen des DS-Sarkoms in der Lage sind, unter *in-vivo*-Bedingungen 5-ALA in die Zelle aufzunehmen und es zu Protoporphyrin IX, das maßgeblich für die Effektivität der 5-ALA-PDT mitverantwortlich ist, zu metabolisieren. Ferner zeigen die Messergebnisse, dass die Anreicherung von PPIX durch die zusätzliche Gabe von O<sub>2</sub> deutlich gesteigert werden kann.

### **3.3. Tumorwachstum nach der Photodynamischen Therapie in Abhängigkeit von der inspiratorischen Sauerstofffraktion**

Nach der PDT-Behandlung wurde bei allen Tieren täglich das Tumorwachstum protokolliert bis zu einem Volumen von 3,5 ml oder maximal über einen Zeitraum von 90 Tagen. Für die Auswertung des Wachstumsverhaltens wurde das Verfahren nach Kaplan-Meier eingesetzt, wobei die Wahrscheinlichkeit berechnet wurde, dass ein Tumor noch nicht ein Volumen von 3,5 ml erreicht hat. Tiere, die aus anderen Gründen vorzeitig aus der Studie genommen werden mussten (z.B. reduzierter Allgemeinzustand) wurden als „zensierte“ Fälle betrachtet. Eine Wahrscheinlichkeit von 0 ist so zu interpretieren, dass alle Tumoren dieser Versuchsgruppe das Volumen von 3,5 ml erreicht haben.

Tumoren von unbehandelten Tieren (n = 10), d.h. die Tiere, die keiner PDT-Behandlung unterzogen wurden, erreichten nach vier bis sechs Tagen ein Volumen von 3,5 ml. (Abb. 9). In der Gruppe, die mit PDT unter Raumluftbedingungen behandelt wurden (n = 18), konnte bei 3 Tieren eine lokale Tumorkontrolle über mindestens 90 Tage erreicht werden (Abb. 9). Ferner wurde bei den behandelten Tieren eine Wachstumsverzögerung des Tumors beobachtet, die durch eine Rechtsverschiebung der Kaplan-Meier-Kurve im Anfangsbereich des Beobachtungszeitraums sichtbar wird.

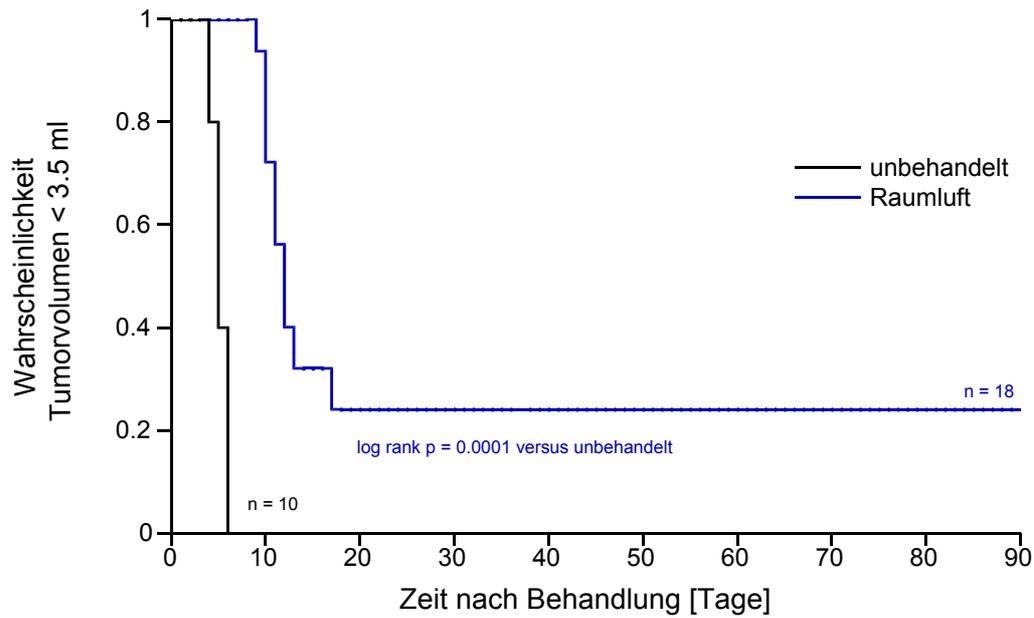


Abb. 9: Tumorwachstum nach der 5-ALA-PDT unter Raumlufatmung verglichen mit unbehandelten Tieren; n = Anzahl der Tumoren

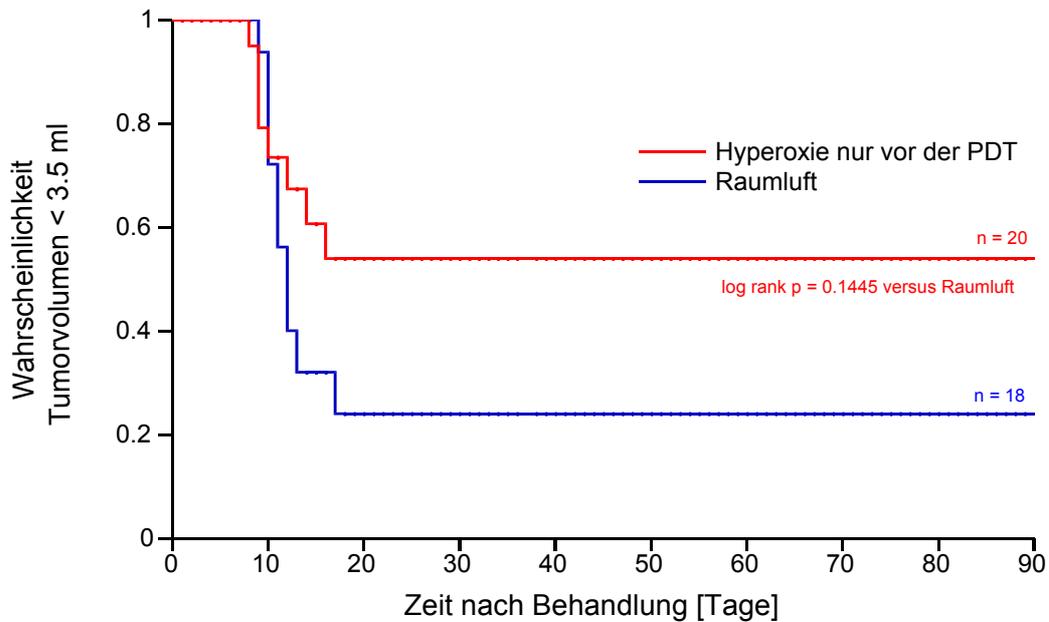


Abb. 10: Einfluss inspiratorischer Hyperoxie zwischen 5-ALA Applikation und der Bestrahlung auf das Tumorwachstum nach der 5-ALA-PDT im Vergleich zu Raumlufatmung; n = Anzahl der Tumoren

Im Vergleich zur Raumlufthgruppe zeigten die Tiere, die während der Zeit zwischen der 5-ALA-Applikation und Bestrahlung Hyperoxiegas atmeten ( $n = 21$ ) und der daraus resultierenden höheren Anreicherung von Protoporphyrin IX, eine Wahrscheinlichkeit von 54%, das Kriterium Tumolvolumen  $> 3,5$  ml nicht zu erreichen (Abb. 10). Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant ( $p = 0.1445$ ), zeigte aber eine Tendenz der höheren Effektivität der 5-ALA-PDT durch inspiratorische Hyperoxie für die Zeit zwischen Applikation und Bestrahlung.

Die beiden Behandlungsgruppen, die während der Bestrahlung ( $n = 20$ ) bzw. 3 Stunden vor und während der Bestrahlung Hyperoxiegas ( $n = 19$ ) atmeten, zeigten den stärksten antitumoralen Effekt. Die Wahrscheinlichkeit, dass Tumoren nicht das Grenzvolumen von 3,5 ml erreichten, betrug hier 70% bzw. 71% und war statistisch signifikant gegenüber Raumlufatmung ( $p = 0,0042$  bzw.  $p = 0,0133$ , Abb. 11). Ferner ist die Kaplan-Meier-Kurve im Anfangsbereich des Beobachtungszeitraums nach rechts verschoben, was eine stärkere Wachstumsverzögerung des Tumors nach der Bestrahlung bedeutet. Bei einem Tier der Gruppe „Hyperoxie während der Bestrahlung“ trat am 45. Tag nach Behandlung ein lokales Rezidiv auf, das jedoch ein deutlich langsames Tumorwachstum zeigte als der Primärtumor, so dass ein Volumen von 3,5 ml erst am 67. Tag erreicht wurde. Tiere, die während der Bestrahlung reinen Sauerstoff atmeten, zeigten am ersten Tag nach der Behandlung eine stärkere Volumenzunahme des behandelten Tumors im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen. In Tabelle 4 sind die Tumorumina zum Zeitpunkt der Behandlung und an den ersten vier Tagen danach wiedergegeben.

Bei den drei Tiergruppen, die Hypoxiegas atmeten, konnte keine statistisch signifikante Beeinflussung der lokalen Tumorkontrolle im Vergleich zu den Tieren, die Raumlufatmeten, beobachtet werden (Abb. 12). Die Wahrscheinlichkeiten, nicht das Volumen von 3,5 ml zu erreichen, betrug für Tiere, die Hypoxiegas für 3 Stunden vor der Bestrahlung atmeten ( $n = 19$ ), 30%, die Hypoxiegas während der PDT ( $n = 17$ ) atmeten, 33% und die Hypoxiegas vor und während der Bestrahlung ( $n = 17$ ) atmeten, 25%. Ferner zeigten alle Kurven annähernd den gleichen Verlauf, besonders im Anfangsbereich des Beobachtungszeitraums.

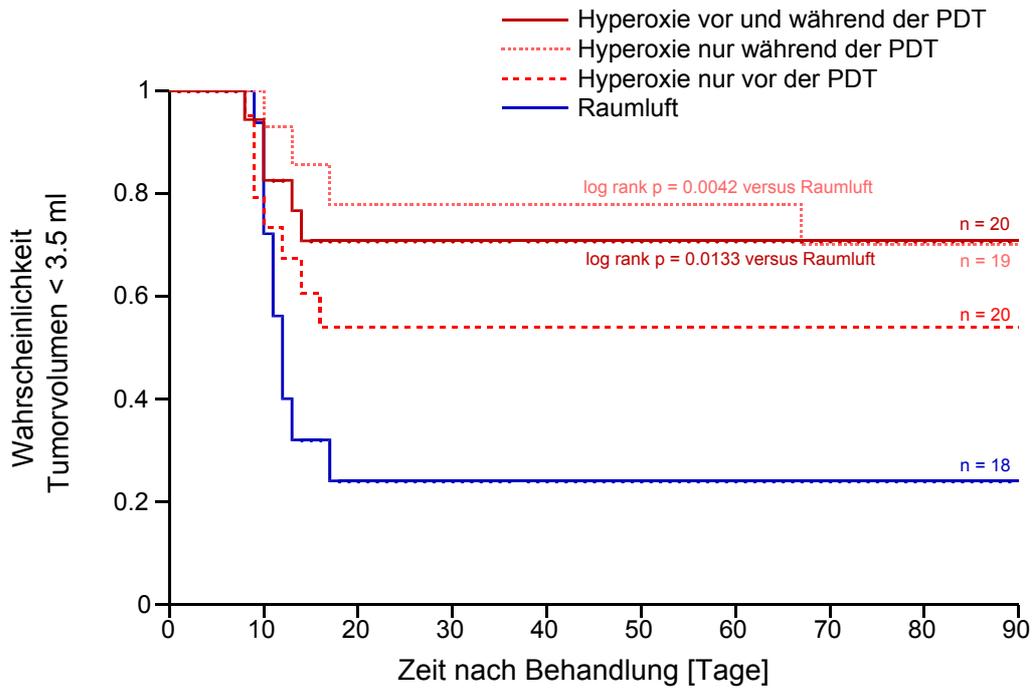


Abb. 11: Einfluss inspiratorischer Hyperoxie auf das Tumorwachstum nach der 5-ALA-PDT verglichen mit Raumlufatmung und inspiratorischer Hyperoxie zwischen 5-ALA Applikation und der Bestrahlung; n = Anzahl der Tumoren

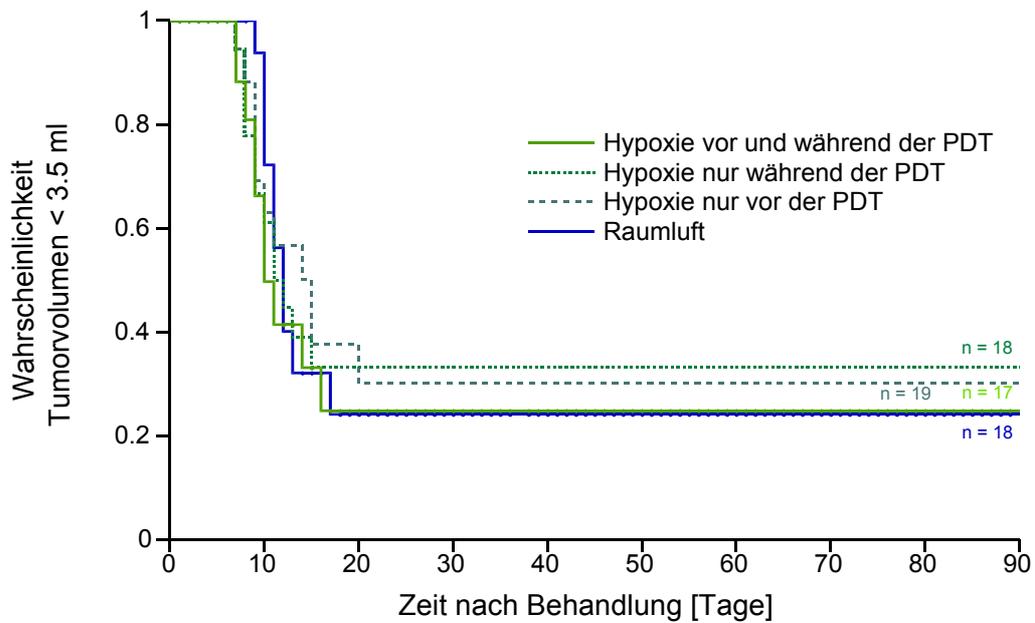


Abb. 12: Einfluss inspiratorischer Hypoxie auf das Tumorwachstum nach der 5-ALA-PDT verglichen mit Raumlufatmung; n = Anzahl der Tumoren

Alle Tiere, die über 90 Tage beobachtet wurden, zeigten am Ende der Beobachtungszeit makroskopisch kein sichtbares Tumorwachstum mehr und galten somit als geheilt. Einige Tage nach der Behandlung bildete sich eine Kruste an der behandelten Stelle, die dann spätestens nach 16 Tagen abfiel und unter Bildung einer Narbe abheilte. Ferner konnte kein phototoxischer Effekt an der normalen Haut beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass durch die zusätzliche Gabe von Sauerstoff für die Zeit zwischen 5-ALA-Applikation und Bestrahlung eine Steigerung der Effektivität der Photodynamischen Therapie möglich ist. Eine noch stärkere Hemmung des Tumorwachstums und zusätzliche Steigerung der Therapieeffektivität kann durch die Gabe von Sauerstoff während der Bestrahlung erreicht werden, wohin gegen durch die Atmung eines hypoxischen Gasgemisches zu den verschiedenen Behandlungszeitpunkten die Behandlungseffektivität nicht beeinflusst wurde.

	n	Tag der Behandlung	1. Tag nach Behandlung	2. Tag nach Behandlung	3. Tag nach Behandlung	4. Tag nach Behandlung
<b>Kontrolle (ohne Behandlung)</b>	10	0,73 ± 0,03	1,11 ± 0,05	1,68 ± 0,12	2,52 ± 0,13	3,18 ± 0,19
<b>Hyperoxie vor und während der PDT</b>	20	0,69 ± 0,02	1,49 ± 0,04	1,27 ± 0,05	1,03 ± 0,04	0,63 ± 0,09
<b>Hyperoxie nur vor der PDT</b>	20	0,68 ± 0,02	1,36 ± 0,04	1,23 ± 0,05	1,11 ± 0,05	0,97 ± 0,05
<b>Hyperoxie nur während der PDT</b>	19	0,68 ± 0,02	1,53 ± 0,04	1,38 ± 0,05	1,09 ± 0,06	1,02 ± 0,06
<b>Hypoxie vor und während der PDT</b>	17	0,65 ± 0,02	1,34 ± 0,06	0,99 ± 0,05	1,17 ± 0,06	1,04 ± 0,08
<b>Hypoxie nur vor der PDT</b>	19	0,66 ± 0,02	1,36 ± 0,05	1,14 ± 0,04	0,98 ± 0,06	0,84 ± 0,07
<b>Hypoxie nur während der PDT</b>	18	0,66 ± 0,02	1,37 ± 0,05	1,15 ± 0,05	1,13 ± 0,06	1,09 ± 0,07
<b>Raumluft</b>	18	0,65 ± 0,02	1,32 ± 0,04	1,17 ± 0,05	1,11 ± 0,07	0,94 ± 0,04

**Tabelle 4:** Mittelwerte und Standardfehler der Tumorumfänge [ml] zum Zeitpunkt der Behandlung und in den ersten vier Tagen nach Behandlung in Abhängigkeit von der inspiratorischen Sauerstofffraktion; n = Anzahl der behandelten Tumoren

### 3.4. Parameter des Tumorstoffwechsels (ATP, ADP und AMP, Laktat, Glukose)

Die Messungen der Parameter des Tumorstoffwechsels erfolgte 3 Stunden nach der 5-ALA Applikation bzw. unmittelbar nach der PDT-Behandlung. Die Adenosintriphosphat-Konzentration lag drei Stunden nach der 5-ALA-Applikation und Atmung der entsprechenden Gasmische zwischen  $0,64 \pm 0,08$  und  $0,77 \pm 0,14$   $\mu\text{mol/g}$  (Abb. 13). Infolge der Bestrahlung sank sie in allen Gruppen statistisch signifikant ab ( $p < 0,0001$ ) und lag zwischen  $0,22 \pm 0,02$  und  $0,29 \pm 0,04$   $\mu\text{mol/g}$  (Abb. 14), es zeigten sich keine statistischen Unterschiede zwischen den sieben Tiergruppen.

Die ADP-Konzentrationen zeigten drei Stunden nach der 5-ALA-Applikation mit  $0,15 \pm 0,01$   $\mu\text{mol/g}$  die geringste Konzentration in der Hypoxiegruppe, in der Gruppe, die Hyperoxiegas atmeten, die höchste Konzentration mit  $0,23 \pm 0,03$   $\mu\text{mol/g}$  (Abb. 15), nach der Bestrahlung lagen sie in allen Gruppen zwischen  $0,12 \pm 0,01$  und  $0,15 \pm 0,03$   $\mu\text{mol/g}$  (Abb. 15). Die Verringerung der Konzentration war in den drei Hyperoxiegruppen und der Tiergruppe, die ausschließlich Hypoxiegas atmeten, statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der sieben Gruppen beobachtet werden konnten (Abb. 16).

Die Konzentrationen für AMP drei Stunden nach der 5-ALA-Applikation lagen in den vier Gruppen in einem Bereich von  $0,03 \pm 0,01$  bis  $0,05 \pm 0,01$   $\mu\text{mol/g}$  (Abb. 17). Nach der Bestrahlung stiegen die Konzentrationen von AMP in allen Gruppen statistisch signifikant an ( $p < 0,005$ , Abb. 18). In den drei Tiergruppen, die Hyperoxiegas atmeten, lagen diese bei  $0,1 \pm 0,1$   $\mu\text{mol/g}$ . Den höchsten Gehalt an AMP mit  $0,13 \pm 0,01$   $\mu\text{mol/g}$  zeigten die Tiere, die während der Bestrahlung Hypoxiegas atmeten. Die Energieladung (EC) lag in allen vier unbehandelten Gruppen im Bereich  $0,85 \pm 0,02$  (Abb. 19). Infolge der Bestrahlung sank diese in allen Gruppen statistisch signifikant ab ( $p < 0,001$ ) und lag zwischen  $0,55 \pm 0,03$  und  $0,68 \pm 0,04$  (Abb. 20).

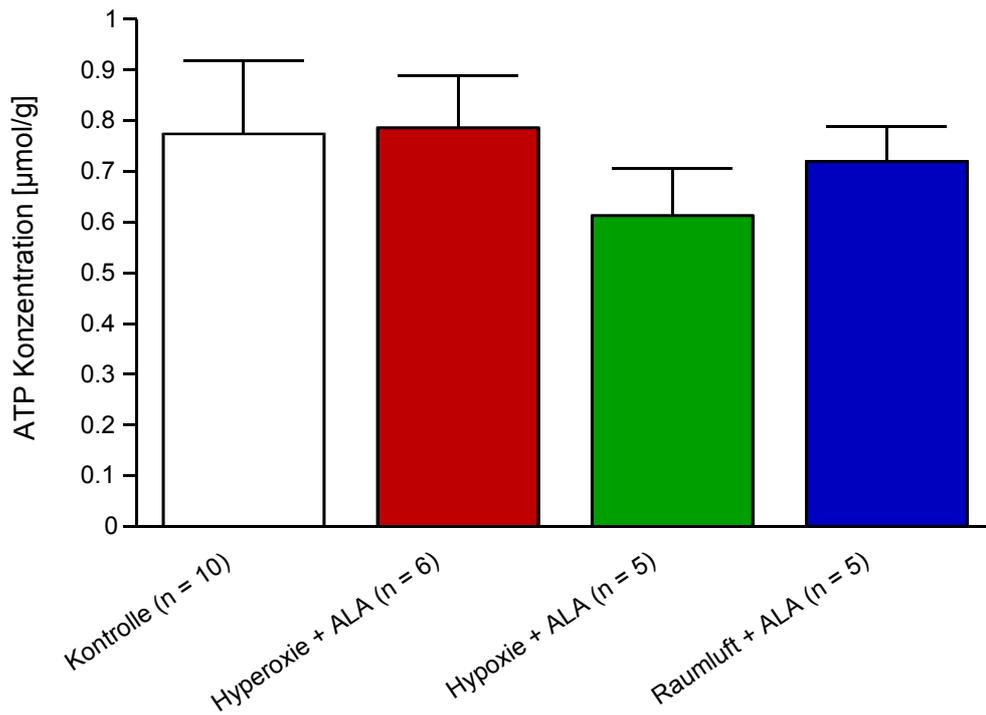


Abb. 13: ATP-Konzentration am Ende der 3-stündigen 5-ALA-Inkubation (vor PDT-Behandlung) in Abhängigkeit des inspiratorischen Gasgemisches und in unbehandelten Kontrollen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren

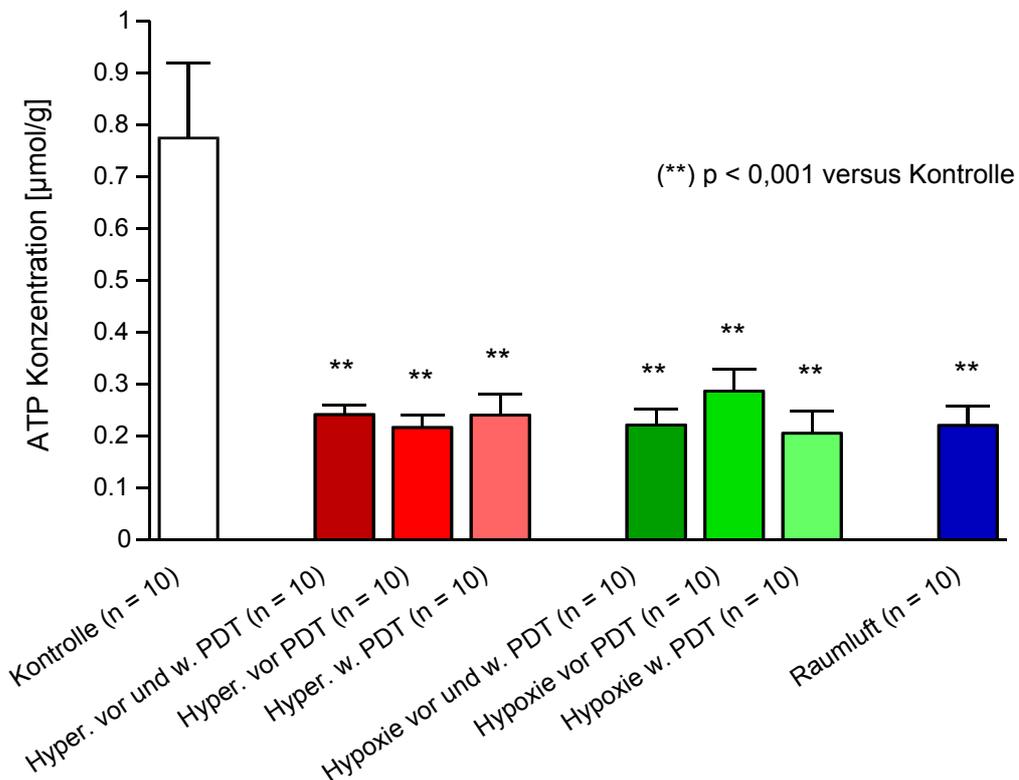


Abb. 14: ATP-Konzentration am Ende der 5-ALA-PDT-Behandlung in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren

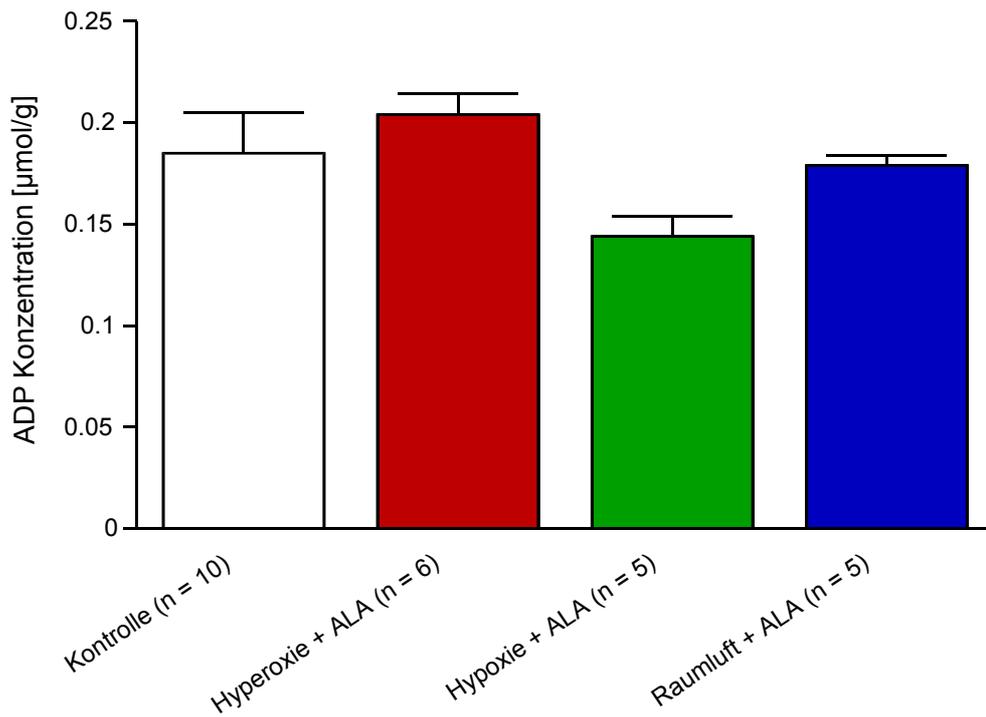


Abb. 15: ADP-Konzentration am Ende der 3-stündigen 5-ALA-Inkubation (vor PDT-Behandlung) in Abhängigkeit des inspiratorischen Gasgemisches und in unbehandelten Kontrollen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren

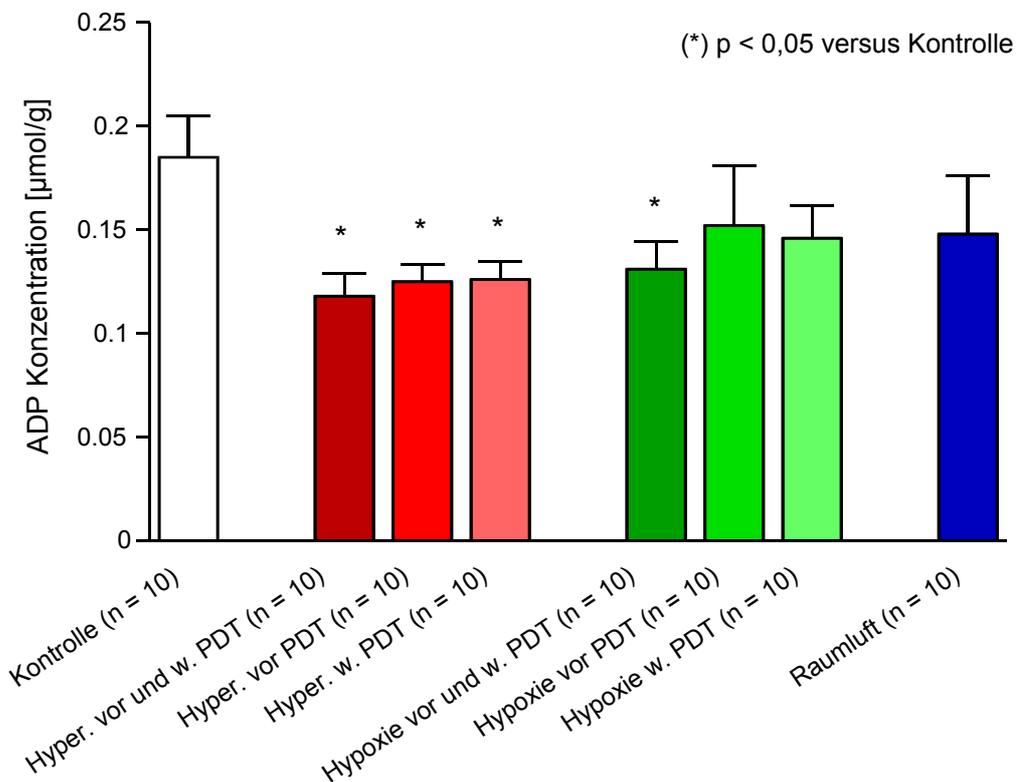


Abb. 16: ADP-Konzentration am Ende der 5-ALA-PDT-Behandlung in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren

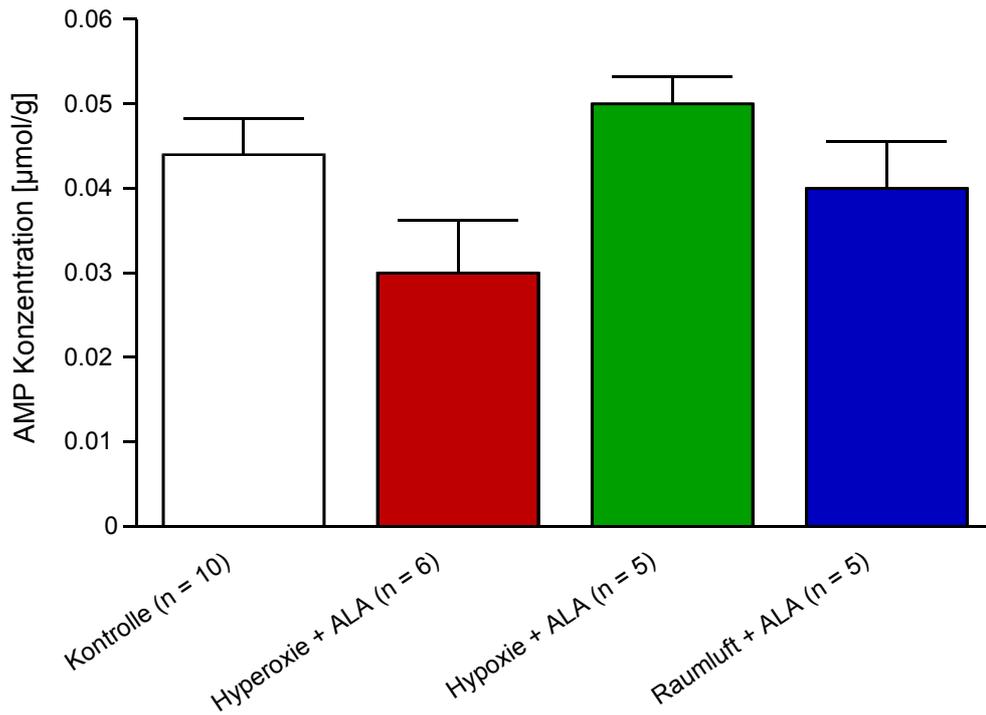


Abb. 17: AMP-Konzentration am Ende der 3-stündigen 5-ALA-Inkubation (vor PDT-Behandlung) in Abhängigkeit des inspiratorischen Gasgemisches und in unbehandelten Kontrollen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren

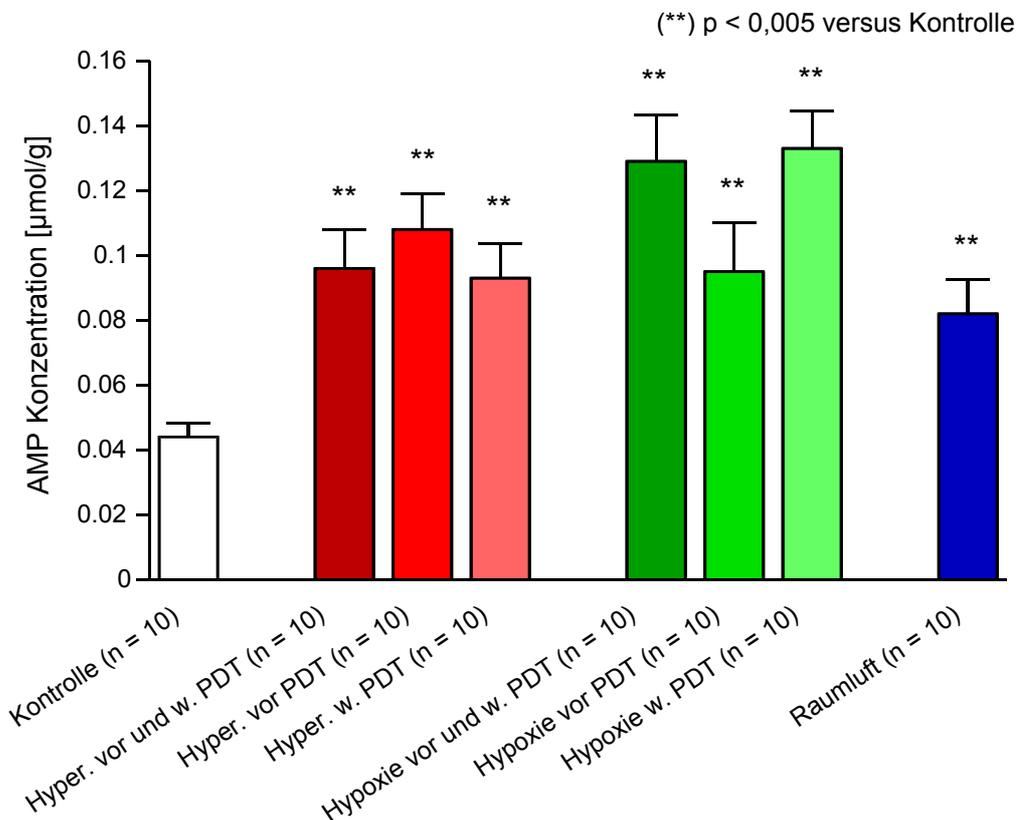
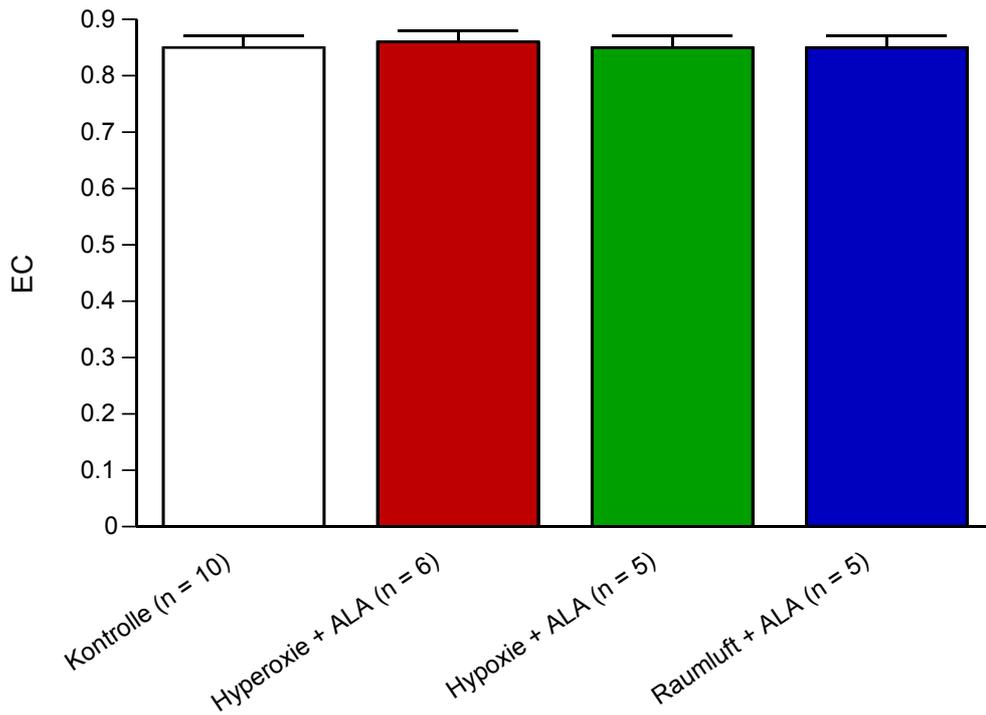
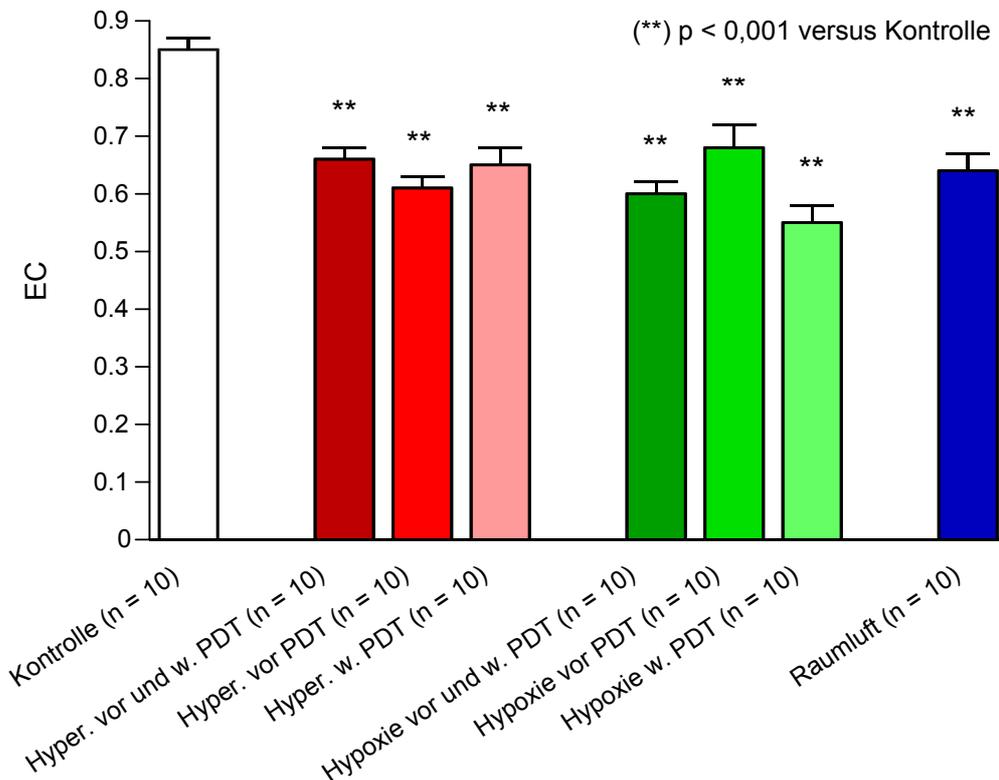


Abb. 18: AMP-Konzentration am Ende der 5-ALA-PDT-Behandlung in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren



**Abb. 19:** Energieladung (EC) am Ende der 3-stündigen 5-ALA-Inkubation (vor PDT-Behandlung) in Abhängigkeit des inspiratorischen Gasmisches und in unbehandelten Kontrollen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren



**Abb. 20:** Energieladung (EC) am Ende der 5-ALA-PDT-Behandlung in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren

Die Tumor-Laktatkonzentration am Ende der 5-ALA-Inkubation (vor der PDT-Behandlung) zeigte eine Abhängigkeit von dem angebotenen Atemgas, wobei sie in der Hypoxiegasgruppe mit  $14,7 \pm 1,33 \mu\text{mol/g}$  statistisch signifikant höher war ( $p = 0,013$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $10,8 \pm 0,62 \mu\text{mol/g}$ ). In der Hyperoxiegasgruppe lag diese mit  $8,85 \pm 1,12 \mu\text{mol/g}$  am niedrigsten (Abb. 21).

Infolge der Bestrahlung für 80 min stieg die Laktatkonzentration in allen sieben Gruppen an (Abb. 22). Dieser Anstieg war in allen Gruppen außer in der, die Hypoxiegas nur vor der Bestrahlung atmete, statistisch signifikant ( $p < 0,005$ , bei Raumluftatmung  $p = 0,048$ ). In den drei Hyperoxiegasgruppen lagen sie im Bereich von  $16 \mu\text{mol/g}$ . Die Tiere, die Hypoxiegas vor und während der PDT atmeten, wiesen mit  $20,8 \pm 2,33 \mu\text{mol/g}$  die höchste Laktatkonzentration auf und zeigten eine statistisch signifikant höhere Konzentration zu den Tiergruppen, die sich nur vor der Bestrahlung für drei Stunden unter hypoxischen Bedingungen aufhielten ( $p = 0,011$ ).

Die Glukosekonzentration im Tumorgewebe am Ende der 3-stündigen 5-ALA-Inkubation (vor der PDT-Behandlung) zeigte in den Tiergruppen, die Hyperoxiegas ( $1,58 \pm 0,07 \mu\text{mol/g}$ ) bzw. Raumluft ( $1,52 \pm 0,14 \mu\text{mol/g}$ ) atmeten, keinen Unterschied zu unbehandelten Kontrolltieren ( $1,50 \pm 0,1 \mu\text{mol/g}$ ), wohingegen die Konzentration im Tumor unter Hypoxiebedingungen geringfügig auf  $1,28 \pm 0,08 \mu\text{mol/g}$  sank (Abb. 23).

Nach der PDT-Behandlung stieg die Glukosekonzentration in den drei Gruppen, die Hyperoxiegas bzw. ausschließlich Raumluft atmeten, an, wobei die Konzentration mit  $2,1 \mu\text{mol/g}$  in diesen Gruppen annähernd gleich war und keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen diesen Gruppen beobachtet werden konnten (Abb. 24). Die Gruppe, denen Hypoxiegas vor und während der Bestrahlung zugeführt wurde, zeigte mit  $1,33 \pm 0,2 \mu\text{mol/g}$  eine statistisch signifikant niedrigere Konzentration im Vergleich zu den Gruppen, die ausschließlich Raumluft ( $2,08 \pm 0,17 \mu\text{mol/g}$ ,  $p = 0,0276$ ), Hypoxiegas ( $2,21 \pm 0,3 \mu\text{mol/g}$ ,  $p = 0,0443$ ) bzw. Hyperoxiegas ( $2,15 \pm 0,22 \mu\text{mol/g}$ ,  $p = 0,0111$ ) für 3 Stunden vor der Bestrahlung atmeten. Der Anstieg der Glukosekonzentrationen nach der Bestrahlung verglichen mit der Kontrollgruppe war bei den Gruppen Raumluft ( $p = 0,0142$ ), Hypoxie vor Behandlung ( $p = 0,0376$ ) und Hyperoxie vor Behandlung ( $p = 0,0207$ ) statistisch signifikant.

(\*) p = 0,013 versus Kontrolle

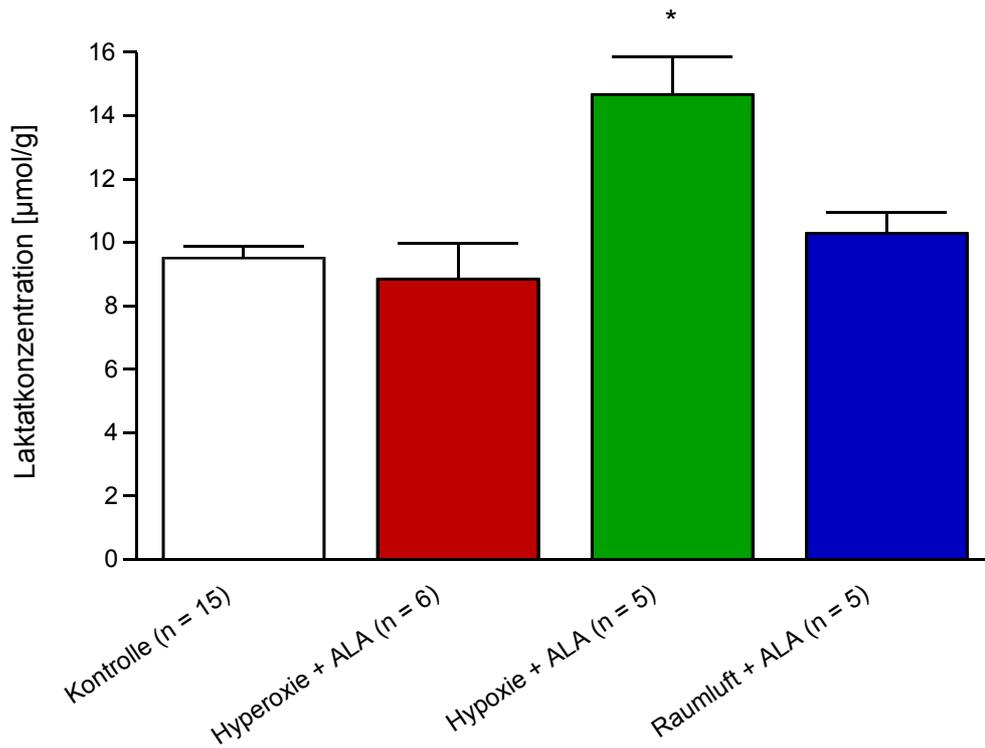


Abb. 21: Laktatkonzentration am Ende der 3-stündigen 5-ALA-Inkubation (vor PDT-Behandlung) in Abhängigkeit des inspiratorischen Gasmisches und in unbehandelten Kontrollen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren

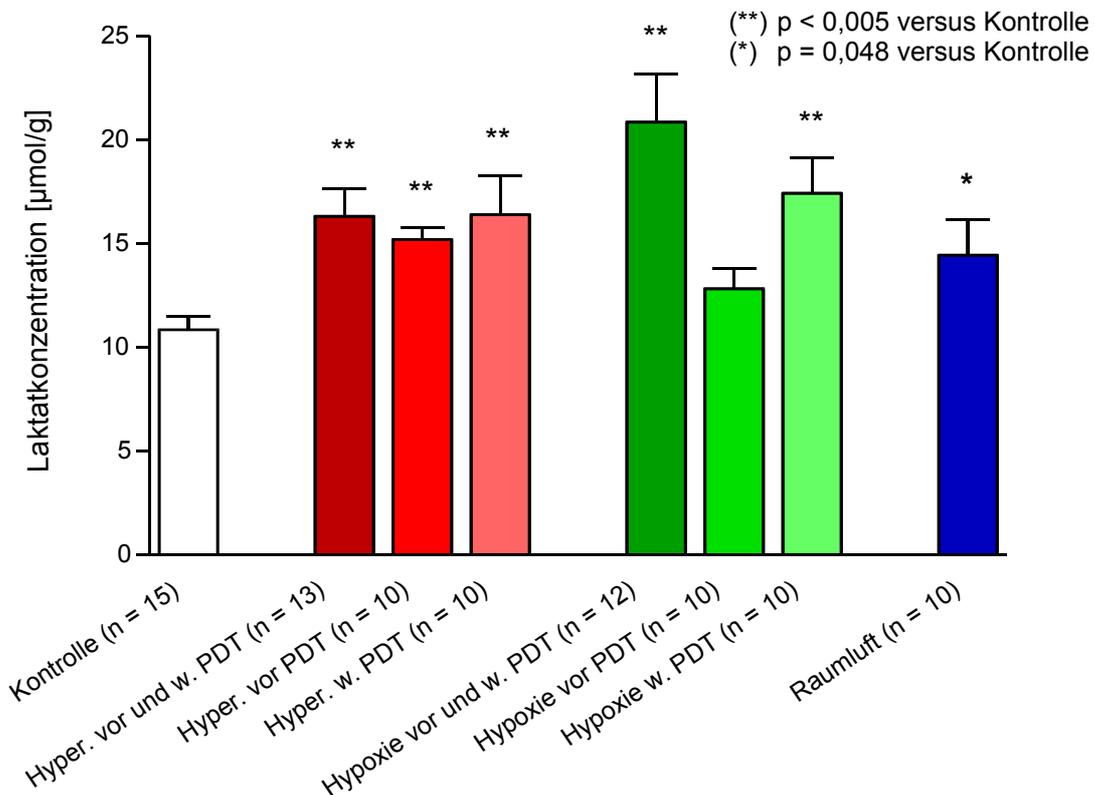
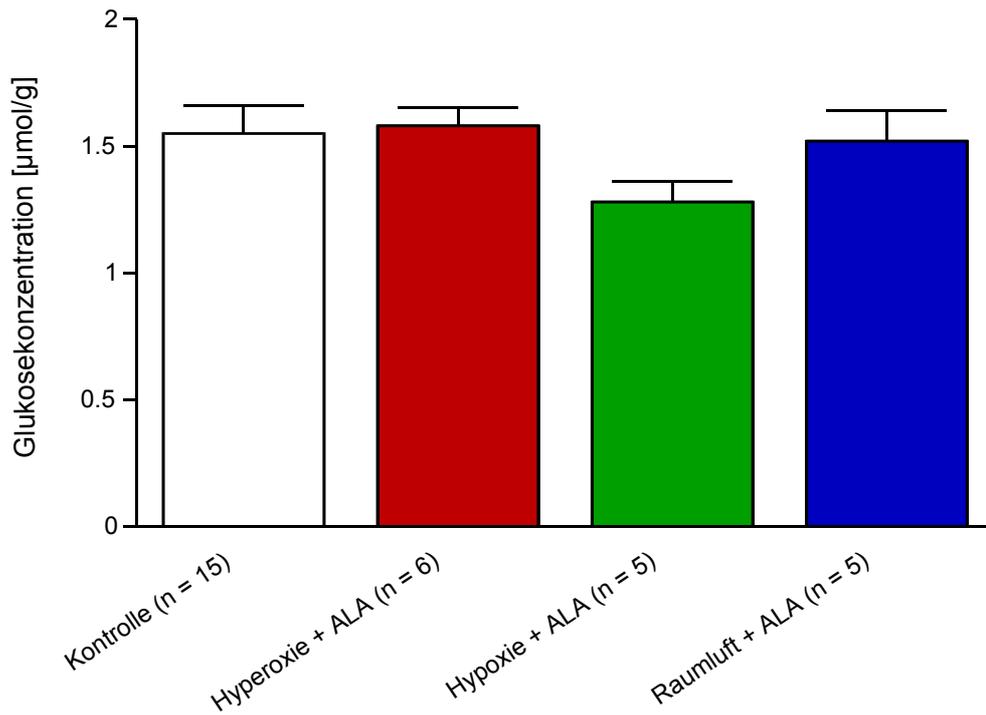
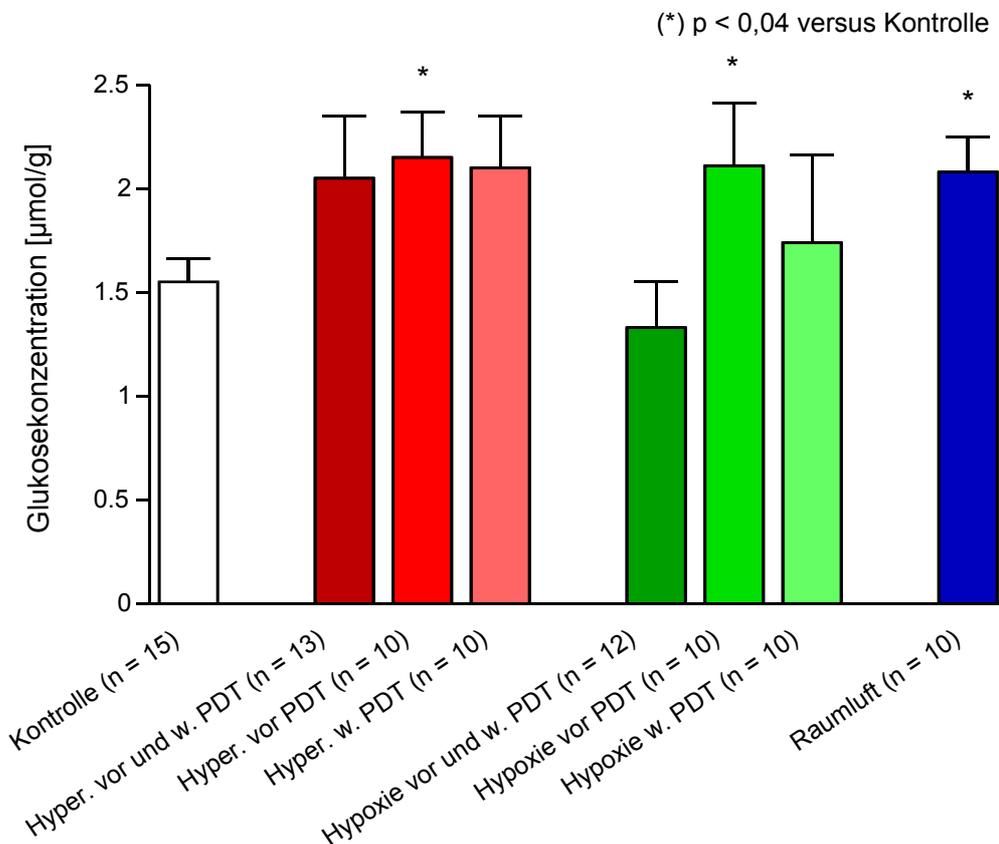


