

- [11] POKORA, T.; BRING, D.; MAMMEL, M.; BOROS, S.: Neonatal high frequency jet ventilation. *Pediatrics* 72 (1983) 27-32.  
[12] SLUTSKY, A. S.: Mechanisms affecting gas transport during high frequency oscillation. *Crit. Care Med.* 12 (1984) 713-717.

(Eingegangen bei der Redaktion am 13. 4. 1987; angenommen am 5. 5. 1987)

Anschrift der Verfasser:

p. A. MR Dr. sc. med. HORST ECKERT, Forschungsinstitut für Lungenkrankheiten und Tuberkulose, Karower Straße 11, Berlin-Buch, DDR - 1115

## Hämatoporphyrinderivat-induzierte Tumorfloreszenz

### Haematoporphyrin-Derivative-Induced Tumour Fluorescence

E. KNOTH<sup>1)</sup>\*, K. KÖNIG<sup>2)</sup>, W. GRASZME<sup>3)</sup>, W. DIETEL<sup>2)</sup>, K.-H. DONNERHACKE<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Zentralklinik Bad Berka, <sup>2)</sup>Sektion Physik der FSU Jena, <sup>3)</sup>Forschungszentrum des Kombiniertes VEB Carl Zeiss JENA/DDR

#### Summary

Detection of HpD-sensitized tumour was successful by use of HBO 200 mercury lamp, Argon ion laser, as well as for N<sub>2</sub>-pumped dye laser.

After 20 hours period of HpD application the localization of the Ehrlich ascites tumour in mice was identified macroscopically and by spectroscopy.

To exclude red emissions of detection sources the use of dye lasers is recommend.

**Key words:** Haematoporphyrin Derivative (HpD) - Tumour Fluorescence

#### Zusammenfassung

Der fluoreszenzoptische Nachweis HpD-sensibilisierter Tumoren gelang durch Bestrahlung mittels HBO-200-Quecksilberhöchstdrucklampe, durch Argonlasereinsatz sowie durch Verwendung eines stickstofflasergepumpten Farbstofflasers. Unter Verwendung eines soliden Ehrlich-Aszites-Mäusetumormodells konnte nach 20stündiger HpD-Vorsensibilisierung eine sichere Tumorkalibration makroskopisch und spektroskopisch erreicht werden. Zur Vermeidung störender Erregerlichtemission wird die Verwendung des Farbstofflasers empfohlen.

**Deskriptoren:** Hämatoporphyrinderivat (HpD) - Tumorfloreszenz

Die Tatsache, daß Hämatoporphyrinderivat (HpD) eine selektive Anreicherung im tumorösen Gewebe aufweist, läßt sich durch Fluoreszenznachweis zur Tumorkalibration nutzen. Für Bronchologie, Urologie, Gastroenterologie, Dermatologie u. a. wurden entsprechende klinische Anwendungsmöglichkeiten erarbeitet [2, 4]. Offene Fragen ergeben sich jedoch im Hinblick auf das erfaßte Tumorstadium und in der sicheren Differenzierung gegenüber anderen Prozessen regenerativer oder entzündlicher Art.

Aus technischer Sicht leiten sich weitere Probleme ab. Sie betreffen die Empfindlichkeit der Fluoreszenznachweisordnung. Außerdem können störende Rotemissionen der Erregerlichtquellen fehlinterpretiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zu dieser Fragestellung verschiedene experimentelle Anordnungen zum Fluoreszenznachweis an einem speziellen Tumormodell getestet.

## Material und Methodik

### 1. Tumormodelle

Zur Verfügung standen selbst propagierte Mäusetumoren, die durch subkutane Injektion von 0,2 ml einer Ehrlich-Azites-Karzinomzell-Suspension (6 Mill./ml) an weiblichen ICR-Mäusen induziert wurden. Zur Diagnostik wurden Tumoren verschiedenen Alters und unterschiedlicher Größe benutzt. Die Tiere wurden mit Standardfutter und Leitungswasser ad libitum ernährt. Ihre Haltung erfolgte in Gemeinschaftskäfigen, nach HpD-Injektion im abgedunkelten Raum. Die Mäuse wurden nach Hexobarbital-Narkose auf schwarzem Untergrund in Schräglage so fixiert, daß die Fluoreszenz senkrecht zum einfallenden Erregerlicht registriert wurde.

