

Arbeitsgruppe „Laser in der Medizin“ (Leiter: MR Prof. Dr. sc. med. H. BOSSECKERT) der Friedrich-Schiller-Universität Jena

## Photochemotherapie an tierexperimentellen Tumoren mit verschiedenen Photosensibilisatoren

Von K. KÖNIG, V. BOCKHORN, W. DIETEL und H. SCHUBERT

Mit 8 Abbildungen

In wenigstens 60% der Fälle ist das Harnblasenkarzinom ein multifokal wachsender Tumor. Häufig finden sich neben endoskopisch sichtbaren Tumoren mikroskopisch kleine Tumoren, u. a. das prognostisch ungünstige Carcinoma in situ. Hier sind die Ursachen der therapeutischen Probleme zu suchen. Die gezielte Behandlung der makroskopisch erkennbaren Tumoranteile ist bekannt. In den nicht erfaßten Tumoranteilen ist eine wesentliche Ursache für die hohe Rezidivquote zu sehen.

Obwohl die intracavitäre Zytostatikabehandlung kleine, an der Oberfläche der Harnblasenwand befindliche Tumoranteile zerstören kann, konnten die Heilungsergebnisse nur partiell verbessert werden. Zudem besteht die Gefahr einer zytostatikabedingten eigenständigen Tumorindikation in der miterfaßten gesunden Mukosa. Angesichts dieser Tatsache ergeben sich mit der Photochemotherapie neue Möglichkeiten zur effektiveren Therapie von nicht erkennbaren Tumoranteilen.

Mit der Entwicklung der Laser- und Lichtleittechnik gewinnt der Einsatz von photodynamisch wirksamen und sich bevorzugt in Tumorgewebe anlagernden Farbstoffen zunehmend an Bedeutung. Üblicherweise wird als Photosensibilisator das Porphyringemisch Hämato-porphyrinderivat (HpD) verwendet, die Aktivierung erfolgt mit Strahlung der Wellenlänge um 630 nm. Inzwischen sind einige 1000 Pat. mit diesem Sensibilisator behandelt worden (1). HpD weist jedoch einige Nachteile auf. So verfügt die Substanz über ein nur geringes Absorptionsvermögen im therapeutisch interessierenden Spektralbereich hoher Gewebetransmission und führt nach intravenöser Applikation infolge einer Akkumulation in den äußeren Hautschichten zu einer mehrwöchigen Photosensibilität des Patienten. Die Suche nach HpD-Alternativen ist deshalb von größtem Interesse.

Die Sektion Physik der Friedrich-Schiller-Universität Jena, die Urologische Klinik und das Tierexperimentelle Zentrum testen seit einigen Jahren in Zell- und Tierversuchen die photodynamische Wirkung spezieller Farbstoffe.

Bei der Auswahl der Substanzen werden dabei folgende Kriterien berücksichtigt:

1. Hydrophiles/lipophiles Verhalten
2. Größe des molaren Absorptionskoeffizienten im roten und NIR-Spektralbereich (Abb. 1)
3. ISC-Rate
4. Photoinduzierte Generation von Singulett-Sauerstoff oder Radikalen, die durch Wechselwirkung mit molekularem Sauerstoff entstehen
5. Bestandteil von Medikamenten (Verkürzung des Zulassungsverfahrens)

Zunächst erfolgt die Testung der Wirksamkeit der Farbstoffe anhand phototoxischer Untersuchungen. Zeigt sich eine photodynamische Wirkung, wird der Photosensibilisator tumortragenden Versuchstieren injiziert und das Verhalten auf das Tumorwachstum mit und ohne

zusätzliche Laserbestrahlung untersucht. Das Anlagerungsverhalten des i.p. oder i.v. applizierten Photosensibilisators (PS) wird mittels optischer Verfahren (Fluoreszenz, Photoakustik, Transmission) beobachtet.