Abb. 22: Laktatkonzentrationen am Ende der 5-ALA-PDT-Behandlung in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren



**Abb. 23:** Glukosekonzentration am Ende der 3-stündigen 5-ALA-Inkubation (vor PDT-Behandlung) in Abhängigkeit des inspiratorischen Gasgemisches und in unbehandelten Kontrollen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren

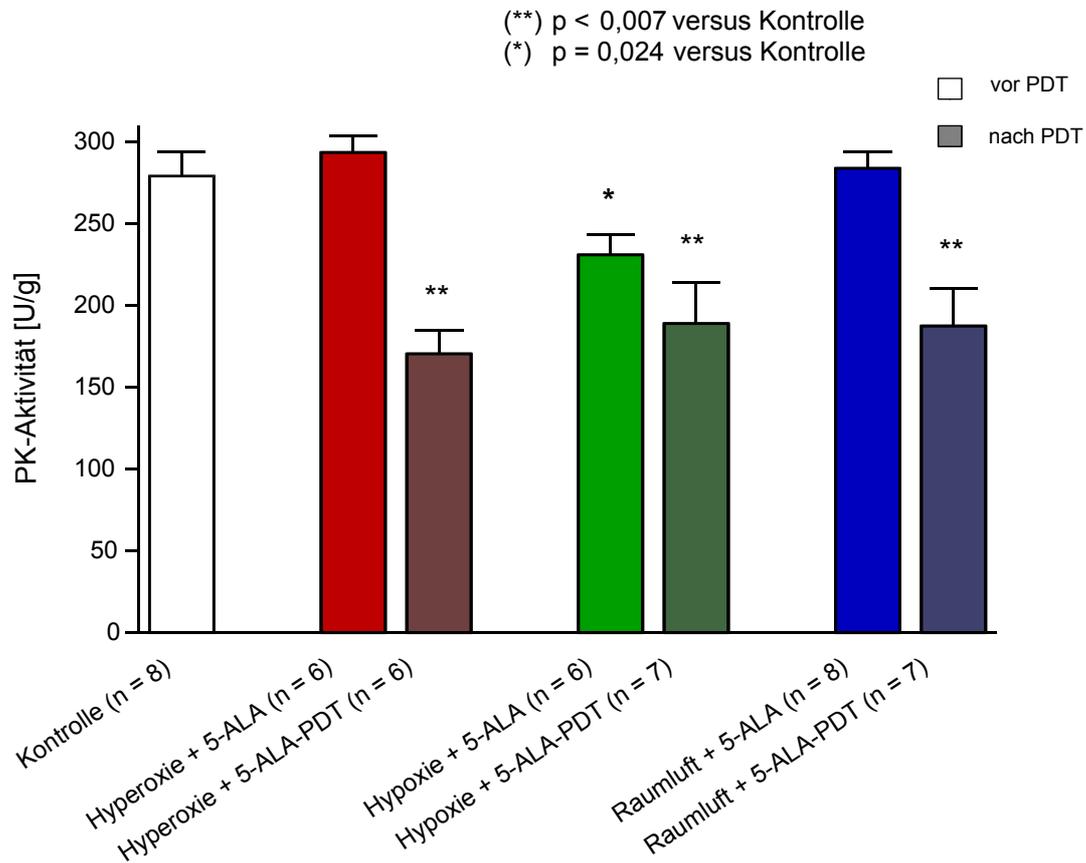


**Abb. 24:** Glukosekonzentrationen am Ende der 5-ALA-PDT-Behandlung in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren

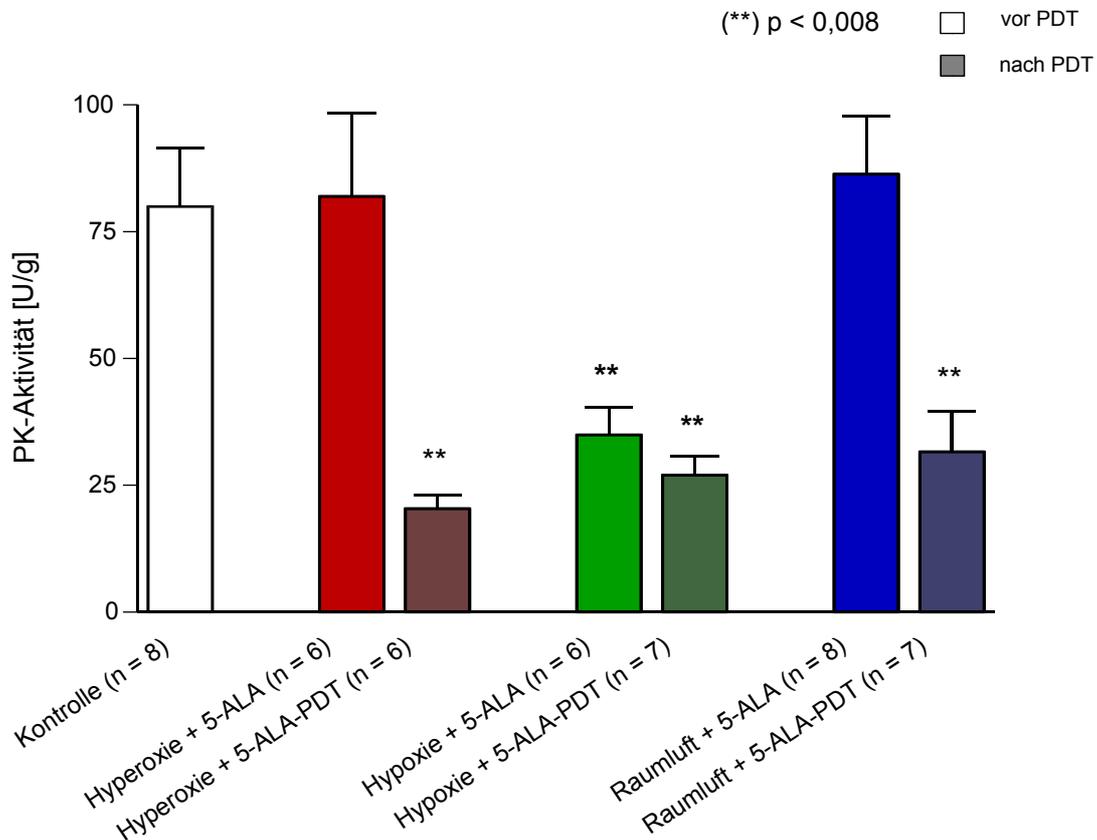
### 3.5. Zytosolische Enzyme Pyruvatkinase, Laktatdehydrogenase und Nukleosiddiphosphat-Kinase

Die Messungen der Enzymaktivität erfolgte drei Stunden nach 5-ALA-Inkubation unter den entsprechenden Atemgasgemischen bzw. unmittelbar nach der Behandlung. Die Tiergruppe, die vor der PDT 3 Stunden Hypoxiegas atmete, zeigte mit  $231 \pm 12$  U/g die geringste  $V_{\max}$ -Aktivität der Pyruvatkinase (PK) bei hohen Posphoenolpyruvat-Konzentrationen (2 mM, Abb. 25), die statistisch signifikant niedriger lag als die Aktivität der Kontrollgruppe ( $p = 0,0239$ ). In den anderen Gruppen lag die Aktivität zwischen  $279 \pm 14$  U/g und  $293 \pm 10$  U/g. Nach der PDT-Behandlung sank die Aktivität in allen Gruppen statistisch signifikant ab, wobei der Abfall in der Tiergruppe, die Hyperoxiegas atmeten, am größten war ( $170 \pm 14$  U/g,  $p = 0,0024$ ). Die Aktivität der Pyruvatkinase bei physiologischen PEP-Konzentrationen (0,2 mM, Abb. 26) sank statistisch signifikant durch eine inspiratorische Hypoxie vor der PDT auf  $35 \pm 5$  U/g ( $p = 0,0081$ ) verglichen mit der Kontrollgruppe. In den anderen Gruppen lag die Aktivität zwischen  $80 \pm 11$  U/g und  $86 \pm 11$  U/g lag (Abb. 26). Nach der 5-ALA-PDT sank die Aktivität der PK in allen Tiergruppen statistisch signifikant ( $p < 0,002$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ab. Die Laktatdehydrogenase-Aktivität drei Stunden nach der 5-ALA Applikation lag in allen vier Gruppen zwischen  $210 \pm 16$  U/g und  $218 \pm 9$  U/g (Abb. 27). Die Behandlung führte in allen Gruppen zu einer leichten Abnahme der Aktivität, die jedoch nicht statistisch signifikant war.

In allen vier Gruppen lag die Aktivität der Nukleosiddiphosphat-Kinase (NDPK) 3 Stunden nach der 5-ALA-Applikation (vor der PDT-Behandlung) zwischen  $165 \pm 3$  U/g und  $180 \pm 10$  U/g (Abb. 28). Die PDT-Behandlung führte in allen Gruppen zu einer signifikanten Abnahme der Aktivität ( $p \leq 0,047$ , Abb. 28).



**Abb. 25:**  $V_{max}$ -Aktivität (gemessen bei 2,0 mM PEP) der Pyruvatkinase am Ende der 3-stündigen 5-ALA-Inkubationsperiode vor PDT und nach Ende der 5-ALA-PDT-Behandlung in Abhängigkeit des inspiratorischen Gasgemisches. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren



**Abb. 26:** Aktivität der Pyruvatkinase bei physiologischer PEP-Konzentration (0,2 mM PEP) am Ende der 3-stündigen 5-ALA-Inkubationsperiode vor PDT und nach Ende der 5-ALA-PDT-Behandlung in Abhängigkeit des inspiratorischen Gasgemisches. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren

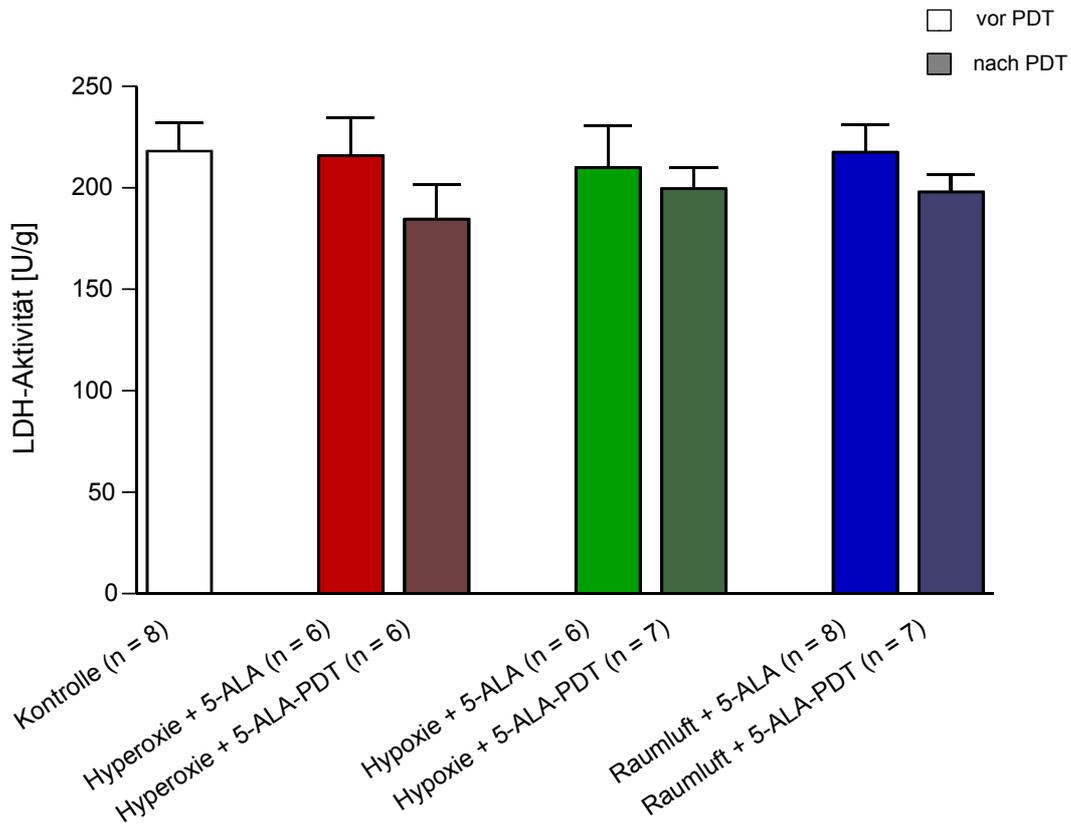


Abb. 27: Aktivität der Laktatdehydrogenase am Ende der 3-stündigen 5-ALA-Inkubationsperiode vor PDT und nach Ende der 5-ALA-PDT-Behandlung in Abhängigkeit des inspiratorischen Gasgemisches. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren

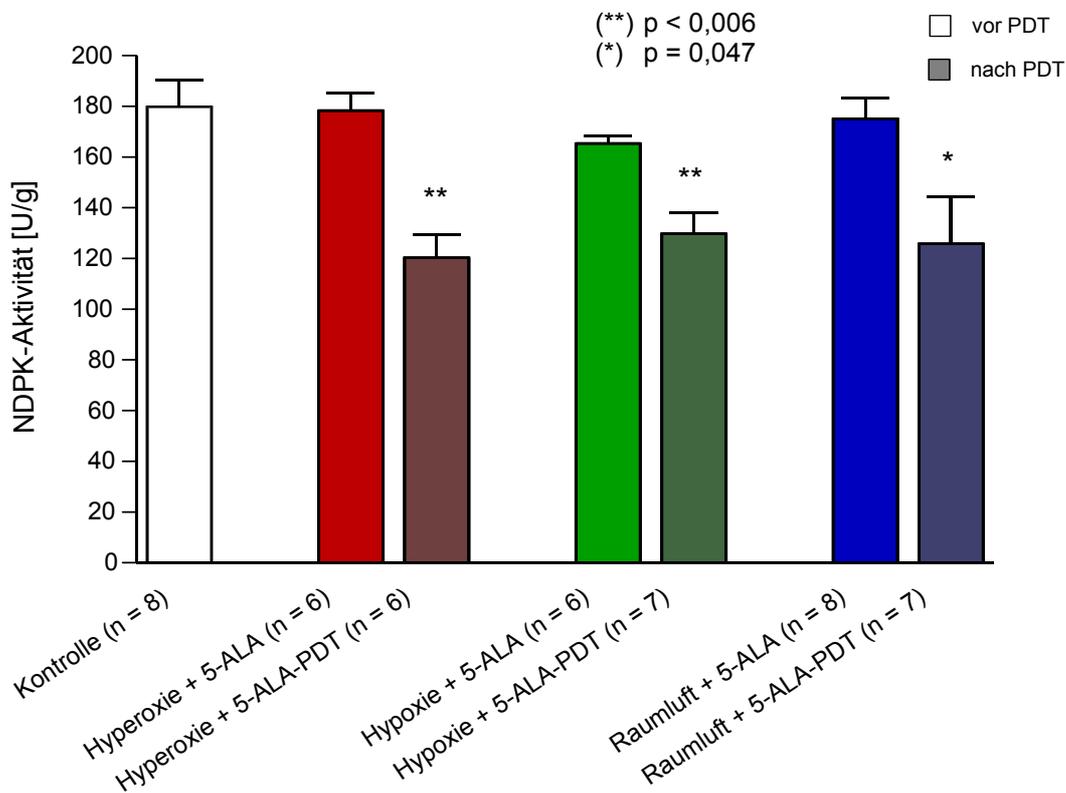


Abb. 28: Aktivität der Nucleosiddiphosphat-Kinase am Ende der 3-stündigen 5-ALA-Inkubationsperiode vor PDT und nach Ende der 5-ALA-PDT-Behandlung in Abhängigkeit des inspiratorischen Gasgemisches. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler; n = Anzahl der untersuchten Tumoren

## **4. Diskussion**

Die Photodynamische Therapie stellt ein neuartiges minimal invasives Therapieverfahren dar, welches das Prinzip der selektiven, lichtinduzierten Gewebedestruktion von Malignomen nutzt. Hierzu wird vor der Therapie eine photoaktive Substanz bzw. wie in dieser Studie in Form von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), eine Vorstufe des Photosensitisers, appliziert, die sich in maligne transformierten Geweben in einer höheren Konzentration als in Normalgewebe anreichert. Die nachfolgende lokale Lichtbestrahlung führt durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zu einem zytotoxischen Effekt. Infolge früherer Studien ist bekannt, dass diese Therapieform sauerstoffabhängig ist und dass evtl. auch die Aufnahme bzw. die Metabolisierung von 5-ALA  $O_2$ -abhängig sein könnte [Fuchs und Thiele 1998, Henderson und Fingar 1987, 1989, Wyld *et al.* 1998].

Ein limitierender Faktor dieser Therapie könnte somit die Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes darstellen, die sich stark von der des Normalgewebes unterscheidet. Während im Normalgewebe kaum hypoxische Areale auftreten, ist die Hypoxie ein typisches Merkmal lokal fortgeschrittener solider Tumoren, die sich mit dem Wachstum des Malignoms noch weiter verstärkt [Vaupel 1974, Vaupel *et al.* 1994]. Klinische Studien belegen das Vorkommen hypoxischer bzw. anoxischer Gewebeareale in etwa 30-60% der humanen Tumoren [Höckel *et al.* 1999, Höckel und Vaupel 2001, Vaupel *et al.* 1989a].

Der Sauerstoffpartialdruck im Tumor resultiert aus dem Verhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch des Gewebes. Das Sauerstoffangebot wird durch die Mikrozirkulation, die oft strukturelle Defizite der Gefäße und funktionelle Störungen aufweist [Vaupel *et al.* 1989a] und vom  $O_2$ -Gehalt des Blutes, der vom  $pO_2$  der Atemluft abhängt, bestimmt [Dewhirst *et al.* 1996].

5-Aminolävulinsäure ist ein Vorläuferprodukt von Häm im körpereigenen Stoffwechsel der Säuger. 5-ALA selbst stellt keine photoaktive Substanz dar, sondern muss erst in den Zellen zu Protoporphyrin IX metabolisiert werden. Durch die exogene Zufuhr von 5-ALA umgeht man den die Protoporphyrinsynthese begrenzenden ersten Reaktionsschritt, die Kondensation von Glycin und Succinyl-CoA zu 5-ALA, im Hämstoffwechsel. Die Produktion endogener Porphyrine, die normalerweise durch ein negatives Feedback über die freie Hämkonzentration

geregelt ist, kann folglich ungehemmt und rasch ablaufen. Protoporphyrin IX wird als vorletztes Glied der Kette nur relativ langsam durch die Einlagerung von Eisen in Häm umgewandelt, und es kommt daher zu einer starken Anreicherung im Tumorgewebe [Peng *et al.* 1997a]. Eine Verbesserung der Tumoroxygenierung könnte die Anreicherung von PPIX in Tumorzellen verstärken und die Effektivität der PDT steigern.

In der vorliegenden Studie wurde daher an einem Tumormodell systematisch untersucht, in wieweit durch Modulation der inspiratorischen Sauerstofffraktion die Tumoroxygenierung beeinflusst werden kann, welche Folgen dies auf die Anreicherung von PPIX in Tumor- und Leberzellen und welche Auswirkungen dies für die Effektivität der Photodynamischen Therapie hat. Ferner wurden Untersuchungen metabolischer Parameter und stoffwechselrelevanter Enzyme des Tumors vor und nach der Therapie durchgeführt.

#### **4.1. Diskussion der PDT und der Methodik**

##### **4.1.1. PDT**

Der Vorteil der Photodynamischen Therapie liegt darin, dass diese durch die selektive Anreicherung des Photosensitisers im Tumorgewebe und die direkte Bestrahlung des Malignoms mit Licht einer bestimmten Wellenlänge ein minimal-invasives Verfahren darstellt. Die PDT kann vor, nach oder zusätzlich mit anderen Standardtherapien wie Chirurgie, Radio- oder Chemotherapie kombiniert werden ohne bekannte Kontraindikationen [Wilson 2002]. Die selektive Anreicherung der photoaktiven Substanz im Tumorgewebe führt nur zu einer geringen Schädigung des Normalgewebes und so zu einer guten Heilungsrate. Weiterhin kann die PDT für den gleichen Tumor wiederholt angewandt werden, auch in Kombination mit einer Radio- oder Chemotherapie, ohne eine Resistenz des Tumors bzw. eine Hypersensitivität des Normalgewebes zu induzieren [Hornung *et al.* 1998]. Die unerwünschten Wirkungen der Photodynamischen Therapie sind minimal. Der Photosensitizer kann zu einer Photosensibilität der Haut führen, weshalb sich Patienten nach der Therapie vor Tageslicht schützen müssen. Diese Photosensibilität der Haut gegenüber

Tageslicht kann bei Einsatz von Photofrin als Sensitizer mehrere Wochen betragen. Durch die Entwicklung neuer Sensitizer wie z.B. 5-ALA konnte diese unerwünschte Wirkung umgangen werden, da 5-ALA innerhalb von 24 Stunden metabolisiert wird [Dougherty *et al.* 1998]. Durch Auswahl des Sensitive, der Art der Applikation (lokal oder systemisch) und dem Zeitintervall zwischen Applikation und der Bestrahlung können Tumore gezielter behandelt und die Therapie für jeden Patienten individuell gestaltet werden.

Die Nachteile der Photodynamischen Therapie liegen darin, dass nur kleine Tumore behandelt werden können. Aufgrund der Wellenlänge des Lichtes, die für die Aktivierung des Photosensitizers notwendig ist, beträgt die Eindringtiefe 5 bis 10 mm und begrenzt so die Größe der therapierbaren Tumore. Jedoch kann die geringe Eindringtiefe von Vorteil sein, nämlich bei der Behandlung von Karzinomen der Harnblase und des Magen-Darm-Trakts. In solchen Fällen verwendet man grünes Licht (kürzere Wellenlänge) wodurch die Eindringtiefe noch verringert wird [Nseyo *et al.* 1993]. Um größere Tumore behandeln zu können, wurden interstitielle Lichtverteiler entwickelt, bei denen im Tumor mehrere optische Fasern platziert werden und das Licht so tiefer gelegene Tumorzellen erreichen kann. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass die Wahl des Photosensitizers, der Bestrahlungsdauer und der Lichtdosis sowie das Intervall zwischen Photosensitizer-Applikation von Patient zu Patient bzw. Malignom zu Malignom stark variieren kann und so standardisierte Therapieprotokolle nicht immer zum optimalen Therapieeffekt führen.

#### 4.1.2. Methodik

In der vorliegenden Studie diente ein Infrarot-A-Strahler (IRA-Strahler, siehe Kapitel 2.5., Abb. 4) als Lichtquelle. Die Anschaffungskosten dieses Strahles sind im Vergleich zu einem Laser wesentlich geringer. Das Spektrum des IRA-Strahlers liegt zwischen 400 und 800 nm, so dass auf Grund des Absorptionsspektrums von Protoporphyrin IX (siehe Abb. 1) es zu einer optimalen Aktivierung des Sensitive kommt. Weiterhin kann nach Entfernung des Hochpass-Filters die 5-ALA-PDT mit einer lokalen Hyperthermie kombiniert werden, was experimentell bereits untersucht wurde [Kelleher *et al.* 2003].

Der Nachteil einer solchen Bestrahlungsquelle besteht darin, dass die Lichtdosis in der Peripherie des bestrahlten Tumors geringer als im Zentrum ist. Dies kann zu einer nicht optimalen Behandlung der Tumorgrenzen führen. Ferner können im Vergleich zu einem Laser nur leicht zugängliche Tumore behandelt werden.

In der vorliegenden Studie wurde die Therapie fraktioniert durchgeführt. Der Wechsel zwischen der Beleuchtungs- und der Dunkelphase wurde gewählt, um die Ergebnisse dieser Studie mit der 5-ALA-PDT in Kombination mit einer lokalen Hyperthermie, welche ebenfalls am hiesigen Institut durchgeführt wird, vergleichen zu können. Für die Hyperthermie ist dieser Wechsel zwischen den beiden Phasen unbedingt notwendig, um die Tumortemperatur konstant bei 43° C halten zu können. Studien haben dabei belegt, dass sich die Effektivität der PDT bei einer kontinuierlichen Bestrahlung nicht von der einer fraktionierten unterscheidet [Kelleher *et al.* 2003]. Energiedichte, Flussrate und Bestrahlungsdauer sowie die Dosis von 5-ALA wurden durch Voruntersuchungen als die mit dem größten antitumoralen Effekt bei einer geringen Toxizität ermittelt.

Die Tumoroxygenierung wurde durch die Atmung von 100% O<sub>2</sub> gesteigert. Wenn Sauerstoff in höheren Konzentrationen geatmet wird als sie in der atmosphärischen Luft vorkommt, ist der Sauerstoff als Medikament zu betrachten. Wie bei jedem Medikament gibt es auch bei der Sauerstoffatmung in höheren Konzentrationen, oder besser mit einem erhöhten Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>), die Möglichkeit von Nebenwirkungen für den menschlichen Organismus. Die Inzidenz dieser Nebenwirkungen hängt generell vom eingeatmeten pO<sub>2</sub> und von der Expositionsdauer ab. Die aktuellen Hypothesen zu den Ursachen toxischer Sauerstoffeffekte beruhen im Wesentlichen auf den Wirkungen entstehender freier Sauerstoffradikale, die zur Zerstörung von Sulfhydrylbindungen in organischen Molekülen führen, zur Peroxidation von Lipiden in Zellmembranen und zur Blockierung der Synthese von Neurotransmittern wie GABA, Dopamin, Decarboxylase oder Glutathiondecarboxylase [Camporesi 1996]. Bei atmosphärischem Luftdruck (100 kPa) führt die Atmung von Sauerstoff in Konzentrationen über 50% (pO<sub>2</sub> 50 kPa) zu Veränderungen im Lungengewebe mit Verschlechterungen verschiedener Lungenfunktionsparameter. Dieser Effekt wurde zuerst von J. L. Smith [1899] beschrieben und wird seit dem allgemein als "Lorraine-Smith-Effekt" bezeichnet. Nach Atmung von 100% Sauerstoff bei atmosphärischem

Luftdruck über 24 Stunden reduziert sich die Vitalkapazität (VC) auf 90% des Ausgangswertes, die Compliance der Lunge ( $C_L$ ) reduziert sich nach 30 bis 48 Stunden auf ca. 70% des Normalwerts. Darüber hinaus kommt es zu einer deutlichen Reduktion von Ventilationsgrenzwerten (MVV = maximum voluntary ventilation), zu einer Reduktion der Kohlenmonoxyd-Diffusionskapazität ( $D_{CO}$ ), zu einer Reduktion des pulmonalen Surfactant-Faktors sowie subjektiv zu atemabhängigem retrosternalen Brustschmerz und in bildgebenden Untersuchungsverfahren zur Darstellung von Bereichen fleckiger Atelektasen. Alle genannten Effekte treten dabei mit einer großen interindividuellen und intraindividuellen Variabilität auf. Auf Grund der Atmung von 100%  $O_2$  für 80 bzw. 260 Minuten in der vorliegenden Studie ist jedoch nicht von einer Schädigung der Lunge auszugehen.