### 2. Photosensibilisator

Zur Sensibilisierung wurde Hämatoporphyrinderivat (HpD, Fa. Ferak, Berlin/West) in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpermasse intravenös appliziert. Die Untersuchungen wurden einheitlich 20 Stunden post injectionem ausgeführt.

### 3. Technische Voraussetzungen

#### 3.1. Erregerlichtquellen

Verwendet wurden Lichtquellen mit einer Emission um 400 nm, die in das Hauptabsorptionsgebiet des Hämatoporphyrinderivates einstrahlen. Zur Verfügung standen

1. eine Quecksilberhochdrucklampe HBO 200 des VEB Narva Berlin ( $\lambda = 405$  nm, Abb. 1),
2. ein Argonionenlaser ILA 120 des VEB Carl Zeiss JENA ( $\lambda = 488; 514,5$  nm). Die roten Plasmaliniolen wurden spektral mittels Prisma ausgefiltert (Abb. 2).
3. ein Stickstofflaser-gepumpter Farbstofflaser ( $\lambda = 406$  nm, Laboraufbau des VEB Carl Zeiss JENA).

Abb. 3 stellt den verwendeten Farbstoffküvettenlaser mit Gitterresonator und Aufweitungssystem dar. Als aktives Medium wurde der Farbstoff BDAO, gelöst in Benzen, benutzt. Pumpquelle war ein leistungsstarker Stickstoffsupersstrahler (600 kW,  $\tau = 9$  ns, Wirkungsgrad 10%). Die Erregerstrahlung wurde auf den chirurgisch freigelegten subkutanen Tumor gerichtet.

#### 3.2. Fluoreszenzdetektorsysteme

Die induzierte Fluoreszenz wurde über Lichtleiter einem Gittermonochromator zur Wellenlängenselektion zugeführt und über ein SEV-Meßsystem (S-20-Kathode) erfaßt. Entsprechend dem Strahl-

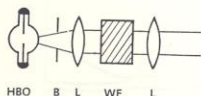


Abb. 1 Fluoreszenzanzregung durch HBO 200 (Quecksilberhochdrucklampe des VEB Narva Berlin). Schematische Darstellung der Filterung,  $\lambda = 405$  nm. (B = Blende, L = Linse, WF = Wärmeschutzfilter)

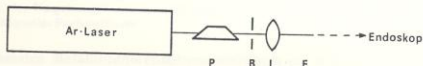
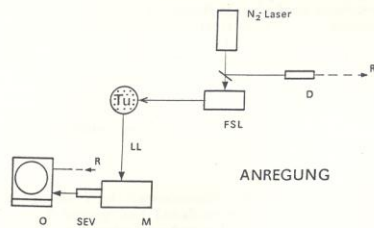


Abb. 2 Einsatz des Argonlasers ILA 120 zum Tumorfloreszenznachweis (P = Prisma, B = Blende, L = Linse, F = Lichtleitfaser)

4) Herrn Dr. rer. nat. Gutsche, Zentralinstitut f. Molekularbiologie u. experiment. Therapie d. Akad. d. Wiss. d. DDR, Jena, wird für die freundliche Überlassung des Tumormodells gedankt.



### FLUORESCENZ-NACHWEIS

Abb. 3 Versuchsanordnung (schematisch) zur Fluoreszenzanzregung und Registrierung mittels stickstofflasergepumpten Farbstofflasers (FSL = Farbstofflaser, D = Diode, R = Referenzkanal, LL = Lichtleiter, M = Monochromator, O = Oszillograf, SEV = Sekundärelektronenvervielfacher)