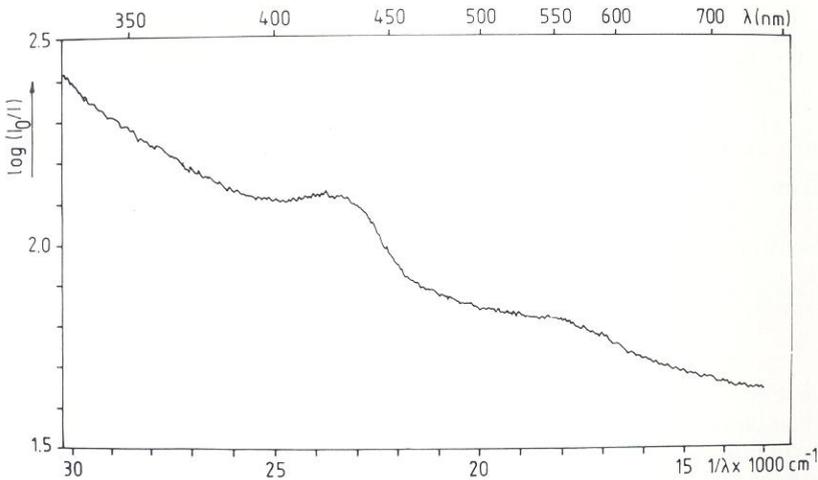


Abb. 1. Extinktionsspektrum von biologischem Gewebe

Insbesondere die körpereigenen Farbstoffe Melanin, Bilirubin und Hämoglobin führen im kurzwelligen Teil des sichtbaren Spektralbereiches zu einer hohen Gewebeabsorption. Als Bereich des „optischen Fensters“ von biologischem Gewebe wird deshalb der rote und NIR-Bereich angesehen

### 1. Testung der photodynamischen Wirksamkeit

Die Testung der photodynamischen Wirkung der ausgewählten Farbstoffe erfolgt durch Bestimmung der Phototoxizität

1. durch Vitalitätsuntersuchung humaner Lymphozyten nach Farbstoff-Inkubation und Bestrahlung. Photodynamisch induzierte Schädigungen der Zellen werden durch Auszählung der lytisch gewordenen Zellen und durch Nicrosin-Färbung (Nachweis der Membranschädigung) bestimmt. Dosis-Wirkungs-Kurven werden auch in Abhängigkeit von der eingestrahelten Wellenlänge aufgenommen. Bisher wurden verschiedene HpD-Präparate derart untersucht.
2. durch Toxizitätstests an ICR-Mäusen ( $LD_{50}$ -Bestimmung). Die Letalitätsrate wird in Abhängigkeit von der applizierten Farbstoffmenge, der Bestrahlungsdosis und eingestrahelter Wellenlänge bestimmt (siehe auch Abb. 5.).

### 2. Testung der antitumorösen Wirksamkeit

Zeigt sich bei den untersuchten Farbstoffen eine photodynamische Wirkung, werden diese Photosensibilisatoren (PS) hinsichtlich ihrer antitumorösen Wirksamkeit untersucht. Die Testung bzw. die Photochemotherapie (PCT, auch Photodynamische Therapie, PDT, genannt) erfolgt an tierexperimentellen Tumoren (u. a. solides Ehrlich-Carcinom der Maus).

#### 2.1. Versuchstiere (Tumor) Gruppeneinteilung

Zum Einsatz kommen weibliche Shoe-ICR-Mäuse (VTP Schönwalde) im Alter von 4–6 Monaten (konventionelle Haltungsbedingungen, natürlicher Lichtrhythmus, VIDI-Mäuse und Rattenfutter (VTP Schönwalde), RT 18-23 C) mit ein- oder zweiseitig subcutan induziertem

soliden Tumor. Das verwendete Ehrlich-Carcinom zeigt ein dreiphasiges Wachstum (Abb. 2). Nach einer ersten langsamen Phase schließt sich eine schnelle zweite Phase an, der eine dritte mit Sättigungscharakter folgt. Bereits in der zweiten Phase ist ein zunehmender Anteil autonekrotischer Areale zu beobachten.

