

Beiträge zur selektiven Photochemotherapie
und
optischen Diagnostik von Tumoren

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors des
Wissenschaftszweiges an der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen
Fakultät des Wissenschaftlichen Rates der Friedrich-Schiller-Universität Jena

vorgelegt
von

Karsten König

geboren am 07.02.1960 in Dessau

Tag der Verleihung des Doktorgrades: ...18.9.89.....

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 1

1. Die Aufgaben der Technik 2

2. Die Aufgaben der Technik 3

3. Die Aufgaben der Technik 4

4. Die Aufgaben der Technik 5

5. Die Aufgaben der Technik 6

6. Die Aufgaben der Technik 7

7. Die Aufgaben der Technik 8

8. Die Aufgaben der Technik 9

9. Die Aufgaben der Technik 10

10. Die Aufgaben der Technik 11

11. Die Aufgaben der Technik 12

12. Die Aufgaben der Technik 13

13. Die Aufgaben der Technik 14

14. Die Aufgaben der Technik 15

15. Die Aufgaben der Technik 16

16. Die Aufgaben der Technik 17

17. Die Aufgaben der Technik 18

Gutachter: ... Prof. B. Wilhelm

Gutachter: ... Prof. H. Berg

Gutachter: ... Prof. E. Müller

Inhaltsverzeichnis

0.	Verwendete Abkürzungen und Symbole	3
1.	Problematik	4
2.	Anforderungen an Farbstoffe hinsichtlich ihrer Eignung als Photosensibilisatoren für die selektive Photochemotherapie und Diagnostik	8
2.1.	ISC - Rate	8
2.2.	Molarer Absorptionskoeffizient	10
2.3.	IC - Rate	11
2.4.	Fluoreszenzquantenausbeute	11
2.5.	Photobleaching	12
2.6.	Aggregationsverhalten	12
2.7.	Wasser- und Lipidlöslichkeit	12
2.8.	Toxizität	12
3.	Untersuchungen zur photodynamischen Aktivität	13
3.1.	Zielstellung und Bestrahlungsanordnung	13
3.2.	Abschätzung des Wirkungsradius der PCT und des thermischen Verhaltens bei Bestrahlung	14
3.3.	Ergebnisse der in-vivo Testung der photodyna- mischen Wirksamkeit	18
3.3.1.	Versuchstiere/Tumor/Gruppeneinteilung/Applikation	18
3.3.2.	Testung von aggregatangereicherten HpD-Präparaten der DDR-Produktion	18
3.3.3.	Untersuchungen mit dem PS Methylenblau	19
3.3.4.	Untersuchungen an reduzierten Porphyrinen	21
4.	Fluoreszenzdiagnostik	22
4.1.	Einleitung	22
4.2.	Anordnung zur in-vivo Fluoreszenzspektroskopie	25

4.3.	Untersuchungen zur Autofluoreszenz von biologischem Gewebe	26
4.4.	In-vivo Untersuchungen zur HpD-Fluoreszenz	29
4.5.	In-vitro Untersuchungen zur Generation von fluoreszierenden Photoprodukten	31
4.6.	Fluoreszenzverhalten des Photoproduktes	36
4.7.	Sauerstoff-Abhängigkeit	37
5.	Weiterführende Untersuchungen zum Photoprodukt	39
5.1.	Photodynamische Wirksamkeit	39
5.2.	Messungen zur Triplett-Lebensdauer	41
5.3.	Chromatographische Untersuchungen	42
5.4.	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie	43
5.4.1.	Experimentelle Anordnung	43
5.4.2.	Untersuchungen bei schwacher Anregungsstrahlung	44
5.4.3.	Fluoreszenzverhalten von HpD-Lösungen mit Photoproduktanteil	47
5.4.4.	Untersuchungen an HpD-inkubierten humanen Lymphozyten und EAC-Zellen, sowie in-vivo Messungen am Tier	50
6.	Photoakustischer Nachweis von Photosensibilisatoren	52
6.1.	Einleitung	52
6.2.	Aufbau und Eichung eines photoakustischen Spektrometers	55
6.3.	Untersuchungen von Photosensibilisatoren in wässriger Lösung	57
6.4.	Untersuchungen von markiertem Gewebe	59
6.5.	Einfluß der Mehrfachstreuung von Gewebe auf das FAA-Signal	61
7.	Zusammenfassung	64
	Literatur	68

Verwendete Abkürzungen und Symbole

CTAB	-cetyltrimethylammonium bromide (Micelle)
EC	-Ehrlich-Carcinom (hier: die solide Form des EAC)
EAC	-Ehrlich-Ascites-Carcinom
EtOH	-Ethanol
HP	-Hämatoporphyrin
HPD	-Hämatoporphyrin-Derivat
HPTLC-RP	-Dünnschichtchromatogramm (high performance thin layer chromatogram -reverse phase)
HSA	-Humanserumalbumin
HWB	-Halbwertsbreite
i. p.	-intraperitoneal
i. v.	-intravenös
LDL	-Lipoproteine geringer Dichte (low density lipoproteins)
M	-Mol pro Liter
Mb	-Methylenblau
mg/kg KM	-Milligramm je Kilogramm Körpermasse
NaCl	-isotonische Kochsalzlösung
OVA/OMA	-Optischer Vielkanalanalysator (Optical Multichannel Analyzer)
PAA	-Photoakustische Absorption
PBS	-Phosphat-Puffer (phosphate buffered saline), wenn nicht anders angegeben, pH-Wert: 7,4
PCT	-Photochemotherapie
PP	-Photoprodukt/e
PS	-Photosensibilisator
s.c.	-subcutan
SDS	-sodium dodecylsulphate (Micelle)
SPC	-Einzelphotonenzählung (single photon counting)
T ₅₀	-Toxizitätsrate, bei der eine Letalität von 50% vorliegt
TCSPS	-Zeitkorrelierte SPC (time-correlated SPC)
ZOS	-Zentralinstitut für Optik und Spektroskopie
[A]	-Konzentration von A

Verwendete Abkürzungen und Symbole

CTAB	-cetyltrimethylammonium bromide (Micelle)
EC	-Ehrlich-Carcinom (hier: die solide Form des EAC)
EAC	-Ehrlich-Ascites-Carcinom
EtOH	-Ethanol
HP	-Hämatoporphyrin
HPD	-Hämatoporphyrin-Derivat
HPTLC-RP	-Dünnschichtchromatogramm (high performance thin layer chromatogram -reverse phase)
HSA	-Humanserumalbumin
HWB	-Halbwertsbreite
i. p.	-intraperitoneal
i. v.	-intravenös
LDL	-Lipoproteine geringer Dichte (low density lipoproteins)
M	-Mol pro Liter
Mb	-Methylenblau
mg/kg KM	-Milligramm je Kilogramm Körpermasse
NaCl	-isotonische Kochsalzlösung
OVA/OMA	-Optischer Vielkanalanalysator (Optical Multichannel Analyzer)
PAA	-Photoakustische Absorption
PBS	-Phosphat-Puffer (phosphate buffered saline), wenn nicht anders angegeben, pH-Wert: 7,4
PCT	-Photochemotherapie
PP	-Photoprodukt/e
PS	-Photosensibilisator
s.c.	-subcutan
SDS	-sodium dodecylsulphate (Micelle)
SPC	-Einzelphotonenzählung (single photon counting)
T ₅₀	-Toxizitätsrate, bei der eine Letalität von 50% vorliegt
TCSPS	-Zeitkorrelierte SPC (time-correlated SPC)
ZOS	-Zentralinstitut für Optik und Spektroskopie
[A]	-Konzentration von A

1. Problematik

Mit der Entwicklung der Laser- und Lichtleittechnik gewinnen therapeutische und diagnostische Verfahren mittels elektromagnetischer Strahlung im ultravioletten, sichtbaren und infraroten Spektralbereich in der Medizin zunehmend an Bedeutung. Eine große Anwendungsbreite haben solche Laser erreicht, bei denen die Absorption der Strahlung genutzt wird, um durch Gewebeaufheizung thermische Effekte, wie Koagulation, Vaporisation und Karbonisierung zur Gewebearbeitung zu induzieren. Üblicherweise werden dabei leistungsstarke Laser mit geeigneter Emissionswellenlänge eingesetzt, beispielsweise der Argonionen-Laser zur Koagulation (514nm-Strahlung wird von Hämoglobin absorbiert), der CO₂-Laser zum Schneiden (10,6µm wird von Wasser absorbiert) und der Nd-YAG-Laser hoher Leistung zur Bearbeitung auch tieferliegender Gewebepartien (1,06µm-Strahlung liegt im Bereich hoher Gewebetransmission) /1/.

Laser hoher Impulsleistung und hoher Photonenenergie, z.B. Excimerlaser, können andererseits zur Gewebeabtragung eingesetzt werden, ohne daß eine merkliche Gewebeaufheizung stattfindet. Infolge induzierter Dissoziation von Makromolekülen wird hier der Prozeß der ablativen Photodekomposition wirksam /2,3/.

Laserstrahlung geringer Intensität wird für die Photostimulierung von Heilprozessen /4/, die Akupunktur /5/ oder die Fluoreszenzdiagnostik und Photochemotherapie von Psoriasis und Tumoren /6-10/ eingesetzt.

Physikalische Aspekte der Photochemotherapie und der optischen Diagnose von Tumoren stehen im Mittelpunkt vorliegender Arbeit.

Die Photochemotherapie beruht auf der Wirkung von Licht auf spezielle Substanzen. Dabei dient i.allg. Laserstrahlung zur Aktivierung dieser Substanz, eines sogenannten Photosensibilisators. Photosensibilisatoren (PS) sind vorwiegend spezielle Farbstoffe, die nach Lichtabsorption Oxydationsprozesse im Gewebe auslösen und damit zu toxischen Wirkungen führen. Diese sogenannten photodynamischen Effekte können therapeutisch genutzt werden. Man spricht von der Photodynamischen- oder Photochemotherapie (PCT). Bei der Tumorthherapie kann der Sensibilisator intratumoral injiziert (selektive Applikation) oder aber nach systemischer Applikation gezielt das Tumoreareal bestrahlt werden (selektive Bestrahlung). Neuerdings wird auch der Transport von Substanzen und ihre bevorzugte Aufnahme durch den Tumor infolge Kopplung an Liposomen und Antikörper diskutiert /9/.

Besitzt der Photosensibilisator jedoch neben der Eigenschaft der photodynamischen Wirksamkeit auch die der bevorzugten Anlagerung in Tumorgewebe ist die Möglichkeit einer selektiven Tumorthherapie gegeben. Das bedeutet, daß auch nach systemischer Applikation und einer großflächigen Bestrahlung hauptsächlich die Tumoreareale geschädigt werden, umgebende normale Gewebepartien aber nur geringfügig oder nicht und bei multifocalem Auftreten alle Tumorherde innerhalb des Bestrahlungsfeldes den zytotoxischen Reaktionen unterliegen. Voraussetzung ist eine ausreichende Differenzierung hinsichtlich der Konzentration des PS im Tumorgewebe zur Konzentration des Sensibilisators im umgebenden gesunden Gewebe. Gelingt es, diese Differenz auch meßtechnisch zu erfassen, kann die bevorzugte Anlagerung im Tumor auch zur Diagnose genutzt werden. Die Frühdiagnose maligner Geschwülste erhöht die Heilungsaussichten wesentlich.

Mit der meßtechnischen Erfassung der in biologischem Gewebe akkumulierten Photosensibilisatoren beschäftigt sich die vorliegende Arbeit. Dabei werden verschiedene optische Verfahren zum Nachweis, zur Konzentrationsbestimmung, zur Messung des Absorptions- und Fluoreszenzverhaltens und zum Auftreten photochemischer Umwandlungen des Photosensibilisators im Gewebe getestet. Diese Zielstellung schließt die vorherige Testung der photodynamischen Wirksamkeit untersuchter Substanzen anhand von Zell- und Tierversuchen ein.

Als Photosensibilisator wird bisher bei der PCT-Behandlung von Tumoren das Porphyringemisch Hämatoporphyrinderivat (HpD) eingesetzt. Es wurde erstmals 1960 von Lipson /11/ präpariert, 1976 fanden mit einem modifizierten Präparat (Handelsname: Photofrin) erste umfangreiche klinische Anwendungen statt. Inzwischen sind einige tausend Patienten mit diesem Präparat behandelt worden /9/.

HpD besteht zu einem großen Teil aus den metallfreien Porphyrinen Hämatoporphyrin (HPIX), Protoporphyrin (PPIX) und Hydroxyethylvinyl-Deuteroporphyrin (HVDIX) sowie deren Aggregate. Yamashita /12/ unterscheidet folgende Aggregate:

- 1) stabile, konzentrationsunabhängige Aggregate, z.B. Dihämatoporphyrin-Ether (DHE), ein durch Ether und/oder Esterbrücken verbundenes Dimer
- 2) dissoziierbare Aggregate, wobei die Möglichkeit der Bildung hochmolekularer Verbindungen über van-der-Waals Bindungen besteht.

Dem nur schwach polaren und gering fluoreszierenden DHE-Dimer wird eine besondere Bedeutung als wahrscheinlich aktivste Spezies des Gemisches eingeräumt.

HpD fluoresziert im roten Spektralbereich mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von etwa 1% in wässriger Lösung. Die Messung der Fluoreszenz ermöglicht Untersuchungen zur HpD-Akkumulation in Gewebe. Eine bevorzugte Anlagerung in Tumorgewebe konnte mittels Fluoreszenzuntersuchungen /12/ nachgewiesen werden. Messungen mit radioaktiven Markern /13/ bestätigen diese Ergebnisse. Lipson /11/ konnte eine 80%ige Korrelation von Fluoreszenz und biopsiegeprüfter Malignität feststellen. Die Ursachen der tumorselektiven Anlagerung und die ablaufenden photochemischen, zytotoxischen Reaktionen sind nicht eindeutig geklärt und Gegenstand internationaler Forschung.

HpD weist jedoch eine Reihe von Nachteilen auf. So ist die Absorption des PS im therapeutisch interessierenden Bereich hoher Gewebetransmission gering. Zudem besteht HpD aus einem Gemisch von verschiedenen Porphyrinen und deren Aggregaten, wodurch die Untersuchungen kompliziert werden und eine reproduzierbare Herstellung fragwürdig wird. Als nachteilig erweist sich zudem der Umstand, daß eine Photosensibilität des Patienten über einen mehrwöchigen Zeitraum nach erfolgter intravenöser Applikation vorliegt. Neuerdings werden auch neurotoxische Nebenwirkungen diskutiert /14/.

Eine ausführliche Literaturrecherche ist beispielsweise /15*/ zu entnehmen,

Die Suche nach HpD-Alternativen erweist sich damit als notwendig. Auswahlkriterien werden im folgenden Kapitel vorgestellt. Es schließen sich im Kapitel 3 Untersuchungen zu photodynamischen und antitumorösen Eigenschaften medizinisch relevanter Farbstoffe an einem ausgewählten Tumormodell an.

So wurde der photodynamisch wirksame und bevorzugt im roten Spektralbereich absorbierende Thiazinfarbstoffes Methylenblau hinsichtlich seiner Eignung zur Behandlung von Tumoren der Harnblase untersucht. Diese Experimente basieren auf den Veröffentlichungen von Berg und Jungst, 1966 /16/ zur photodynamischen Wirksamkeit von Methylenblau infolge Bestrahlung mittels Hochdrucklampe und der von Fukui et al. 1983 /17/ beschriebenen Korrelation von Tumorstadium und Methylenblaufärbung von Harnblasentumoren.

Die Wirkung eines in der DDR (HNO-Klinik Halle) hergestellten aggregatangereicherten HpD-Präparates wurde getestet und im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die zusätzliche Applikation der als Elektronenakzeptoren wirkenden Nitroimidazole die photodynamischen Wirkung bei Existenz hypoxischer Tumoreareale effektiviert.

Ausgehend von diesen Ergebnissen werden Untersuchungen zur tumorselektiven Anlagerung von endogenen und exogenen Farbstoffen bzw. Substanzen vorgestellt. Hierbei kommen Verfahren der Fluoreszenzspektroskopie und der Photoakustik zur Anwendung.