## 4.2. Diskussion der Messergebnisse

### 4.2.1. Sauerstoffpartialdruckmessung

#### 4.2.1.1. Messung der Tumoroxygenierung

Die Sauerstoffversorgung des Tumors wird einerseits vom arteriellen Sauerstoffgehalt (überwiegend abhängig vom arteriellen  $pO_2$  und der Hämoglobinkonzentration) und andererseits von der Gewebedurchblutung bestimmt. Als eine Ursache der Tumorphoxie ist der Abstand der Tumorzellen zu den versorgenden Kapillaren anzusehen, der größer ist als die Diffusionsreichweite von Sauerstoff. Durch Erhöhung des arteriellen  $pO_2$  erreicht man einen größeren Diffusionsradius von Sauerstoff, und somit sollte dies zu einer Verminderung des  $O_2$ -Mangels führen [Gröbe und Vaupel 1988, Secomb *et al.* 1996]. Demgegenüber sollte durch eine inspiratorische Hypoxie mit Verringerung des arteriellen  $pO_2$  die bestehende Tumorphoxie noch verstärkt werden.

Durch die inspiratorische Hyperoxie stieg in der vorliegenden Arbeit der arterielle  $pO_2$  auf über 500 mmHg (unter Raumlufbedingungen lag er im Mittel bei  $78 \pm 1$  mmHg) und stimmt mit den Ergebnissen von Thews *et al.* [2002] überein. Diese Werte entsprechen den Messdaten an Patienten während der Atmung von Carbogen (95%

O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) [Fatigante *et al.* 1994]. Durch Beatmung mit Hypoxiegas mit einer O<sub>2</sub>-Fraktion von 8% lag der pO<sub>2</sub> im Mittel bei 42 mmHg.

Die vorliegende Studie belegt, dass durch Atmung des Hyperoxiegases und Erhöhung des arteriellen pO<sub>2</sub> die Tumoroxygenierung des DS-Sarkoms deutlich verbessert werden konnte aber immer noch hypoxische Areale auftraten (Abb. 5,6). Zu gleichen Ergebnissen kamen Thews *et al.* [2002] für das DS-Sarkom. In dem verwendeten Tumormodell reichte eine Erhöhung des O<sub>2</sub> Anteils in der Atemluft nicht aus, die Tumorphoxie vollständig zu beseitigen. Dies liegt vermutlich in einer unzureichenden Gefäßversorgung bzw. an avaskulären Areale in den einzelnen untersuchten Tumoren begründet. Es muss ferner darauf hingewiesen werden, dass die gemessenen Tumoren individuelle Unterschiede zeigten und der Anstieg des pO<sub>2</sub> stark variierte.

Es konnte bereits in verschiedenen tierexperimentellen und klinischen Studien gezeigt werden [Dewhirst *et al.* 1996, Falk *et al.* 1992, Robinson *et al.* 1997, Thews *et al.* 2002], dass durch eine inspiratorische Hyperoxie die Tumoroxygenierung deutlich verbessert wird. Es wurden aber auch Untersuchungen an Tumorzelllinien durchgeführt, die keine Verbesserung [Brizel *et al.* 1995, Falk *et al.* 1992, Robinson *et al.* 1997] oder sogar eine Verschlechterung der Oxygenierung zeigten [Falk *et al.* 1992, Martin *et al.* 1993]. Robinson *et al.* [1997] beschreibt zwei Tumorzelllinien, bei denen in den ersten fünf Minuten nach der Atmung von Carbogen der pO<sub>2</sub> im Tumor absinkt, sich aber dann wieder verbessert. Die Autoren diskutieren für dieses Phänomen eine verminderte Tumordurchblutung (eventuell aufgrund eines Steal-Phänomens durch eine CO<sub>2</sub>-induzierte Vasodilatation im umgebenden Normalgewebe).

In den Experimenten mit der inspiratorischen Hypoxie kam es durch den arteriellen O<sub>2</sub>-Mangel (arterieller pO<sub>2</sub> = 42 ± 2 mmHg) reflektorisch zu einer Hyperventilation und einer respiratorischen Alkalose, wie es bei einem plötzlichen Höhengaufenthalt zu beobachten ist. Die Tumoroxygenierung verschlechterte sich durch die inspiratorische Hypoxie statistisch signifikant im Vergleich zur Raumluft (medianer pO<sub>2</sub> = 2 ± 0,2 mmHg, Abb. 5).

Ferner kommt es durch eine inspiratorische Hypoxie zu einer kompensatorischen Hypoxie-induzierten systemischen Vasodilatation in verschiedenen Organen und Geweben, was zu einer Senkung des totalen peripheren Widerstands führt und so zu

einem Blutdruckabfall (Tab. 2) und einem sinkenden Blutfluss [Vaupel 1974]. Die deutliche Abnahme der Tumoroxygenierung infolge der inspiratorischen Hypoxie liegt somit einerseits in dem geringeren arteriellen  $pO_2$  und andererseits in dem Abfall des arteriellen Blutdrucks und dem daraus resultierendem reduzierten Blutfluss begründet.

Durch die Gabe von reinem Sauerstoff konnten der Anteil hypoxischer  $pO_2$ -Werte  $\leq 2,5$  mmHg bzw.  $\leq 5$  mmHg deutlich reduziert werden (Abb. 6). Diese hypoxischen Fraktionen sind besonders relevant für sauerstoffabhängige Therapien wie die Radiotherapie, da die Strahlensensibilität gegenüber locker ionisierender Strahlung mit steigendem Gewebe  $pO_2$  steigt [Gray *et al.* 1953, Vaupel *et al.* 1989a]. Verschiedene Studien belegen, dass auch die Effektivität der Photodynamischen Therapie mit einer Verbesserung des Tumor- $O_2$ -Status zunimmt (s. Kapitel 1.2.2.).

Abschließend kann man sagen, dass für dieses Tumormodell eine Hypoxie durch eine Erhöhung des arteriellen  $pO_2$  mittels inspiratorischer Hyperoxie teilweise kompensiert werden kann. Im Gegensatz dazu verschlechtert sich die Tumoroxygenierung deutlich durch die Atmung eines Hypoxiegases.

#### 4.2.1.2. Messung der Leberoxygenierung

Die Durchblutung der Leber erfolgt zu 70-80 % über die Vena portae und zu 20-30 % über die Arteria hepatica [Greenway und Stark 1971]. Die Beziehung zwischen beiden Versorgungssystemen besteht darin, dass sich die Durchblutung über die Arteria hepatica reziprok kompensatorisch gegenüber einer veränderten Durchblutung über die Vena portae ändert [Lautt 1981] mit dem Ziel, die gesamte Leberoxygenierung konstant zu halten [Mathie und Blumgart 1983]. Morphologisch verlaufen in der Leber die Äste der A. hepatica und der V. porta parallel zueinander und versorgen die hepatischen Sinusoide über ihre terminalen Äste mit Mischblut.

Eine inspiratorische Hyperoxie führte zu einem statistisch signifikant höheren mittleren Sauerstoffpartialdruck verglichen mit einer inspiratorischen Hypoxie ( $p = 0,0304$ , Abb. 7) bzw. Raumlufatmung ( $p = 0,0304$ ). Diese gesteigerte Leberoxygenierung ist vermutlich auf den deutlich höheren  $pO_2$  im arteriellen Blut zurückzuführen, aus dem vermutlich auch ein höherer  $pO_2$  der V. portae resultiert. In geringem Maße führt wahrscheinlich auch der erhöhte  $pO_2$  der A. hepatica zu einer

verbesserten Leberoxygenierung. Der  $pO_2$  der Arteria hepatica bzw. Vena portae wurden jedoch nicht untersucht.

Wie bereits oben beschrieben führt eine inspiratorische Hypoxie einerseits zu einer Hyperventilation und einer respiratorischen Alkalose, andererseits zu einer kompensatorischen, systemischen Vasodilatation und so zu einem Abfall des peripheren Widerstandes und einem daraus resultierenden Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Leberoxygenierung verglichen mit Raumlufatmung durch eine inspiratorische Hypoxie nicht statistisch signifikant beeinflusst wird ( $p = 0,1939$ ). Als Grund hierfür sind die kompensatorischen Regelmechanismen wie Erhöhung der Herzfrequenz und damit des Herzzeitvolumens und die systemische Vasodilatation anzusehen.

#### **4.2.2. Messung der durch Protoporphyrin IX induzierten Fluoreszenz in Leber- und Tumorzellen**

Es ist bekannt, dass die Effektivität der PDT mit Hämatoporphyrin-Derivaten (HpD) durch eine Hypoxie stark eingeschränkt werden kann [Busch *et al.* 2000, Fingar *et al.* 1992, Fuchs und Thiele 1998, Henderson und Fingar 1987, 1989, Herzog *et al.* 1994]. 5-Aminolävulinsäure wird als Pro-Drug in der PDT eingesetzt und muss erst von den Tumorzellen durch Enzyme der Häm-Biosynthese in PPIX umgewandelt werden [Tait 1978]. Die Enzyme Coproporphyrinogen- und die Protoporphyrinogen-Oxidase sind sauerstoffabhängig [Poulson und Polglase 1975, Sano und Granick 1961]; die Enzyme Porphobilinogen-Deaminase und die Coproporphyrinogen-Oxidase sind vermutlich die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme bei der Synthese von PPIX [Bottomley und Müller-Eberhard 1988, Ortel *et al.* 1998]. Weiterhin erfolgt die 5-ALA-Aufnahme in die Zelle über einen aktiven Transport, der pH-abhängig ist [Bermudez Moretti *et al.* 1993]. Wenn Succinyl-CoA und Glycin als Substrate für die Häm-Synthese verwendet werden, sinkt unter Hypoxie die Syntheserate von PPIX [Falk *et al.* 1959]. Es ist jedoch nicht bekannt, ob dies auch zutrifft, wenn 5-ALA exogen appliziert wird und so der erste Schritt für die 5-ALA-Synthese umgangen wird [Wyld *et al.* 1998].

Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob die Anreicherung von PPIX tumorspezifisch ist und in wieweit diese Anreicherung von der inspiratorischen

Sauerstofffraktion beeinflusst werden kann. Die vorliegende Studie zeigt, dass DS-Sarkom-Zellen wie auch die Leberzellen der Ratte in der Lage sind, 5-ALA aufzunehmen und dieses in fluoreszierende Substanzen zu metabolisieren, was mit der Studie von Kelleher *et al.* [2003] übereinstimmt. Einige Autoren zeigten bereits die tumorspezifische Anreicherung von PPIX für verschiedene andere Tumorzelllinien [z.B. Peng *et al.* 1993, 1997 a, b, Perotti *et al.* 2002]. Eines dieser fluoreszierenden Produkte stellt das Protoporphyrin IX dar, welches maßgeblich für den photodynamischen Effekt der 5-ALA-PDT verantwortlich ist [Wyld *et al.* 1998]. Besonders im Hinblick auf die Gefahr einer Hautirritation durch Tageslicht nach der Applikation von 5-ALA wäre ein Vergleich der PPIX-Anreicherung in Tumorzellen und normaler Haut geeigneter gewesen. Jedoch war die mechanische Aufarbeitung von Haut zu einer Einzelzell-Suspension nicht möglich, eine enzymatische Lyse der Haut benötigt hingegen eine relativ lange Inkubationszeit, so dass die Detektion der Fluoreszenz drei Stunden nach der 5-ALA-Applikation nicht möglich bzw. nicht aussagekräftig gewesen wäre. Die vorliegenden Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Aufnahme von 5-ALA und die Metabolisierung zu fluoreszierenden Substanzen tumorspezifisch ist, da das Verhältnis zwischen Fluoreszenz in Leberzellen zu Tumorzellen unter Raumluftbedingungen 1 : 3,4 beträgt (Abb. 8). Perotti *et al.* [2002] untersuchten die Porphyrinsynthese nach der 5-ALA-Applikation spektrofluorometrisch und fanden ein ähnliches Verhältnis der Fluoreszenz zwischen Tumor- und Lebergewebe. Weiterhin zeigten die Autoren eine fast dreimal höhere Fluoreszenz im Tumorgewebe verglichen mit normaler Haut. Wenn man davon ausgeht, dass die Aufnahme von 5-ALA und die Metabolisierung in der normalen Haut in beiden Studien vergleichbar sind, dann lassen die vorliegenden Ergebnisse vermuten, dass die Aufnahme und Metabolisierung auch für das hier verwendete DS-Sarkom spezifisch ist.

Für viele Tumorzelllinien konnte für die PPIX-Anreicherung eine tumorspezifische Veränderungen im Hämstoffwechsel und/oder einer veränderten 5-ALA-Aufnahme nachgewiesen werden [z.B. Bermudez Moretti *et al.* 1993, 2002, El-Sharabasy *et al.* 1992, Kondo *et al.* 1993, Leibovici *et al.* 1988, van Hillegersberg *et al.* 1992]. In der hier vorliegenden Studie wurde jedoch nicht analysiert, ob eine tumorspezifische Veränderung im Hämstoffwechsel und/oder eine veränderte 5-ALA-Aufnahme für die verstärkte Anreicherung von PPIX im DS-Sarkom verantwortlich sind. In der Literatur konnten ferne keine Studien gefunden werden, die Untersuchungen bezüglich des

Hämstoffwechsels bzw. der 5-ALA-Aufnahme an DS-Sarkom-Zellen durchgeführt haben. Die Erkenntnisse für die tumorspezifische Anreicherung von PPIX bei anderen Tumorentitäten scheinen zumindest teilweise auch für das DS-Sarkom zuzutreffen. Um diese Theorien zu verifizieren sind jedoch weitergehende Untersuchungen für das DS-Sarkom nötig.

Ferner ist die 5-ALA-Aufnahme bzw. die -Metabolisierung in den Tumorzellen sauerstoffabhängig. Durch die inspiratorische Hyperoxie während der 3-stündigen Inkubationsphase kam es zu einer statistisch signifikant höheren Konzentrationen in den Tumorzellen verglichen mit Raumluft-Atmung ( $p = 0,0003$ ), eine inspiratorische Hypoxie führte dagegen zu einer signifikant niedrigeren Konzentration ( $p = 0,0001$ ). Die Modulation der inspiratorischen Sauerstofffraktion hatte jedoch keinen Einfluss auf die PPIX-Konzentration in den Leberzellen, in allen drei Gruppen waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zu beobachten. Wie gezeigt werden konnte, führt eine verminderte inspiratorische Sauerstofffraktion zu keiner statistisch signifikanten Abnahme des mittleren  $pO_2$  in der Leber, so dass vermutlich die 5-ALA-Aufnahme und -Metabolisierung in den Leberzellen nicht beeinflusst wird. Ebenfalls hatte die statistisch signifikante Erhöhung des mittleren  $pO_2$  in der Leber durch eine inspiratorische Hyperoxie keinen Einfluss auf die 5-ALA-Aufnahme und -Metabolisierung. Diese Daten lassen vermuten, dass in der Leber bereits bei einem  $pO_2$  von 20 mmHg (Abb. 7) die Metabolisierungsrate von 5-ALA maximal abläuft und durch eine zusätzliche Erhöhung des medianen  $pO_2$  durch eine inspiratorische Hyperoxie nicht gesteigert werden kann.

Ein Grund für die statistisch signifikanten Unterschiede der PPIX-Konzentrationen in Abhängigkeit der inspiratorischen Sauerstofffraktion in den Tumorzellen könnte darin bestehen, dass durch die inspiratorische Hyperoxie die Tumordurchblutung deutlich verbessert werden kann [Thews *et al.* 2002]. Dadurch kann eine größere Menge des Photosensitisers in das Tumorgewebe gelangen, besser verteilt und verstärkt von den Tumorzellen aufgenommen werden. Ferner ist die Sauerstoffversorgung deutlich verbessert, so dass Sauerstoff als limitierenden Faktor der für die Metabolisierung zu PPIX notwendigen sauerstoffabhängigen Enzyme eine geringere Bedeutung zukommt als unter Raumluftbedingungen bzw. Hypoxie. Wyld *et al.* [1998] untersuchten an HT 1197 Tumorzellen *in-vitro* die PPIX-Synthese in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken (0% - 21%  $O_2$ ). Nach 4 Stunden erfolgte die Messung der intrazellulären PPIX-Konzentration spektrofluometrisch. Die

Autoren zeigten, dass durch 0, 2,5 und 5% Sauerstoff die Synthese von Protoporphyrin IX signifikant gehemmt wurde, das Optimum bei 10% Sauerstoff lag und die Synthese unter Raumluftbedingungen (21% O<sub>2</sub>) wieder sank. Falk *et al.* [1959] konnte ähnliche Ergebnisse erzielen, die den Effekt einer Hypoxie auf die PPIX-Synthese aus Succinyl-CoA und Glycin an Erythrozyten des Huhns *in-vitro* untersuchten und eine maximale Synthese bei 9% O<sub>2</sub> zeigten. Steigende Sauerstoffkonzentrationen führten zu einer statistischen Abnahme der PPIX-Synthese. Beide Autoren sehen eine maximale Synthese unter diesen „hypoxischen Bedingungen“ darin begründet, dass steigende Sauerstoffkonzentrationen unter *in-vitro*-Bedingungen zytotoxisch wirken und so physiologische Stoffwechselprozesse der Zellen beeinflusst werden. Nach *in-vitro*-Studien kann die Synthese von PPIX auch durch die Erhöhung der Glukosekonzentration gesteigert werden [Wyld *et al.* 2002]. In wieweit in der hier vorliegenden Studie die reduzierte Glukosekonzentration unter Hypoxiebedingungen (Abb. 23) Einfluss auf die geringere Konzentration von PPIX im Tumorgewebe hat (Abb. 8), müssen zukünftige Untersuchungen klären.

In der vorliegenden Studie wurde nicht untersucht, ob man durch Erhöhung der applizierten 5-ALA-Dosis von 375 mg/kg KG eine weitere Steigerung der PPIX-Konzentration in Tumorzellen erreichen kann. Eine Konzentration von 375 mg/kg KG 5-ALA im Tiermodell ist bereits eine sehr hohe Konzentration. Diese Dosierung wurde auf Grundlage von Vorversuchen gewählt, die zeigten, dass bei dieser Dosis der größte antitumorale Effekt bei einer geringen Toxizität erzielt wird. Ferner ist dies die geringste 5-ALA-Konzentration aus der eine maximale durch PPIX induzierte Fluoreszenz in den Tumorzellen resultiert [Kelleher *et al.* 2003]. Durch eine zusätzliche Steigerung der Dosis von 5-ALA können neurotoxische Symptome auftreten [Dougherty *et al.* 1998]. Dabei ist jedoch nicht geklärt, ob 5-ALA selbst oder ein Zwischenprodukt toxisch wirkt. Einige Studien belegen, dass 5-ALA die Blut-Hirn-Schranke penetrieren und das zentrale Nervensystem Porphyrine aus dem exogen zugeführten 5-ALA synthetisieren kann [Prince *et al.* 1994, Juknat *et al.* 1995]. In klinischen Untersuchungen litten Patienten vorübergehend unter Schwindel, Erbrechen und/oder einer gestörten Leberfunktion [Kennedy *et al.* 1996, Webber *et al.* 1997]. Bei einer Dosierung von 30 mg/kg KG i.v. oder 60 mg/kg KG oral treten bei Menschen jedoch keine neurotoxischen Symptome auf; und es wird ein maximaler antitumoraler Effekt erreicht. Aus diesem Grund sollte von einer Erhöhung der 5-ALA-Konzentration abgesehen werden, besonders bei Erkrankungen der Leber

und der Niere. Aus diesem Grund ist die Gabe von einem hyperoxischen Gasgemisch vor der Bestrahlung eine sehr effektive Methode, die Protoporphyrin IX-Konzentration im Tumor zu erhöhen ohne die applizierte 5-ALA-Dosis erhöhen zu müssen und somit die unerwünschten neurotoxischen Wirkungen bei einer systemischen Applikation zu umgehen. In weiteren Studien muss jedoch genau abgeklärt werden, ob eine inspiratorische Hyperoxie zu einer verstärkten Anreicherung von 5-ALA bzw. seiner Zwischenprodukte im ZNS und somit zu einer gesteigerten Neurotoxizität führt. In der vorliegenden Studie konnten unmittelbar vor der Behandlung sowie in den folgenden Tagen nach der Behandlung keine neurologischen Ausfallserscheinungen bzw. ein gestörtes Allgemeinbefinden der Versuchstiere beobachtet werden.

Die vorliegende Studie zeigt, dass eine inspiratorische Hyperoxie zu einer verstärkten Anreicherung von PPIX im Tumorgewebe führt, nicht jedoch in der Leber. In zukünftigen Untersuchungen muss analysiert werden, ob diese Ergebnisse nur für die Leber gelten oder auch für andere Organe. Von besonderem Interesse muss einerseits das ZNS aufgrund einer erhöhten Neurotoxizität, andererseits die Haut wegen einer erhöhten Gefahr der Hautirritation nach der Behandlung durch Tageslicht sein.

#### **4.2.3. Tumorwachstum nach der Photodynamischen Therapie in Abhängigkeit der inspiratorischen Sauerstofffraktion**

In der Photodynamischen Therapie spielt Sauerstoff zumeist eine direkte Rolle für photochemische Reaktionen, die schließlich zu einer Schädigung biologischer Strukturen führen. In verschiedenen *in-vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass unter anoxischen Bedingungen die PDT zu keinen biologischen Effekten führte und somit die Wirksamkeit stark vom Sauerstoffgehalt des Tumorgewebes abhängig ist [Busch *et al.* 2000, Fingar *et al.* 1992, Fuchs und Thiele 1998, Gomer und Razum 1984, Henderson und Fingar 1987, 1989, Herzog *et al.* 1994]. Außerdem kann durch eine PDT die Hypoxie in dem bestrahlten Areal verstärkt werden, da diese Form der Therapie selbst Sauerstoff benötigt und zu einer Schädigung der versorgenden Gefäße führt. Dabei können zunächst gut oxygenierte Zellen während der Behandlung hypoxisch werden [Chen *et al.* 1996a, Henderson *et al.* 2000, Sitnik *et*

al. 1998, Tromberg *et al.* 1990]. Pogue *et al.* [2001] konnten zeigen, dass bei einer ausreichenden Bestrahlungsintensität der Sauerstoffpartialdruck des bestrahlten Tumorgewebes innerhalb der ersten Behandlungsminuten signifikant sinkt.

In der vorliegenden Studie wurde zur Auswertung der Tumorwachstumsdaten die Kaplan-Meier-Analyse verwendet. Der Vorteil dieser Analyse liegt darin, dass Ereignisse das Beobachtungsintervall definieren und nicht die Beobachtungsintervalle fest vorgegeben sind. Wenn ein Versuchstier aus einem anderen Grund als das vorgegebene Kriterium (hier Tumolvolumen  $\geq 3,5$  ml) nicht weiter beobachtet werden kann, wird dieses „zensiert“. Dieses Tier wird dann in die Berechnung der Überlebenszeit bis zum Tag der Zensur einbezogen. Nach dem Tag der Zensur wird das Tier nicht mehr für die Berechnung der bedingten Wahrscheinlichkeit berücksichtigt. So lassen sich mit der Kaplan-Meier-Analyse auch dann Wahrscheinlichkeiten berechnen, wenn nicht alle Versuchstiere identische Beobachtungs-Zeiträume haben. Ferner ist die Analyse hilfreich, spezifische Überlebensraten oder Überlebenszeiten zu ermitteln.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die PDT unter Raumluftbedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer Heilung bzw. Verzögerung des Tumorwachstums führt und die Wahrscheinlichkeit, ein Tumolvolumen von 3,5 ml nicht zu erreichen, signifikant anstieg ( $p = 0,0001$ , Abb. 9). Die alleinige Applikation von 5-ALA ohne Bestrahlung bzw. Bestrahlung ohne 5-ALA-Applikation haben dabei keinen signifikanten Einfluss auf das Tumorwachstum [Kelleher *et al.* 2003]. Beim Vergleich der Tiere, die vor und während der PDT Raumluft geatmet haben, mit der Tiergruppe, die während der dreistündigen Phase zwischen Applikation und Bestrahlung Hyperoxiegas atmeten und dadurch eine höhere Konzentration an Protoporphyrin IX im Tumorgewebe zeigten, sieht man eine Effektivitätssteigerung, die jedoch nicht statistisch signifikant war ( $p = 0,1445$ , Abb. 10). Diese Steigerung ist vermutlich auf die höhere Konzentration von PPIX im Tumorgewebe zurückzuführen. In verschiedenen Studien konnte eine Abhängigkeit der Therapieeffektivität von der Konzentration des Photosensitisers 5-ALA nachgewiesen werden [Fukuda *et al.* 1993, Iinuma *et al.* 1994, 1995, Lim *et al.* 1994]. Eine Ursache für die gesteigerte Effektivität ist darin zu sehen, dass aufgrund der höheren PPIX-Konzentration auch mehr reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden können. Ferner verteilt sich vermutlich der Photosensitizer bedingt durch eine verbesserte Durchblutung und Oxygenierung in Folge der inspiratorischen Hyperoxie

homogener im Tumorgewebe, und Tumorzellen können so vermehrt 5-ALA aufnehmen. Auszuschließen ist eine anhaltend bessere Oxygenierung des Tumors während der PDT, da bei Raumlufatmung der arterielle  $pO_2$  absinkt und sich so die Tumoroxygenierung wieder verschlechtert.

Durch eine inspiratorische Hyperoxie während der PDT erreicht man eine zusätzliche Effektivitätssteigerung gegenüber der Raumlufatmung, die statistisch signifikant ist ( $p = 0,0133$ , Abb. 11). Es ist jedoch nur ein geringer Unterschied zwischen der Tiergruppe, die nur während der PDT und der, die zusätzlich während der drei Stunden zwischen Applikation und der PDT Hyperoxiegas atmeten, sichtbar, obwohl letztere Gruppe eine signifikant höhere Konzentration an PPIX aufweist. Bereits in *in-vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass durch Hyperoxie die Effektivität der PDT gesteigert werden kann. Dabei schwanken jedoch die Angaben für den Sauerstoffpartialdruck für eine optimale Zellschädigung. Lee See *et al.* [1984] zeigten mit Hämatoporphyrinderivaten (HpD) als Sensitizer bei einem  $pO_2$  von 90 mmHg eine vollständige Schädigung der Zellen *in-vitro*, wohin gegen Moan und Sommer [1985] dies mit HpD schon bei 40 mmHg erreichten. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Henderson und Fingar [1987] überein. Die Autoren machen für die verschiedenen Sauerstoffpartialdrücke, bei denen es zu einer vollständigen Schädigung der Tumorzellen kam, die unterschiedlich gewählten Konzentrationen des SENSITISERS verantwortlich. Wyld *et al.* [1998] erzielten unter *in-vitro*-Bedingungen mit 5-ALA ebenfalls bei 40 mmHg die stärkste antitumorale Wirkung der PDT. Chen *et al.* [2002] konnten in *in-vivo*-Studien durch inspiratorische Hyperoxie (100%  $O_2$ ) eine signifikante Effektivitätssteigerung der PDT mit HpD zeigen. Sie verglichen die Wirkung unter normobarer und hyperbarer (3 atm) Hyperoxie und konnten keinen signifikanten Unterschied in der Heilungsrate zwischen den beiden Therapiemodalitäten feststellen. Ursache dafür ist vermutlich, dass oberhalb eines bestimmten Sauerstoffpartialdrucks der zytotoxische Effekt der PDT nur noch gering gesteigert werden kann [Henderson und Fingar 1989] und man vermutlich mit normobarer Hyperoxie einen ausreichend hohen Tumor- $pO_2$  für eine maximale Zellschädigung erreicht. Maier *et al.* [2000] kombinierten die Photodynamische Therapie (HpD als Photosensitizer) mit einer hyperbaren Hyperoxie (2 atm). Sie behandelten 75 Patienten mit inoperablen Oesophagus-Karzinomen, davon 31 unter normobarer Normoxie und 44 unter hyperbarer Hyperoxie. Die Patienten, die unter hyperbarer Hyperoxie behandelt wurden, zeigten nach 6 Monaten eine statistisch

signifikante Tumorregression ( $p = 0,002$ ) im Vergleich zu denen, die unter normobarer Normoxie behandelt wurden. Eine Photodynamische Therapie in Kombination mit einer hyperbaren Hyperoxie (2 atm) führten ferner Tomaselli *et al.* [2001] durch. Sie behandelten 30 Patienten mit inoperablen Bronchialkarzinomen. 4 Wochen nach der Behandlung zeigten die Patienten, die unter hyperbaren Bedingungen behandelt worden waren, eine statistisch signifikante Reduzierung der durch den Tumor hervorgerufenen Stenose ( $p = 0,05$ ) und eine statistisch signifikante Verbesserung des Karnovski-Index ( $p = 0,05$ ).