Zur Erzeugung der soliden Form werden 0,2 ml einer Ehrlich-Ascites-Zellsuspension (2 Millionen Zellen/ml) den Versuchstieren subcutan in den vorher von Haaren befreiten lateralen Abdominalbereich appliziert. Die Tiere werden in verschiedene Kontroll- und PCT-Gruppen eingeteilt (i. allg. n = 10).

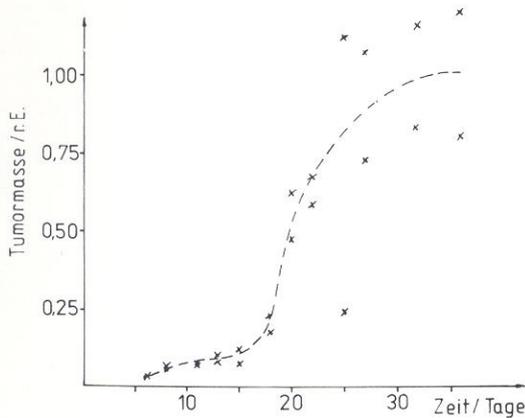


Abb. 2. Wachstum des soliden Ehrlichcarcinoms

In der Phase schnellen Wachstums treten hypoxische und autonekrotische Areale auf. Die Auswertung erfolgt deshalb i. allg. zu Beginn dieser Phase

## 2.2. PS-Applikation

Die mit NaCl und PBS (pH = 7,4) versetzten Pharmaca werden den Versuchstieren, entsprechend dem Versuchsplan, i.v. (Schwanzvene), i.p. oder s.c. (Umspritzen des Tumorbettes) nach dem makroskopischen Sichtbarwerden des Tumors (etwa 5. Tag p.i.) appliziert.

Die Anlagerung der PS im Tumorgewebe wird durch in-vitro Fluoreszenzmessungen (Anregungsstrahlung bei Porphyrinen: 351 nm und 364 nm, Methylenblau: um 600 nm) oder durch Absorptionsmessungen mittels photoakustischem Spektrometer (3) zeitlich verfolgt. So kann nach i.p. Injektion einer 5 mg/kg KM HpD-Lösung der PS nach 1 h im Tumor nachgewiesen werden und erreicht nach etwa 20 h den günstigsten Konzentrationsgradienten zur Tumorumgebung.

## 2.3. Bestrahlungsanordnung und Bestrahlungsregime

Als Bestrahlungsquellen stehen Gasionenlaser (Emissionswellenlängen des Kryptonionen-Lasers: 647 und 676 nm, Laserwellenlänge des Helium-Neon-Lasers: 633 nm) und cw-Farbstofflaser (aktives Medium: Rh 6G, Rh B, Rh + Kresylviolett, DCM) zur Verfügung. Abbildung 3 zeigt eine Versuchsanordnung. Die Bestrahlungsdosen (E 200 J/cm) werden so gering gehalten, daß thermisch induzierte Nekrosen ausgeschlossen werden können.

Die HpD-Gruppe wird 20 h nach HpD-Applikation, die anderen untersuchten PS-Gruppen i. allg. 4 h nach Applikation der Substanzen bestrahlt. Die Bestrahlungsdauer variiert zwischen 10 und 60 min.

## 2.4. Auswertung

Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der Tumorfeuchtgewichte (Entnahme und Wägung durch dritte Person). Statistik: Nach dem F-Test wurde der t-Test oder der u-Test (MANN-WHITNEY-Statistik) verwendet.

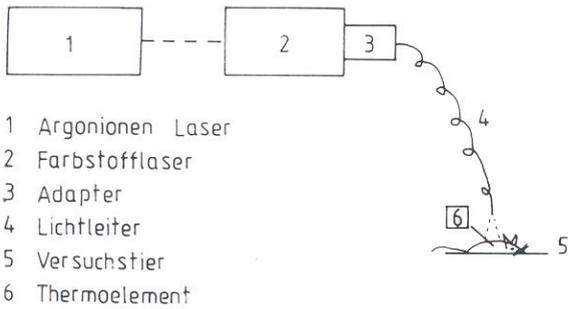


Abb. 3. Schema der PCT-Anlage

Typische Bestrahlungsbedingungen sind:  $P = 200 \text{ mW}$ ,  $t = 30 \text{ min}$ , Bestrahlungsfläche  $2 \text{ cm}^2$ . Die Temperaturmessung erfolgt durch Thermolemente und Handpyrometer.