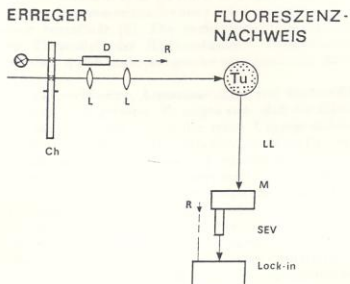


Abb. 4 Detektorsystem unter Verwendung der Lock-in-Technik (Ch = Chopper, Abkürzungen: siehe Abb. 3)

verhalten wurde für cw-Strahlung (HBO 200, Argonlaser) die Lock-in-Nachweisteknik benutzt (Abb. 4), während beim Stickstoff-Farbstofflaser ein getriggertes Oszillograph eingesetzt wurde (Abb. 3). Zusätzlich erfolgte die Fluoreszenzbeurteilung durch direkte visuelle Beobachtung unter Filterverwendung (OG 2, OG 3) sowie mit dem flexiblen Bronchoskop. Dabei wurde ein Okularfilter (OG 2, OG 3) erforderlich.

### Ergebnisse

Die HpD-induzierte Tumorfloreszenz wurde mit allen Verfahren nachgewiesen. Bei direkter visueller Beobachtung mit Absorptionsfiltern (OG 2, OG 3) bzw.

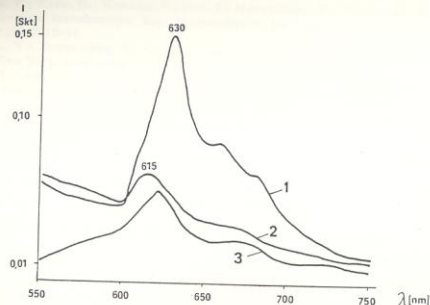


Abb. 5 In-vivo-Fluoreszenzspektrum eines Mäuse-Ehrlich-Karzinoms nach HpD-Injektion (1) im Vergleich zum unbehandelten Kontrolltumor (2), Erregerlichtquelle: HBO 200 (3).

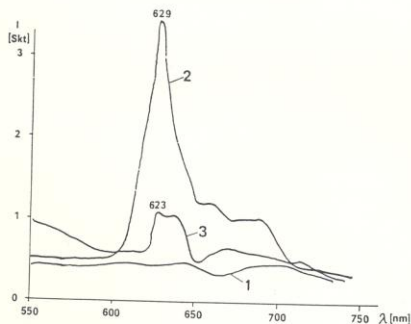


Abb. 6 In-vivo-Fluoreszenzspektrum eines HpD-sensibilisierten soliden Mäuse-Ehrlich-Aszites-tumors (2), der Umgebungsfloreszenz (3) sowie eines nichtsensibilisierten Kontrolltumors (1). Erregerlichtquelle: Farbstofflaser

entsprechenden Metallinterferenzfiltern stellt sich ein tieferer, von der Umgebung abgegrenzter Tumor dar. Die aufgezeichneten In-vivo-Fluoreszenzspektren sind in Abb. 5 und 6 dargestellt. Bei Verwendung der HBO-200-Quecksilberhöchstdrucklampe (Abb. 5) befindet sich die rote Untergrundstrahlung im Bereich beider HpD-Fluoreszenzmaxima (630, 690 nm). Der Tumor selbst repräsentiert eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität.

Messungen mit dem gepulsten Farbstofflaser erlaubten Aussagen zur Fluoreszenzintensität, zum Kontrastverhältnis von HpD im Tumor gegenüber dem Umgebungsgewebe und zur Tumoraufloreszenz. Abb. 6 belegt das Fehlen der störenden Rotemission sowie ein größeres Kontrastverhältnis gegenüber dem Umgebungsgewebe. Die Bestrahlung mit Argonlaserlicht erfordert höhere Intensität. Messungen ergaben, daß eine intensitäts- und zeitabhängige Fluoreszenzlösung infolge photodynamischer Wirkung auftritt. Bei Leistungsdichten größer als 100 mW/cm<sup>2</sup> ist die Möglichkeit thermischer Nebeneffekte gegeben.