Ferner konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine inspiratorische Hyperoxie während der Zeit zwischen der 5-ALA-Applikation und der Bestrahlung zu einer höheren PPIX-Konzentration im Tumorgewebe führt. Eine zusätzliche Hyperoxie während der Bestrahlung hatte keine effektivitätssteigernde Wirkung im Vergleich zu einer inspiratorischen Hyperoxie nur während der Bestrahlung (Abb. 11). Vermutlich erreicht man schon mit einer geringeren Konzentration des Photosensitisers in den Tumorzellen in Kombination mit einer inspiratorischen Hyperoxie eine maximale Ausbeute an reaktiven Sauerstoffspezies, die durch eine höhere Konzentration des Photopharmakons nicht weiter gesteigert werden kann. Ferner konnten Henderson und Fingar [1989] zeigen, dass bei einer hohen Konzentration des Photosensitisers (in ihrem Fall HpD) durch die Wirkung auf die Mikrozirkulation die  $O_2$ -Versorgung des Tumors stark vermindert wird und so die Effektivität abnimmt. Dies könnte auch für die vorliegende Studie zutreffen.

Vergleicht man die drei Tiergruppen, die Hypoxiegas geatmet haben, dann sieht man keine statistisch signifikante Veränderung der Effektivität verglichen mit der Tiergruppe, die ausschließlich Raumluft geatmet haben. Die Kurven nach Kaplan-Meier dieser vier Gruppen zeigen annähernd den gleichen Verlauf (Abb. 12).

Henderson und Fingar [1987] konnten unter anoxischen Bedingungen *in-vitro* mit HpD keine Zellschädigung beobachten, wohin gegen bei einem  $pO_2$  von 5 mmHg die Hälfte der Tumorzellen geschädigt wurde. Dies entspricht den Ergebnissen von Moan und Sommer [1985]. Wyld *et al.* [1998] zeigten ähnliche Ergebnisse für die 5-ALA-PDT *in-vitro*. Bei 0% Sauerstoff konnten sie keine zellschädigende Wirkung beobachten, bei 5%  $O_2$  wurden 40% der Zellen zerstört. Gomer und Razum [1984] untersuchten *in-vivo* die Hautreaktion von Mäusen unter normoxischen und anoxischen Bedingungen während einer Photodynamischen Therapie mit HpD. Eine Anoxie erreichten sie, indem die Blutzirkulation des zu bestrahlenden Fußes mittels

einer Klemme unterbunden wurde. Unter Anoxie konnten sie keine Hautreaktion in den folgenden Tagen nach der Behandlung beobachten wohingegen es bei physiologischem  $pO_2$  der Haut zur Rötung und Ausbildung eines Ödems kam. Dies zeigt, dass unter anoxischen Bedingungen der phototoxische Effekt einer PDT verhindert wird.

Durch die inspiratorische Hypoxie sank in der vorliegenden Studie (wie auch bei Kelleher *et al.* [1997]) der mediane Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe signifikant im Vergleich zur Raumlufatmung, wobei dies jedoch keine Auswirkungen auf die Therapieeffektivität hatte. Ursache für die gleiche Effektivität unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu Raumlufbedingungen liegt darin, dass es durch die PDT, wie es in *in-vitro*-Studien belegt werden konnte [Henderson und Fingar 1987, Moan und Sommer 1985, Wyld *et al.* 1998], auch unter hypoxischen Bedingungen *in-vivo* zu einer zytotoxischen Wirkung kommt. Einerseits ist, wenn auch nur in einigen Arealen des Tumors, ein relativ hoher  $pO_2$  für die Genierung von ROS vorhanden; andererseits kommt der sauerstoffunabhängigen Reaktion vom Typ III (s. Kapitel 1.2.1.) unter diesen hypoxischen Bedingungen eine größere Rolle zu. Die PPIX-Konzentration war nach 3 Stunden unter hypoxischer Atmosphäre signifikant geringer im Tumorgewebe ( $p = 0,0001$ , Abb. 8) als unter Raumlufbedingungen. Trotzdem unterschied sich die Effektivität der PDT in beiden Gruppen nicht. Vermutlich ist zusätzlich die Anzahl der zerstörten Tumorzellen in der Lage, das Immunsystem ausreichend zu stimulieren um eine Regression des Tumors zu induzieren, da die PDT eine Immunantwort induzieren kann, auch wenn die Tumoren selbst nur geringe immunogene Eigenschaften aufweisen [Korbelik 1996a].

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Effektivität der Photodynamischen Therapie sowohl durch eine inspiratorische Hyperoxie vor der Bestrahlung (durch eine höhere PPIX-Konzentration im Tumorgewebe) als auch durch eine inspiratorische Hyperoxie während der Bestrahlung gesteigert werden kann. Die größere Bedeutung hat die Gabe von Sauerstoff während der PDT. Durch den höheren Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe können vermehrt ROS generiert und die durch die PDT-bedingte Sauerstoffdepletion kompensiert werden [Peng *et al.* 2002].

#### 4.2.4. Messung der metabolischen und bioenergetischen Parameter

Die gemessenen Glukose-, Laktat, ATP-, ADP- und AMP-Konzentrationen im Tumorgewebe des DS-Sarkoms der Kontrollgruppen stimmen mit den ermittelten Werten anderer Autoren überein [Kelleher *et al.* 1995a, Vaupel 1994, Vaupel *et al.* 1994]. Die Veränderungen der untersuchten Metabolite nach der PDT-Behandlung in der vorliegenden Studie weisen auf einen veränderten Zellmetabolismus infolge der PDT hin.

Die Frage, welche die limitierenden Faktoren für den Energiestoffwechsel der Zelle sind, ist vielfach untersucht und diskutiert worden. Untersuchungen, die Gerweck *et al.* [1993] an Ovarialzellen des Hamsters durchführten, ergaben, dass Sauerstoff im Gewebe nicht der einzige limitierende Faktor im Energiestoffwechsel der Zelle ist. Bei ausreichender Glukosekonzentration kann die ATP-Konzentration auch unter O<sub>2</sub>-Mangel aufrechterhalten werden. Vaupel *et al.* zeigten 1994 in einer Studie am DS-Sarkom, dass die ATP-Konzentration im Tumorgewebe konstant bleibt, solange die Tumordurchblutung (TBF) und/oder die Tumoroxygenierung nicht unter einen kritischen Schwellenwert fallen (Schwellenwert für TBF = 0,4 - 0,5 ml/g/min und für den medianen pO<sub>2</sub> = 5 - 10 mmHg). Verschiedene Studien belegen, dass die Glukoseaufnahme durch die Versorgung mit Substraten und nicht durch den metabolischen Bedarf der Tumorzellen limitiert wird [Vaupel 1994].

In der vorliegenden Studie stellten sich die Fragen, welche Auswirkungen die PDT auf die Konzentrationen der Adenosinphosphate und welche Bedeutung dies auf den Therapieverlauf haben könnte. In allen Tiergruppen kam es zu einer signifikanten Abnahme der ATP-Konzentrationen nach der PDT (Abb.14) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p \leq 0,001$ ). Dabei bestanden aber keine signifikanten Unterschiede innerhalb der behandelten Tiergruppen. Kelleher *et al.* [1995a] haben eine signifikante Abnahme der ATP-Konzentration nach einer lokalen Tumor-Hyperthermie für das DS-Sarkom beschrieben. Für die Abnahme der ATP-Konzentrationen nach der PDT gibt es mehrere Gründe. Die primären Zielstrukturen der 5-ALA-PDT sind die Mitochondrien, besonders die Mitochondrien-Membranen [Morgan und Oseroff 2001]. Durch Schädigung bzw. Inaktivierung von Enzymen wie ATP-Synthase und Cytochrom-C-Oxidase kann es so zu einer verminderten Synthese von ATP kommen. Der Übertritt der Cytochrom-C-Oxidase vom

Mitochondrium durch die geschädigte Membran in das Zytosol kann verschiedene Folgen haben. Varnes *et al.* [1999] beobachteten eine Hemmung der Atmungskette und eine sinkende ATP-Konzentration nach der PDT, die durch Gabe von Cytochrom-C-Oxidase reversibel war. Außerdem kann es durch die 5-ALA-PDT selbst zu einer O<sub>2</sub>-Depletion, einer Schädigung der Tumorgefäße und einer Verschlechterung der Mikrozirkulation kommen. Die Tumoroxygenierung wird maßgeblich durch die Tumordurchblutung bestimmt, wobei eine positive Korrelation zwischen Gewebeoxygenierung und ATP-Konzentration besteht [Müller-Klieser *et al.* 1990, Vaupel *et al.* 1989b]. Aus diesem Grund könnte die ATP-Konzentration zusätzlich durch eine unzureichende Tumoroxygenierung infolge der Sauerstoffdepletion durch die Therapie und die Wirkung auf vaskulärer Ebene reduziert werden. Weiterhin kann die Reduktion der ATP-Konzentration auf eine gesteigerte ATP-Hydrolyse zurückgeführt werden, wobei dieser Stoffwechselweg nicht zu einer kompletten Depletion führt. Die Hydrolyse von ATP scheint in diesem Tumormodell ein bedeutender Faktor für die Abnahme der ATP-Konzentration zu sein, da in allen Gruppen eine signifikante Zunahme der AMP-Konzentration gezeigt werden konnte ( $p \leq 0,005$ , Abb. 18). Ferner könnte die Abnahme der Aktivität der Pyruvatkinase, die die Reaktion von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat unter der Bildung von ATP katalysiert, infolge der Behandlung (Abb. 25, 26) zu einem Abfall der ATP-Konzentration führen. Dadurch kommt es ebenfalls zu einem Anstieg der AMP-Konzentration.

In Zellen mit einem ausreichenden Energie-Vorrat wird AMP über ADP zu ATP phosphoryliert. Bei einem Energie-Defizit reichert sich infolge der ATP-Depletion und -Hydrolyse AMP an [Weber *et al.* 1971]. Aus diesem Grund kommt es vermutlich in allen behandelten Tiergruppen zu einem statistisch signifikanten Anstieg der AMP-Konzentrationen ( $p \leq 0,0054$ ).

Der Zusammenhang zwischen der Konzentration der Adenosinphosphate im Tumorgewebe und der Effektivität einer PDT ist vielfach untersucht und diskutiert worden. Plätzer *et al.* [2002] konnten mit dem Photosensitizer Aluminiumphthalocyanin für die humane Karzinomzelllinie A 431 *in-vitro* eine Korrelation zwischen der Abnahme der ATP-Konzentration und der verstärkten Induktion einer Apoptose bzw. Nekrose nachweisen. Nishiwaki *et al.* [1999] wiesen *in-vivo* einen Zusammenhang zwischen der Tumorantwort von HeLa-Zellen nach der PDT mit HpD und dem Verhältnis zwischen ATP und organischem Phosphat nach.

Die PDT führte in ihrer Studie zu einer Abnahme der ATP-Konzentration und zu einem Anstieg der von Phosphat. Bei einem Verhältnis ATP/Pi von  $0,64 \pm 0,29\%$  beobachteten sie einen kompletten Rückgang der Tumoren wohingegen bei einem Verhältnis von  $2,45 \pm 0,93\%$  nur eine partielle Tumorregression erfolgte. Schunck *et al.* [1997] konnten zeigen, dass bei einem schnellen Abfall (innerhalb einer halben Stunde) der Nukleosidtriphosphate (NTP) nach der PDT-Behandlung von CHO-Zellen 0% der Zellen überlebten. Bei einem verzögerten Abfall (über 2 Stunden nach der Bestrahlung) überlebten 22% der bestrahlten Zellen. Kessel und Luo [1998] konnten hingegen keinen Zusammenhang zwischen der ATP-Depletion und der Induktion einer Apoptose nach einer PDT an Leukozyten der Maus beobachten.

In der vorliegenden Studie lassen die Adenosinphosphat-Konzentrationen im Tumorgewebe unmittelbar nach der Behandlung keine Aussagen über den Therapieverlauf nach der PDT zu, da zwar signifikante Unterschiede in dem Wachstumsverlauf des Tumors in Abhängigkeit der inspiratorischen O<sub>2</sub>-Fraktion gesehen wurden aber keine statistisch signifikanten Unterschiede in den ATP-Konzentrationen innerhalb der Versuchsgruppen erkennbar waren.

Durch die inspiratorische Hypoxie wird die Tumorphoxie verstärkt und verursacht eine deutlich höhere Laktatkonzentration im Tumorgewebe vor der PDT-Behandlung (Abb. 21). Laktat ist das Produkt der Glykolyse, durch die im Gewebe ATP gebildet wird. Unter hypoxischen Bedingungen läuft verstärkt die anaerobe Glykolyse ab, die bezüglich der Energieausbeute zur aeroben wesentlich ineffizienter ist (2 Mol ATP/Mol Glukose bei anaerober Glykolyse im Vergleich zu 38 Mol ATP bei aeroben Stoffwechsel). Aus diesem Grund reichert sich vermehrt Laktat im Tumorgewebe an. Laktat kann auch über die Glutaminolyse, die jedoch sauerstoffabhängig ist, oder die Serinolyse gebildet werden (Kap. 1.6.).

Der Anstieg der Laktatkonzentration nach der Photodynamischen Therapie (Abb. 22) ist vermutlich überwiegend auf anaerobe Glykolyse zurückzuführen, da einerseits Gefäße geschädigt werden können und somit die Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes sinkt und andererseits diese Therapie selbst zu einer Sauerstoffdepletion führt und so die Tumoroxygenierung zusätzlich verschlechtert wird. Der starke Anstieg der Laktatkonzentration in den beiden Tiergruppen, die vor und während der PDT bzw. nur während der PDT Hypoxiegas atmeten, ist ebenfalls auf eine verstärkte anaerobe Glykolyse zurückzuführen. Die Laktatkonzentration der

Tiergruppe, die nur vor der PDT Hypoxiegas geatmet haben, weisen annähernd gleiche Konzentrationen wie die Tiergruppe, die ausschließlich Raumlufatmet haben, auf. Dies liegt vermutlich daran, dass der Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe nach Raumlufatmung innerhalb kurzer Zeit auf das Ausgangsniveau ansteigt und somit die Laktatkonzentration wieder absinkt. Der Grund für den starken Anstieg der Laktatkonzentrationen in den Tiergruppen, die Hyperoxiegas geatmet haben, ist unklar und lässt nur Spekulationen zu. Die inspiratorische Hyperoxie könnte zu einer reflektorischen Vasokonstriktion im Tumorgewebe und so einer Minderdurchblutung führen. Weiterhin könnten im Verlauf der Therapie so massive Gefäßschäden auftreten, dass trotz einer inspiratorischen Hyperoxie eine starke Tumorphoxie resultiert mit der Folge der anaeroben Glykolyse. Aufgrund der besseren Tumoroxygenierung, zumindest zu Beginn der PDT, könnte auch verstärkt die sauerstoffabhängige Glutaminolyse ablaufen und so zu einem starken Anstieg der Laktatkonzentration führen. Um dies jedoch abzuklären, müsste die Tumoroxygenierung während der gesamten Bestrahlungsdauer protokolliert und die Laktat- sowie die Glutaminkonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Therapie bestimmt werden.

In klinischen Studien zeigte sich, dass eine hohe Laktatkonzentration in Primärtumoren mit der Neigung zur Metastasenbildung korreliert ist [Schwickert *et al.* 1995, Walenta *et al.* 1997, 2000]. Ferner wird vermutet, dass der Tumor-Laktatgehalt ein prognostischer Faktor für die Klinik darstellen könnte [Walenta *et al.* 2000]. In dieser Studie kann anhand der Laktatkonzentration unmittelbar nach der Behandlung keine Aussage über den weiteren Verlauf des Tumorwachstums bzw. Metastasierung getroffen werden, da die Laktatkonzentrationen in den drei Hypoxiegasgruppen und der Raumlufatgruppe signifikante Unterschiede untereinander aufwiesen, sich die Therapieeffektivität jedoch nicht statistisch signifikant unterschied (Abb. 22). Ferner lag die Laktatkonzentration in den Tumoren der Tiergruppen, die Hyperoxiegas atmeten, unmittelbar nach der Behandlung höher als in der Tiergruppe, die Raumlufatmeten. Eine inspiratorische Hyperoxie zeigte jedoch eine gesteigerte Effektivität verglichen mit der Therapie unter Raumlufatmung.

In allen Versuchstiergruppen bis auf die Tiergruppe, die Hypoxiegas während der Zeit zwischen Applikation und der Photodynamischen Therapie atmeten, kam es zu einem Anstieg der Glukosekonzentration nach der Behandlung. Dieser Anstieg war in

den Gruppen, die ausschließlich Raumlufte, nur Hypoxiegas oder Hyperoxiegas während der Zeit zwischen Applikation und der PDT atmeten, statistisch signifikant ( $p = 0,038$ , Abb. 23, 24). Der Anstieg der Glukosekonzentrationen kann verschiedene Ursachen haben. Einerseits könnte die Photodynamische Therapie zu einer verminderten Glukose-Utilisation aufgrund einer direkten Zellschädigung führen. Andererseits entsteht während der Therapie ein Ödem, so dass es zu einer Ausdehnung des interstitiellen Raumes kommt. Nach Vaupel und Kelleher [1995] ist die Glukosekonzentration dort höher als in den Tumorzellen. So könnte es zu einem scheinbaren Anstieg der Glukosekonzentration im Tumorgewebe kommen. Infolge der Photodynamischen Therapie kommt es zu einem starken Anstieg der AMP-Konzentration im Tumorgewebe. Hohe AMP-Konzentrationen können zu einer Hemmung der Glykolyse führen [Mazurek *et al.* 1997, 1999a], aus der ein Anstieg der Glukosekonzentration resultieren könnte.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch die Photodynamische Therapie das metabolische Mikromilieu beeinflusst wird aber die gemessenen Parameter wie die Konzentrationen der Adenosinphosphate, Laktat und Glukose keine Aussage über die Tumorantwort unmittelbar nach der Behandlung bei dem verwendeten Tumormodell zulassen.

#### **4.2.5. Messung der Aktivität der zytosolischen Enzyme**

Die Wirkung der 5-ALA-PDT beruht im Wesentlichen auf der Schädigung der Mitochondrien [Morgan und Oseroff 2001], da sich Protoporphyrin IX (PPIX) in diesen besonders anreichert, weil der letzte Syntheseschritt zu PPIX in den Mitochondrien stattfindet. Fluoreszenzmikroskopisch konnte eine starke Anreicherung von PPIX in den Mitochondrien und perinukleär nachgewiesen werden, eine geringere im Zytoplasma und in Plasmamembranen [Iinuma *et al.* 1994]. Ferner kann durch Schädigung der Mitochondrienmembranen infolge der Bestrahlung der Photosensitizer ins Zytosol gelangen und dort zytosolische Enzyme und subzelluläre Strukturen schädigen [Morgan *et al.* 2000]. Aus diesem Grund sollte die Wirkung der PDT in Abhängigkeit der inspiratorischen Sauerstofffraktion auf die Aktivität der zytosolischen Enzyme Pyruvatkinase, Laktatdehydrogenase und Nucleosiddiphosphat-Kinase untersucht werden. Diese Enzyme zeigen gewöhnlich

eine erhöhte Aktivität in neoplastischen Zellen, sind in einigen Tumormodellen mitverantwortlich für das Wachstum und sind in der anaeroben Glykolyse an der Bereitstellung von ATP beteiligt [Hilf *et al.* 1970]. Eine Inaktivierung der Enzyme könnte zusätzlich zu einer verminderten ATP-Synthese führen und somit für den Zelluntergang mit verantwortlich sein. Im Organismus treten je nach Gewebe verschiedene Isoenzyme der Pyruvatkinase auf. Die Pyruvatkinase Typ M2 (M2-PK) kommt verstärkt in Geweben mit einer hohen Nukleinsäure-Synthese-Rate vor. Dies sind alle proliferierenden Zellen wie Stammzellen, embryonale Zellen und Tumorzellen. Die Pyruvatkinase in Tumoren bezeichnet man auch als Tumor-M2-PK.

Eine inspiratorische Hypoxie vor der Behandlung führte zu einer statistisch signifikanten Abnahme ( $p = 0,0239$ , Abb. 25) der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) der Pyruvatkinase (PK) bei der Messung mit hohen Phosphoenolpyruvat-Konzentrationen (2 mM), wohingegen eine inspiratorische Hyperoxie keinen Einfluss auf die Aktivität verglichen mit der Kontrollgruppe hatte. Die Ursache für die Abnahme während der inspiratorischen Hypoxie konnte nicht geklärt werden.

In Folge der Bestrahlung kam es in allen drei Versuchsgruppen zu einer statistisch signifikanten Abnahme der  $V_{\max}$ -Aktivität der M2-PK ( $p \leq 0,0204$ , Abb. 25). Dies deutet darauf hin, dass die Wirkung der 5-ALA-PDT nicht nur auf die Mitochondrien beschränkt bleibt, sondern der Photosensitizer auch in das Zytosol gelangt und dort Enzyme schädigen kann. Die Tiergruppe, die das hyperoxische Gasgemisch während der Bestrahlung atmete, zeigten eine Abnahme der Aktivität um 42 %, wohingegen Raumlufatmung und das hypoxische Gasgemisch zu einer Abnahme von 34 % führten. Für die Inaktivierung von glykolytischen Enzymen werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Für die Pyruvatkinase ist bekannt, dass diese durch Phosphorylierung und/oder Proteolyse inaktiviert werden kann [Eigenbrodt *et al.* 1998a, b]. Ferner sinkt die Aktivität der PK im Verlauf der Apoptose [Mazurek *et al.* 1999b].

In der vorliegenden Studie beruht die Abnahme der Aktivität der M2-PK vermutlich auf der Schädigung des Enzyms durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Die unterschiedlich starke Hemmung in Abhängigkeit der inspiratorischen Sauerstofffraktion ist wahrscheinlich auf eine vermehrte Generierung von ROS in

Folge der inspiratorischen Hyperoxie und einer verminderten während der inspiratorischen Hypoxie zurück zu führen.

Die Aktivität der M2-PK bei der Messung mit physiologischen Phosphoenolpyruvat-Konzentrationen (0,2 mM) wird bereits durch eine inspiratorische Hypoxie vor der Bestrahlung statistisch signifikant ( $p = 0,0081$ , Abb. 26) gesenkt. Die Ursache hierfür konnte jedoch nicht geklärt werden. Die Bestrahlung führte unter einer inspiratorischen Hyperoxie bzw. Raumluft zu einer signifikanten Abnahme der Aktivität. Eine inspiratorische Hypoxie während der Bestrahlung hatte jedoch vermutlich aufgrund der geringen Aktivität unter hypoxischen Bedingungen bereits vor der Bestrahlung keinen zusätzlichen hemmenden Effekt auf die Aktivität nach der Behandlung (Abb. 26). Die Aktivität der M2-PK in der Glykolyse ist wichtig für die Bereitstellung von Substraten für den Zitratzyklus und somit für die Atmungskette. Die Hemmung der M2-PK könnte somit zu einer verminderten Metabolisierung über die Glykolyse und zusammen mit der Hemmung der Atmungskette zu einer verstärkten Schädigung der Tumorzellen führen. Jedoch kann über die Aktivität der Pyruvatkinase unmittelbar nach der Bestrahlung keine Rückschlüsse auf die Tumorantwort nach der PDT gezogen werden, da innerhalb der behandelten Gruppen keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden konnten, obwohl die Effektivität der 5-ALA-PDT durch eine inspiratorische Hyperoxie deutlich gesteigert werden konnte.

Schneider *et al.* [2003] untersuchten an 33 Patienten mit Lungenkarzinomen, die alle mit einer systemischen Chemotherapie behandelt wurden, den Verlauf der Therapie anhand verschiedener Tumormarker. Zur Bestimmung der Tumor-M2-PK mittels ELISA diente EDTA-Blut. Die Kombination der drei Tumormarker NSE/ProGRP/Tumor-M2-PK zeigte eine Sensitivität von 67%, die der zwei Tumormarker ProGRP/Tumor-M2-PK von 56%.

In der hier vorliegenden Studie konnte anhand der Aktivität der M2-PK keine Aussage über den weiteren Therapieverlauf getroffen werden. Dafür gibt es verschiedene mögliche Ursachen. In dieser Studie wurde die Aktivität der M2-PK direkt im Tumorgewebe gemessen. Zurzeit ist es jedoch nicht möglich, die M2-PK-Aktivität im Rattenblut zu bestimmen, da der ELISA nur die humane M2-PK erkennt. Außerdem wurde keine Markerkombination durchgeführt. Weiterhin wurde die Aktivität unmittelbar nach der Therapie bestimmt. Über eine Bestimmung der Aktivität der M2-PK an mehreren aufeinander folgenden Tagen nach der Therapie hätten

eventuell Aussagen über den Therapieverlauf getroffen werden können. Dies war jedoch wiederum nicht möglich, da die Bestimmung im Tumorgewebe erfolgte und die Versuchstiere dafür tierschutzgerecht getötet werden mussten. Zurzeit liegen keine Studien vor, in denen die Tumor-M2-PK nach einer Photodynamischen Therapie als Tumormarker verwendet wurde. Von daher ist nicht sicher, ob sich die M2-PK überhaupt für die Tumorverlaufskontrolle nach einer PDT eignet. Zur Klärung dieser Fragen sind weitere Studien nötig.

Die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) wurde durch die Bestrahlung in allen drei Gruppen nur geringfügig beeinflusst (Abb. 27), die Aktivitätsminderung betrug in der Tiergruppe, die das hyperoxische Gasgemisch atmeten, 15 %, bei Atmung des hypoxischen bzw. von Raumluft 5 %. Ursächlich für die unterschiedlich starke Hemmung der Aktivität ist vermutlich wiederum die unterschiedliche Generierung von ROS in Abhängigkeit des inspiratorischen Sauerstoffpartialdrucks. In der Tumorforschung und -diagnostik wird die LDH hauptsächlich als Maß für die Zellschädigung eingesetzt. Die LDH ist hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften relativ stabil und wird im Blut nur langsam abgebaut. In der vorliegenden Studie kann jedoch anhand der LDH-Aktivität unmittelbar nach der Behandlung keine Rückschlüsse auf die Tumorantwort gezogen werden, da es innerhalb der untersuchten Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede gab.