Es besteht die Möglichkeit der Untersuchung der Verteilung des PS im biologischen Gewebe mit Hilfe einer radioaktiven Markierung des Sensibilisators. Ergebnisse von derart markiertem HpD sind beispielsweise in /18/ (^3H -) und /19/ (^{64}Cu -Markierung) veröffentlicht worden. Probleme dieser Untersuchungsmethode bestehen u.a. in Degradierungserscheinungen des Sensibilisators und in der Wahl von Präparaten geeigneter Halbwertszeit.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich ausschließlich auf optische Verfahren. So widmet sich Kapitel 4 insbesondere der stationären Fluoreszenzspektroskopie. Eine Anlage zur in-vivo Fluoreszenzmessung wird beschrieben und die Möglichkeit einer Differenzierung von Tumor- und Normalgewebe anhand gemessener Autofluoreszenzspektren diskutiert. Bisher existieren nur sehr wenige derartige Untersuchungen.

Bei der Messung der in-vivo-Fluoreszenz von HpD-inkubiertem Tumorgewebe wurde in Abhängigkeit von der eingestrahlten Wellenlänge und der Strahlungsdosis das Auftreten einer zusätzlichen Fluoreszenzbande beobachtet. Es schließen sich in Kapitel 5 Untersuchungen zur Aufklärung dieser Erscheinung an, u.a. zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen mit der Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC). Die gewonnenen Ergebnisse werden hinsichtlich ihrer Relevanz für die HpD-Photochemotherapie, der Möglichkeit der Messung des Sauerstoffstatus von Tumorgewebe und für die Fluoreszenzdiagnostik diskutiert.

Neben der Fluoreszenzspektroskopie bieten Absorptionsmeßverfahren die Möglichkeit der Lokalisation und der Konzentrationsbestimmung von PS in biologischem Gewebe. Der Einsatz eignet sich insbesondere dort, wo Aussagen über das Anlagerungsverhalten von Stoffen geringer Fluoreszenzquantenausbeute, z.B. von HpD-Aggregaten, und Aussagen zum Absorptionsverhalten, z.B. bezüglich der Bestimmung der optimalen Therapiewellenlänge, benötigt werden. In Kapitel 6 werden verschiedene photothermische Meßverfahren hinsichtlich der Vermessung von Gewebeproben verglichen. Ein photoakustisches Spektrometer wird vorgestellt, das auf dem Prinzip des Gaszelle-Mikrophon-Verfahrens basiert und Absorptions-, aber auch Transmissions- und Remissionsmessungen ermöglicht. Als Untersuchungsobjekt diente Methylenblau, das in wäßriger Lösung als Monomer-Dimer-Gemisch mit

jeweils ausgeprägten Absorptionsbanden im roten Spektralbereich vorliegt. Bisher sind dem Verfasser vorliegender Arbeit keine derartigen Messungen an PS-inkubiertem biologischen Gewebe in der Literatur bekannt.

Die tierexperimentellen Arbeiten wurden in der Zusammenarbeit mit der Urologischen Klinik und dem Tierexperimentellen Zentrum der FSU Jena durchgeführt. Die Messungen zur Bestimmung von Triplett-Lebensdauern und der Raten der Singulett-sauerstoff-Generation erfolgten am Physikalischen Institut der Belorussischen Akademie in Minsk, die Streulichtuntersuchungen an HpD-inkubierten Erythrozyten zu einem großen Teil an der Sektion Biophysik der Universität Minsk. Die anderen Meßergebnisse wurden an der Sektion Physik der FSU Jena gewonnen. Kooperationspartner sind den Veröffentlichungen zu entnehmen. Publikationen, die unter Mitwirkung des Autors vorliegender Arbeit entstanden, sind durch * gekennzeichnet.

2. Anforderungen an Farbstoffe hinsichtlich ihrer Eignung als Photosensibilisatoren für die selektive Photochemotherapie und Diagnostik

Im folgenden werden Auswahlkriterien für relevante Farbstoffe anhand photophysikalischer und photochemischer Parameter dargelegt.

2.1. ISC-Rate

Die zytotoxische Wirkung bei der PCT beruht auf Wechselwirkungen aktivierter PS mit Biomolekülen, welche sich i. allg. im Singulettgrundzustand befinden und sich in der Form RH (R-Molekülrest, H-Wasserstoffatom) darstellen lassen.

Die Aktivierung des Sensibilisators erfolgt durch Absorption elektromagnetischer Strahlung, wobei ein Übergang in höherenergetische Zustände stattfindet. Diese können bereits Ausgangspunkt für zytotoxische Folgereaktionen sein, insbesondere durch Sensibilisator-Komplex-Bildungen. So konnte Andreoni /20/ photodynamische Wirkungen nach Multiphotonenabsorption in höherenergetische Zustände nachweisen. Im allgemeinen ist jedoch der Übergang aus dem primär angeregten Zustand in den S_1 -Zustand wesentlich. Dieser ist Ausgangsniveau sowohl des fluoreszierenden Überganges, als auch für den ISC-Übergang zum langlebigen Triplettzustand, s. Abb. 2.1.1. Im T_1 -Zustand wird der Sensibilisator befähigt, photodynamische Reaktionen, insbesondere Photooxydationsprozesse, auszulösen. Die Reaktionen können in aerober und anaerober Umgebung ablaufen. Ein typischer Vertreter unter den Sensibilisatoren für den letzteren Fall ist 8-

Metoxypsoralen (8-MOP). Porphyrine, und damit HpD, benötigen für den Ablauf der photochemischen Reaktionen die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff. Die biologischen Spezies werden in diesem Fall durch die Photooxydationsprozesse Typ I und/oder Typ II geschädigt.

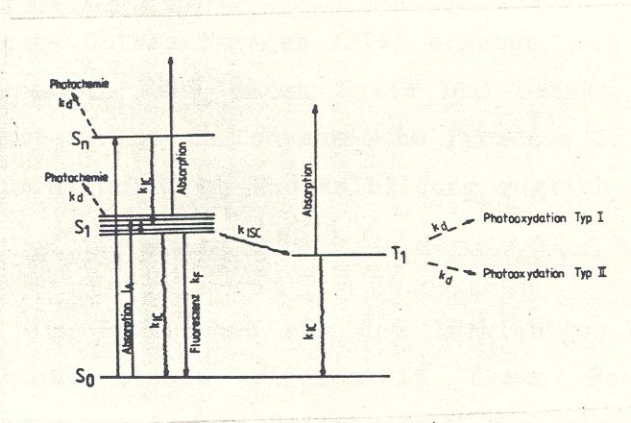
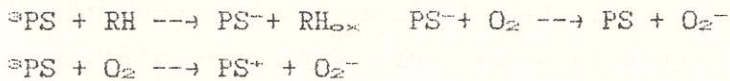


Abb. 2.1.1 Termschema

Typ-I-Prozeß. Bei diesem Prozeß liegt eine direkte Wechselwirkung des Sensibilisators mit dem Substrat vor. Es handelt sich hierbei um einen charge-transfer (z.B. Elektronentransfer) oder um einen Wasserstofftransfer. Hochreaktive Radikale entstehen. Für Porphyrine, die als Elektronenakzeptor und -donor wirken können, sind beispielsweise folgende Reaktionen möglich, die zur Entstehung von reaktiven Superoxidionen führen:

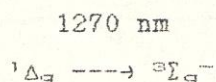


Eine ausführliche Darstellung der radikalischen Reaktionen ist z.B. /21/ zu entnehmen.

Typ-II-Prozeß. Bei diesem Prozeß handelt es sich um einen Energie-Transfer. Er führt zu einer Aktivierung molekularen Sauerstoffs. Der resultierende Singulett-Sauerstoff ist äußerst reaktiv.



Singulett-Sauerstoff kann durch Zugabe von Sonden oder Löschern indirekt nachgewiesen werden. Es besteht auch die Möglichkeit des direkten Nachweises von Singulett-Sauerstoff unter Ausnutzung des strahlenden Überganges:



Der Nachweis erfolgt üblicherweise in D₂O-Lösungen (Lebensdauer von ¹O₂ hier: 58µs, in H₂O: 4,4µs /25/).

Im Fall des aktivierten HpD konnten sowohl Radikale, als auch Singulett-Sauerstoff indirekt nachgewiesen werden /22,23,24/, wobei der Typ II als der dominante Prozeß angesehen wird.

Inzwischen gelang auch der direkte in-vivo $^1\text{O}_2$ -Nachweis /26/.

Eigene Untersuchungen /27*/ ergaben, daß bei Applikation von Nitroimidazol-HpD-Gemischen -von denen Bazin und Santus /28/ bei in-vitro-Experimenten zeigen konnten, daß photodynamische Prozesse bei Suppression der Singulett-Sauerstoff-Generation durch Radikalbildung möglich sind-, eine PCT-Wirkung im Tierexperiment vorliegt (s. Kap.3.).

Da die Reaktionen aus dem langlebigen Triplettzustand erfolgen, ist für die photodynamische Wirksamkeit eines Farbstoffes somit eine hohe ISC-Rate entscheidend. Im Falle eines dominanten Typ-II-Mechanismus ergibt sich die leichterfüllbare Forderung nach einem PS, dessen T_1 -Zustand nicht tiefer als der Singulettzustand des Sauerstoffs liegt.

2.2. Molarer Absorptionskoeffizient

Um einen hohen Wirkungsgrad der Aktivierung zu erreichen, ist die Anregungsstrahlung so zu wählen, daß in die Absorptionsbanden des PS und in einen Bereich minimaler Gewebeabsorption eingestrahlt wird. Hohe Gewebetransmission liegt im roten und nahen infraroten (NIR-) Spektralbereich vor. Abb. 2.2.1 zeigt ein im Rahmen dieser Arbeit gemessenes in-vivo Extinktionsspektrum von Hautgewebe.

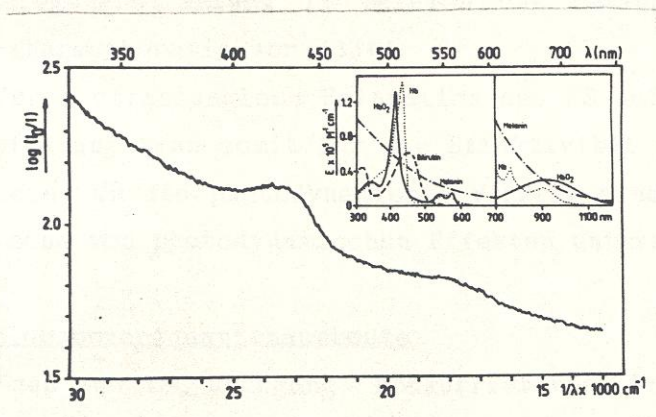


Abb. 2.2.1 In-vivo Extinktionsspektrum von Hautgewebe

(Ohr einer weißen Maus der Dicke 200µm, specord M40) und Absorptionsspektren verschiedener, in durchbluteter Haut enthaltener Pigmente (/29/)

Die hohe Extinktion im UV und kurzwelligen sichtbaren (VIS) Bereich resultieren aus verschiedenen, ebenfalls in Abb. 2.2.I dargestellten, Pigmentabsorptionen. Man erkennt, daß die entscheidende Hämoglobin-Absorption oberhalb 600nm stark zurückgeht. Ein hoher Aktivierungswirkungsgrad des Photosensibilisators in Gewebe erfordert somit die Existenz von Absorptionsbanden im roten/NIR-Bereich. Da die Extinktion im NIR nur noch schwach abnimmt, ist bei der Durchführung der PCT der Einstrahlung im langwelligen sichtbaren Bereich dabei aus praktischen Gründen der Vorzug zu geben. Die Einstrahlung in das "optische Fenster von Gewebe" erweist sich aus zwei weiteren Gesichtspunkten als günstig:

1. Infolge hoher Gewebetransmission werden tieferliegende und ausgedehnte Tumoreareale erfaßt. Aussagen zu Eindringtiefen sind dem Kapitel 3 zu entnehmen.
2. Die geringe Eigenabsorption des Gewebes schließt thermische Nekrosen bei verwendeten Intensitäten von max. 200mW/cm² aus.

2.3. IC-Rate

Infolge strahlungsloser Relaxation erfolgt in Abhängigkeit vom spektralen Absorptionskoeffizienten, der Strahlungsintensität und der Bestrahlungsdauer eine Erwärmung des PS-haltigen Tumoreareals. Die in /30/ durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß synergetische Effekte zwischen der photodynamischen Wirkung und Hyperthermie bestehen. Zudem ist bekannt /31/, daß malignes Gewebe bereits ab Temperaturen von 41°C äußerst sensibel reagiert. Während z.B. in /32/ die gezielte Wärmeentwicklung an dem Ende eines Lichtleitkabels für therapeutische Zwecke benutzt wird, schlagen wir die Verwendung eines tumorselektiven Farbstoffes hoher IC-Rate und großem molaren Absorptionskoeffizienten in Kombination mit Anregungsstrahlung im Bereich des optischen Fensters für eine derartige Tumor-Thermotherapie vor /33*/.

Eine durch strahlungslose Relaxation des PS auf das Tumoreareal beschränkte Wärmeentwicklung kann somit für die Effektivität photodynamischer Prozesse von Wirkung sein. Um die photodynamische Wirkung eines PS beurteilen zu können, müssen thermische von photodynamischen Effekten unterschieden werden, s. Kap.3.

2.4. Fluoreszenzquantenausbeute

Auf einen zum ISC-Übergang konkurrierenden Prozeß, der Emission vom angeregten S₁-Zustand, basiert die Fluoreszenzdiagnostik. Voraussetzung ist die bevorzugte Akkumulation des fluoreszierenden PS im Tumorgewebe. In Kap.4 wird ausführlich auf diese Möglichkeit der Tumorlokalisation eingegangen.

2.5. Photobleaching

Während der Bestrahlung (Therapiestrahlung, Fluoreszenzanregungsstrahlung) sollte der Sensibilisator keinen wesentlichen photochemischen Änderungen unterliegen, die seinen Einsatz als photodynamisch wirksame Substanz und evtl. für die Fluoreszenzdiagnostik geeigneten Marker beeinträchtigen (s. Kap.4).

2.6. Aggregationsverhalten

Untersuchungen an HpD in wäßriger Lösung zeigen, daß der Aggregatbildung im wäßrigen Milieu eine wesentliche Rolle für die photodynamische Aktivität und für die Eigenschaft der tumorselektiven Anlagerung zukommt. So korreliert die photodynamische Wirksamkeit mit der Hydrophobizität der Porphyrine /34/. Das stabile Dimer DHE ist relativ unpolar. Durch Anreicherung der DHE-Dimere im Porphyringemisch mittels Gelfiltration (DHE-angereichertes HpD unter dem Handelsnamen Photofrin II erhältlich), kann eine verstärkte PCT-Wirkung erzielt werden /35/. Allgemein wird angenommen /z.B.36/, daß die Ursache für das tumorselektive Verhalten des HpD in dem Vorhandensein von DHE-Dimeren zu sehen ist. Möglicherweise ist die erhöhte photodynamische Wirksamkeit von Photofrin II nur auf eine verstärkte Akkumulation im Tumorgewebe zurückzuführen.

Dem Aggregationsverhalten des PS in wäßrigem Milieu, insbesondere der Existenz von relativ stabilen, kovalent gebundenen Dimeren, muß besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

2.7. Wasser- und Lipidlöslichkeit

In Abhängigkeit von der Applikationsart müssen Forderungen an die Löslichkeit des PS gestellt werden. Im Fall der intravenösen Injektion ist ein hydrophiles Verhalten notwendig. Lipophile Bestandteile werden dagegen leichter durch Membranen diffundieren. Die Bestandteile des Gemisches HpD weisen unterschiedliches Lösungsverhalten auf, s. auch 2.6.

2.8. Toxizität

Die Toxizitätsraten müssen weit oberhalb der für die PCT notwendigen applizierten Konzentrationen liegen. Der PS sollte nur eine kurze Verweildauer im Körper besitzen. Die Akkumulation in den äußeren Hautschichten muß gering sein, da sie -wie das Beispiel HpD zeigt- zu einer Photosensibilität des Patienten führt.