*Diskussion*

Der bronchologische Wert fluoreszenzoptischen Tumornachweises besteht in der endoskopischen Erfassung und Lokalisation bislang nicht identifizierbarer, multilokulärer, invasiv wachsender oder früher Tumoren [1, 3, 6, 7]. Durch entsprechende Bestrahlungstechniken wird zugleich die selektive Tumorthherapie auf der Basis eines photodynamischen Effektes möglich (photo radiation therapy).

Voraussetzung sind potente Fotosensibilisatoren, die eine hohe Selektivität der Anlagerung in neoplastischem Gewebe aufweisen und nicht toxisch sind.

HpD hat sich sowohl experimentell als auch bei klinischem Einsatz als hinreichend effektiv erwiesen. Nachteilig ist neben einer lang anhaltenden allgemeinen Fotosensibilisierung des Patienten die nur geringe Absorption in Wellenlängenbereichen mit hoher Gewebetransmission, d. h. im roten und infraroten Spektralbereich.

Die Effizienz des Fluoreszenznachweises wird weiterhin durch die verwendete Erregerlichtquelle beeinflusst [5]. Die vorliegende Untersuchung bestätigt an einem ausgewählten Tiermodell die HpD-induzierte Tumorfloreszenz. Alle Nachweistechniken erlauben durch makroskopische oder spektrale Analyse die sichere Tumorklassifikation.

Quecksilberhöchstdrucklampe, Argonionenlaser und Farbstofflaser wurden als Strahlungsquelle vergleichend getestet. Es zeigte sich, daß die HBO 200 für die Aufnahme von Fluoreszenzspektren auf Grund der roten Untergrundstrahlung wenig geeignet ist. Weiterhin werden energiereichere Strahlungsquellen für die Einkopplung in Lichtleitfasern zur endoskopischen Anwendung erforderlich.

Hieraus resultiert der notwendige Lasereinsatz. Die Emission des Argonionenlasers ILA 120 entspricht nicht dem Absorptionsmaximum des HpD. Dieser Laser kann jedoch bei der Untersuchung von blutenden oder stark vaskularisierten Tumoren auf Grund höherer Strahlstrahlung gegenüber einer 405-nm-Quelle von Vorteil sein [3]. Der Gasionenlaser weist ebenfalls eine nicht zu vernachlässigende Rotemission (Plasmaentladung) auf. Dispersive Filterung wird deshalb notwendig (Abb. 2).

Von großem Interesse ist der Einsatz von Strahlungsquellen ohne störende Rotemission, z. B. eines Farbstofflasers. Er bietet zudem die Möglichkeit der Durchstimmbarkeit der Erregerwellenlänge und gestattet damit die Verwendung anderer, geeigneterer Fotosensibilisatoren.

*Literatur*

[1] BALCHUM, O. I.; DOIRON, D. R.; PROFIO, A. E.; HUTCH G. C.: Fluorescence bronchoscopy for localizing early bronchial cancer and carcinoma in situ. *Recent Res. Cancer Res.* 82 (1982) 97-120.  
 [2] BENSON, JR., R. C.; FARROW, G. M.; KINSEY, J. H.; CORTESE, D. A.; ZINCKE, H.; UTZ, D. C.: Detection and localization of in situ carcinoma of the bladder with hematoporphyrin derivative. *Mayo Clin. Proc.* 57 (1982) 548-555.

- [3] HAYATA, Y.; KATO, H.; KONAKA, C.; ONO, I.; MATSUSHIMA, Y.; YONEYAMA, K.; NISHIMIYA, K.: Fiberoptic bronchoscopic laser photoradiation for tumor localization in lung cancer. *Chest* 82 (1982) 10-14.
- [4] HAYATA, Y.; DOUGHERTY, T. J. (Ed.): *Lasers and hematoporphyrin derivative in cancer*. Tokyo-New York: Igaku-Shoin 1983.
- [5] KATO, H.; AIZAWA, K.; ONO, I.; KONAKA, C.; KAWATE, N.; YONEYAMA, K.; KINOSHITA, K.; NISHIMIYA, K.; SAKAI, H.; NOGUCHI, M.; TOMONO, T.; KAWASAKI, S.; TOKUDA, Y. HAYATA, Y.: Clinical measurement of tumor fluorescence using a new diagnostic system with hematoporphyrin derivative laser photoradiation, and a spectroscopy. *Lasers Surg. Med.* 4 (1984) 49-58.
- [6] KATO, H.; CORTESE, D. A.: Early detection of lung cancer by means of hematoporphyrin derivative fluorescence and laser photoradiation. *Clin. Chest Med.* 6 (1985) 237-253.
- [7] PROFIO, A. E.; DOIRON, D. R.; BALCHUM, O. I.; HUTCH, G. C.: Fluorescence bronchoscopy for localization of carcinoma in situ. *Med. Phys.* 10 (1983) 33-39.