Die drei unterschiedlichen Gasgemische hatten keinen Einfluss auf die Aktivität der Nucleosiddiphosphat-Kinase vor der Bestrahlung. Die Bestrahlung führte in allen drei Gruppen zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Aktivität, die mit 34 % durch eine Hyperoxie am stärksten war ( $p = 0,0024$ , Abb. 28). Für Raumluftatmung betrug die Aktivitätsabnahme 28 %, für Hypoxiegasatmung 20 %. Die Nucleosiddiphosphat-Kinase wird von den Nm 23 Gen kodiert. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Nm 23 einer Metastasierung entgegen wirken kann [Baba *et al.* 1995, Fukuda *et al.* 1996, Kantor *et al.* 1993, Leone *et al.* 1991, Parhar *et al.* 1995]. Eine mögliche Begründung für die Unterdrückung von Metastasen ist darin zu sehen, dass die NDPK nicht nur die Synthese von Nucleosidtriphosphaten katalysiert, sondern auch andere Substrate phosphorylieren kann [De la Rosa *et al.* 1995]. In der vorliegenden Studie konnte jedoch in den verschiedenen Versuchsgruppen kein erhöhtes metastatisches Potential in

Abhängigkeit der inspiratorischen Sauerstofffraktion beobachtet werden. Daher scheint die Aktivität der NDPK unmittelbar nach der Therapie, zumindest für das verwendete DS-Sarkom, kein geeignetes Kriterium für die Ausbildung von Metastasen zu sein.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die 5-ALA-PDT zu einer unterschiedlich starken Aktivitätsminderung der drei untersuchten Enzyme führt. Dabei war das Ausmaß der Hemmung für alle drei Enzyme durch eine inspiratorische Hyperoxie am stärksten. Dies ist vermutlich auf eine gesteigerte Genierung von ROS zurückzuführen. Ferner zeigen die Ergebnisse, dass die Aktivität der M2-PK stark gesenkt wurde, wohingegen die der LDH gering beeinflusst wurde. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Hilf *et al.* [1984], die die PDT mit HpD durchführten. Dieses Phänomen könnte auf einer unterschiedlichen Sensitivität der drei Enzyme gegenüber den ROS beruhen. Aufgrund der Aktivität der untersuchten Enzyme nach der Therapie sind keine Rückschlüsse auf den weiteren Therapieverlauf möglich, da innerhalb der behandelten Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet werden konnten.

#### 4.3. Vergleich zu anderen Studien

In den letzten Jahren ist der Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf die Effektivität der PDT diskutiert und sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* untersucht worden. Moan und Sommer [1985] analysierten die Sauerstoffabhängigkeit der PDT mit Hämatoporphyrinderivaten (HpD) *in-vitro* an NHIK 3025 Zellen. Bei 0% O<sub>2</sub> beobachteten sie keine Zellschädigung, den maximalen antitumoralen Effekt erreichten sie bei 5% O<sub>2</sub>. Zu gleichen Ergebnissen kamen Mitchell *et al.* [1985], die den Einfluss von Sauerstoff während der PDT mit HpD an den Hamster-Zellen V79 untersuchten. Henderson und Fingar [1987] führten eine *in-vivo/in-vitro*-Studie durch, um den Zusammenhang zwischen einer Tumorphoxie und der Tumorantwort nach der PDT mit HpD zu klären. Mäusen, denen RIF-Tumorzellen subkutan injiziert wurden, erhielten 6 Tage nach Implantation eine Injektion von 25 mg/kg KG Photofrin II i.p.. 24 Stunden später wurden die Tumore exzidiert und *in-vitro* unter verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken bestrahlt. Unter anoxischen Bedingungen

führte die PDT zu keinem antitumoralen Effekt, bei einem  $pO_2$  von 1% wurden die Hälfte der Zellen geschädigt, eine vollständige Schädigung erreichten sie bei 5%  $O_2$ . Wyld *et al.* [1998] führten eine *in-vitro*-Studie über den Einfluss einer Hypoxie auf die Synthese von Protoporphyrin IX (PPIX) aus 5-ALA und die Effektivität der 5-ALA-PDT durch. Als Tumorzelllinie verwendeten sie das Blasenkarzinom HAT 1197. Es zeigte sich eine  $O_2$ -Abhängigkeit der Synthese von PPIX. Bei 0%  $O_2$  war die Synthese am geringsten und bei 10% am höchsten. Bei 0%  $O_2$  konnte nur eine geringe Schädigung der Tumorzellen beobachtet werden, bei 5% wurden alle Zellen geschädigt.

Chen *et al* [2002] untersuchten *in-vivo* die Effektivität der PDT in Abhängigkeit der inspiratorischen  $O_2$ -Fraktion. Mäuse, die auf dem Hinterfuß ein implantiertes Mammakarzinom trugen, erhielten 12,5 mg/kg KG Photofrin. 24 Stunden später erfolgte die Behandlung des Tumors mit einem Laser bei einer Wellenlänge von 630 nm. Die Behandlung erfolgte unter Anoxie, Raumlufbedingungen, normobarer und hyperbarer (3 atm) Hyperoxie (100%  $O_2$ ). Eine Anoxie wurde erreicht, indem die Durchblutung des tumortragenden Fußes mittels einer Klemme verhindert wurde. Unter anoxischen Bedingungen führte die PDT zu keiner Tumorreaktion. Die Heilungsrate unter Raumlufbedingungen betrug 20%, unter normobarer Hyperoxie 80% und unter hyperbarer 60%, wobei zwischen den beiden Hyperoxiegruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede bestanden. Diese Studie unterscheidet sich zur vorliegenden im Tier- und Tumormodell, dem verwendeten Photosensitizer und der Bestrahlungsquelle. Ferner führten sie Untersuchungen unter anoxischen Bedingungen durch und nicht unter einer inspiratorischen Hypoxie (8%  $O_2$ ).

#### 4.4. Ausblick

Die vorliegende Studie konnte anhand von tierexperimentellen Untersuchungen eindeutig belegen, dass die Effektivität der Photodynamischen Therapie mit 5-ALA durch inspiratorische Hyperoxie deutlich gesteigert werden kann. Diese Ergebnisse geben Anlass zur Hoffnung, dass auch im klinischen Einsatz die Effektivität der 5-ALA-PDT durch Atmung eines  $O_2$ -angereicherten Atemgases gesteigert werden kann. Jedoch können Ergebnisse aus tierexperimentellen Untersuchungen nicht

bedingungslos auf humane Tumore übertragen werden, da folgende Unterschiede berücksichtigt werden müssen:

- Humane Tumore weisen andere Histologien mit sehr heterogener Zellpopulation auf [Minchinton 1995].
- Experimentelle Tumore wachsen oft erheblich schneller als humane (das DS-Sarkom hat eine Volumensverdoppelungszeit von etwa 2,5 Tage). Daraus ergeben sich unter Umständen Unterschiede in der Gewebestruktur bzw. der Vaskularisierung, die sich auf die Sauerstoff- und Substratversorgung auswirken können.
- Tierexperimentelle Tumorentitäten zeigen untereinander deutliche Unterschiede in der Oxygenierung [Kallinowski *et al.* 1989b, Thews *et al.* 1997], so dass die Übertragbarkeit der Ergebnisse von einem Tumormodell auf ein anderes und auf humane Tumoren nur bedingt möglich ist.
- Die Tumore in diesem Tierexperiment wurden bei einem Volumen von etwa 0,3% des Körpergewichts behandelt. Ein vergleichbar großer Tumor bei Menschen könnte auf Grund der geringen Eindringtiefe des Lichtes nicht mehr ausschließlich durch eine Photodynamische Therapie behandelt werden.

Eine Photodynamische Therapie in Kombination mit hyperbarer Hyperoxie führten Maier *et al.* [2000] in einer klinischen Studie durch. Sie behandelten von Januar 1996 bis Januar 1997 75 Patienten, die an einem inoperablen Oesophagus-Karzinom (Plattenepithel- bzw. Adenokarzinom) litten. Bei 44 Patienten wurde die PDT unter hyperbarer Hyperoxie (2 atm), bei 31 Patienten unter Raumluftbedingungen durchgeführt. Alle Patienten erhielten 48 Stunden vor der Behandlung 2 mg/kg Körpergewicht Photosan-3 (ein HpD). Die Bestrahlung erfolgte mittels eines Nd:YAG-Lasers bei einer Wellenlänge von 630 nm. Patienten, die unter hyperbaren Bedingungen behandelt wurden, zeigten eine statistisch signifikante stärkere Tumorregression ( $p = 0,002$ ) nach 6 Monaten. Ferner stieg die Überlebenschance statistisch signifikant an und lag nach 12 Monaten bei 52% im Vergleich zu 25% unter normobaren Bedingungen. Die mediane Überlebenszeit betrug für Patienten, die unter normobaren Bedingungen behandelt wurden, 8,7 Monaten, für hyperbare Hyperoxie 13,8 Monate.

Tomaselli *et al.* [2001] führten eine klinische Studie an 30 Patienten mit inoperablen Bronchial-Karzinomen durch. Sie kombinierten ebenfalls die PDT mit hyperbarer (2 atm) Hyperoxie. 19 Patienten wurden unter hyperbarer Hyperoxie, 11 unter Raumlufbedingungen behandelt. 48 Stunden zuvor erhielten die Patienten 2 mg/kg KG Photosan-3. Die PDT wurde mittels eines Nd:YAG-Lasers bei einer Wellenlänge von 630 nm durchgeführt. Nach einer und nach 4 Wochen erfolgte eine Nachuntersuchung mittels Endoskop, Spirometrie, Laborparameter und subjektive Einschätzungen der Patienten. Subjektiv empfanden die Patienten, die unter hyperbarer Hyperoxie behandelt wurden, eine deutliche Verbesserung der Dyspnoe und des Allgemeinbefindens. Weiterhin konnte nach 4 Wochen eine statistisch signifikante Reduzierung der durch den Tumor hervorgerufenen Stenose und eine statistisch signifikante Verbesserung des Karnovsky-Index ( $p = 0,05$ ) festgestellt werden. Aufgrund der geringen Patientenzahlen können keine definitiven Rückschlüsse gezogen werden, doch könnte die PDT in Kombination mit einer inspiratorischen Hyperoxie auch bei Bronchial-Karzinomen in Zukunft eine neue, viel versprechende Therapiemodalität sein.

Inwieweit sich durch die hyperbare Hyperoxie der Sauerstoffpartialdruck in den Tumoren ändert, wurde in diesen beiden Studien nicht gemessen. Jedoch konnte durch Messungen belegt werden, dass der transcutan gemessene  $pO_2$  auf 500-750 mmHg anstieg im Vergleich zu 60-75 mmHg unter Raumlufbedingungen.

Für den Einsatz der 5-ALA-PDT in Kombination mit einer inspiratorischen Hyperoxie in der Klinik sprechen einige Gründe:

- Durch eine inspiratorische Hyperoxie kann die Tumoroxygenierung deutlich verbessert und somit auch die Effektivität von sauerstoffabhängigen Therapien gesteigert werden.
- Eine inspiratorische Hyperoxie unter normobaren Bedingungen ist leicht durchführbar im Vergleich zu einer hyperbaren Beatmung in einer Beatmungskammer.
- Die Wahrscheinlichkeit von auftretenden Komplikationen einer inspiratorischen Hyperoxie ist gering (siehe 4.1.2.).

Die Photodynamische Therapie hat sich bereits in der Klinik bei verschiedenen Indikationen (siehe Tabelle 1) als viel versprechende Therapie etabliert. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie für die 5-ALA-PDT sowie andere tierexperimentelle Untersuchungen weisen auf eine größere Effektivität der PDT in Kombination mit einer inspiratorischen Hyperoxie hin, was nun in klinischen Studien belegt werden müsste.

## **5. Zusammenfassung**

Die Photodynamische Therapie (PDT) stellt ein neuartiges Tumorbehandlungsverfahren dar, bei dem zunächst ein nicht toxisches Pharmakon durch Beleuchtung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge im Organismus aktiviert wird und eine zytotoxische Wirksamkeit entfaltet. In dieser Studie wird 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) als Pro-Drug verwendet, das sich seit einigen Jahren in der klinischen Erprobung befindet. 5-ALA muss in die Tumorzelle aufgenommen und zu Protoporphyrin IX metabolisiert werden, da 5-ALA selber nicht phototoxisch wirksam ist. *In-vitro*-Studien belegen, dass die 5-ALA-Aufnahme bzw. die 5-ALA-Metabolisierung sauerstoffabhängig ist. Ferner scheint auch die 5-ALA-PDT O<sub>2</sub>-abhängig zu sein, da die Bildung zellschädigender reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die infolge der Lichtbestrahlung entstehen, auf die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff angewiesen ist. In soliden Tumoren existieren hypoxische bzw. anoxische Areale, die auf die pathologisch veränderte Gefäßstruktur in Tumoren zurückzuführen sind und die Effektivität der herkömmlichen Strahlentherapie, O<sub>2</sub>-abhängigen Chemotherapien und eventuell auch die der PDT negativ beeinflusst.

Ziel dieser Arbeit war es, an einem definierten Tiermodell durch Modulation der inspiratorischen Sauerstofffraktion die Auswirkungen auf die Tumoroxygenierung, die Konzentration von Protoporphyrin IX (PPIX) in Leber- und Tumorzellen und auf die Effektivität der PDT zu untersuchen. Ferner wurden verschiedene Parameter des Mikromilieus sowie stoffwechselrelevante Enzyme vor und nach der Behandlung bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten an experimentellen DS-Sarkomen, die auf den Fußrücken der Hinterpfoten von SD-Ratten implantiert wurden. Als Atemgasgemische wurden Hypoxiegas (8% O<sub>2</sub> + 92% N<sub>2</sub>), Raumluft (21% O<sub>2</sub>) und Hyperoxiegas (100% O<sub>2</sub>) verwendet. Die Messungen der Tumoroxygenierung erfolgte mittels polarographischer Nadelelektrode, die Konzentrationen von PPIX mittels Durchflußzytometrie. Die Tumorantwort nach der PDT in Abhängigkeit der inspiratorischen Sauerstofffraktion wurde täglich durch Messungen des Tumolvolumens protokolliert und in dem Algorithmus nach Kaplan-Meier ausgewertet. Metabolische und bioenergetische Parameter sowie die Enzymaktivitäten wurden über biochemische Nachweismethoden bzw. HPLC-Technik bestimmt.

Die Messungen des O<sub>2</sub>-Partialdrucks ergaben, dass durch eine inspiratorische Hyperoxie die Tumoroxygenierung signifikant verbessert werden konnte, wohingegen

sich die Oxygenierung durch die Gabe des Hypoxiegases deutlich verschlechterte. Eine inspiratorische Hyperoxie führte zu einer deutlich höheren durch PPIX induzierten Fluoreszenz in Tumorzellen als unter Raumluf- bzw. Hypoxiebedingungen, was darauf hindeutet, dass die 5-ALA-Aufnahme bzw. 5-ALA-Metabolisierung sauerstoffabhängig ist. In Leberzellen konnte hingegen keine Abhängigkeit der durch PPIX induzierten Fluoreszenz von der inspiratorischen Sauerstofffraktion beobachtet werden. Ferner ließ sich eine tumorspezifische Anreicherung von PPIX nachweisen, die auf die veränderte Aktivität der Enzyme der Hämbiosynthese in Tumorzellen zurückzuführen sein könnte.

Eine durch inspiratorische Hyperoxie bedingte höhere Konzentration von PPIX in Tumorzellen führte zu einer gesteigerten Effektivität der PDT. Eine inspiratorische Hyperoxie nur während der Behandlung erzielte eine signifikante Effektivitätssteigerung. Eine inspiratorische Hyperoxie vor und während der Behandlung bewirkte keine zusätzliche Wirkungsverstärkung. Sowohl eine höhere Konzentration von PPIX als auch die Gabe von Sauerstoff während der Behandlung führten zu einer gesteigerten Effektivität, wobei der verstärkten Generierung von ROS wohl die wichtigere Rolle zukommt. Eine inspiratorische Hypoxie hatte keinen Einfluss auf die Effektivität der PDT im Vergleich zu einer PDT unter Raumlufbedingungen.

Die ATP-Konzentrationen sanken nach der Behandlung in allen behandelten Gruppen signifikant ab, die AMP-Konzentrationen stiegen signifikant an. Ferner führte die Therapie zu einem Anstieg der Laktat- und Glukosekonzentrationen. Anhand der gemessenen Parameter konnte jedoch keine Aussage über die Effektivität der Behandlung getroffen werden. Die Enzyme Pyruvatkinase und Nukleosiddiphosphat-Kinase zeigten eine statistisch signifikante Abnahme der Aktivität in allen Gruppen nach der Behandlung, wohin gegen die Aktivität der Laktatdehydrogenase infolge der Behandlung nur geringfügig sank. Jedoch konnten anhand der Aktivität dieser Enzyme nach der Behandlung keine Rückschlüsse auf den weiteren Therapieverlauf gezogen werden, da keine statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen beobachtet werden konnten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass durch eine inspiratorische Hyperoxie, besonders während der Bestrahlungsphase, im Tiermodell die Effektivität der PDT deutlich gesteigert werden kann. Zukünftige klinische Studien müssen nun untersuchen, ob diese einfach durchzuführende Supportivmaßnahme die 5-ALA-PDT auch in der klinischen Onkologie wirksamer machen.

## 6. Literatur

Allen, R.P., Kessel, D., Tharratt, R.S., Volz, W. (1992) Photodynamic therapy of superficial malignancies with NPe6 in man. In: Spinelli, P., Dal Fante, M., Marchesini, R. (eds.) Photodynamic therapy and biomedical lasers. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, pp 441-445

Allison, B.A., Pritchard, P.H., Levy, J.G. (1994) Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative. *Br. J. Cancer* **69**: 833-839

Allison, B.A., Pritchard, P.H., Richter, A.M., Levy, J.G. (1990) The plasma distribution of benzoporphyrin derivative and the effects of plasma lipoproteins on its biodistribution. *Photochem. Photobiol.* **52**: 501-507

Allison, B.A., Waterfield, E., Richter, A.M., Levy, J.G. (1991) The effects of plasma lipoproteins on *in vitro* tumor cell killing and *in vivo* tumor photosensitization with benzoporphyrin derivative. *Photochem. Photobiol* **54**:709-715

Allison, R., Mang, T., Hewson, G., Snider, W., Dougherty, D. (2001) Photodynamic therapy for chest wall progression from breast carcinoma is an underutilized treatment modality. *Cancer* **91**: 1-8

Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2002, eds.) Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends. Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 3. Ausgabe, Saarbrücken

Atkinson, D.E. (1977) Cellular Energy Metabolism and its Regulation. Academic Press, New York

Baas, P., Saarnak, A.E., Oppelaar, H., Neering, H., Stewart, F.A. (2001) Photodynamic therapy with meta-tetrahydroxyphenylchlorin for basal cell carcinoma: a phase I/II study. *Br. J. Dermatol.* **145**: 1-2

- Baba, H., Urano, T., Okada, K., Furukawa, K., Nakayama, E., Tanaka, H., Iwasaki, K., Shiku, H. (1995) Two isotypes of murine nm23/nucleoside diphosphate kinase, nm23-M1 and nm23-M2, are involved in metastatic suppression of a murine melanoma line. *Cancer Res.* **55**: 1977-1981
- Barnett, A.A., Haller, J.C., Cairnduff, F., Lane, G., Brown, S.B., Roberts, D.J. (2003) A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Cancer* **103**: 829-832
- Barrett, A.J., Kennedy, J.C., Jones, R.A., Nadeau, P., Pottier, R.H. (1990) The effect of tissue and cellular pH on the selective biodistribution of porphyrin-type photochemotherapeutic agents: a volumetric titration study. *J. Photochem. Photobiol.* **6**: 309-323
- Bauer, T.W., Hahn, S.M., Spitz, F.R., Kachur, A., Glatstein, E., Fraker, D.L. (2001) Preliminary report of photodynamic therapy for intraperitoneal sarcomatosis. *Ann. Surg. Oncol.* **8**: 254-259
- Bereiter-Hahn, J., Münnich, A., Weiteneck, P. (1998) Dependence of energy metabolism on the density of cells in culture. *Cell Struc. Funct.* **23**: 85-93
- Bergmeyer, H.U. (eds., 1974) *Methoden der Enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse, 3. Auflage, Band I und II
- Bermudez Moretti, M., Correa Garcia, S., Stella, C., Ramos, E., Batlle, A.M. (1993)  $\delta$ -aminolaevulinic acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Biochem.* **25**: 1917-1924
- Bermudez Moretti, M., Correa Gracia, S., Perotti, C., Batlle, A.M., Casas, A. (2002)  $\delta$ -aminolevulinic acid transport in murine mammary adenocarcinoma cells is mediated by beta transporters. *Br. J. Cancer* **87**: 471-474

- Bernstein, Z.P., Wilson, B.D., Oseroff, A.R., Jones, C.M., Dozier, S.E., Brooks, J.S., Cheney, R., Foulke, L., Mang, T.S., Bellnier, D.A., Dougherty, T.J. (1999) Photofrin photodynamic therapy for treatment of AIDS-related cutaneous Kaposi's sarcoma. *AIDS* **10**: 1697-1704
- Berry, G.H., Dixon, B., Ward, A.J. (1979) The Leeds results for radiotherapy in HBO for carcinoma of the head and neck. *Clin. Radiol.* **30**: 591-592
- Biggs, J., Hersperger, E., Steeg, P.S., Liotta, L.A., Shearn, A. (1990) A *Drosophila* gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase. *Cell* **30**: 933-940
- Bissonette, R., Tremblay, J.F., Juzenas, P., Boushira, M., Lui, H. (2002) Systemic photodynamic therapy with aminolaevulinic acid induces apoptosis in lesional T lymphocytes of psoriatic plaques. *J. Invest. Dermatol.* **119**: 77-83
- Bonny, C., Cooker, L.A., Goldberg, E. (1998) Deoxyribonucleic acid-protein interactions and expression of the human testis. Specific lactate dehydrogenase promoter: transcription factor Sp1 plays a major role. *Biol. Reprod.* **58**: 754-759
- Bottomley, S. S., Müller-Eberhard, U. (1988) Pathophysiology of heme synthesis. *Semin. Hematol.* **25**: 282-302
- Bown, S.G., Rogowska, A.Z., Whitelaw, D.E., Lees, W.R., Lovat, L.B., Ripley, P., Jones, L., Wyld, P., Gillams, A., Hatfield, A.W. (2002) Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. *Gut* **50**: 549-557
- Brinck, U., Eigenbrodt, E., Oehmke, M., Mazurek, S., Fischer, G. (1994) L- and M2-pyruvate kinase expression in renal cell carcinomas and their metastases. *Virchows Arch.* **424**: 177-185

- Brizel, D.M., Schröder, T., Scher, R.L., Walenta, S., Clough, R.W., Dewhirst, M.W., Müller-Klieser, W. (2001) Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **51**: 349-353
- Bugelski, P.J., Porter, C.W., Dougherty, T.J. (1981) Autoradiographic distribution of hematoporphyrin derivate in normal and tumor tissue of the mouse. *Cancer Res.* **41**: 4606-4612
- Buono, R.J., Lang, R.K. (1999) Hypoxic repression of laccate dehydrogenase-B in retina. *Exp. Eye Res.* **69**: 685-693
- Busch, T.M., Hahn, S.M. Evans, S.M., Koch, C.J. (2000) Depletion of tumor oxygenation during photodynamic therapy: detection by the hypoxia marker EF3 [2-(2-nitroimidazol-1[H]-yl)-N-(3,3,3-trifluoroprpyl)acetamide]. *Cancer Res.* **60**: 2636-2642
- Camporesi, E.M. (1996) Diving and pregnancy. *Sem. Perinat.* **20**: 292-302
- Chaplin, D.J., Hill, S.A., (1995) Temporal heterogeneity in microregional erythrocyte flux in experimental solid tumours. *Br. J. Cancer* **71**: 1210-1213
- Chen, Q., Chen, H, Hetzel, F.W. (1996a) Tumor oxygenation changes post-photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **63**: 128-131
- Chen, Q., Chen, H., Shapiro, H., Hetzel, F.W. (1996b) Sequencing of combined hyperthermia and photodynamic therapy. *Radiat. Res.* **146**: 293-297
- Chen, Q., Huang, Z., Chen, H., Shapiro, H., Becker, J., Hetzel, F.W. (2002) Improvement of tumor response by manipulation of tumor oxygenation during photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **76**: 197-203

- Chopade, B.A., Shanker, S., Sundin, G.W., Mukhopadhyay, S., Chakrabarty, A.M. (1997) Characterization of membrane-associated *Pseudomonas aeruginosa* ras-like protein Pra, a GTP-binding protein that forms complexes with truncated nucleoside diphosphate kinase and pyruvate kinase to modulate GTP synthesis. *J. Bacteriol.* **179**: 2181-2188
- Chou, T.M., Woodburn, K.W., Cheong, W.F., Lacy, S.A., Sudhir, K., Adelman, D.C., Wahr, D. (2002) Photodynamic therapy: applications in atherosclerotic vascular disease with Motexafin Lutetium. *Catheter Cardiovasc. Interv.* **57**: 387-394
- Chow, S.N., Wu, C.C., Huang, S.C., Tsai, Y.L., Chien, C.H. (1991) Combined analysis of serum lactic dehydrogenase levels and isoenzyme patterns in ovarian neoplasms. *Proc. Natl. Sci. Council. Repub. China B* **15**: 101-104
- Christensen, T., Wahl, A., Smedshammer, L. (1984) Effects of haematoporphyrin derivate and light in combination with hyperthermia on cells in culture. *Br. J. Cancer* **50**: 85-89
- Curnow, A., Haller, J.C., Bown, S.G. (2000) Oxygen monitoring during 5-aminolaevulinic acid induced photodynamic therapy in normal rat colon. Comparison of continuous and fractionated light regimes. *Photochem. Photobiol.* **58**: 149-155
- Dalla Via, L., Marciani Magno, S. (2001) Photochemotherapy in the treatment of cancer. *Current Med. Chem.* **8**: 1405-1418
- De la Rosa, A., Williams, R.L., Steeg, P.S. (1995), Nm23/nucleoside diphosphate kinase: toward a structural and biochemical understanding of its biological functions. *Bioessays* **17**: 53-62.
- Degner, F.L., Sutherland, R.M. (1988) Mathematical modelling of oxygen supply and oxygenation in tumor tissues: prognostic, therapeutic and experimental implications. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **15**: 391-397