3. Untersuchungen zur photodynamischen Aktivität

3.1. Zielstellung und Bestrahlungsanordnung

Wie angedeutet, ist die Suche nach Alternativen zu dem HpD-Präparat Photofrin Gegenstand internationaler Forschung. HpD weist ISC-Raten von 0,8-0,9 auf /37/, verfügt jedoch wie aus Abb.4.1.1 ersichtlich, mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon \approx 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Molekulargewicht des HP-Monomers angenommen) über ein nur geringes Absorptionsvermögen im roten Spektralbereich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Farbstoffe hinsichtlich ihrer zyto- und tumor-toxischen Wirkung durch photodynamische Prozesse getestet, die im langwelligen Spektralbereich mit $\epsilon > 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ über ausgeprägte Absorptionsbanden im therapeutisch interessierenden Wellenlängenbereich verfügen. Untersuchungsobjekte waren insbesondere der Thiazinfarbstoff Methylenblau, sowie die Chlorophyllabkömmlinge Phäophorbid a, Chlorophyllin und Chlorin *a*. Als Vergleich dienten HpD-Chargen verschiedenen Aggregatgehaltes aus der DDR-Produktion (HNO-Klinik Halle), die zuvor hinsichtlich ihrer photodynamischen Wirkung auch für den Fall sauerstoffarmer (hypoxischer) Tumorareale untersucht wurden.

Für die Testung des photodynamischen Verhaltens von Farbstoffen in biologischen Systemen (Zellsuspension und Versuchstier) wurde ein Bestrahlungsplatz aufgebaut, der speziell für die Einstrahlung im roten Spektralbereich vorgesehen ist, Abb.3.1.1. Mit dieser Anlage erfolgten zunächst phototoxische Untersuchungen nach PS-Applikation. Zeigt sich eine photodynamische Wirkung, wurde der PS tumortragenden Versuchstieren injiziert und das Verhalten auf das Tumorstadium mit und ohne zusätzliche Laserbestrahlung untersucht.

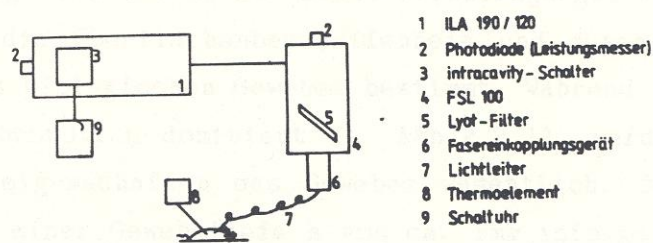


Abb.3.1.1 PCT-Bestrahlungsanordnung

Als Anregungsquelle diente ein kontinuierlich gepumpter Farbstofflaser mit dem aktiven Medium DCM. Mit diesem Laserfarbstoff ist eine Durchstimmung im Bereich 590nm bis 710nm möglich (Maximum: 645nm). Bei Verwendung eines ILA-190 als Pumpquelle, stehen bei einem Wirkungsgrad von 10-15 % ($c=0,45\text{g/l}$ in Ethylenglykol/Benzylalkohol) übliche Ausgangsleistungen von $P(645\text{nm})=0,5\text{W}$ zur Verfügung. Es kamen aber auch He-Ne-Laser (633nm) und Kryptonionenlaser (647nm, 673nm) zum Einsatz. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit dem ZOS der AdW auch vorgeschlagen, einen Stickstoff-Fluor-Impulslaser mit regelbarer Folgefrequenz zu verwenden, der simultan im UV/blauen und roten/nahen IR-Spektralbereich emittiert und dadurch eine effektive Therapie und gleichzeitige Fluoreszenzdiagnose gestattet /38*/.

Die Übertragung an den Bestrahlungsort erfolgte über Umkehrspiegel oder durch die Einkopplung in einen Lichtleiter (Kerndurchmesser $300\mu\text{m}$). Bei der interstitiellen Therapie wurde der Lichtleiter über eine Kanüle direkt in das Gewebe eingeführt. Ansonsten wurde der Abstand Fiber-Bestrahlungsobjekt so gewählt, daß die bestrahlte Fläche größer als das Tumoreal war.

3.2. Abschätzung des Wirkungsradius der PCT und des thermischen Verhaltens

Die Wirkung der PCT ist neben dem Absorptions- und pharmakokinetischen Verhalten des PS (zeit- und ortsabhängige Konzentration $c(r,t)$), sowie den gewebe- und immunsystem-spezifischen Eigenschaften insbesondere von der Lichtintensität am Wirkungsort abhängig. Im folgenden soll eine Abschätzung über den Wirkungsradius der PCT bei Einstrahlung im roten Spektralbereich gegeben werden und anhand dieser, die Wahl eines geeigneten Tumormodells diskutiert werden.

Die Lichtverteilung wird durch die Einstrahlbedingungen (insbesondere Divergenz und Intensität), die Oberflächenbeschaffenheit und durch das Absorptions- und Streuverhalten des biologischen Gewebes bestimmt. Während im UV und kurzwelligen VIS-Bereich die Absorption dominiert (s. Abb.2.2.I), werden im roten Spektralbereich die Streueigenschaften des Gewebes wesentlich. Bei vielen Gewebearten liegt bereits bei einer Gewebetiefe h von ca. 1mm infolge Mehrfachstreuung eine annähernd isotrope Intensitätsverteilung vor. Untersuchungen zur Lichtausbreitung in Gewebe werden in verschiedenen Arbeiten vorgestellt (z.B. /39,40/).

Unter den Voraussetzungen einer homogenen Verteilung der Absorptions- und Streuzentren, einer isotropen Lichtausbreitung bzw. genügender Entfernung vom Licht-

eintrittsort kann bei stark streuenden Medien die Lichtausbreitung mit einem Diffusionsmodell beschrieben werden:

Mit $j = -\theta \text{ grad} \psi \quad -\text{div } j = \theta \psi$

j : Vektor des diffusen Strahlflusses, θ : Diffusionskoeffizient, ψ : Bestrahlungsstärke, θ -Absorptionskoeffizient), erhält man die Gleichung:

$$\text{div grad} \psi - \psi / \mu_1^2 = 0$$

mit der optischen Eindringtiefe $\mu_1 = (\theta/\theta)^{1/2}$ und nach /39/ als Lösungen:

1) eindimensionaler Fall (Strahldurchmesser) $\gg \mu_1$

$$\psi = \psi_0 \exp((\mu_1 - h) / \mu_1)$$

2) kugelsymmetrischer Fall (Lichtleiter in Gewebe, r : Abstand zur Faser)

$$\psi = \psi_0 \mu_1 / r \exp((\mu_1 - r) / \mu_1)$$

Die Gleichungen sind für Wege $\gg \mu_1$ gültig. Für die Lichtausbreitung nahe der Oberfläche bzw. nahe dem Lichtleiter muß extrapoliert werden. ψ_0 läßt sich im Fall 1) aus dem Produkt $\psi_0 = k I_0$ bestimmen, wobei I_0 die einfallende Lichtintensität und k einen dimensionslosen, von dem Gewebe und der Strahldivergenz abhängigen Wert darstellen.

Für den Fall der interstitiellen Therapie (Fall 2) wurde die Abhängigkeit für Fettgewebe untersucht und eine optische Eindringtiefe von $\mu_1(630\text{nm}) = (3,0 \pm 0,5)\text{mm}$ bestimmt (Abb. 3.2.1). Für Gewebe des soliden Ehrlich-Carcinoms ergaben sich Werte von $\mu_1(630\text{nm}) = (3,5 - 4,5)\text{mm}$.

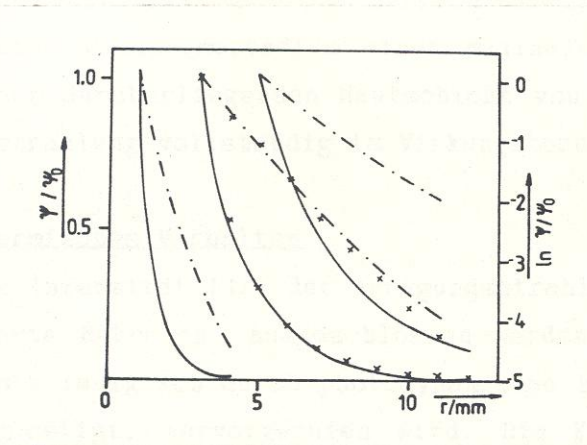


Abb. 3.2.1 Relative Bestrahlungsstärke in Abhängigkeit vom Faserabstand für $\mu_1 = 1\text{mm}, 3\text{mm}$ und 5mm
 — : ψ/ψ_0 - - - : $\ln \psi/\psi_0$ (berechnet nach Gleichung Fall 2)
 x : experimentelle Werte, Fett

Bei den bisherigen Betrachtungen wurde der Einfluß des akkumulierten PS nicht beachtet. Unter der Voraussetzung einer vernachlässigbaren Änderung des Diffusionskoeffizienten (PS-Molekülgröße sehr gering), beeinflusst die Absorption des PS infolge der verringerten optischen Eindringtiefe μ_1 die Lichtausbreitung im Gewebe, wobei $\mu_1 = f(c_{PS}(r, t))$ gilt. Der zeitabhängige Konzentrationsgradient

führt also zu einer Orts- und Zeitabhängigkeit der Lichtausbreitung. Die lokale Konzentration hängt neben der applizierten Dosis vom pharmakokinetischen Verhalten ab. Maximale Konzentrationswerte werden durch die Toxizität des PS bestimmt. Nach i.v. Injektion von 10 mg/kg KM HpD wurden 24h nach Applikation PS-Konzentrationen von ca. (5-8)mg/kg KM innerhalb des untersuchten Tumoreals gemessen /41/. Für Gewebe mit homogener HpD-Verteilung läßt sich demnach mit einer Bestrahlungswellenlänge von 630nm, $\epsilon(630\text{nm}) \approx 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und einer Weglänge von 1cm, eine Schwächung der Bestrahlungsstärke infolge HpD-Absorption von ca. 3% abschätzen. Da der Einfluß des HpD auf die Lichtausbreitung somit vernachlässigbar ist, werden die Wirkungsradien der HpD-PCT durch die optischen Eigenschaften des Gewebes bestimmt. Bei üblichen Bestrahlungsdosen von 100 mW/cm^2 konnten PCT-induzierte Nekroseherde mit einem Durchmesser von ca. 1cm /42/ beobachtet werden. Somit ist der Wirkungsradius größer als die optische Eindringtiefe und beträgt ca. $2\mu\text{m}$.

Der Einfluß des PS auf die optische Eindringtiefe μ_1 wird erst für PS mit einem $\epsilon > 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ oder/und bei höheren Konzentrationen (z.B. bei intratumoraler Applikation) wesentlich. Für eine wäßrige Methylenblaulösung mit $\epsilon(670\text{nm}) \approx 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ folgt bei Annahme einer Konzentration von 10mg/kg KM bei 1cm Weglänge eine Absorption von ca. 60%, bei 5mm von 35%.

Aufgrund dieser Abschätzungen wurde als Tumormodell ein subcutaner Tumor der Maus verwendet (colides Ehrlich-Carcinom), der bei Behandlungsbeginn in einem frühen Wachstumsstadium einen maximalen Durchmesser von 5mm aufweist, und bei einer darüberliegenden Hautschicht von ca. 500 μm somit auch bei oberflächlicher Bestrahlung vollständig im Wirkungsbereich der photodynamischen Aktivität liegt.

Thermisches Verhalten

Die Intensität $I(\lambda)$ der Anregungsstrahlung ist so zu wählen, daß thermisch induzierte Nekrosen ausgeschlossen werden können, eine Schädigung des Tumoreals somit lediglich durch photodynamische Effekte, gegebenenfalls durch Hyperthermie begünstigt, hervorgerufen wird. Die Korrelation von Effektivität der PCT und Hyperthermie wird in /38*/ berücksichtigt.

Die Erhöhung der Temperatur des bestrahlten Areals ist neben der Konzentration des PS und den optischen Eigenschaften des Gewebes von dessen thermischen Eigenschaften (spezifische Wärme C, thermische Leitfähigkeit k) abhängig sowie dem Blutfluß X infolge Wärmekonvektion.

Die Temperaturverteilung $T(r,t)$ läßt sich durch Lösung der Wärmeleitungsgleichung bestimmen:

$$\text{div grad } T - 1/\chi \partial T / \partial t - q_1/k = - q_2/k$$

wobei q_1 die Wärmequellendichte (W/m^3) darstellt und die Wärmesenke infolge Wärmetransport durch Blutkonvektion sich durch $q_2 = \rho_{\text{Blut}} C_{\text{Blut}} T X \rho_{\text{Blut}} = k x T / \mu_{\text{th}}^2$ mit der thermischen Eindringtiefe $\mu_{\text{th}} = \chi / (X \rho)$, der thermischen Diffusität $\chi = k / (\rho C)$ und der Dichte $\rho_{\text{Blut}} \approx \rho_{\text{Gewebe}}$, darstellen läßt.

Wird eine großflächige Bestrahlung (D) μ_1, μ_{th} , D : Strahldurchmesser), vorausgesetzt, kann:

$$q_1 = I_0 / \mu_1 (1-R) \exp(-h/\mu_1) \quad R: \text{Remissionskoeffizient}$$

gesetzt werden und man erhält nach /39/ für den Fall des Fließgleichgewichtes ($\partial T / \partial t \rightarrow 0$) eine Temperaturerhöhung ΔT von:

$$\Delta T = I_0 (1-R) / (\mu_1 k (\mu_1^{-2} - \mu_{\text{th}}^{-2})) \times (\mu_{\text{th}} / \mu_1 \exp(-h/\mu_{\text{th}}) - \exp(-h/\mu_1))$$

Demnach erhält man für Gewebe mit den Werten $R=0,33$ (s. Kap.6), $\chi=1,2 \times 10^{-6} \text{m}^2/\text{s}$, $k=0,4 \text{W}/(\text{m K})$, $\rho=1 \text{kg/l}$, $I_0=50 \text{mW}/\text{cm}^2$ und $X_{\text{Haut}}=10 \times 10^{-5} \text{m}^3/(\text{skg})$ ein $\mu_{\text{th}} \approx 3,5 \text{mm}$ und die in Abb. 3.2.II dargestellten Abhängigkeiten $\Delta T = f(h, \mu_1)$. Weiterhin zeigt die Abbildung im Rahmen dieser Arbeit gemessene in-vivo Temperaturverläufe von Methylenblau-inkubiertem Gewebe. Um Verfälschungen infolge Änderungen der Gesamt-Körpertemperatur (Narkose führt zu T-Erniedrigung) zu vermeiden, wurde ein Vergleichsmeßfühler in einem ähnlichen, aber unbestrahlten Hautareal angebracht.

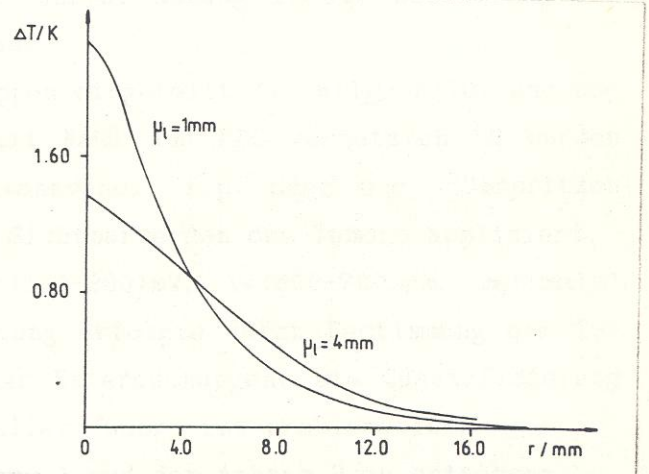
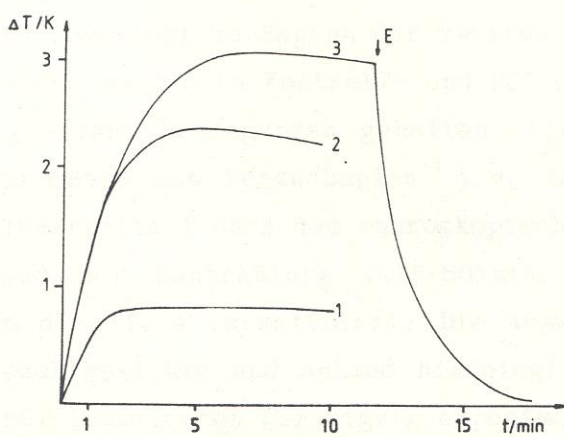


Abb.3.2.II links. In-vivo gemessene Temperatur als Funktion der Bestrahlungszeit Gewebe einer Maus, $r=2 \text{mm}$, $I=50 \text{mW}/\text{cm}^2$, 645nm , PS: Methylenblau, $10 \times 10^{-4} \text{M}/0,1 \text{ml}/\text{s.c.}$ 1: ohne PS 3: Messung 10min 2: Messung 60min nach Applikation, E: Bestrahlungsende. Thermoelement: Konstantan-Edelstahl (X5CrNiMo), punktgeschweißt, Kanülenform, Empfindlichkeit $0,05 \text{mV}/\text{K}$. Rechts: berechnete Werte $T(x, \mu_1)$. Demnach erhält man für unmarkiertes Gewebe ein $T(2 \text{mm}, 4 \text{mm}) \approx 1,1 \text{K}$.