Zur qualitativen Bewertung werden in Ergänzung histologische Untersuchungen (LM, in einigen Fällen auch EM) durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Untersuchungen mit dem Photosensibilisator Methylenblau

Der Thiazinfarbstoff Tetramethylthionin (Methylenblau) ist als Sensibilisator mit hoher Singulett-Sauerstoff-Generation und auch als Radikalbildner seit langem bekannt (z. B. 3). Versuche zur antitumorösen Wirksamkeit wurden von BERG und JUNGSTAND (4) bereits 1966 durchgeführt. Die Autoren verwendeten dabei Gashochdrucklampen. Von FUKUI (5) 1983 wird eine Korrelation zwischen der Methylenblau-Färbung des Gewebes und dem Grading bei bestimmten Tumoren gefunden. Damit wird ein Einsatz des Farbstoffes Methylenblau als PS für die selektive PCT z. B. bei Blasen Tumoren möglich. Hier kann die lokale Applikation (Instillation der Methylenblaulösung in die Harnblase) eine Akkumulation in äußeren Hautschichten und damit eine Photosensibilisierung des Patienten (i. G. zu HpD nach i. v. Injektion) verhindern.

Die Abbildung 4 zeigt das Absorptionsspektrum einer Methylenblaulösung (LM: NaCl, PBS). Der wesentlich höhere molare Extinktionskoeffizient von Methylenblau im roten Spektralbereich im Vergleich zu HpD ist für die Effektivität der PCT wesentlich. Bei unseren Experimenten verwenden wir im allgemeinen simultan die beiden Emissionslinien des Kryptonionen-Lasers bei 647 und 676 nm. In der Abbildung 5 sind die Toxizitätsraten bestrahlter Tiere in Abhängigkeit von der applizierten PS-Konzentration, sowie die Ergebnisse der PCT dargestellt. Eine deutliche Reduktion der Tumorfuechtgewichte, einschl. vollständiger Vernichtung in einigen Fällen, kann erzielt werden (6).

Inzwischen werden die technischen Voraussetzungen zur PCT-Behandlung von Patienten mit Harnblasentumoren geschaffen (Abb. 8).

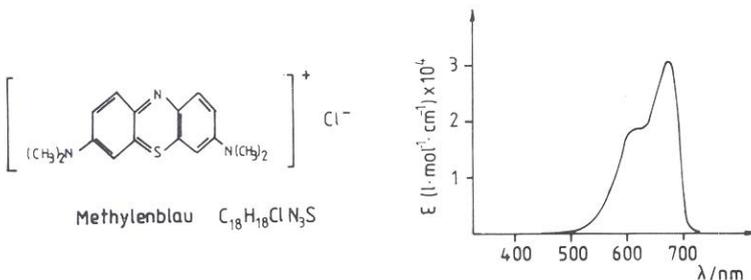


Abb. 4. Absorptionsspektrum von Methylenblau in PBS,  $\text{pH} = 7,4/c = 3 \times 10^{-5} \text{ M}$