- Dewhirst, M.W., Ong, E.T., Rosner, G.L., Rehmus, S.W., Shan, S., Braun, R.D., Brizel, D.M., Secomb, T.W. (1996) Arteriolar oxygenation in tumour and subcutaneous arterioles: effects of inspired air oxygen content. *Br. J. Cancer Suppl.* **74**: S241-S246
- Diaz-Jimenez, J.P., Martinez-Ballarín, J.E., Llunell, A., Farrero, E., Rodriguez, A., Castro, M.J. (1999) Efficacy and safety of photodynamic therapy versus Nd-YAG laser resection in NSCLC with airway obstruction. *Eur. Respir. J.* **14**: 800-805
- Dijkstra, A.T., Majoie, I.M., van Dongen, J.W., van Weelden, H., van Vloten, W.A. (2001) photodynamic therapy with violet light and topical 5-aminolaevulinic acid in the treatment of actinic keratosis, Bowen's disease and basal cell carcinoma. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **15**: 550-554
- Dimofte, A., Zhu, T.C., Hahn, S.M., Lustig, R.A. (2002) *In-vivo* light dosimetry for motexafin lutetium-mediated PDT of recurrent breast cancer. *Laser Surg. Med.* **31**: 305-312
- Döring, F., Walter, J., Will, J., Föcking, M., Boll, M., Amasheh, S., Clauss, W., Daniel, H. (1998) Delta-aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications. *J. Clin. Invest.* **101**: 2761-2767
- Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D. Korbelik, Moan, J., Peng, Q. (1998) Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**: 889-905
- Dougherty, T.J., Kaufman, J.E., Goldfarb A., Weishaupt K.R., Boyle, D., Mittleman A. (1978) Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* **38**: 2628-2635
- Driver, I., Lowdell, C.P., Ash, D.V. (1991) *In vivo* measurement of the optical interaction coefficients of human tumours. *Phys. Med. Biol.* **36**: 805-813

- Droller, M.J. (2000) Hypoxic radiosensitizers in radical radiotherapy for patients with bladder carcinoma: hyperbaric oxygen, misonidazole and accelerated radiotherapy, carbogen and nicotinamide. *J. Urol.* **163**: 1600-1605
- Duska, L.R., Wimberly, J., Deutsch, T.F., Ortel, B., Haas, J., Houck, K., Hasan, T. (2002) Detection of female lower genital tract dysplasia using orally administered 5-aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX: a preliminary study. *Gynecol. Oncol.* **85**: 125-128
- Eigenbrodt, E., Basenau, D., Holthusen, S., Mazurek, S., Fischer, G. (1997) Quantification of tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK) in human carcinomas. *Anticancer Res.* **17**: 3153-3156
- Eigenbrodt, E., Gerbracht, U., Mazurek, S., Presek, P., Friis, R. (1994) Carbohydrate metabolism and neoplasia: New perspectives for diagnosis and therapy. In: Pretlow, T.G. and Pretlow, T.P. (eds.) *Biochemical and Molecular Aspects of Selected Cancers*. San Diego: Academic Press, Vol. 2, pp. 311-381
- Eigenbrodt, E., Kallinowski, F., Ott, M., Mazurek, S., Vaupel, P. (1998b) Pyruvate kinase and the interaction of amino acid and carbohydrate metabolism in solid tumors. *Anticancer Res.* **18**: 3267-3274
- Eigenbrodt, E., Mazurek, S., Friis, R.R. (1998a) Double role of pyruvate kinase type M2 in the regulation of phosphometabolite pools. In: Bannasch, P., Kanduc, D., Papa, S., Tager, J.M. (eds.) *Cell growth and oncogenesis*. Birkhäuser Verlag, Basel/ Schweiz, pp. 15-30
- Eigenbrodt, E., Reinacher, M., Scheefers-Borchel, U., Scheefers, H., Friis, R.R. (1992) A double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells. In: Perucho, M., (ed.) *Critical Reviews in Oncogenesis*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 91-115
- El-Sharabasy, M.M.H., El-Wassel, A.M., Hafez, M.M., Salim, S.A. (1992) Porphyrin metabolism in some malignant diseases. *Br. J. Cancer* **65**: 409-412

- Eversen, J.F., Malik, Z., Moan, J., (1988) Ultrastructural changes in the nuclei of human carcinoma cells after photodynamic treatment with hematoporphyrin derivate and with tetrasodium-meso-tetra-(4-sulphonatophenyl) porphine. *Lasers Med. Sci.* **3**: 195-206
- Eversen, J.F., Moan, J. (1982) Photodynamic action and chromosomal damage: a comparison of haematoporphyrin derivate (HpD) and light with x-irradiation. *Br. J. Cancer* **45**: 456-465
- Falk, J.E., Porra, R.J., Brown, A., Moss, F., Larminie, H.E. (1959) Effect of oxygen tension on haem and porphyrin biosynthesis. *Nature* **184**: 1217-1219
- Falk, S.J., Ward, R., Bleehen, N.M. (1992) The influence of carbogen breathing on tumour tissue oxygenation in man evaluated by computerised pO<sub>2</sub> histography. *Br. J. Cancer* **66**: 919-924
- Fatigante, L., Cartei, F., Ducci, F., Marini, C., Prediletto, R., Caciagli, P., Laddaga, M. (1994) Carbogen breathing in patients with glioblastoma multiforme submitted to radiotherapy. Assessment of gas exchange parameters. *Acta Oncol.* **33**: 807-811
- Fehr, M.K., Hornung, R., Schwarz, V.A., Simeon, R., Haller, U., Wyss, P. (2002) Photodynamic therapy of vulvar intraepithelial neoplasia III using topically applied 5-aminolaevulinic acid. *Gynecol. Oncol.* **84**: 187-189
- Fingar, V.H. (1996) Vascular effects of photodynamic therapy. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **14**: 323-328
- Fingar, V.H., Siegel, K.A., Wieman, T.J., Doak, K.W. (1993) The effects of thromboxane inhibitors on the microvascular and tumor response to photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **58**: 393-399
- Fingar, V.H., Wieman, T.J., Haydon, P.S. (1997) The effects of thrombocytopenia on vessel stasis and macromolecular leakage after photodynamic therapy using photofrin. *Photochem. Photobiol.* **66**: 513-517

- Fingar, V.H., Wieman, T.J., Park, Y.J., Henderson, B.W. (1992) Implications of a pre-existing tumor hypoxic fraction on photodynamic therapy. *J. Surg. Res.* **53**: 524-528
- Foster, T.H., Hartley, D.F., Nichols, M.G., Hilf, R. (1993) Fluence rate effects in photodynamic therapy of multicell tumor spheroids. *Cancer Res.* **53**: 1249-1254
- Foster, T.H., Murant, R.S., Bryant, R.G., Knox, R.S., Gibson, S.L., Hilf, R. (1991) Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. *Radiat. Res.* **126**: 296-303
- Freije, J.M.O., MacDonald, N.J., Steeg, P.S. (1996) Regularory Factors In: Gunthert, U., Shalg, P.M., Birchmeier, W. (eds) *Attempts to understand metastasis formation II*. Springer, Berlin-Heidelberg- New York, pp: 215-232
- Friedberg, J.S., Mick, R., Stevenson, J., Metz, J., Zhu, T., Buyske, J., Sterman, D.H., Pass, H.I., Glatstein, E., Hahn, S.M. (2003) A phase I study of Foscan-mediated photodynamic therapy and surgery in patients with mesothelioma. *Ann. Thorac. Surg.* **75**: 952-959
- Fuchs, J., Thiele, J. (1998) The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. *Free Radic. Biol. Med.* **24**: 835-847
- Fukuda, H., Battle, A.M., Riley, P.A. (1993) Kinetics of porphyrin accumulation in cultured epithelial cells exposed to ALA. *Int. J. Biochem.* **25**: 1407-1410
- Fukuda, M., Ishii, A., Yasutomo, Y., Shimada, N., Ishikawa, N., Hanai, N., Nagata, N., Irimura, T., Nicolson, G.L., Kimura, N. (1996) Decrease expression of nucleoside diphosphate kinase alpha isoform, an nm23-H2 gene homolog, is associated with metastatic potential of rat mammary-adenocarcinoma cells. *Int. J. Cancer* **65**: 531-537
- Gerweck, L.E., Seneviratne, T., Gerweck, K.K. (1993) Energy status and radiobiological hypoxia at specified oxygen concentrations. *Radiat. Res.* **135**: 69-74

- Gibson, S.L., Murant, R.S., Hilf, R., (1988) Photosensitising effects of hematoporphyrin derivate and Photofrin II on the plasma membrane enzymes 5'-nucleotidase. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase in R3230AC rat mammary adenocarcinomas. *Cancer Res.* **48**: 3360-3366
- Girotti, A.W. (1990) Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem. Photobiol.* **51**: 497-509
- Gollnick, S.O., Liu, X., Owczarczak, B., Musser, D.A., Henderson, B.W. (1997) Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy *in-vivo*. *Cancer Res.* **57**: 3904-3909
- Gomer, C.J., Ferrario, A., Hayashi, N., Szirth, B.C., Murphree, A.L. (1988) Molecular, cellular and tissue responses following photodynamic therapy. *Laser Surg. Med.* **8**: 450-463
- Gomer, C.J., Razum, N.J. (1984) Acute skin response in albino mice following porphyrin photosensitization under oxic and anoxic conditions. *Photochem. Photobiol.* **40**: 435-439
- Gomer, C.J., Rucker, N., Banerjee, A., Benedict, W.F. (1983) Comparison of mutagenicity and induction of sister chromatid exchange in Chinese hamster cells exposed to haematoporphyrin derivative photoradiation, ionizing radiation or ultraviolet radiation. *Cancer Res.* **43**: 2622-2627
- Gragoudas, E., Schmidt-Erfurth, U., Sickenkey, M. (1997) Results and preliminary dosimetry of photodynamic therapy for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration in a phase II/III study. *Abstract. Assoc. Res. Vision Ophthalmology* **38**:73-79
- Greenway, C.V., Stark, R.D. (1971) Hepatic vascular bed. *Physiolol. Reviews* **51**: 23-65

- Gröbe, K., Vaupel, P. (1988) Evaluation of oxygen diffusion distances in human breast cancer xenografts using tumor-specific *in vivo* data: role of various mechanisms in the development of tumor hypoxia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **15**: 691-697
- Hausmann, W. (1911) Die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins. *Biochem. Zeit.* **17**: 276-316
- Henderson B.W., Fingar, V.H. (1989) Oxygen limitation of direct tumor cell killing during photodynamic treatment of a murine tumor model. *Photochem. Photobiol.* **49**: 299-304
- Henderson, B.W., Busch, T.M., Vaughan, L.A., Frawley, N.P., Babich, D., Sosa, T.A., Zollo, J.D., Dee, A.S., Cooper, M.T., Bellnier, D.A., Greco, W.R., Oseroff, A.R. (2000) Photofrin photodynamic therapy can significantly deplete or preserve oxygenation in human basal cell carcinomas during treatment, depending on fluence rate. *Cancer Res.* **60**: 525-529
- Henderson, B.W., Dougherty, T.J. (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* **55**: 145-157
- Henderson, B.W., Fingar, V.H. (1987) Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. *Cancer Res.* **47**: 3110-3114
- Henderson, B.W., Waldow, S.M., Potter, W.R., Dougherty, T.J. (1985) Interaction of photodynamic therapy and hyperthermia: tumor response and cell survival studies after treatment of mice *in vivo*. *Cancer Res.* **45**: 6071-6077
- Herzog, M., Moser, J., Wagner, B., Broecker, J. (1994) Shielding effects and hypoxia in photodynamic therapy. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **23**: 406-408
- Hetzel, F.W., Chopp, M. (1989) Modifications in intratumor microenvironment with PDT. *Proc. SPIE* **1065**: 41-47

- Hilf, R., Goldenberg, H., Michel, I., Orlando, R.A., Archer, F.L. (1970) Enzymes, nucleic acids and lipids in human breast cancer and normal breast tissue. *Cancer Res.* **30**: 1874-1882
- Hilf, R., Smail, D.B., Murant, R.S., Leakey, P.B., Gibson, S.L. (1984) Hematoporphyrin derivate-induced photosensitivity of mitochondrial succinate dehydrogenase and selected cytosolic enzymes of R3230AC mammary adenocarcinomas of Rats. *Cancer Res.* **44**: 1483-1488
- Höckel, M., Knoop, C., Schlenger, K., Vorndran, B., Bausmann, E., Mitze, M., Knapstein, P.G., Vaupel, P. (1993) Intratumoral pO<sub>2</sub> predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother. Oncol.* **26**: 45-50
- Höckel, M., Schlenger, K., Aral, B., Mitze, M., Schäffer, U., Vaupel, P. (1996) Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* **56**: 4509-4515
- Höckel, M., Schlenger, K., Höckel, S., Vaupel, P. (1999) Association between tumor hypoxia and malignant progression: the clinical evidence in cancer of the uterine cervix. In: Vaupel, P., Kelleher, D. K. (eds.) *Tumor Hypoxia*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, pp. 65-74
- Höckel, M., Vaupel, P. (2001) Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biological and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**: 266-276
- Hornung, R., Walt, H., Crompton, N.E. (1998) m-THPC mediated photodynamic therapy (PDT) does not induce resistance to chemotherapy, radiotherapy or PDT on human breast cancer cells in vitro. *Photochem. Photobiol.* **68**: 569-574
- Iinuma, S., Bachor, R., Flotte, T., Hasan, T. (1995) Biodistribution and phototoxicity of 5-aminolaevulinic acid-induced PPIX in an orthotopic rat bladder tumor model. *J. Urol.* **153**: 802-806

- linuma, S., Farshi, S.S., Ortel, B., Hasan, T. (1994) A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. *Br. J. Cancer* **70**: 21-28
- Itoh, Y., Ninomiya, Y., Tajima, S., Ishibashi, A. (2001) Photodynamic therapy of acne vulgaris with topical delta-aminolaevulinic acid and incoherent light in Japanese patients. *Br. J. Dermatol.* **144**: 575-579
- Javaid, B., Watt, P., Krasner, N. (2002) Photodynamic therapy (PDT) for oesophageal dysplasia and early carcinoma with mTHPC (m-tetrahydroxyphenyl chlorine): a preliminary study. *Laser Med. Sci.* **17**: 51-56
- Jori, G., Spikes, J.D. (1984) Photochemistry of porphyrins. In: Smith K.C., (ed.) *Topics in Photomedicine*, New York: Plenum Press, pp. 183-318
- José, M.P., Freije, Pilar Blay, Nicholas, J., MacDonald, Richard, E., Manrow, Steeg, P.S. (1997) Site-directed Mutation of Nm23-H1. *J. Biol. Chem.* **272**: 5525-5532
- Juknat, A.A., Kotler, M.L., Batlle, A.M. (1995) High  $\delta$ -aminolaevulinic acid uptake in rat cerebral cortex: effect on porphyrin biosynthesis. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **111**: 143-150
- Jurklies, B., Anastassiou, G., Ortmans, S., Schuler, A., Schilling, H., Schmidt-Erfurth, U., Bornfeld, N. (2003) Photodynamic therapy using verteporfin in circumscribed choroidal haemangioma. *Br. J. Ophthalmol.* **87**: 84-89
- Juzenienne, A., Juzenas, P., Iani, V., Moan, J. (2002) Topical application of 5-aminolaevulinic acid and its methylester, hexylester and octylester derivatives: considerations for dosimetry in mouse skin model. *Photochem. Photobiol.* **76**: 329-334
- Kallinowski, F. Schäfer, C., Tyler, G., Vaupel, P. (1989a) *In-vivo* targets of recombinant human tumour necrosis factor- $\alpha$ : blood flow, oxygen consumption and growth of isografted rat tumours. *Br. J. Cancer* **60**: 555-560

- Kallinowski, F., Schlenger, K.H., Runkel, S., Kloes, M., Stohrer, M., Okunieff, P., Vaupel, P. (1989b) Blood flow, metabolism, cellular microenvironment, and growth rate of human tumor xenografts. *Cancer Res.* **49**: 3759-3764
- Kallinowski, F., Zander, R., Höckel, M., Vaupel, P. (1990) Tumor tissue oxygenation as evaluated by computerized-pO<sub>2</sub>-histography. *Int. J. Radiot. Oncol. Biol. Phys.* **19**: 953-961
- Kantor, J.D., Mc Cormick, B., Steeg, P.S., Zetter, B.R. (1993) Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells. *Cancer Res.* **53**: 1971-1973
- Keefe, K.A., Chahine, E.B., DiSaia, P.J., Krasieva, T.B., Lin, F., Berns, M.W., Tadir, Y. (2001) Fluorescence detection of cervical intraepithelial neoplasia for photodynamic therapy with the topical agents 5-aminolaevulinic acid and benzoporphyrin-derivative monoacid ring. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **184**: 1164-1169
- Keefe, K.A., Tadir, Y., Tromberg, B., Berns, M., Osann, K., Hashad, R., Monk, B.J. (2002) Photodynamic therapy of high-grade cervical intraepithelial neoplasia with 5-aminolaevulinic acid. *Laser Surg. Med.* **31**: 289-293
- Keim, D. Hailat, N., Melhem, R., Zhu, XX, Lascu, I., Veron, M., Strahler, J., Hansah, S.M. (1992) Proliferation – related expression of p19/nm23 nucleoside diphosphate kinase. *J. Clin. Invest* **89**: 919-924
- Kelleher, D.K., Bastian, J., Thews, O., Vaupel, P. (2003) Enhanced effects of aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy through local hyperthermia in rat tumours. *Br. J. Cancer* **89**: 405-411
- Kelleher, D.K., Engel, T., Vaupel, P. (1995a) Changes in microregional perfusion, oxygenation, ATP and lactate distribution in subcutaneous rat tumours upon water-filtered IR-A hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* **11**: 241-255

- Kelleher, D.K., Thews, O., Vaupel, P. (1995b) Oxygenation status of experimental rat tumors: impact of duration of anesthesia and positioning of tumor. In: Vaupel, P.W., Kelleher, D.K., Günderoth, M. (eds.) Tumor Oxygenation. Gustav Fischer, Stuttgart-Jena-New York, pp. 17-25
- Kelleher, D.K., Thews, O., Vaupel, P. (1997) Hypoxyradiotherapy: lack of experimental evidence for a preferential radioprotective effect on normal versus tumor tissue as shown by direct oxygenation measurements in experimental sarcomas. *Radiother. Oncol.* **45**: 191-197
- Kennedy, J.C., Marcus, S.L., Pottier, R.H. (1996) Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolaevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **14**: 289-304
- Kessel, D., Luo, Y. (1998) Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *Photochem. Photobiol.* **42**: 89-95
- Kimel, S., Svaasand, L.O., Hammer-Wilson, M., Gottfried, V., Cheng, S., Svaasand, E., Berns, M.W. (1992) Demonstration of synergistic effects of hyperthermia and photodynamic therapy using the chick chorioallantoic membrane model. *Laser Surg. Med.* **12**: 432-440
- Kimura, H., Braun, R.D., Ong, E.T., Hsu, R., Secomb, T.W., Papahadjopoulos, D., Hong, K., Dewhirst, M.W. (1996) Fluctuations in red cell flux in tumor microvessels can lead to transient hypoxia and reoxygenation in tumor parenchyma. *Cancer Res.* **56**: 5522-5528
- Kondo, M., Hirota, N., Takaoka, T., Kajiwara, M. (1993) Heme-biosynthetic enzyme activities and porphyrin accumulation in normal liver and hepatoma cell line of rats. *Cell Biol. Toxicol.* **9**: 95-103

- Konerding, M.A., Malkusch, W., Klaphor, B., van Ackern, C., Fait, E., Hill, S.A., Parkins, C., Chaplin, D.J., Presta, M., Denekamp, J. (1999) Evidence for characteristic vascular patterns in solid tumours: quantitative studies using corrosion casts. *Br. J. Cancer* **80**: 724-732
- Konerding, M.A., Steinberg, F., Streffer, C. (1989a) The vasculature of xenotransplanted human melanomas and sarcomas on nude mice. I. Vascular corrosion casting studies. *Acta Anat.* **136**: 21-26
- Konerding, M.A., Steinberg, F., Streffer, C. (1989b) The vasculature of xenotransplanted human melanomas and sarcomas on nude mice. II. Scanning and transmission electron microscopic studies. *Acta Anat.* **136**: 27-33
- Kopperschlager, G., Kirchberger, J. (1996) Methods for the separation of lactate dehydrogenases and clinical significance of the enzyme. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* **684**: 25-49
- Korbelik, M. (1996a) Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **14**: 329-343
- Korbelik, M. (1996b) Photosensitizer distribution and photosensitized damage of tumor tissues. In: Hönigsmann, H., Jori, G. Young, A.R., (eds.) *The Fundamental Bases of Phototherapy*. OEMF-spa, Mailand, pp. 229-245
- Korbelik, M., Krosol, G., Olive, P.L., Chaplin, D.J., (1991) Distribution of Photofrin between tumour cells and tumour associated macrophages. *Br. J. Cancer* **64**: 508-512
- Korsl, G., Korbelik, M., Dougherty, G.J. (1995) Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. *Br. J. Cancer* **71**: 549-555

- Krüger, W., Kelleher, D.K., Vaupel, P. (1993) Infrarot-A-Bestrahlung mit Wasserfilter: Neues technisches Konzept eines bekannten physikalischen Prinzips und seine Anwendung in der Physiotherapie. *Phys. Rehab. Kur. Med.* **3**: 45 – 51.
- Kubler, A.C., de Carpentier, J., Hopper, C., Leonard, A.G., Putnam, G. (2001) Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy. *Int. J. Maxillofac. Surg.* **30**: 504-509
- Kunugita, N., Kohshi, K., Kinoshita, Y., Katoh, T., Abe, H., Tosaki, T., Kawamoto, T., Norimura, T. (2001) Radiotherapy after hyperbaric oxygenation improves radioresponse in experimental tumor models. *Cancer Lett.* **164**: 149-154
- Lakso, M. Steeg, P.S., Westphal, H. (1992) Embryonic expression of nm23 during mouse organogenesis. *Cell Growth Differ* **3**: 873 – 879
- Laustriat, G. (1986) Molecular mechanisms of photosensitization. *Biochimie* **68**: 771-778
- Lautt, W.W. (1981) Role and control of the hepatic artery. In: Lautt, W.W., (ed.) *Hepatic circulation in Health and Disease*. Raven Press, New York, pp. 203-226
- Lee See, K., Forbes, I.J., Betts, W.H. (1984) Oxygen dependency of photocytotoxicity with haematoporphyrin derivate. *Photochem. Photobiol.* **39**: 631-634
- Leibovici, L., Schönfeld, N., Yehoshua, H.A., Mamet, R., Rakowski, Shindel, A. (1988) Activity of porphobilinogen deaminase in peripheral blood mononuclear cells of patients with metastatic cancer. *Cancer* **62**: 2297-2300
- Leone, A., Flatow, U., King, C.R., Sandeen, M.A., Margulies, I.M., Liotta, L.A., Steeg, P.S. (1991) Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23 – transfected melanoma cells. *Cell* **65**: 25-35

- Lim, H.W., Behar, S., He, D. (1994) Effect of porphyrin and irradiation on heme biosynthetic pathway in endothelial cells. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **10**: 17-21
- Lipson, R.L., Baldes, E.J., Gray, M.J. (1967) Haematoporphrin derivate for detection and management of cancer. *Cancer* **20**: 2255-2257
- Lui, H., Anderson, R.R. (1993) Photodynamic therapy in dermatology: recent developments. *Dermatol. Clin.***11**: 1-13
- Luketich, J.D., Christie, N.A., Buenaventura, P.O., Weigel, T.L., Keenan, R.J., Nguyen, N.T. (2000) Endoscopic photodynamic therapy for obstructing esophageal cancer: 77 cases over a 2-year period. *Surg. Endosc.* **14**: 653-657
- MacDonald, N.J., Freije, J.M., Stracke, M.L., Manrow, R.E., Steeg, P.S. (1996) Site-directed mutagenesis of nm23-H1. Mutation of proline 96 or serine 120 abrogates its motility inhibitory activity upon transfection into human breast carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **11**: 25107-25116
- Maier, A., Tomaselli, F., Anegg, U., Rehak, P., Fell, B., Luznik, S., Pinter, H., Smolle-Jüttner, F. M. (2000) Combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in carcinoma of the esophagus and the esophago-gastric junction. *Eur. J. Cardiothoracic Surg.* **18**: 649-655
- Maier, A., Tomaselli, F., Matzi, V., Woltsche, M., Anegg, U., Fell, B., Rehak, P., Pinter, H., Smolle-Juttner, F.M. (2002) Comparison of 5-aminolaevulinic acid and porphyrin photosensitization for photodynamic therapy of malignant bronchial stenosis: a clinical pilot study. *Laser Surg. Med.* **30**: 12-17
- Malmgren, R.A., Flanigan, C.C. (1955) Localisation of the negative form of clostridium tetanii in mouse tumors following intravenous spore administration. *Cancer Res.* **15**: 473

- Mang, T.S., Allison, R., Hewson, G., Snider, W., Moskowitz, R. (1998) A phase II/III clinical study of tin ethyl etiopurpurin (Purlytin)-induced photodynamic therapy for the treatment of recurrent cutaneous metastatic breast cancer. *Cancer J. Sci. Am.* **4**: 378-384
- Marks, P.V., Belchetz, P.E., Saxena, A., Igbaseimokumo, U., Thomson, S., Nelson, M., Stringer, M.R., Holroyd, J.A., Brown, S.B. (2000) Effect of photodynamic therapy on recurrent pituitary adenomas: clinical phase I/II trial: an early report. *Br. J. Neurosurg.* **14**: 317-325
- Martin, L., Lartigau, E., Weeger, P., Lambin, P., Le Ridant, A.M., Lusinchi, A., Wibault, P., Eschwege, F., Luboinski, B., Guichard, M. (1993) Changes in the oxygenation of head and neck tumors during carbogen breathing. *Radiother. Oncol.* **27**: 123-130
- Mathie, R.T., Blumgart, L.H. (1983) The hepatic arterial blood flow: hepatic arterial buffer response. *Federat. Proc.* **42**: 1662-1666
- Mazurek, S., Boschek, C.B., Eigenbrodt, E. (1997a) The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism and tumor therapy. *J. Bioenerg. Biomem.* **29**: 315-330
- Mazurek, S., Eigenbrodt, E., Failing, K., Steinberg, P. (1999a) Alterations in the glycolytic and glutaminolytic pathway after malignant transformation of rat liver oval cells. *J. Cell. Physiol.* **181**: 136-146
- Mazurek, S., Hugo, F., Failing, K., Eigenbrodt, E. (1996) Studies on associations of glycolytic and glutaminolytic enzymes in MCF-7 cells: role of p36. *J. Cell. Physiol.* **167**: 238-250
- Mazurek, S., Michel, A., Eigenbrodt, E. (1997b) Effects of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rates. *J. Biolog. Chem.* **272**: 4941-4952