(Eingegangen bei der Redaktion am 28. 3. 1987; angenommen am 8. 9. 1987)

Anschrift der Verfasser:

OA Dr. med. E. KNOTH, Zentralklinik für Herz- und Lungenkrankheiten Bad Berka, DDR - 5303

## Kurze wissenschaftliche Mitteilungen

### Vergleichende Untersuchungen an Blutmonozyten und Alveolarmakrophagen bei Patienten mit Sarkoidose\*\*

Investigations Comparing Blood Monocytes and Alveolar Macrophages in Sarcoidosis

R. CLAU<sup>1</sup>\*, M. NAUSCH<sup>2</sup>, C. ZINGLER<sup>2</sup>, M. KLEIN<sup>3</sup>, U. DIETRICH<sup>3</sup>, K. DIWOK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>) Institut für Immunologie; <sup>2</sup>) Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik;

<sup>3</sup>) Klinik für Innere Medizin, Bereich Medizin, Wilhelm-Pieck-Universität Rostock/DDR

#### Summary

To establish criteria of activity and disease specificity of sarcoidosis several functional markers of alveolar macrophages and blood monocytes were examined. The results are discussed.

**Key words:** Alveolar Macrophages - Sarcoidosis - Activity

#### Zusammenfassung

Zur Feststellung von Aktivitäts- und krankheitsspezifischen Kriterien bei Sarkoidose wurden funktionelle Marker der Alveolarmakrophagen und der Blutmonozyten untersucht. Die Ergebnisse werden diskutiert.

**Deskriptoren:** Alveolarmakrophagen - Sarkoidose - Aktivität

Bei lokalen chronisch entzündlichen Prozessen (u. a. thorakale Sarkoidose) führen Untersuchungen an immunkompetenten Zellen aus dem peripheren Blut häufig zu nicht repräsentativen Ergebnissen. Auf der Suche nach Aktivitäts- und krankheitsspezifischen Kriterien der Sarkoidose verglichen wir funktionelle Marker der Alveolarmakrophagen (durch BAL gewonnen) und Blutmonozyten (nach Dichtegradientenzentrifugation durch Glasadhärenz der mononukleären Zellen (MNC) angereichert; Reinheit 75-95%). Einunddreißig Patienten mit Sarkoidose (davon 20 aktiv) wurden Kontrollen (Gesunde, Patienten mit pulmonaler Entzündung und Bronchialkarzinom) gegenübergestellt.

#### Methoden

1. Leukozytenzählung, unspezifische Esterasäufärbung, Vitalfärbung mit Acridinorange/Ethidiumbromid zur Bestimmung der Monozyten-/Makrophagenzahl und 3-Tage-Überlebensrate.
2. Oberflächenmarkerbestimmung (BL-La/1) zur Erfassung der MHC-Antigene, Klasse II.
3. Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE)-Bestimmung in 20-Stunden-Kulturüberständen.
4. Thymozytenproliferationstest zur Bestimmung von Interleukin (IL1/IL2) in 20-Stunden-Kulturüberständen.
5. Nitrotetrazolumblau-Reduktion (NBT-Test) zur Erfassung des oxidativen Metabolismus.
6. Phagozytose von fluoreszierenden Latexpartikeln.

\*\* Als Vortrag gehalten am 17. 10. 1986 auf dem Symposium über „Neue Diagnostik- und Therapieverfahren in der Bronchologie“, Bad Berka