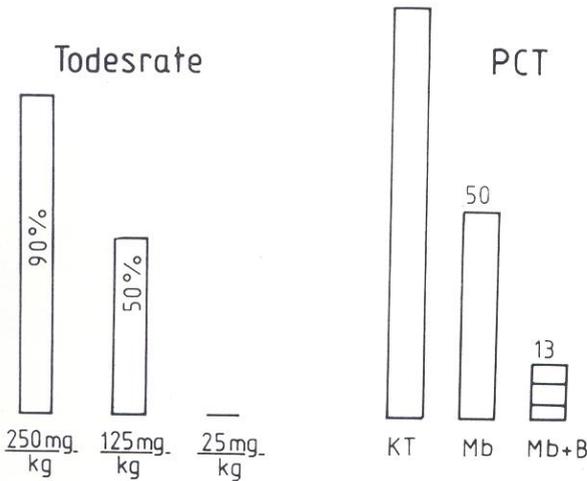


Abb. 5. Testung der photodynamischen Wirksamkeit anhand der Letalitätsrate nach Methylenblau-Applikation und Bestrahlung (200 J/cm<sup>2</sup>, 647 und 676 nm), links und PCT-Resultate nach 25 mg/kg KM Methylenblau-Applikation (s.c.) und gleichen Bestrahlungsbedingungen, rechts

### 3.2. Untersuchungen mit reduzierten Porphyrinen

Zum Einsatz kommt der Chlorophyllabkömmling Phaeophorbid a, der in wässriger Lösung einen hohen Aggregationsgrad verbunden mit einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute, eine hohe ISC-Rate und hohem molaren Extinktionskoeffizienten im roten Bereich aufweist. In den Versuchen mit Phäophorbid a konnte jedoch keine Hemmung des Tumorwachstums gefunden werden. Eine Substanzschädigung infolge einer notwendigen Vorbehandlung mit C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (geringe Wasserlöslichkeit) ist nicht auszuschließen.

Demgegenüber können die typischen photodynamischen Wirkungen, einschl. einer Reduzierung des Tumorwachstums, nach Gabe von Chlorophyllin und Lichtapplikation beobachtet werden. Abbildung 6 zeigt erhaltene Ergebnisse im Vergleich zu den HpD- und Methylenblau-Experimenten. Die Untersuchungsergebnisse bzgl. HpD sind (9) zu entnehmen.

### Tumor - Feuchtgewichte

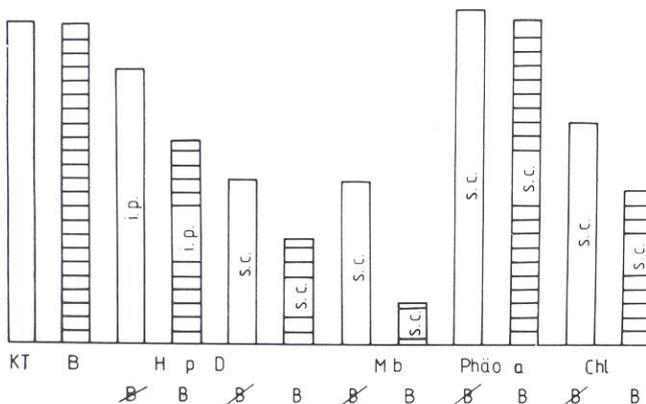


Abb. 6. Hemmung des Tumorwachstums des soliden Ehrlichcarcinoms nach PCT bei Gabe von Phäophorbid a und Chlorophyllin im Vergleich zu HpD und Methylenblau. Die Kontrolltiere erhalten die gleiche Menge NaCl verabreicht

### 3.3. PCT hypoxischer Tumorareale

Wie Untersuchungen zeigen, setzt eine Hypoxie des Gewebes die Effektivität der PCT wesentlich herab. Solide Tumoren weisen aber häufig einen hohen Anteil hypoxischer Areale auf (nach (7) bis 50%). Ein verringertes Sauerstoffangebot begrenzt auch die Möglichkeiten der

Radiologie. Es zeigt sich jedoch, daß bestimmte elektrophile Verbindungen mit großem Diffusionsradius in biologischem Gewebe, die Nitroimidazole, die Strahlenresistenz hypoxischer Zentren herabsetzen. Aus Untersuchungen von (8) ist zudem bekannt, daß aktivierte Porphyrine mit diesen „Radiosensitizern“ photodynamisch wirksame Komplexe bilden (Photooxydation Typ I). Wie unsere in-vivo Untersuchungen zeigen (Abb. 7), kann die zusätzliche Applikation von Nitroimidazolen zur HpD-PCT bei soliden Tumoren mit hohem hypoxischen Anteil die antitumoröse Wirksamkeit erhöhen.