- Mazurek, S., Weisse, G., Wust, G., Schäfer-Schwebel, A., Eigenbrodt, E., Friis, R.R. (1999b) Energy metabolism in the involuting mammary gland. *In vivo*: **13**: 467-477
- Mazurek, S., Zwerschke, W., Jansen-Dürr, P., Eigenbrodt, E. (2001) Effects of the HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: Role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic enzyme complex. *Biochem. J.* **356**: 247-256
- Menke, H., Vaupel, P. (1988) Effect of injectable or inhalational anesthetics and of neuroleptic, neuroleptanalgesic and sedative agents on tumor blood flow. *Rad. Res.* **114**: 64–76.
- Menon, C., Kutney, S.N., Lehr, S.C., Hendren, S.K., Busch, T.M., Hahn, S.M., Fraker, D.L. (2001) Vascularity and uptake of photosensitizer in small human tumor nodules: implications for intraperitoneal photodynamic therapy. *Clin. Cancer Res.* **7**: 3904-3911
- Minchinton, A.I. (1995) Tumor oxygenation in mice and man. In: Vaupel, P., Kelleher, D.K., Günderoth, M. (eds.) *Tumor Oxygenation*. Gustav Fischer, Stuttgart-Jena-New York, pp. 211-218
- Mitchell, J.B., McPherson, S., DeGraff, W., Gamson, J., Zabell, A., Russo, A. (1985) Oxygen dependence of hematoporphyrin derivate-induced photoinactivation of chinese hamster cells. *Cancer Res.* **45**: 2008-2011
- Moan, J. (1990) On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *Photochem. Photobiol.* **6**: 343-344
- Moan, J., Sommer, S. (1985) Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivate in NHIK 3025 cells. *Cancer Res.* **45**: 1608-1610
- Moore, M.R., McColl, K.E.L., Rimogton, C., Goldberg, A. (1987) *Discorders of porphyrin metabolism*. New York: Plenum Press 14-19

- Morgan, J., Oseroff, A.R. (2001) Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **49**: 71-86
- Morgan, J., Potter, W.R., Oseroff, A.R. (2000) Comparison of photodynamic targets in a carcinoma cell line and its mitochondrial DNA-deficient derivative. *Photochem. Photobiol.* **71**: 747-757
- Morita, M., Noguchi, S., Kawamoto, H., Tapiri, J., Tamaru, M., Muratami, N. (1994) Thyroglobulin and lactic dehydrogenase isoenzymes in cystic fluid of thyroid nodules. *Endocr. J.* **41**: 227-233
- Müller-Klieser, W., Schäfer, C., Walenta, S., Rofstad, E. K., Fenton, B. M., Sutherland, R. M. (1990) Assessment of tumor energy and oxygenation status by bioluminescence, nuclear magnetic resonance spectroscopy and cryospectrophotometry. *Cancer Res.* **50**: 1681-1685
- Müller-Klieser, W., Vaupel, P. (1983) Tumor oxygenation under normobaric and hyperbaric conditions. *Br. J. Radiol.* **56**: 559-564
- Nathan, T.R., Whitelaw, D.E., Chang, S.C., Lees, W.R., Ripley, P.M., Payne, H., Jones, L., Parkinson, M.C., Emberton, M., Gillams, A.R., Mundy, A.R., Bown, S.G. (2002) Photodynamic therapy for prostate cancer recurrence after radiotherapy: a phase I study. *J. Urol.* **168**: 1427-1432
- Nehar, D., Mauduit, C., Boussouar, F., Benahmed, M. (1997) Tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated lactate production is linked to lactate dehydrogenase A expression and activity increase in porcine cultured Sertoli cells. *Endocrinol.* **138**: 1964-1971
- Nelson, J.S., Liaw, L.H., Orenstein, A., Roberts, W.G., Berns, M.W. (1988) Mechanism of tumor destruction following photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative, chlorin and phthalocyanine. *J. Natl. Cancer Inst.* **80**: 1599-1605

- Nishikawa, A., Tanaka, T., Takeuchi, T., Fujihira, S., Mori, H. (1991) The diagnostic significance of lactate dehydrogenase isoenzymes in urinary cytology. *Br. J. Cancer* **63**: 819-821
- Nishiwaki, M., Fujise, Y., Yoshida, T.O., Matsuzawa, E., Nishiwaki, Y. (1999) Evaluation of the effects of photodynamic therapy with phosphorus 31 magnetic resonance spectroscopy. *Br. J. Cancer* **80**: 133-141
- Noodt, B.B., Berg, K., Stokke, T., Peng, Q., Nesland, J.M. (1996) Apoptosis and necrosis induced with light and 5-aminolaevulinic acid-derived protoporphyrin IX. *Br. J. Cancer* **74**: 22-29
- Nseyo, U.O., Merrill, D.C., Lundahl, S.L. (1993) Green light photodynamic therapy in the human bladder. *J.Clin. Laser Med. Surg.* **11**: 247-250
- Ochsner, M. (1997) Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Photochem. Photobiol.* **39**: 1-18
- Oremek, G.M., Eigenbrodt, E., Radle, J., Zenzem, S., Seiffert, U.B. (1997) Value of the serum levels of the tumor marker TUM<sup>+</sup>-PK in pancreatic cancer. *Anticancer Res.* **17**: 3031-3033
- Ortel, B., Chen, N., Brisette, J., Dotto, G. P., Maytin, E., Hasan, T. (1998) Differentiation-specific increase in ALA-induced protoporphyrin IX accumulation in primary mouse keratinocytes. *Br. J. Cancer* **77**: 1744-1751
- Oseroff, A.R., Ohuoha, D. Ara, G., McAuliffe, D., Foley, J., Cincotta, L. (1986) Intramitochondrial dyes allow selective in vitro photolysis of carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 9729-9733
- Parhar, R.S., Shi, Y., Zou, M., Farit, N.R., Ernst, P., al-Sedairy, S.T. (1995) Effects of cytokine-mediated modulation of nm23 expression on the invasion and metastatic behaviour of B16F10 melanoma cells. *Int. J.Cancer* **60**: 204-210

- Pariser, D.M., Lowe, N.J., Stewart, D.M., Jarratt, M.T., Lucky, A.W., Pariser, R.J., Yamauchi, P.S. (2003) Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: results of a prospective randomized multicenter trial. *J. Am. Acad. Dermatol.* **48**: 227-232
- Pass, H.I. (1993) Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**: 443-456
- Peng, Q., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Giercksky, Nesland J.M. (1997b) 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem. Photobiol.* **65**: 235-251
- Peng, Q., Moan, J., Warloe, T., Nesland, J.M., Rimington, C. (1992) Distribution and photosensitising efficiency of porphyrins induced by application of exogenous 5-aminolaevulinic acid in mice bearing mammary carcinoma. *Int. J. Cancer* **52**: 433-443
- Peng, Q., Warloe T., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Giercksky, K.E., Nesland J.M. (1997a) 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer* **79**: 2282-2308
- Peng, Q., Warloe, T., Moan, J., Steen, H., Giercksky, K.E., Nesland, J.M. (1993) Localization of ALA-induced porphyrins in normal and malignant tissues of mice, dogs and patients. Conference on photosensitization and photochemotherapy of cancer, Oslo, pp. S4
- Perotti, C., Casas, A., Balle, A.M. (2002) Scavengers protection of cells against ALA-based photodynamic therapy-induced damage. *Lasers Med. Sci.* **17**: 222-229
- Pfeiffer, H. (1911) Der Nachweis photodynamischer Wirkungen fluoreszierender Stoffe am lebenden Warmblüter. In: Abderhaldan, E. (ed.), *Handbuch der Biochemischen Arbeitsmethoden*. Urban und Schwarzenberg, Berlin, pp. 563-571

- Plätzer, K., Kiesslich, T., Krammer, B., Hammerl, P. (2002) Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular supply in response to AIPcS4-PDT. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**: 172-177
- Pogue, B., Braun, R.D., Lanzen, J.L., Erickson, C., Dewhirst, M.W. (2001) Analysis of heterogeneity of pO<sub>2</sub> dynamics during photodynamic therapy with verteporfin. *Photochem. Photobiol.* **74**: 700-706
- Popanda, O., Fox, G., Thielmann, H.W. (1998) Modulation of DNA polymerases  $\alpha$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$  by lactate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *Biochem. Biophys. Acta* **1397**: 102-117
- Postel, E.H. (1998) NM 23-NDP kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**: 1291-1295
- Poulson, R., Polglase, W.J. (1975) The enzymic conversion of protoporphyrinogen IX to protoporphyrin IX. Protoporphyrinogen oxidase activity in mitochondrial extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **250**: 1269-1274
- Prince, F.G., Juknat, A.A., Battle, C. (1994) Porphyrinogenesis in rat cerebellum. Effect of high  $\delta$ -aminolaevulinic acid concentration. *Gen. Pharmacol.* **25**: 761-766
- Raab, O. (1900) Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien, *Z. Biol.* **39**: 524-546
- Rasch, M.H., Tijssen, K., Van Steveninck, J., Dubbelman, T.M.A.R. (1996) Synergistic interaction of photodynamic therapy with the sensitizer aluminium phthalocyanine and hyperthermia on loss of conogenicity of CHO cells. *Photochem. Photobiol.* **64**: 586-593
- Razum, N., Snyder, A., Doiron, D. (1996) SnET2: Clinical update. *Proc. SPIE* **2675**:43-46
- Reed, M.W.R., Miller, F.N., Wieman, T.J., Tseng, M.T., Pietsch (1998) The effect of photodynamic therapy on microcirculation. *J. Surgical Res.* **45**: 452-459

- Renschler, M., Yuen, A., Panella, T. (1997) Photodynamic therapy with Lutetium Texaphyrin. *Photochem. Photobiol.* **65**: 475-479
- Roberts, D.J.H., Cairnuff, F., Driver, I., Dixon, B., Brown, S.B. (1994) Tumour vascular shutdown following photodynamic therapy based on polyhaematoporphyrin or 5-aminolaevulinic acid. *Int. J. Oncol.* **5**: 763-768
- Robinson, S.P., Rodrigues, L.M., Ojugo, A.S., McSheehy, P.M., Howe, F.A., Griffiths, J.R. (1997) The response to carbogen breathing in experimental tumour models monitored by gradient-recalled echo magnetic resonance imaging. *Br. J. Cancer* **75**:1000-1006
- Rockson, S.G., Kramer, P., Razavi, M., Szuba, A., Filardo, S., Fitzgerald, P., Cooke, J.P., Yousuf, S., DeVault, A.R., Renschler, M.F., Adelman, D.C. (2000) Photoangioplasty for human peripheral atherosclerosis. Results of a phase I trial of photodynamic therapy with Motexafin Lutetium (Antrin). *Circulation* **102**: 2322-2324
- Rud, E., Gederaas, O., Høgset, A., Berg, K. (2000) 5-aminolevulinic acid but not 5-aminolaevulinic acid ester, is transported into adenocarcinoma cells by system beta transporters. *Photochem. Photobiol.* **71**: 640-647
- Sano, S., Granick, S. (1961) Mitochondrial coproporphyrinogen oxidase and protoporphyrin production. *J. Biol. Chem.* **236**: 1173-1180
- Schmähl, D. (1970) Entstehung, Wachstum und Chemotherapie maligner Tumoren. Editio Cantor, Aulendorf
- Schneider, J., Morr, H., Velcovsky, H.G., Weisse, G., Eigenbrodt, E. (2000a) Quantitative detection of tumor M2-pyruvate kinase in plasma of patients with lung cancer in comparison to other lung diseases. *Cancer Detect. Prev.* **24**: 531-535

- Schneider, J., Peltri, G., Bitterlich, N., Neu, K., Velcovsky, H.G., Morr, H., Katz, N., Eigenbrodt, E. (2003) Fuzzy logic-based tumor marker profiles including a new marker tumor M2-PK improved sensitivity to the detection of progression in lung cancer patients. *Anticancer Res.* **23**: 899-906
- Schneider, J., Velcovsky, H.G., Morr, H., Katz, N., Neu, K., Eigenbrost, E. (2000b) Comparison of the tumor markers tumor M2-PK, CEA, CYFRA 21-1, NSE and SCC in the diagnostic of lung cancer. *Anticancer Res.* **20**: 5053-50558
- Schunck, T., Poulet, P., Steibel, J. (1997)  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy of photodynamically treated cells. *Anticancer Res.* **17**: 2513-2518
- Schwarz, S.K., Absolon, K., Vermund, H. (1955) Some relationships of porphyrins, x-rays and tumours. *Univ. Minn. Bull.* **27**: 7-8
- Schwickert, G., Walenta, S., Sundfor, K., Rofstad, E. K., Müller-Klieser, W. (1995) Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis. *Cancer Res.* **55**: 4757-4759
- Secomb, T.W., Hsu, R., Ong, E.T., Gross, J.F., Dewhirst, M.W. (1995) Analysis of the effects of oxygen supply and demand on hypoxic fraction in tumors. *Acta Oncol.* **34**: 313-316.
- Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M., Wang, G.L. (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* **269**: 23757-23763
- Shackley, D.C., Briggs, C., Gilhooley, A., Whitehurst, C., O'Flynn, K.J., Betts, C.D., Moore, J.V., Clarke, N.W. (2002) Photodynamic therapy for superficial bladder cancer under local anaesthetic. *BJU Int.* **89**: 665-670
- Sharief, F.S., Mohler, J.L., Sharief, Y., Li, S.S. (1994) Expression of human prostatic acid phosphatase and prostate specific antigen genes in neoplastic and benign tissues. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **33**: 567-574

- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B.C., Wu, C.S., Dang, G., Jungmann, R.A., Dalla Favera R., Dang, C.V. (1997) c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 6658-6663
- Sibata, C.H., Colussi, V.C., Oleinick, N.L., Kinsella, T.J. (2000) Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**: 869-880
- Sibata, C.H., Colussi, V.C., Oleinick, N.L., Kinsella, T.J. (2001) Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opin. Pharma.* **2**: 917-927
- Siemann, D.W., Bronskill, M.J., Hill, R.P., Bush, R.S. (1975) The relationship between mouse arterial partial pressure of oxygen (PaO<sub>2</sub>) and the effectiveness of localized tumour irradiation. *Br. J. Radiol.* **48**: 662-667
- Sitnik, T.M., Hampton, J.A., Henderson, B.W. (1998) Reduction of tumour oxygenation during and after photodynamic therapy in vivo: effects of fluence rate. *Br. J. Cancer* **77**: 1386-1394
- Sitnik, T.M., Hampton, J.A., Nichols, M.G., Hilf, R. (1993) Fluence rate effects in photodynamic therapy of multicell tumour spheroids. *Cancer Res.* **53**: 1249-1254
- Smith, J.L. (1899) The physiological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. *J. Physiol* **24**: 19-35
- Sokolov, V.V., Chissov, V.I., Yakubovska, R.I., Aristarkhova, E.L., Filonenko, E.V., Belous, T.A. (1996) Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors by photosensitiser. Potosens: results of 45 clinical cases. In: Ehrenberg, B., Jori, G., Moan, J. (eds.): *Photochemotherapy: Photodynamic therapy and other modalities.* *Proc. SPIE* **2625**: 281-287
- Steeg, P.S., Bevilacqua, G., Pozzatti, R., Liotta L.A., Sobel, M.E. (1988), Altered expression of NM23, a gene associated with low tumor metastatic potential, during adenovirus 2 Ela inhibition of experimental metastasis. *Cancer Res.* **48**: 6550-6554

- Stern, S.J., Craig, J., Flock, S., Montague, D., Waner, M., Jacques, S. (1993) Tumor specific response to photodynamic therapy. *Laser Surg. Med.* **13**: 434-439
- Taber, S.W., Fingar, V.H., Coots, C.T., Wieman, T.J. (1998) Photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorine e6 (Npe6) for the treatment of cutaneous disease: a phase I clinical study. *Clinical Cancer Res.* **4**:2741-2746
- Tait, G.H. (1978) The biosynthesis and degradation of haem. In: De Matteis, F., Aldridge, W.N. (eds.) *Heme and Hemoproteins, Handbook of Experimental Pharmacology, Vol 44*, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 1-48
- Tan, W.C., Fulljames, C., Stone, N., Dix, A.J., Shepherd, N., Roberts, D.J., Brown, S.B., Krasner, N., Barr, H. (1999) Photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid for oesophageal adenocarcinoma associated with Barrett's metaplasia. *J. Photochem. Photobiol.* **53**: 75-80
- Thews, O., Kelleher, D. K., Vaupel, P. (1995) Intra- and intertumor variability of oxygenation: quantification and evaluation of minimum number of electrode tracks for representative measurements. In: Vaupel, P.W., Kelleher, D. K., Günderoth, M (eds.) *Tumor Oxygenation*. Gustav Fischer, Stuttgart-Jena-New York, pp. 39–47
- Thews, O., Kelleher, D. K., Lecher, B., Vaupel, P. (1997) Effect of cell line and differentiation on the oxygenation status of experimental sarcomas. *Adv. Exp. Med. Biol.* **428**: 123-128
- Thews, O., Kelleher, D.K., Vaupel, P. (2002) Dynamics of tumor oxygenation and red blood cell flux in response to inspiratory hyperoxia combined with different levels of inspiratory hypercapnia. *Radiother. Oncol.* **62**: 77-85
- Thews, O., Zywietz, F., Lecher, B., Vaupel, P. (1999) Quantitative changes of metabolic and bioenergetic parameters in experimental tumors during fractionated irradiation. *Int. J. Radiother. Oncol. Biol. Phys.* **45**: 1281-1288

- Thomlinson, R.H., Gray, L.H. (1955) The histological structure of some human lung cancers and the possible implication for radiotherapy. *Br. J. Cancer* **9**: 539-549
- Tomaselli, F., Maier, A., Sankin, O., Anegg, U., Stranzl, U., Pinter, H., Kapp, K., Smolle-Juttner, F.M. (2001) Acute effects of combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in lung cancer- a clinical pilot study. *Laser Surg. Med.* **28**: 399-403
- Tromberg, B.J., Orenstein, A., Kimel, S., Barker, S.J., Hyatt, J., Nelson, J.S., Berns, M.W. (1990) *In vivo* oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **52**: 375-385
- Urbach, F. (1956) Pathophysiology of malignancy: I. Tissue oxygenation of benign and malignant tumors of the skin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**: 644-649
- Vacek, A., Rotkowska, D., Bartonickova, A., Tacev, T. (1986) Differences in radioprotective effects of hypoxia in normal tissues and in experimental tumours. *Int. J. Radiat. Biol.* **49**: 858-863
- Van Hillegersberg, R., van den Berg, J.W., Kort, W.J., Terpstra, O.T., Wilson, J.H. (1992) Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats. *Gastroenterol.* **103**: 647-651
- Varma, S., Willson, H., Kurwa, H.A., Gambles, B., Charman, C., Pearse, A.D., Taylor, D., Vanstey, A. (2001) Bowen's disease, solar keratoses and superficial basal cell carcinomas treated by photodynamic therapy using a large-field incoherent source. *Br.J.Dermatol.* **144**: 567-574
- Varnes, M. E., Chiu, S. M., Xue, L. Y., Oleinick, N. L. (1999) Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**: 673-679

- Vaupel, P. (1974) Atemgaswechsel und Glukosestoffwechsel von Implantationstumoren (DS-Carzinom) *in-vivo*. Funktionsanalyse biologischer Systeme. Steiner, Wiesbaden
- Vaupel, P. (1975) Interrelationship between mean arterial blood pressure, blood flow and vascular resistance in solid tumor tissue of DS-carcinoma. *Experimentia* **31**: 587-589
- Vaupel, P. (1985) Das Mikromilieu der Geschwülste. *Forschungsmagazin* 2/85, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz
- Vaupel, P. (1990) Oxygenation of human tumors. *Strahlenther. Onkol.* **166**: 377-386
- Vaupel, P., (1994) Blood flow, oxygenation, tissue pH distribution and bioenergetic status of tumors. Ernst Schering Research Foundation Lecture 23. Ernst Schering Research Foundation, Berlin
- Vaupel, P., Höckel, M. (1999) Oxygenation status of breast cancer: the Mainz experience. In: Vaupel, P., Kelleher, D.K. (eds.) *Tumor Hypoxia*. Wissenschaftlicher Verlagsgesellschaft, Stuttgart, pp. 1-11
- Vaupel, P., Kallinowski, F., Okunieff, P. (1989a) Blood flow, oxygen consumption and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* **49**: 6449-6465
- Vaupel, P., Kelleher, D.K. (1995) Metabolic status and reaction to heat of normal and tumor tissue. In: Seegenschmidt, M.H., Fessenden, P., Vernon, C. (eds.) *Medical radiology – diagnostic imaging and radiation oncology, thermoradiotherapy*. Vol. 1 Biol. physiol physics Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 157-176
- Vaupel, P., Kelleher, D.K., Engel, T. (1994) Stable bioenergetic status despite substantial changes in blood flow and tissue oxygenation in a rat tumor. *Br. J. Cancer* **69**: 46-49

- Vaupel, P., Kelleher, D.K., Krüger, W. (1992) Water-filtered infrared-A radiation: a novel technique to heat superficial tumors. *Strahlenther. Onkol.* **S11**: 633 – 639.
- Vaupel, P., Kelleher, D.K., Thews, O. (1998) Modulation of tumor oxygenation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **42**: 843-848
- Vaupel, P., Schlenger K., Knopp, C., Höckel, M. (1991) Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancer by computerized O<sub>2</sub> tension measurements. *Cancer Res.* **51**: 3316-3322
- Vaupel, P., Okunieff, P., Kallinowski, F., Neuringer, L.J. (1989b) Correlations between <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy and tissue O<sub>2</sub> tension measurements in a murine fibrosarcoma. *Radiat. Res.* **120**: 477-493
- Von Tappeiner, H., Jesionek, A. (1903) Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Münch. Med. Wochenschr.* **47**: 2042-2044
- Von Tappeiner, H., Jodlbauer, A. (1907) Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. *Gesammelte Untersuchungen über die Phtotodynamische Erscheinung.* FCW Vogel, Leipzig
- Wagner, P.D., Vu, N.D. (1995) Phosphorylation of ATP-citrate lyase by nucleoside diphosphate kinase. *J. Biol. Chem.* **15**: 21758-21764
- Walenta S., Wetterling, M., Lehrke, M., Schwickert, G., Sundfor, K., Rofstad, E.K., Müller-Klieser, W. (2000) High lactate levels predicts likelihood of metastases, tumor recurrence and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res.* **60**: 916-921
- Walenta, S., Salameh, A., Lyng, H., Evensen, J. F., Mitze, M., Rofstad, E.K., Müller-Klieser, W. (1997) Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with evidence of metastasis. *Am. J. Pathol.* **150**: 409-415

- Webber, J., Kessel, D., Fromm, D. (1997) Side effects and photosensitization of human tissues after aminolaevulinic acid. *J. Surg. Res.* **68**: 31-37
- Weber, G., Stubbs, M., Morris, H. P. (1971) Metabolism of hepatomas of different growth rates *in situ* and during ischemia. *Cancer Res.* **31**: 2177-2183
- Whitaker, C.J., Battah, S.H., Forsyth, M.J., Edwards, C., Boyle, R.W., Matthews, E.K. (2000) Photosensitization of pancreatic tumour cells by 5-aminolevulinic acid esters. *Anticancer Drug Des.* **15**: 161-170
- Wilson, B.C. (1986) The physics of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.* **31**: 327-360
- Wilson, B.C. (2002) Photodynamic therapy for cancer: principles. *Can. J. Gastroenterol* **16**: 393-396
- Wilson, B.D., Mang, T. (1995) Photodynamic therapy for cutaneous malignancies. *Clin. Dermatol.* **13**: 91-96
- Workman, P., Twentyman, T., Balkwill, F., Balmain, A., Chaplin, D., Double, J., Embelton, J., Newell, D., Raymond, R., Stables, J., Stephens, T.C., Wallace, J. (1998) United Kingdom co-ordinating committee on cancer research (UKCCCR) guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia (second edition). *Br. J. Cancer* **77**: 1-10
- Wyld, L., Reed, M.W.R., Brown, N.J. (1998) The influence of hypoxia and pH on aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy in bladder cancer cells *in vitro*. *Br. J. Cancer* **77**: 1621-1627
- Wyld, L., Tomlinson, M., Reed, M.W.R., Brown, N.J. (2002) Aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy: cellular responses to glucose starvation. *Br. J. Cancer* **86**: 1343-1347

- Wyss, P., Schwarz, V., Dobler-Girdziunaite, D., Hornung, R., Walt, H., Degen, A., Fehr, M. (2001) Photodynamic therapy of locoregional breast cancer recurrences using a chlorin-type photosensitizer. *Int. J. Cancer* **93**: 720-724
- Yarmonenko, S.P., Wainson, A.A., Bereznova, L.I., Krimke, V.M., Ovakimov, G.V., Petrosian, E.P., Shmakova, N.L. (1976) The selective protection of normal tissues by irradiation of tumor-bearing mice in hypoxic hypoxia. *Radiat. Res.* **67**: 447-458
- Zimmermann, A., Ritsch-Marte, M., Kostron, H. (2001) mTHPC-mediated photodynamic diagnosis of malignant brain tumors. *Photochem. Photobiol.* **74**: 611-616
- Zwerschke, W., Mazurek, S., Massimi, P., Banks, L., Eigenbrodt, E., Jansen-Dürr, P (1999) Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Proceed. Nation. Academy Sci., USA* **96**: 1291-1296

# DANKSAGUNG

Mein Dank gilt den folgenden Personen, die bei der Durchführung meiner Arbeit beigetragen haben:

Ich bedanke mich bei Herrn Univ. Prof. Dr. Peter Vaupel, dass er mir ermöglicht hat, am Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz meine Arbeit zu erstellen sowie für die wissenschaftliche Anleitung und Unterstützung.

Bei Herrn Univ. Prof. Dr. Erich Eigenbrodt möchte mich ich besonders für die Unterstützung und Bereitschaft, die extern durchgeführte Arbeit vor dem Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zu vertreten, bedanken.

Daneben möchte ich Herrn Prof. Dr. Oliver Thews für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die sehr gute Betreuung und Unterstützung während der Arbeit sowie für die geduldige und freundliche Einweisung im EDV-Bereich und die Anleitung bei der statistischen Auswertung danken.

Frau Dr. Debra K. Bickes-Kelleher gilt mein Dank für die Einführung in die Methoden, die Zusammenarbeit und Unterstützung bei den praktischen und wissenschaftlichen Teilen meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Sybille Mazurek für die technischen Einweisungen in die praktischen Arbeiten im Labor des biochemischen Institutes in Gießen und für die wissenschaftlichen Diskussionen.

Ferner gilt mein Dank Herrn Wolfgang Dillenburg, der durch seine stete Bereitschaft zur Diskussion und Hilfe bei der praktischen Durchführung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Barbara Biesalski, Frau Annetraut Jung und Frau Bianca Kulick danke ich für ihre stets bereitwillige Hilfe bei den Versuchen.

Schließlich bedanke ich mich bei der Dr. med. h.c. ERWIN-BRAUN-STIFTUNG, Basel, für die finanzielle Unterstützung.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung.

*In Memoriam*

# *Erich Eigenbrodt*

*Prof. Dr. med. vet.*

*28. 3. 1949 – 11. 6. 2004*

Aus Wurzeln, die in Tiefen reichen,  
sich dem Licht entgegenstrecken,  
der Kälte Leben abzubringen  
und Frucht zu bringen mit der Zeit –  
wachsen wie ein Baum

Im Einklang mit der Vielfalt bleiben,  
Grund und Luft und Säfte teilen,  
den Stürmen wehrlos widerstehen,  
sich seiner Mitte sicher sein –  
wachsen wie ein Baum.

Verluste schmerzlich zu empfinden,  
und doch nie am Frühling zweifeln,  
der Hitze Schatten abzutrotzen,  
im Regen Unterschlupf zu sein –  
wachsen, wie ein Baum

Mit Gutem Böses zu vergelten,  
sterbend noch die Hoffnung wahren,  
dass Äxte, die die Welt zerschlagen,  
betroffen schweigen eines Tags –  
fallen, wie ein Baum.



*(Eugen Eckert)*