Es ist ersichtlich, daß die Einstellung des stationären Temperaturwertes nach max. 10min erfolgt. Während unmarkiertes Hautgewebe Temperaturerhöhungen von ca. $(15-20)K/(Wcm^{-2})$ zeigt, werden bei subcutaner Injektion des PS Werte von $(40-60)K/(Wcm^{-2})$ bei gegebener Konzentration und gegebenem Abstand erzielt.

Die sinkende Temperatur mit zunehmendem Abstand vom Injektionszeitpunkt (Kurve 2 und 3) ist infolge diffusionsabhängiger Eliminationsprozesse des PS und Änderungen in den Durchblutungsbedingungen (Körperreaktion) erklärbar.

Die Bestrahlungsdosen wurden bei den PCT-Experimenten so gewählt, daß maximale Temperaturerhöhungen von $<4K$ auftraten. Damit konnten thermisch induzierte Nekrosen ausgeschlossen werden.

3.3. Ergebnisse der in-vivo Testung der photodynamischen Wirksamkeit verschiedener Farbstoffe

3.3.1. Versuchstiere/Tumor/Gruppeneinteilung/Applikation

Zum Einsatz kamen weibliche Shoe-ICRMäuse im Alter von 4-6 Monaten mit ein- oder zweiseitig subcutan induziertem Tumor. Das verwendete Ehrlich-Carcinom zeigt ein dreiphasiges Wachstum. Nach einer ersten langsamen Phase schließt sich eine schnelle zweite Wachstumsphase an, der eine dritte mit Sättigungscharakter folgt. Bereits in der zweiten Phase ist ein zunehmender Anteil autonekrotischer und hypoxischer Areale zu verzeichnen, s. Abb.3, Anhang 1. Die Behandlung erfolgte bevorzugt zu Beginn der zweiten Phase.

Die Tiere wurden in Kontroll- und PCT-Gruppen eingeteilt (i. allg. $n=10$) und unter gleichen Bedingungen gehalten. Die mit NaCl und PBS versetzten PS wurden entsprechend dem Versuchsplan, i.v. (Schwanzvene), i.p. oder s.c. (Umspritzen des Tumorbettes) nach dem makroskopischen Sichtbarwerden des Tumors appliziert.

Während der Bestrahlung ($<(10-60)min$, $P=(100-200)mW$, $\lambda=(600-700)nm$, mehrmals) waren die Tiere narkotisiert. Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung der Tumornekrosegewichte und anhand histologischer Untersuchungen. Die Quantifizierung der PCT-induzierten Schädigung experimenteller Tumore ist problematisch.

Detailliertere Informationen sind dem Anhang 1 und dem Anhang 2 zu entnehmen.

3.4.2. Testung von aggregatangereicherten HpD-Präparaten der DDR-Produktion

Die in Kooperation mit der HNO-Klinik Halle durchgeführten Untersuchungen sind im Anhang 1 bzw. in den Publikationen /43*,44*/ dargestellt. Sie belegen die Eignung des DDR-Präparates als photodynamisch wirksames Agens. Weiterführende

Untersuchungen widmeten sich der Frage, inwieweit die HpD-PCT effektiviert werden kann, insbesondere bei Auftreten von Sauerstoffmangel (Hypoxie). Hypoxie setzt die Effektivität der PCT wesentlich herab. Solide Tumoren weisen aber häufig einen hohen Anteil hypoxischer Tumoreale auf (nach /45/ bis 50%). Berg /46/ schlägt eine Optimierung durch zusätzliche Erhöhung des O₂-Angebotes und Hyperthermie vor. Andererseits zeigt sich, daß bestimmte, als Elektronenakzeptoren wirkende Verbindungen mit großem Diffusionsradius, die Nitroimidazole, die Resistenz hypoxischer Zentren gegenüber elektromagnetischer Strahlung herabsetzen /45/. Aus in-vitro Untersuchungen von /28/ ist zudem bekannt, daß die auch als Elektronendonoren wirkenden Porphyrine mit Nitroimidazolen über den Typ I der Photooxidationen photodynamisch wirksame Komplexe bilden. Wie unsere Untersuchungen (Abb.3.3.I) zeigen, kann die zusätzliche Applikation von Nitroimidazolen (hier Metronidazol) zur HpD-PCT bei soliden Tumoren mit hohem hypoxischen Anteil die antitumoröse Wirksamkeit erhöhen (s. auch /27/).

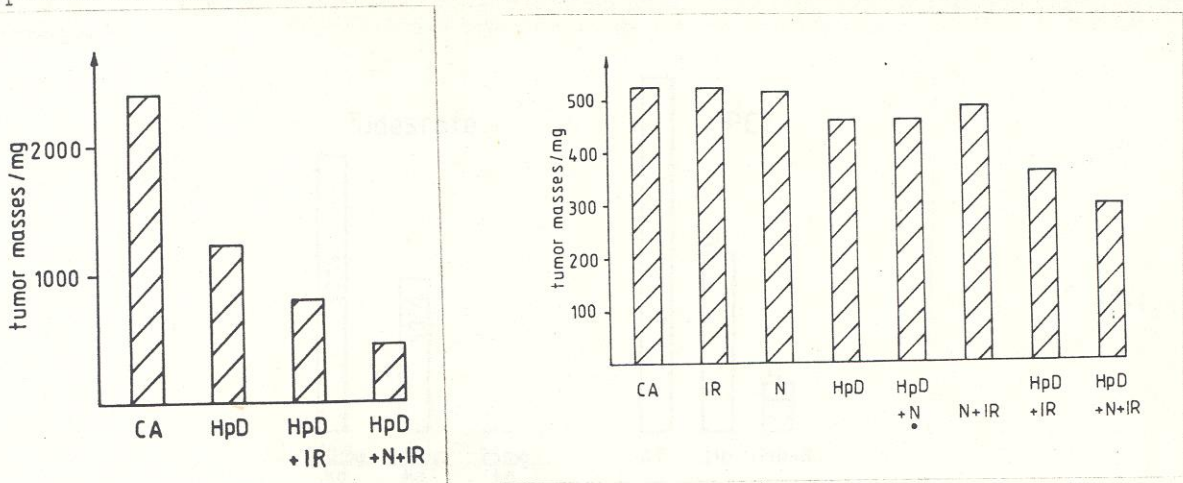


Abb.3.3.I Tumormassengewichte der Kontrolltiere ohne Bestrahlung und PS-Applikation (CA), der nur bestrahlten (IR), der mit alleiniger HpD-Gabe (HpD) und der mit alleiniger Nitroimidazolgabe (N) im Vergleich zu bestrahlten Tieren nach s.c. (links) und i.p. (rechts) HpD-Applikation (HpD+IR) und zusätzlicher Nitroimidazolgabe (HpD+N+IR). Die Tumoren wiesen einen hohen Anteil hypoxischer und teilweise bereits nekrotischer Zonen auf.

3.3.3. Untersuchungen mit dem Photosensibilisator Methylenblau

Der Thiazinfarbstoff Tetramethylthionin (Methylenblau) ist als Sensibilisator mit hoher Singulett-Sauerstoff-Generation und auch als Radikalbildner bekannt /z.B.47/. Die von uns durchgeführten Untersuchungen basieren auf den Experimenten von Berg und Jungst von 1966 /16/ und der von Fukui et al. /17/ 1983

gefundenen Korrelation zwischen der Methylenblaufärbung des Gewebes und dem Tumorstadium von Harnblasentumoren. Ein möglicher Einsatz des Farbstoffes für die selektive PCT wurde in den Arbeiten nicht diskutiert.

Ausgehend von den Ergebnissen beider Arbeitsgruppen wurde durch uns der Einsatz von Methylenblau (Mb) als PS für die selektive PCT, insbesondere bei der Behandlung von Harnblasentumoren, getestet. Der um eine Größenordnung höhere molare Extinktionskoeffizient von $\epsilon(670\text{nm}) \approx 3 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ im roten Spektralbereich sowie die bathochrome Verschiebung im Vergleich zu HpD (Abb.2, Anhang 2 und Abb.1, Anhang 1) ist für die Effektivität der PCT wesentlich.

In der Abb.3.3.II sind die Toxizitätsraten bestrahlter Tiere in Abhängigkeit von der applizierten PS-Konzentration, sowie die Ergebnisse der PCT dargestellt. Eine deutliche Reduktion der Tumormeuchtgewichte konnte erzielt werden, einschl. einzelner Fälle, in denen makroskopisch kein Tumor mehr erkennbar war.

Ausführliche Informationen sind dem Anhang 2 bzw. den Publikationen /48*,49*/ zu entnehmen.

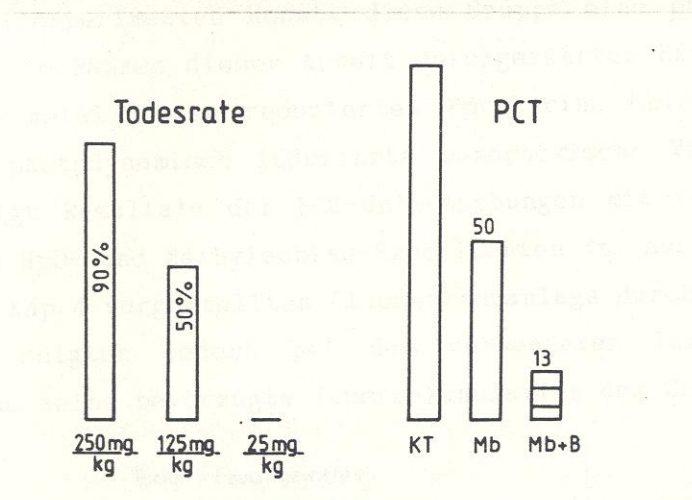


Abb.3.3.II Testung der photodynamischen Wirksamkeit von Mb anhand der Letalitätsrate von Mäusen nach Mb-Applikation und Bestrahlung (647nm, 676nm), links und Tumormeuchtgewichte nach s.c. Mb-Applikation (25mg/kg KM) und PCT, rechts. Bei alleiniger Injektion von 250mg/kg KM (keine Bestrahlung) Letalitätsrate:0.

Nach dem Aufbau einer Bestrahlungsanordnung für den klinischen Einsatz /50*/ fanden in Zusammenarbeit mit der Urologischen Klinik Jena inzwischen erste PCT-Behandlungen von Patienten mit Harnblasentumor statt. Dabei wurde der PS Methylenblau lokal appliziert (Instillation in die Harnblase, zugelassen vom Zentralen Gutachterausschuß), wodurch eine Akkumulation des PS in den äußeren Hautschichten vermieden wurde.

3.3.4. Untersuchungen an reduzierten Porphyrinen

Die Reduktion subcutaner tierexperimenteller Tumoren wurde von /51/ nach Phäophorbid-Gabe und Lichtbehandlung beobachtet. Bei den Versuchen wurden nicht nar-kotisierte Tiere 10min mittels UVA-Lampen (Eindringtiefe von UV: <1mm) be-strahlt. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung (24h nach Applikation der EAC-Zellsuspen-sion) liegt jedoch noch keine solide Form des Tumors vor.

In wäbrigem Milieu weist Phaeophorbid (ISC-Rate $\approx 0,75/51/\epsilon(660\text{nm}) > 10\text{E}05\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) einen hohen Aggregationsgrad auf, der eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz-quantenausbeute <0,01 bewirkt. In den hier durchgeführten Versuchen konnte keine Hemmung des Tumorwachstums nach Bestrahlung in die im roten Spektralbereich ge-legenen Absorptionsbanden gefunden werden. Eine Substanzschädigung infolge einer notwendigen Vorbehandlung mit EtOH (geringe Wasserlöslichkeit des Phäophorbid a) ist nicht auszuschließen.

Eine Minsker Arbeitsgruppe experimentiert mit dem Chlorophyllabkömmling Chlorin e_6 /53/. In Zellexperimenten konnte diese Gruppe eine photodynamische Wirkung beobachten. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente belegen, daß sowohl für die metallfreien reduzierten Porphyrine Chlorin e_6 , als auch für Chlorophylline photodynamisch induzierte tumortoxische Wirkungen bestehen. Die Abb.3.3.III zeigt Resultate der PCT-Untersuchungen mit reduzierten Porphyrinen im Vergleich zu HpD- und Methylenblau-Experimenten (s. auch /54*/).

Die mit der in Kap.4 vorgestellten Fluoreszenzanlage durchgeführten Fluoreszenz-untersuchungen zeigten jedoch bei dem verwendeten Tumormodell des soliden Ehrlichcarcinoms keine bevorzugte Tumorakkumulation des Chlorins.

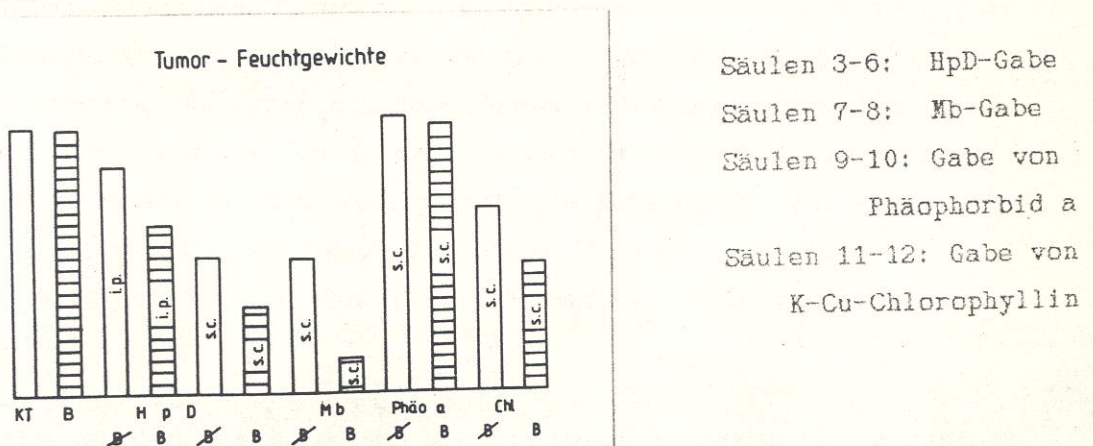


Abb.3.3.III Hemmung des Tumorwachstums des soliden EC nach Applikation verschie-dener PS und Bestrahlung. Die Kontrolltiere erhielten jeweils die gleiche Menge NaCl verabreicht. KT: Kontrolltiere, B: Bestrahlung, $\times$: PS-Applikation ohne B

4. Fluoreszenzdiagnostik

4.1. Einleitung

Ausgehend von den in Kapitel 3 dargestellten Ergebnissen zur photodynamischen Wirksamkeit, sollen in den folgenden Kapiteln optische Methoden vorgestellt werden, die auf Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen basieren und Aussagen zum Anlagerungsverhalten des PS an körpereigene Substanzen, insbesondere in biologischem Gewebe, ermöglichen. So kann die strahlende Relaxation des S_1 -Zustandes (Fluoreszenz) zur Lokalisation einer Substanz genutzt werden. Gelingt hinsichtlich der Kriterien Fluoreszenzintensität I_F , Polarisationsgrad P (problematisch infolge Mehrfachstreuung des Gewebes), spektrale Verteilung $I_F=f(\lambda)$ oder Fluoreszenzabklingzeit τ_F eine Differenzierung zwischen Tumor- und Umgebungsgewebe, kann dieses Verfahren als Diagnostikmethode in Betracht gezogen werden.