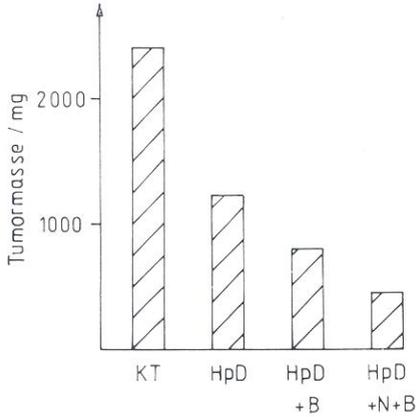


Abb. 7. HpD-PCT bei gleichzeitiger Gabe von Nitroimidazolen. Die Behandlung erfolgt in der Wachstumsphase 2 (siehe Abb. 2). Die alleinige Gabe von Nitroimidazolen mit und ohne Bestrahlung zeigt keinen Einfluß auf das Tumorstadium

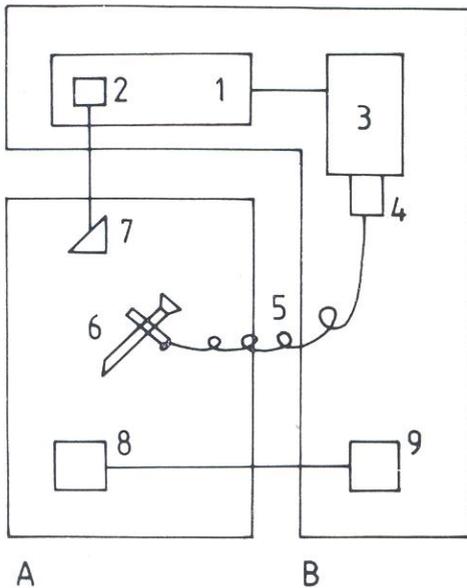


Abb. 8. Laserpilotanlage an der Sektion Physik (B) und der Urologischen Klinik (A)

Als Lichtquelle dient ein ILA-190 (1) gepumpter DCM-FSL (3), der mit einer maximalen Ausgangsleistung von 1 W Strahlung im Spektralbereich von 600–700 nm zur Verfügung steht. Mittels Fasereinkopplungsgerät (4) wird die Laserstrahlung in einen 200 m langen step-index-Lichtleiter (5) eingekoppelt und von der Sektion Physik in den Op-Saal der Urologischen Klinik übertragen. Der Lichtleiter wird dort in den Arbeitskanal eines Zystoskops eingeführt. Durch den Fußschalter (7) und der intracavity-Schalteneinheit (2) ist der Laser fernbedienbar, die Wechselsprechanlage (8, 9) ermöglicht eine Kommunikation. Die Anlage ist im Einsatz zur Methylenblau-PCT und zur lasergestützten Rekanalisation von Harnleiterverschlüssen

### Zusammenfassung

An der Friedrich-Schiller-Universität Jena werden seit mehreren Jahren verschiedene sensibilisierende Farbstoffe mit hohem molaren Extinktionskoeffizienten im roten Spektralbereich hinsichtlich ihrer photodynamischen Wirksamkeit getestet. Zeigt sich ein phototoxisches Verhalten wird der Einfluß dieser Photosensibilisatoren auf die Hemmung des Wachstums schnellwachsender solider Ehrlichcarcinome untersucht. Insbesondere die aktivierten Photosensibilisatoren Methylenblau, HpD-Halle und Chlorophyllin bewirken eine deutliche Reduzierung der

Tumorfeuchtgewichte im Vergleich zu Kontrolltumoren. Bei Vorliegen hypotoxischer Areale bietet sich die zusätzliche Applikation von Nitroimidazolen an. Eine Laserpilotanlage wird vorgestellt, die die Durchführung der PCT an Patienten mit Harnblasentumor ermöglicht.

### Резюме

В университете им. Фридриха Шиллера в Йене уже несколько лет опробуются различные сенсibiliзирующие красители с высоким молярным коэффициентом экстинкции в красной спектральной области на их фотодинамическую действенность. В случае наблюдения фототоксического действия исследуется влияние этих фотосенсибилизаторов на ингибирование роста быстрорастущей солидной карциномы Эрлиха. Особенно активированные фотосенсибилизаторы метилениевой синкой, HpD из города Галле и хлорофиллин вызывают значительное уменьшение веса свежих опухолей по сравнению с контрольными. При наличии гипоксических ареалов рекомендуется дополнительная аппликация нитроимидазола. Представлена опытная лазерная установка, позволяющая проведение фотохимиотерапии у больных с опухолью мочевого пузыря.

### Summary

Different colouring matters with high molar extinction coefficient were tested at the Friedrich Schiller University with regard to their photodynamic efficiency. Test system was the rapidly-growing solid Ehrlich carcinoma. Methylene-blue, hematoporphyrin derivative Halle and chlorophyllin produce a markedly reduction of the tumor weight. In the presence of hypoxic areas an additional application of nitroimidazole is possible. A pilot laser unit for photochemotherapy of urinary bladder tumors is presented.

### Literatur

1. DOIRON, D. R., O. J. GOMER: Porphyrin localization and treatment of tumors. ed by Alan R. Liss. New York 1983.
2. KÖNIG, K., E. WELSCH, H. G. WALTHER: Photoakustisches Spektrometer. Medizintechnik 29 (1989) 16–18.
3. BÜTTNER, G. R., T. P. DOHERTY, T. D. BANNISTER: Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Radical Formation by Methylene Blue in the Presence of Ascorbic Acid. Radiat. Environ. Biophys. 23 (1984) 235–243.
4. BERG, H., W. JUNGSTAND: Photodynamische Wirkung auf das solide Ehrlich-Karzinom. Naturwissenschaften 18 (1966) 235–243.
5. FUKUI, I., et al.: In vivo staining test with Methylene Blue for Bladder Cancer. J. Urol. 130 (1983) 252–255.
6. KÖNIG, K., V. BOCKHORN, W. DIETEL, H. SCHUBERT: Photochemotherapy of animal tumors with the photosensitizer Methylene Blue using a krypton laser. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 113 (1987) 301–303.
7. MAGDON, E.: Zum gegenwärtigen Stand des Einsatzes von Radiosensitizern in der Strahlentherapie aus strahlenbiologischer Sicht. Radiobiol. Radiother. 6 (1980) 778–787.
8. BAZIN, M., R. SANTUS: Selective Typ I Photooxydations in Mixtures of Porphyrines and electrophilic Nitroimidazoles. Photochem. Photobiol. 3 (1986) 235–242.
9. KÖNIG, K., U. KRAUSE, V. BOCKHORN, W. DIETEL, H. SCHUBERT, W. LOTZ, U. LÖBE: Photodynamic therapy with HpD on mice with solid Ehrlichcarcinomas. Archiv Geschwulstforsch. 59 (1989) 1–6.

Eingegangen: 24. 1. 1989

Angenommen: 30. 6. 1989

Anschr. d. Verff.: Oberarzt Dr. med. V. BOCKHORN, Klinik und Poliklinik für Urologie, Bereich Medizin der Friedrich-Schiller-Universität, Lessingstr. 1, Jena, DDR-6900

# KONGRESSANKÜNDIGUNG

## **11. Internationales Symposium des Ludwig-Boltzmann-Institutes zur Erforschung der Infektionen und Geschwülste des Harntraktes**

Wien, 22. bis 24. Februar 1990

Hauptthemen: Pharmakologische Beeinflussung der Blasen- und Blasenhalmsmotorik  
Harninkontinenz bei Mann und Frau  
Erektile Impotenz

Information und Organisation:

Frau E. RIBAR-MAURER

Sekretariat des 11. Internationalen Symposium

c/o Wiener Medizinische Akademie, Alser Straße 4

A-1090 Wien, Telefon: (0222) 42 71 65, Telegramme: MEDACAD Wien,

Telex: 134743 medak a, Fax: 421383 23