Besteht eine Korrelation zwischen einem dieser "Diagnose-Parameter" und der photodynamisch wirksamen Spezies, ergibt sich die Möglichkeit der Abschätzung der Wirkung der selektiven PCT infolge der oft zutreffenden Korrelation zwischen Wirkung und Pharmakonkonzentration.

In dem vorliegenden Kapitel sollen Ergebnisse von Fluoreszenzuntersuchungen vorgestellt werden, die vorwiegend mit dem in der DDR hergestellten HpD-Präparat gewonnen wurden. Den Schwerpunkt bilden dabei Untersuchungen zur photoinduzierten Änderung des Spektralverhaltens.

In der Literatur sind vorwiegend Fluoreszenzuntersuchungen mit dem PS Photofrin zum Zweck einer Tumordiagnostik beschrieben worden /12,56,57,58,60,61,62,63,64/. Stellvertretend sei Hayata /64/ genannt, der Tumore des Bronchialtraktes in einem sehr frühen Stadium (carcinoma in situ) mittels Photofrin-Markierung lokalisierte. Bei der Messung der in-vivo Fluoreszenz des Markers/PS, muß die Eigenfluoreszenz (Autofluoreszenz) des Gewebes infolge endogener Florophore (z.B. Pigmente) berücksichtigt werden. In Abschnitt 4.3. werden entsprechende Untersuchungen vorgestellt.

Das Fluoreszenzverhalten des Gemisches HpD wird im wesentlichen durch den Anteil der Monomere bestimmt. Die Abbildungen 4.1.I zeigen das Fluoreszenz- und das Fluoreszenzanregungsspektrum sowie das Absorptionsspektrum von HpD in wäßriger Lösung. Vergleicht man das Anregungsspektrum mit dem Absorptionsspektrum, fallen insbesondere Unterschiede in der spektralen Lage des Maximums der Soretbande

(Bande im UV/violetten Bereich) und in deren Halbwertsbreite auf. Untersuchungen in stark verdünnten Lösungen oder bei Verwendung von Ethanol (EtOH) als Lösungsmittel zeigen die Korrelation von Anregungsspektrum und Absorptionsspektrum der Monomere, die ein Maximum bei $\approx 400\text{nm}$ aufweisen. Demnach sind dem Maximum der Soretbande bei $\text{ca. } 365\text{nm}$ Aggregate zuzuordnen, die nicht wesentlich zur Fluoreszenz beitragen. Für die Fluoreszenzdiagnose werden deshalb bevorzugt Quecksilber-Hochdruck-lampen (405nm , /55*/), Kryptonionenlaser (407 , 413 , 415nm ; /56/) oder UV-Laser gepumpte Farbstofflaser eingesetzt /56,57,38*/. Fluoreszenz kann aber auch bei UV-Einstrahlung oder Einstrahlung in die schwächer absorbierenden VIS-Absorptionsbanden (Q-Banden) beobachtet werden /58,59*/. Die vier Q-Banden sind typisch für Porphyrine mit reduzierter Zentralsymmetrie, in diesem Fall für metallfreie Porphyrine in neutraler Umgebung /65/. Bei Erniedrigung des pH-Wertes der Lösung erfolgt durch Protonierung (Anlagerung von H-Atomen an die beiden wasserstofffreien N-Atome, s. Abb. 4.1.1, rechts) eine Erhöhung der Symmetrieordnung, korrelierend mit einer Bandenreduzierung. Das Spektrum mit den verbleibenden zwei Q-Banden ähnelt dann denen der Metallporphyrine (Metall ist Zentralatom, z.B. bei Protohäm: Fe).

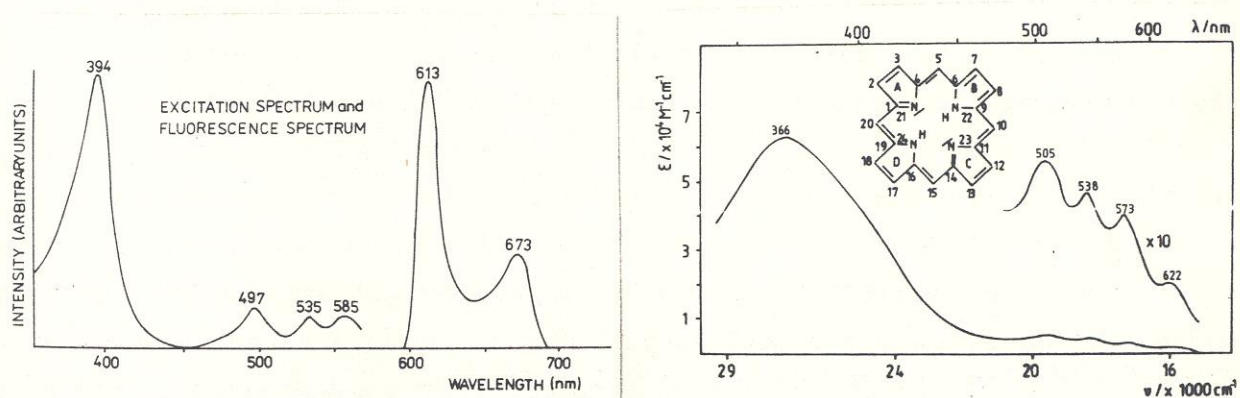


Abb. 4.1.1 links: Fluoreszenz- und Fluoreszenzanregungsspektrum von HpD in PBS, ($c \approx 10\text{E-}06\text{M}$, $\lambda_{\text{exc}} = 400\text{nm}$, $\lambda_{\text{f}} = 612\text{nm}$), rechts: Absorptionsspektrum, $c \approx 10\text{E-}04\text{M}$, mit Darstellung des Porphyringrundgerüsts. Die vier Pyrrolringe A,B,C,D sind durch Methinketten miteinander verbunden. Die C-Atome sind je nach Porphyrin mit verschiedenen Liganden substituiert.

Im folgenden soll eine Abschätzung über die zu erwartende Fluoreszenzintensität eines vollständig bestrahlten, HpD-markierten Tumoreareals mit einer Oberfläche $A = 1\text{cm}^2$ gegeben werden.

Abschätzung der Fluoreszenzintensität von HPD-inkubiertem Gewebe

Bei Kleinsignalverhalten (geringe Photonenflußdichte n) erhält man für den stationären Fall die Anzahl der Fluoreszenzphotonen pro Zeit- und Volumeneinheit:

$$k_F [S_1] = 2,3 \epsilon c n \quad k_F / (k_F + k_{NR} + k_{ISC}) \quad k: \text{Übergangsrate} \\ = 2,3 \epsilon c n \theta_F \quad [S_1]: \text{Besetzungszahl}$$

Mit der Fluoreszenzquantenausbeute $\theta_F = 0,01$ (experimentell bestimmt), dem dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon(400\text{nm}) = 6 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ und der Photonenflußdichte $n = P / (h \nu A)$ mit $h \nu(400\text{nm}) = 5 \times 10^{-19} \text{Ws}$, $P = 10 \text{mW}$, $A = 1 \text{cm}^2$, erhält man:

$$n = 10^{16} \text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$$

Für die Konzentration ergibt sich anhand des in /41/ angegebenen Wertes der Akkumulation von HpD in Tumorgewebe von $5 \mu\text{g/g}$ und einer Gewebedichte von 1kg/l der molare Konzentrationswert von $c = 8,5 \times 10^{-6} \text{M}$ und damit:

$$k_F [S_1] = 4 \times 10^{14} \text{s}^{-1} \text{cm}^{-3}$$

Für den Fall eines oberflächlichen Tumors (häufigster Fall) mit einer Gewebedicke von 1mm und damit einem fluoreszierenden Volumen von $0,1 \text{cm}^3$ erhalten wir für die Abstrahlung in den gesamten Raumwinkel:

$$F = 4 \times 10^{13} \text{s}^{-1}$$

Bei angenommener Punktquelle, einem Abstand s zwischen Quelle und Auge von 30cm (deutliche Sehweite) und einer angenommenen Pupillengröße von $a = 6 \text{mm}$ Durchmesser, gilt:

$$n_{\text{Pupille}} = F \pi a^2 / 4 \pi s^2$$

Ein Photonenstrom von ca. 10^9 Photonen trifft somit pro Sekunde auf die Netzhaut. Das entspricht einer mittleren Leistung von $P = 3 \times 10^{-10} \text{W}$ (630nm). Als Empfindlichkeitsgrenze des Auges wird der Wert $6 \times 10^{-17} \text{W}$ angegeben /66/.

Bisher wurde der Fall eines oberflächlichen Tumors betrachtet und die optische Eindringtiefe des Gewebes nicht beachtet.

Die vorliegenden experimentellen Untersuchungen wurden hauptsächlich an Mäusen mit einem subcutanen Hauttumor durchgeführt. In diesem Fall bedeckt eine ca. $0,5 \text{mm}$ dicke Hautschicht das Tumoreal. Da die Fluoreszenzstrahlung im Bereich des optischen Fensters liegt, kann die Absorption durch diese Hautschicht im Gegensatz zur Anregungsstrahlung näherungsweise vernachlässigt werden. Bei einer optischen Eindringtiefe von $\mu_1 = 1 \text{mm}$ für die Anregungsstrahlung erhält man bei Annahme eines Abfalls nach Lambert-Beer eine Dämpfung des Fluoreszenzphotonenstromes von $\approx 40\%$. Beachtet man weiterhin den Abfall innerhalb des Tumorgewebes für den gleichen Wert μ_1 , kann letztlich ein Dämpfungsfaktor von ca. 5 in Betracht gezogen werden.

Der zu erwartende Fluoreszenzphotonenstrom liegt daher 5-6 Größenordnungen über der Empfindlichkeitsgrenze des Auges. Im abgedunkelten Raum und bei abgetrenntem Streulicht kann die Fluoreszenz des HpD-inkubierten Tumorgewebes ($V=0,1\text{cm}^3$) mit dem Auge erkannt und z.B. die fluoreszierenden Tumoreareale mittels bildgebender Glasfaser und rotempfindlichen Endikon einer Fernsehkamera auf dem Bildschirm sichtbar gemacht werden (s. /15*/). Der beobachtete Photonstrom im roten Spektralbereich wird jedoch nicht allein durch die HpD-Fluoreszenz hervorgerufen. Insbesondere die Autofluoreszenz des Gewebes sowie durch Streustrahlung induzierte Sekundärfluoreszenz und die Untergrundstrahlung der Anregungsquellen führen zu Verfälschungen bzw. setzen die Nachweisempfindlichkeit herab.

4.2. Anordnung zur in-vivo Fluoreszenzspektroskopie

Der in Abb. 4.2.1 schematisch dargestellte Fluoreszenzmeßplatz gestattet neben der in-vivo Messung der HpD-Fluoreszenz auch die der intensitätsschwachen Autofluoreszenz von Gewebe. Das wird durch verlustarme Leitung des Fluoreszenzlichtes in den Monochromator, die Möglichkeit der Selektion im roten Spektralbereich liegender Untergrundstrahlung (z.B. spontane Emission des angeregten Plasmas bei Edelgasionenlasern, UV-induzierte Fluoreszenz an den Brewsterfenstern des Resonators) und die Abtrennung der der Fluoreszenz überlagerten Remissionsstrahlung des Anregungslichtes erreicht. Infolge Mehrfachstreuung wird ein hoher, annähernd isotrop verteilter Anteil der Anregungsstrahlung rückgestreut. Gelangt diese Remissionsstrahlung (Haut, Maus: $\approx 0,3$, s. Kap.6) mit dem Fluoreszenzlicht in die Empfängerfasern des Lichtleiterbündels können zum einen unerwünschte Fluoreszenzen (z.B. von Fasermantel und von Farbgläsern/Schottfilter) angeregt und andererseits in Abhängigkeit von der Stokes-Shift die Detektion der Gewebefluoreszenz durch Streulichtüberlagerung erschwert werden.

Als Anregungsquelle diene bevorzugt der Argonionenlaser, da insbesondere mit der Emission bei 351nm und 364nm in die Soretbande eingestrahlt sowie Eigenfluoreszenzen des Gewebes angeregt werden können und er zudem als Pumplaser für den PCT-Farbstofflaser verwendet werden kann. Weiterhin wurde ein stickstofflaser-gepumpter Farbstoffküvettenlaser mit Gitterresonator verwendet, der bei Nutzung des aktiven Mediums BDAO mit $\lambda_{\text{max}}=406\text{nm}$ in das Absorptionsmaximum der Monomere einstrahlt /55*/. Mit Hilfe eines von uns entwickelten Lichtleitereinkopplungsgerätes, das in Anhang 3 bzw in /59*,67*/ ausführlich dargestellt ist, wurde die Fluoreszenz ohne verfälschenden Untergrund angeregt und registriert. Mit dem in der Abbildung dargestellten Adapter, ist durch den Einsatz eines

Fensters mit UV-reflektierenden, dielektrischen Schichten (Quarzplatte mit Öffnung versehen) eine Abtrennung der Remissions- von der Fluoreszenzstrahlung vor der Einkopplung in die Empfängerfasern gewährleistet. Eine Unterdrückung der Streustrahlung um ca. 10^3 bezüglich der transmittierten Fluoreszenz konnte erzielt werden. Die Verwendung von dielektrischen Schichten erweist sich gegenüber dem Gebrauch von Farbgläsern oder Farbstofflösungen als Filter vorteilhafter, da letztere infolge Eigenfluoreszenz nur bedingt geeignet sind.

Mit der experimentell bestimmten Nachweiseempfindlichkeit von $\approx 10 \text{ ng/cm}^3$ HpD in PBS stand damit eine empfindliche Fluoreszenzanordnung zur Verfügung. Übliche HpD-Konzentrationen im Tumorgewebe sind $(5-8) \mu\text{g/cm}^3$ [41].

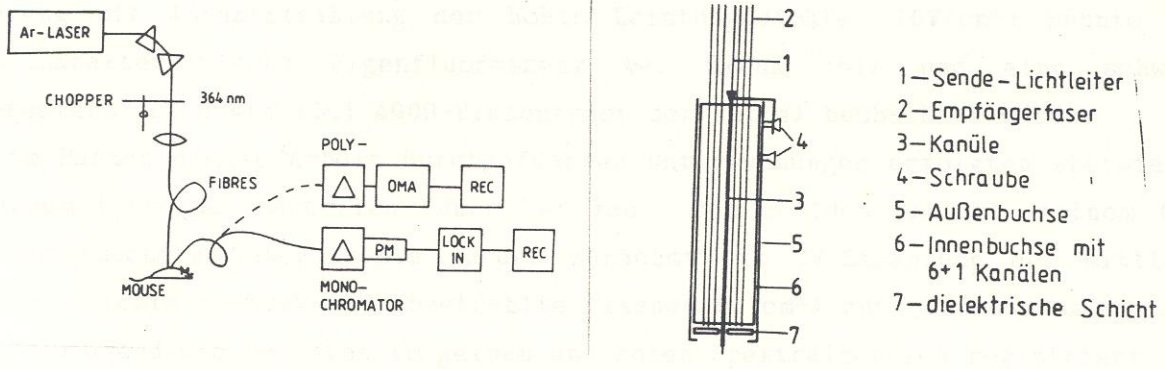


Abb.4.2.1, links: Schema des Fluoreszenzmeßplatzes, rechts: Adapter zur Aufnahme der Fasern und des Eintrittsfensters mit dielektrischer Verspiegelung. Die Anregungs- und Fluoreszenzstrahlung wird nach Abtrennung des Untergrundes und der Streustrahlung in Quarzfasern mit SQ₁-Mantel (Kerndurchmesser: $300 \mu\text{m}$) eingekoppelt. Der Nachweis erfolgt mittels lock-in-Technik (Monochromator-) oder mittels OVA (Polychromator-Einsatz), der auch die Darstellung im Echtzeit-Regime gestattet. Die Anordnung der Empfängerfasern wurde ausgangsseitig dem Spalt angepaßt.

4.3. Untersuchungen zur Autofluoreszenz von biologischem Gewebe

Die Autofluoreszenz von Gewebe erschwert den Nachweis des applizierten fluoreszierenden PS/Markers. Andererseits besteht die Frage, ob durch eventuelle Konzentrationsunterschiede endogener Fluorophore, tumorales von peritumoralem Gewebe unterschieden werden kann. Die vorliegenden Untersuchungen hatten das Ziel, den Einfluß der Autofluoreszenz auf das Spektrum von PS-markiertem Gewebe zu eliminieren (korrigierte Spektren) und andererseits zu überprüfen, ob eine Tumor-Autofluoreszenz-Diagnose (keine Applikation von Tumormarkern) möglich ist.

Es existieren wenig Publikationen, die Messungen der Autofluoreszenz von Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe beinhalten /60,61,62,63,69/. Infolge der geringen Konzentration der Fluophore in Gewebe sind empfindliche Nachweisrichtungen notwendig. Von einigen Autoren werden Tumor-Autofluoreszenzen mit einem Maximum bei 480nm bei Anregung mit einem Stickstofflaser (337 nm) /60/ oder bei 500nm (Bronchialcarcinom) /61/ beobachtet. In /69/ wird eine verstärkte 475nm-Fluoreszenz ($\lambda_{exc}=366nm$) von Tumorrändern (Melanome) gegenüber dem peritumoralen Gewebe registriert. Bei Verwendung eines Xenon-Ionen-Lasers ($\lambda_{exc}=365nm$) konnten bei Untersuchungen verschiedener humaner HNO-Tumoren charakteristische Fluoreszenzbanden bei den Wellenlängen 632nm und 700nm-720nm gefunden werden /67/. Lage und Struktur dieser Banden entsprechen denen verschiedener Porphyrine. Auch bei Anregung mit 488nm-Strahlung der hohen Leistungsdichte ($10W/cm^2$) konnte eine tumorcharakteristische Eigenfluoreszenz bei 520nm /61/ und eine schwache Fluoreszenz bei 634nm (TCT-4909-Blasentumor der Ratte) beobachtet werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erfolgten überwiegend an einem tierexperimentellen Tumor der Maus, dem soliden Ehrlichcarcinom (EC). Die untersuchten Gewebeareale wurden zunächst mit UV-Strahlung der mittleren Leistungsdichte $P=150mW/cm^2$ (bestrahlte Fläche: $0,1cm^2$) zur Fluoreszenz angeregt und vorwiegend die Emission im gelben und roten Spektralbereich registriert.

Neben dem Auftreten einer unspezifischen Fluoreszenz mit Maxima im blau-grünen Spektralbereich, die alle durchbluteten Gewebe aufwiesen und insbesondere auf Autofluoreszenzen des Blutes zurückzuführen sind (Fluoreszenzmaximum vermessener HSA-Proben: 470nm, HWB: $\approx 100nm$), konnten im roten Spektralbereich strukturierte Banden beobachtet werden. So wies die obere, über dem Tumoreal befindliche Hautschicht (rasiert), eine charakteristische Bande bei 673nm auf. Subcutane Gewebsschichten zeigten dagegen nur eine schwache Fluoreszenz im roten Bereich.

Messungen am freigelegten soliden EC ergaben zwei ausgeprägte Banden mit Maxima bei $\approx 640nm$ und $680nm$, Abb. 4.3.1. Eine Differenzierung von tumoralem und angrenzendem cutanen und subcutanen Gewebe war möglich. Vergleichende Messungen an einem weiteren Tier ergaben eine reproduzierbare Bandenlage und Intensitätsverteilung. Das Fluoreszenzverhalten innerhalb des Tumors wurde mit Lichtleiter-technik orts aufgelöst verfolgt. Es zeigten sich Unterschiede in der Fluoreszenzintensität, die qualitative Struktur des Spektrums blieb jedoch erhalten. Nach excitus wurden die inneren Organe (Leber, Lunge, Milz) untersucht. Ebenso wie das Fell (weiß) wiesen diese jedoch keine registrierbare strukturierte Fluoreszenz im roten Spektralbereich auf (s. auch /69*/).

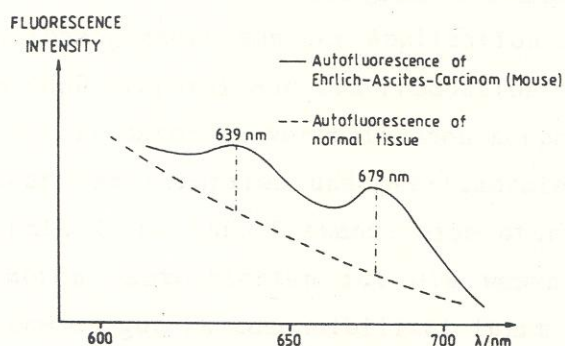


Abb. 4.3.I Autofluoreszenzspektrum (keine HpD-Applikation) des soliden Ehrlich-Carcinoms. Die schwache Autofluoreszenz des Tumors (spezifische Autofluoreszenz) überlagert sich einer unspezifischen Autofluoreszenz des Gewebes (gestrichelte Kurve), 150mW/cm², Meßdauer: 5min

Diskussion

Nach UV-Anregung zeigt das EC-Tumorgewebe mit deutlichem Kontrast zum peritumoralen Gewebe eine strukturierte Autofluoreszenz im Bereich 600nm bis 710nm mit Maxima bei $\approx 640\text{nm}$ und 680nm . Möglicherweise wird diese Fluoreszenz von körpereigenen Porphyrinen hervorgerufen, denn Bandenlage und -struktur ähneln denen verschiedener Porphyrine. Die von Yanming et al. /68/ beobachteten Autofluoreszenzbanden von humanen HNO-Tumoren bei Anregung mit Strahlung vergleichbarer Wellenlänge stimmen näherungsweise ($\Delta\lambda \approx 10\text{nm}-20\text{nm}$) mit denen des EC überein.

Die benachbarte cutane Gewebsschicht weist ebenfalls eine deutlich nachweisbare Fluoreszenz im roten Spektralbereich auf, jedoch kann anhand der spektralen Verteilung eine ausreichende Differenzierung vorgenommen werden. Eine Fluoreszenz im betrachteten Spektralbereich zeigen alle äußeren Hautpartien, im Gegensatz zu den inneren Organen. Die von /62/ beobachtete tumorcharakteristische Bande bei 520nm wurde von uns nicht registriert, auch bestand keine Übereinstimmung im roten Spektralbereich. Die Ursachen für diese unterschiedlichen Ergebnisse dürften insbesondere die Spezifik des Tumors (vergleichende Untersuchungen an dem Lewis-Lung-Tumor der Maus bestätigen diese Behauptung, hier konnte die tumorspezifische Autofluoreszenz nicht beobachtet werden), und in der unterschiedlichen Wahl der Anregungsstrahlung (λ , Intensität) zu suchen sein. Die von /62/ verwendete hohe Intensität von mehreren Watt/cm², aber auch die hier verwendete von 150mW/cm² im UV, kann bei ausreichender Bestrahlungsdauer zur Generation fluoreszierender Photoprodukte führen (s. 4.5.). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, daß die beobachteten in-vivo Fluoreszenzen Resultat photochemischer Umwandlungen sind. Die beobachtete spezifische Autofluoreszenz des soliden EC, sowie die Resultate von Yanming et al. /68/ zeigen, daß eine Diagnose bestimmter Tumore auch ohne vorherige Markierung mittels Fluoreszenznachweis möglich sein kann. Weitergehende Untersuchungen an humanen Tumoren sind von großer Bedeutung.

4.4. In-vivo Untersuchungen zur HpD-Fluoreszenz

In Abhängigkeit von der Applikationsart und dem Zeitintervall nach Injektion des PS (HpD-Präparat aus DDR-Produktion) sowie der Ausgangskonzentration konnte der Sensibilisator in verschiedenen Körperarealen nachgewiesen werden.

Außer dem tumoralen und peritumoralen Gewebe wies insbesondere die äußere Epidermis (z.B. Ohr, Schwanz) eine starke Fluoreszenz auf. Die Akkumulation in den äußeren Hautschichten ist ein wesentlicher Nachteil des HpD, da sie zu einer mehrwöchigen Photosensibilität führt.

Spektroskopische Untersuchungen an tumor(EC-)tragenden Versuchstieren ergaben eine deutlich höhere HpD-Fluoreszenzintensität innerhalb des soliden Tumors im Vergleich zum umgebenden Gewebe und zu verschiedenen Organen (hier Messung nach excitus). Abb. 4.4.I.

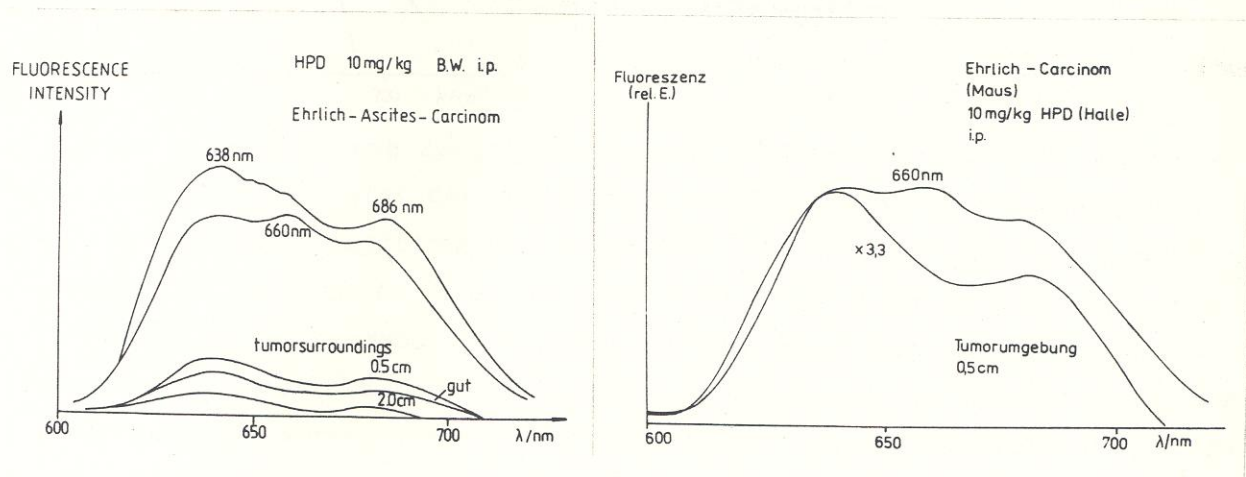


Abb. 4.4.I Fluoreszenzspektrum von unterschiedlichen Geweben 18h nach i.p. HpD-Applikation

Um die beobachtete Rotverschiebung der Fluoreszenzbanden zu erklären, wurde HpD in verschiedener Umgebung untersucht. Es zeigte sich, daß durch Bildung von PS-Monomer -HSA-Komplexen, insbesondere die Bindung an die Lipoproteine geringer Dichte (LDL), und damit verbundener Aggregatdissoziation, eine Rotverschiebung und Intensitätszunahme der Fluoreszenzbanden erfolgt. Der gleiche Effekt ist bei der Anlagerung und Diffusion des PS durch die Zellmembranen entsprechend den Untersuchungen an den Micellen SDS und CTAB (einfache Membranmodelle) zu erwarten, Abb. 4.5.II. Damit wird die in-vivo beobachtete spektrale Lage der Fluoreszenzbanden von $\approx 635\text{nm}$ und $\approx 690\text{nm}$ in HpD inkubierten Gewebekomponenten verständlich.

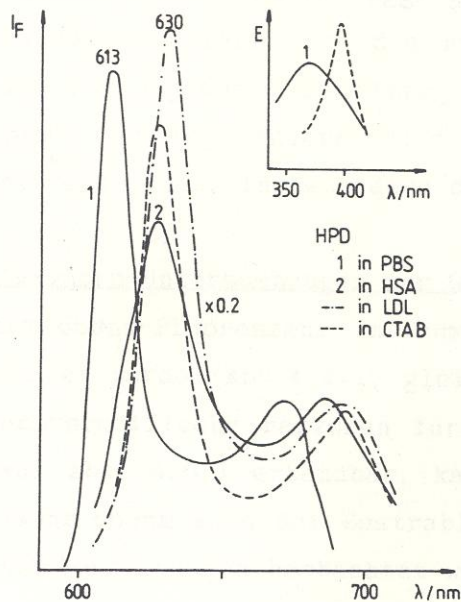


Abb. 4.4.II Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{exc}=400nm$) von HpD in PBS ($10E-04M$) und bei Zugabe von HSA und Micellen sowie 0,2ml humanen Lipoproteinen geringer Dichte ($c=1,79g/l$). Letztere spielen nach /71/ infolge starker Kopplung mit HpD und bevorzugter Aufnahme durch Tumorzellen eine wesentliche Rolle im Prozeß der selektiven Anlagerung. Oben im Bild: Änderung der Soretbande infolge Deaggregation.

Bei Annahme eines linearen Zusammenhanges von Fluoreszenzintensität und Konzentration kann die Intensität der Lumineszenz zur Konzentrationsbestimmung genutzt werden. Intensitätsverhältnisse von 1:3,3 bis 1:10 (Tumorfloreszenz:Umgebungsfluoreszenz in 5mm-20mm Abstand vom Tumorrund) konnten so in Abhängigkeit vom Zeitintervall Injektion-Messung bestimmt werden. Dabei ist die inhomogene Verteilung des PS innerhalb des Tumorgewebes zu beachten. Die Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen verschiedener Autoren über das Anlagerungsverhalten des Präparates Photofrin überein /62/. Damit zeigt sich, daß prinzipiell das DDR-Präparat auch für die Fluoreszenzdiagnostik geeignet ist (s. Anhang 1 bzw. /43*/). Wie aus Abb. 4.4.I auch erkennbar, unterscheidet sich die Spektrenform der Tumorfloreszenz von der der Umgebungsfluoreszenz durch das Intensitätsverhältnis der beiden Monomerfluoreszenzbanden, insbesondere aber durch die zusätzliche Bande bei ≈ 660 nm.

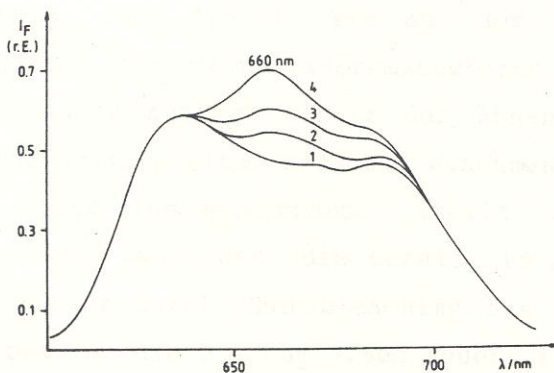


Abb. 4.4.III In-vivo Fluoreszenzspektrum eines HpD-inkubierten Tumors in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis ($10mW/mm^2$, $364nm$) 1: ohne Bestrahlung, 2: 10min, 3: 20min, 4: 30min. Normierung auf den Fluoreszenzpeak bei $\approx 635nm$

Diese zusätzliche Fluoreszenzbande wurde auch von Yamashita et al. [12] beobachtet, der sie den stabilen Aggregaten zuordnet. Wie unsere Untersuchungen jedoch zeigen (Abb. 4.4.III), ist die Entstehung und die Intensität dieser Banden von der Bestrahlungsdosis der Anregungstrahlung abhängig. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer erfolgt andererseits infolge Photobleaching ein Abbau der Monomerfluoreszenzbanden, insbesondere der 635nm-Bande.

4.5. In-vitro Untersuchungen zur Generation von fluoreszierenden Photoprodukten

Da die 660nm-Fluoreszenz im Tumorgewebe im Gegensatz zum peritumoralen Gewebe beobachtet wurde (Abb. 4.4.I, gleiche Bestrahlungsdosis), wurde zunächst geprüft, ob tumorspezifische Faktoren für die Entstehung der Bande verantwortlich sind. Wie aus Abb. 4.5.1 erkennbar, kann das Erscheinen eines neuen Fluoreszenzpeaks bei 650nm-660nm auch bei Bestrahlung von HpD-haltigen Tumorzellsuspensionen und HpD-HSA-Verbindungen beobachtet werden.

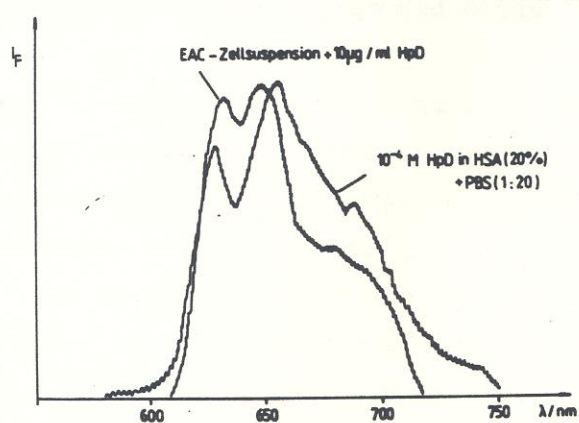


Abb. 4.5.1 Fluoreszenzspektrum einer HpD-inkubierten EAC-Zellsuspension (10^6 Zellen/ml, 2x gewaschen mit PBS) und einer HpD-Lösung mit HSA-Zugabe nach Bestrahlung mit der HBO200 (50 mW/cm^2)

Aber auch in wässriger Lösung kann für 10^{-5} M oder höherkonzentrierte HpD-Lösungen (typischerweise 10^{-4} M) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis eine zusätzliche Bande registriert werden. Nach 4.1. liegen HpD-Konzentrationen in Tumorgewebe ($\approx 1 \text{ µg/ml}$) von $\geq 10^{-5} \text{ M}$ vor. Das Maximum der Bande liegt bei $\approx 642 \text{ nm}$ und folgt damit der erwarteten Verschiebung von 15 nm – 20 nm bzgl. der Lage im in-vivo-Spektrum, Abb. 4.5.II. Wie aus dem Differenzspektrum ersichtlich, nimmt die Intensität der 642 nm -Fluoreszenzbande absolut zu, während die der 612 nm und 675 nm -Banden abnimmt. Trotz der Abnahme der Monomerbanden kann die integrale Fluoreszenzintensität zunächst zunehmen.

Die 642 nm -Fluoreszenzbande stellt somit keine von vornherein gegebene Fluoreszenzbande dar, die bereits im Spektrum der unbestrahlten Probe vorhanden ist und nur durch Photobleaching der Monomermaxima sichtbar wird, sondern ist Ausdruck für die Bildung eines neuen, fluoreszierenden Produktes.

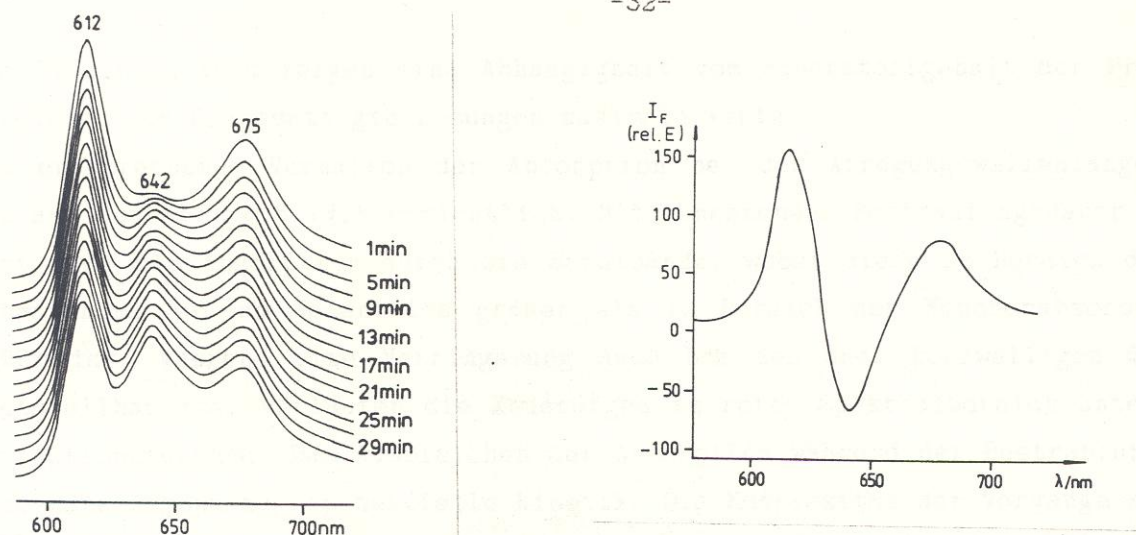


Abb. 4.5.II Fluoreszenzspektren einer 10E-04M HpD-PBS-Lösung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und das Fluoreszenz-Differenzspektrum von unbestrahlter und 40min bestrahlter Probe, bei dem man den Aufbau der 642nm-Bande und den Abbau der Banden bei 612nm und 675nm erkennt.

Die Herausbildung der 660nm-Bande ist somit nicht tumorspezifisch oder an die Existenz bestimmter Verbindungen mit körpereigenen Stoffen (Proteine, Lipide, Lipoproteine) gebunden. Als Ursache für das verstärkte Auftreten dieser Bande im Tumorgewebe kann die erhöhte HpD-Akkumulation angesehen werden.

Um zu prüfen, ob ein thermisch induziertes Produkt vorliegt, wurden 10E-04M HpD-Proben bis zu einer Temperatur von 90°C erwärmt. Beobachtet wurde eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität, korrelierend mit einer langwelligen Verschiebung der Soretbande von max. 5nm. Dies kann auf Deaggregationsprozesse gemäß der zu erwartenden temperaturabhängigen Verschiebung des Gleichgewichtes Monomer - dissoziierbare Aggregate zurückgeführt werden. Die Herausbildung einer zusätzlichen Fluoreszenzbande wurde jedoch nicht beobachtet. Damit liegt der Schluß nahe, daß das/die neuerstandene/n Produkt/e Resultat photochemischer Umwandlungen ist/sind /72*,73*/. Untersuchungen in höherkonzentrierten Lösungen belegen, daß auch durch Bestrahlung Deaggregationsprozesse ablaufen können. Dabei steigt die Fluoreszenzintensität der 612nm und 675nm-Banden zunächst an, zeigt dann aber oben beschriebenes Verhalten.

Betrachten wir zunächst die Kinetik der 612nm-Fluoreszenz, die wie Kapitel 5 zeigt, allein den HpD-Monomeren zugeordnet werden kann. Wie aus Abb. 4.5.III ersichtlich, nimmt die Fluoreszenzintensität einer 10E-04M HpD-Lösung mit zunehmender Bestrahlungszeit ab und zeigt einen exponentiellen Verlauf. Nach langer Bestrahlungszeit ist eine Beschleunigung des Ausbleichprozesses feststellbar.

Die Bleachingraten zeigen eine Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt der Probe und erreichen für O_2 -gesättigte Lösungen maximale Werte.

Das entsprechende Verhalten der Absorption bei der Anregungswellenlänge 400nm ist aus den Abb. 4.5.IV,V ersichtlich. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer verringert sich die Absorption durch die Soretbande, wobei diese im Bereich des Bandenmaximums 367 nm wesentlich größer als im Bereich der Monomerabsorption um 400nm ist. Während eine Verringerung auch bei den drei kurzwelligen Q-Banden feststellbar ist, verlaufen die Änderungen im roten Spektralbereich unter einer Extinktionszunahme. Das Ausbleichen der Absorption während der Bestrahlung zeigt eine näherungsweise exponentielle Kinetik. Die Komplexität der Vorgänge kommt in der unterschiedlichen Geschwindigkeit für das Ausbleichen der Absorption und der Fluoreszenz zum Ausdruck. Trotz Intensitätsabnahme der Monomerfluoreszenz erfolgt zunächst keine wesentliche Änderung des Extinktionswertes für 400nm.

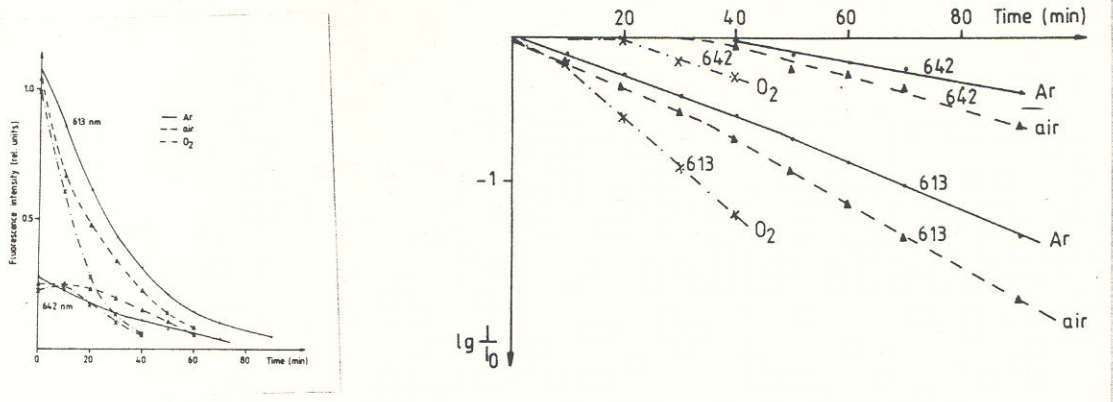


Abb. 4.5.III Intensität der 613nm- und der 642nm-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer (HBO 200, 50mW/cm², $\lambda_{exc}=400nm$) und dem Sauerstoffgehalt (O_2 , Ar-, Luft-Spülung) einer $10E-04M$ HpD-Lösung (0,2ml). In der rechten Abb. wurde die relative Intensität logarithmisch dargestellt. Dem beginnenden langsamen exponentiellen Verlauf folgt eine schnellere Kinetik

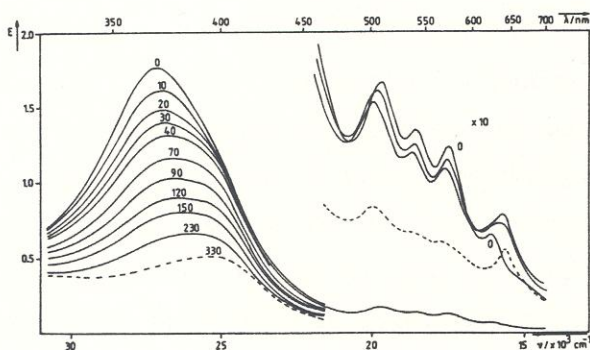


Abb. 4.5.IV Absorptionsspektrum von HpD in PBS. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer (0-330min, HBO 200, 50mW/cm²) bleicht die Probe aus. Der Prozeß des Photobleaching wird von dem Prozeß der Photoproduktgeneration überlagert (reduziertes Bleaching um 400nm, 450-500nm und um 600-650nm).

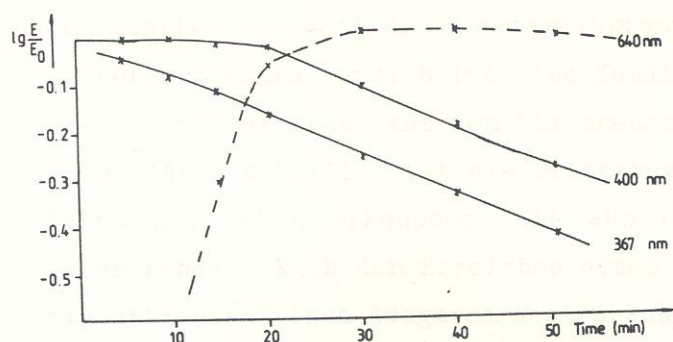


Abb. 4.5.V Kinetik der Absorptionsänderung (Photobleaching), HBO200, 60mW/cm². E₀ entspricht max. Extinktionswert. 640nm-Werte wurden bzgl. Untergrund (Absorption unbestrahlter Probe) korrigiert.

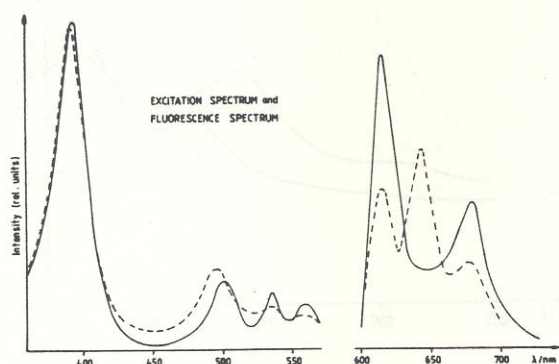


Abb. 4.5.VI Fluoreszenz- und Fluoreszenzanregungsspektrum von bestrahlter $\lambda_F=645\text{nm}$ und unbestrahlter HpD-Lösung $\lambda_F=608\text{nm}$

Wenden wir uns nun dem Photoprodukt (PP) zu. Da in der 330min bestrahlten Probe (gestrichelte Kurve der Abb. 4.5.IV) der Anteil der Monomerfluoreszenz gegenüber der Photoproduktfluoreszenz stark zurückgegangen ist (s. Kap.5), muß das Absorptionsspektrum dieser Probe mit Maxima um 400nm, 495nm (kurzwellige Verschiebung) und 640nm (und einer weiteren breitbandigen UV-Absorption) wesentliche Informationen über die PP-Absorption enthalten.

In der Tat kann die 642nm-Fluoreszenz bevorzugt mit Strahlung der Wellenlänge 488nm gegenüber 514nm-Strahlung angeregt werden. Das in Abb. 4.5.VI dargestellte Fluoreszenzanregungsspektrum der bestrahlten Lösung spiegelt das Absorptionsverhalten (bis auf die breitbandige UV-Absorption und den Bereich oberhalb 580nm) wieder und zeigt besonders die Absorptionzunahme unterhalb 500nm sowie eine wenig veränderte Absorption um 400nm. Die 400nm-Absorption des PP liefert eine Erklärung für das kinetische Verhalten der HpD-Probe in diesem Spektralgebiet (Abb. 4.5.V), wonach insbesondere bei dieser Wellenlänge neben dem Prozeß des Photobleaching eine Extinktionszunahme durch die PP-Generation erfolgt. Für die Deutung der nahezu konstanten Extinktion in der Anfangsphase des Bleachingprozesses könnte weiterhin das dynamische Gleichgewicht von dissozierbaren Aggregaten und Monomeren herangezogen werden (chemisch gebundene/transformierte Mono-

mere werden durch Deaggregation ersetzt). Diese Schlußfolgerung ist jedoch mit dem starken Rückgang der Monomerfluoreszenz (613nm) nicht konsistent.

Im roten Spektralbereich ist eine Zunahme der integralen Extinktion bei Bestrahlung zu verzeichnen. Aus dem Differenzspektrum von unbestrahlter und bestrahlter Probe (Abb. 4.5.VII), ist die Entstehung von drei zusätzlichen Banden bei 607nm, 640nm und 705nm erkennbar. Wie aus der Abbildung ersichtlich, dominiert die 640nm-Bande. Nach dem Erreichen eines Maximums ändert sich die Extinktion (korrigiert) über einen längeren Bestrahlungszeitraum nur wenig.

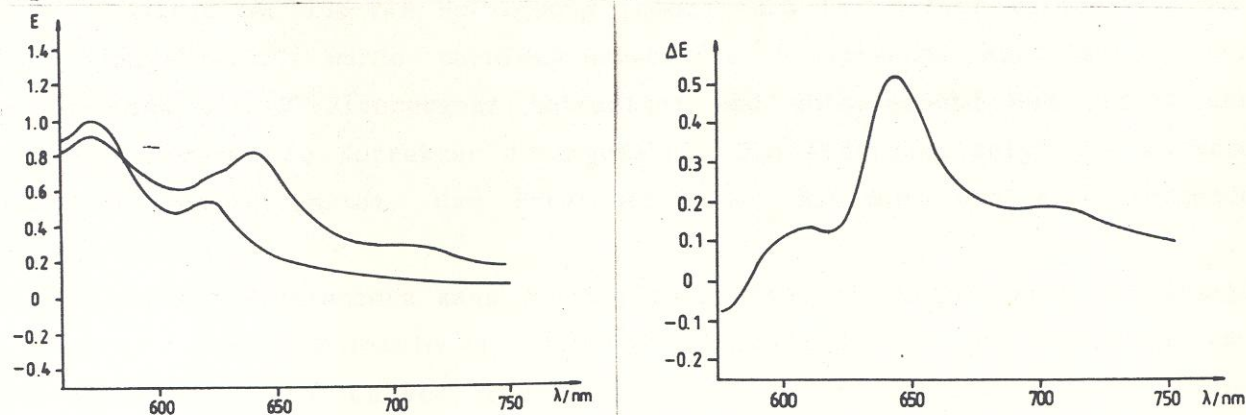
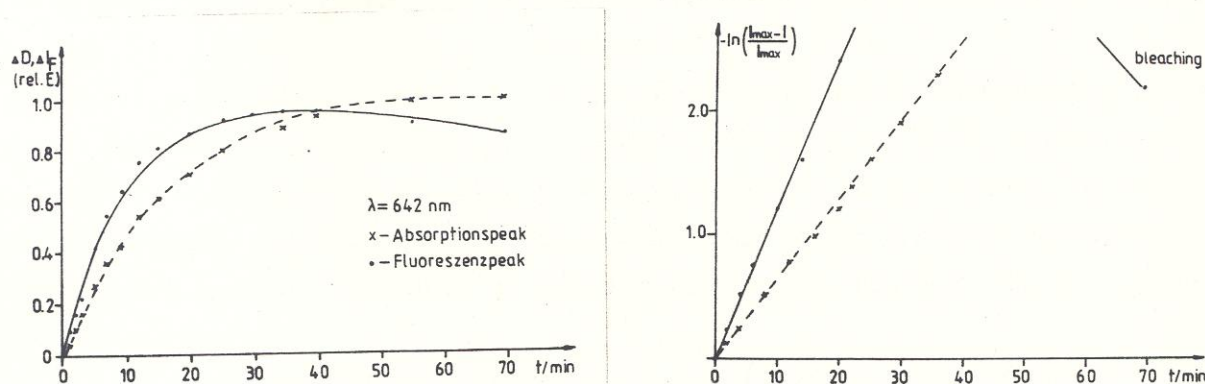


Abb. 4.5.VII Absorptions- und Differenzspektrum von bestrahlter und unbestrahlter Probe im roten Spektralbereich



4.5.VIII Kinetisches Verhalten der Absorptionsbande um 640nm und der Fluoreszenzbande um 642nm. Die alternierende Messung von Absorption und Fluoreszenz erfolgte mit dem OVA unter Beibehaltung der Probenposition, ($\lambda_{exc}=488nm$ für Fluoreszenzanregung und PF-Generation, 100mW, 1ml, Rührer, korrigierte Spektren). Demnach erhält man eine Bildungsrate von $k=(1,0-2,1)10E-03s^{-1}$

Wie Abb.4.5.VIII zeigt, existiert eine Korrelation zwischen der Generation der 640nm-Absorptionsbande und dem 642nm-Fluoreszenzverhalten.

4.6. Fluoreszenzverhalten des Photoproduktes

In der Abb.4.6.I ist die bzgl. der Untergrund-Fluoreszenz bereinigte PP-Fluoreszenz dargestellt. Die Korrektur basiert auf Ergebnissen der UKZ-Untersuchungen (s. Kap.5). Diese belegen, daß im Gegensatz zur 612nm-Fluoreszenz, die im wesentlichen auf eine Relaxation der Monomere zurückgeführt werden kann, der Bereich um 640nm sowohl der Monomer-, als auch der Aggregat- und der PP-Fluoreszenz zugeordnet werden muß. Da der Beitrag zur Fluoreszenz des Monomeranteils einer unbestrahlten $10E-04M$ HpD-Lösung jedoch $\approx 92\%$ bei dieser Wellenlänge beiträgt ($\lambda_{exc}=514nm$), wurde näherungsweise die 642nm-Bande als Gemisch der Monomer- und der PP-Fluoreszenz betrachtet und entsprechend dem Abfall der 612nm-Fluoreszenz die Korrektur durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Zunahme der Fluoreszenzintensität, das Erreichen eines Maximums und eine folgende langsame Abnahme.

Die Abnahme der Fluoreszenz kann bedingt sein durch die Reduzierung der Anzahl der fluoreszierenden Moleküle (z.B. kurze Lebenszeit des PP, photochemische Umwandlung), die Generation von Produkten, die um 400nm absorbieren (Abnahme der PP-Anregungsintensität) oder durch die Zunahme konkurrierender Deaktivierungsprozesse. Messungen an HpD-Proben mehrere Tage nach der Bestrahlung belegen, daß es sich bei der photochemischen Umwandlung um einen irreversiblen Prozeß handelt und damit ein relativ stabiles PP generiert wird.

Bei Bestrahlungszeiten, wo die Fluoreszenzintensität des Photoproduktes abnimmt, scheint die Anzahl der Photoproduktmoleküle konstant zu sein ($E(640nm)=const$, Abb. 4.5.V,VIII). Da sich das Absorptionsband des PP und die HpD-Monomerfluoreszenz überlappen, wurde geprüft, ob die Annahme eines Förster-Transfers [74] zwischen Photoprodukt (Akzeptor) und ausbleichendem Monomer (Donor) gerechtfertigt ist. Mit:

$$R_0^6 = 9000 \times \ln 10 \times \chi^2 \times \theta_F / (128 \times \pi^5 \times n^4 \times N_A) \times \int F_D(f) \times \epsilon_A(f) \times df / f^4$$

χ : Orientierungsfaktor ($\approx 2/3$); θ_F (Monomer) $\approx 0,1$; n (Brechungsindex) $= 1,33$

N : Avogadro-Konstante; $F_D(f)$: Normiertes Monomer-Fluoreszenzspektrum,

erhält man für den Försterradius R_0 maximale Werte von 2,5nm und bei einer Monomerkonzentration von $10E-04M$ einen intermolekularen Donor-Akzeptor-Abstand R_{DA} von minimal 10nm.

Mit: $k_{ET} = 1/\tau_0 (R_0/R_{DA})^6$ τ_0 (Monomerabklingzeit) $= 11ns$

ergibt sich eine Energietransferrate k_{ET} von $\approx 10E04s^{-1}$, die im Vergleich zur Fluoreszenzrate vernachlässigbar ist.

Um dieses Ergebnis zu stützen, wurde geprüft, ob eine Fluoreszenzanregung des PP bei Einstrahlung in die generierte 640nm-Bande möglich ist. Die Aufnahme des Fluoreszenzanregungsspektrums mit Hilfe eines cw-Farbstofflasers (Schrittweite: 5nm), ergab bei Einstrahlung in die 640nm-Absorptionsbande eine Fluoreszenzbande bei ca. 643nm mit einer HWB $\approx$ 25nm, die ihre größte Intensität bei Verwendung einer Anregungsstrahlung bei ca. 635nm aufwies. Für die unbestrahlte Probe lag die günstigste Anregungswellenlänge bei 605nm-610nm.

Es kann somit geschlußfolgert werden, daß die beobachtete 642nm-Fluoreszenz der strahlenden Relaxation des angeregten Photoproduktes zugeordnet werden kann und ein strahlungsloser Energietransfer (Förster-Transfer zum PP oder Transfer der Anregung des PP zu anderen Partnern) ohne Annahme zusätzlicher Voraussetzungen, z.B. Verringerung von R_{DA} über van-der-Waals-Bindungen, unwahrscheinlich ist.

Möglicherweise ist die Konstanz des 640nm-Extinktionswertes nicht mit der konstanten Anzahl fluoreszierender PP-Moleküle gleichzusetzen, sondern einem Gemisch verschiedener, teilweise fluoreszierender Produkte, zumal chromatographische Untersuchungen belegen (s. Kap. 5), daß mehrere HpD-Bestandteile photochemischen Veränderungen unterliegen.

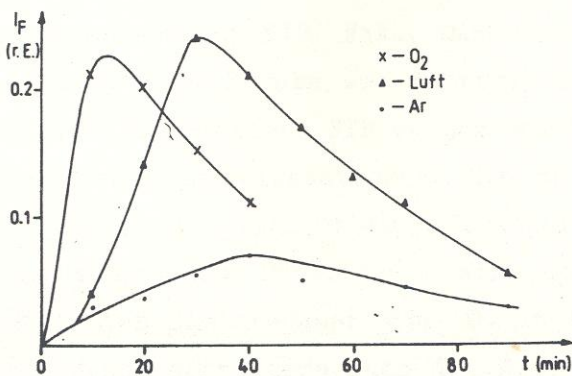


Abb. 4.6.1 PP-Fluoreszenz (korrigiert) in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt

4.7. Sauerstoff-Abhängigkeit

Wie aus den Abb. 4.5.III und 4.6.I ersichtlich, besteht ein Zusammenhang zwischen Bleaching- und Bildungsrate und dem Sauerstoffgehalt der Probe. Insbesondere verläuft in Argon-gesättigten Lösungen die Generation des PP wenig effektiv und bedarf höherer Bestrahlungsdosen. Der Einfluß von Sauerstoff ohne Bestrahlung (Dunkelreaktion) konnte experimentell ausgeschlossen werden.

Evakuierte Proben ($\approx$ 1Pa) geben selbst bei hoher Dosis ($\approx$ 2kJ, HBO 200) im Absorptions- und Fluoreszenzspektrum keinen Hinweis hinsichtlich einer PP-Bildung. Nach anschließender Belüftung kann diese bei gleicher Photonenflußdichte innerhalb weniger Sekunden beobachtet werden. Die Abb. 4.7.I zeigt die Abhängigkeit

von PP-Bildung und Sauerstoffkonzentration, die unter Normalbedingungen (luftgesättigt) in wässrigen Lösungen $0,3 \times 10^{-3} \text{M}$ beträgt /75/. Danach kann das PP noch bei Sauerstoffkonzentrationen um 10^{-5}M sicher nachgewiesen werden. Für Konzentrationen von $c > 10^{-4} \text{M}$ tritt ein Sättigungseffekt ein (verwendete HpD-Konzentration: 10^{-4}M). Die PP-Bildung ist somit empfindlich vom O_2 -Gehalt abhängig /76*, 77*/. Dieses Resultat steht im Widerspruch zu der kürzlich erschienenen Publikation einer sowjetisch-niederländischen Arbeitsgruppe /79/.

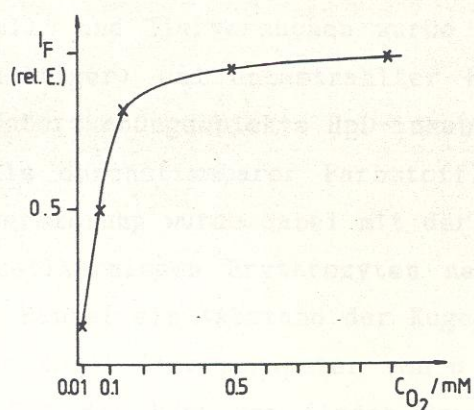


Abb. 4.7.I Maximale Fluoreszenzintensität des PP in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration. Die Proben wurden auf ca. 1Pa evakuiert und dann reiner Sauerstoff eingelassen.

($I_{F, \text{max}}$ (101kPa bzw. $1,5 \times 10^{-3} \text{M}$) wurde gleich 1 gesetzt)

Um zu prüfen, welche aktivierten Sauerstoffspezies Reaktionspartner sind, wurde die PP-Generation bei Anwesenheit von H_2O_2 , sowie den Quenchern D-Mannitol, Nitroblautetrazolium NTB, NaN_3 , DABCO und Metronidazol beobachtet, Abb. 4.7.II. Dabei zeigt die Zugabe des Hydroxylradikal($\text{OH}^\cdot$)fängers D-Mannitol oder des Anionradikal($\text{O}_2^{\cdot-}$)fängers NTB keinen wesentlichen Effekt. Mit H_2O_2 versetzte Proben zeigen keine Dunkelreaktionen, die zu einer PP-Entstehung führen. Die Anwesenheit des Singulett-Sauerstoff-Quenchers NaN_3 und die Zugabe von Metronidazol hemmt dagegen die PP-Bildung. Wird HpD in D_2O gelöst, verläuft die Bildung am effektivsten (Lebensdauer von $^1\text{O}_2$ in D_2O : $58 \mu\text{s}$, in H_2O : $4,4 \mu\text{s}$ /25/). NaN_3 und Metronidazol verringern auch die Bleachingraten (im Vergleich zu HpD in PBS geringere Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 612nm und 640nm, bei Verwendung von D_2O schnellere Abnahme bei gleichen Bestrahlungszeiten).

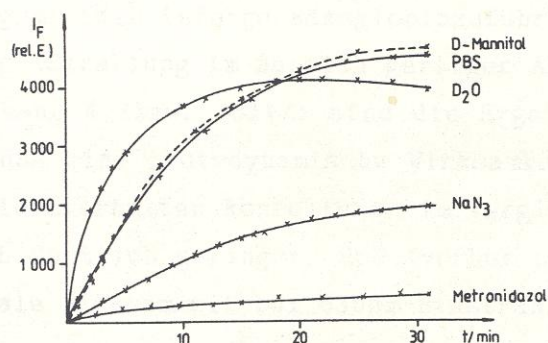


Abb. 4.7.II Einfluß von D-Mannitol (10^{-2}M), NTB (10^{-4}M), NaN_3 (10^{-2}M) und Metronidazol, 0,5% (je 0,16ml) auf die PP-Bildung von 1ml 10^{-4}M HpD-PBS-Lösung (488nm, 100mW) sowie Bildung (10^{-4}M HpD) in D_2O

5. Weiterführende Untersuchungen zum Photoprodukt

5.1. Photodynamische Wirksamkeit

Die während der Bestrahlung von HpD auftretende langwellige Verschiebung des Absorptionsmaximums und die Erhöhung der integralen Extinktion im roten Spektralbereich wirft die Frage auf, inwieweit das Photoprodukt für den Einsatz in der Photochemotherapie geeignet erscheint.

In Zell- und Tierversuchen wurde die photodynamische Wirkung zuvor bestrahlter (PP-haltiger) und unbestrahlter HpD-Lösungen verglichen. Insbesondere dienten als Untersuchungsobjekte HpD-inkubierte humane Erythrozyten, die bei Bestrahlung mittels durchstimmbarer Farbstofflaser in Lyse übergingen. Die Kinetik dieser Zellzerstörung wurde dabei mit der Methode der Kleinwinkelstreuung untersucht.

Die zellkernlosen Erythrozyten nehmen in intaktem Zustand annähernd die Form einer Hantel ein (Abstand der Kugelmittelpunkte $\approx 6\mu\text{m}$ und Kugelradius $\approx 1,2\mu\text{m}$) und weisen damit Streuparameter von $\alpha = \pi r/\lambda$ (r : Teilchengröße) $\approx 10-50$ für $\lambda \approx 600\text{nm}$ auf. Bei der Hämolyse finden Formänderungen unter Volumenabnahme (Übergang zu Kugelform) und Brechzahländerungen ($1,38 \rightarrow 1,33$) statt, die eine theoretische Beschreibung des Streuverhaltens erschweren. Experimentell wird das Auftreten bevorzugter Streurichtungen θ im Kleinwinkelbereich $0-15^\circ$ beobachtet, wobei die Lage der Extrema sich nach /80/ näherungsweise aus der Fraunhofer Beugung mit:

$$I_{\theta} \sim (2J_1(\alpha \sin \theta) / (\alpha \sin \theta))^2 \quad J_1: \text{Besselfunktion 1. Ordnung}$$

ergibt. Für die Anwendung dieser einfachen Beziehung müssen jedoch bestimmte Forderungen an den relativen Brechungsindex m gestellt werden. Insbesondere können die Abweichungen für einige diskrete, α -abhängige m -Werte sehr groß werden. Eine ausführliche Diskussion des Streuverhaltens ist /80/ zu entnehmen.

Bei geeignet gewählten Beobachtungswinkeln kann die Phase des Übergangs in die Kugelform (Schwellphase) beobachtet werden. Der nachfolgende Zelltod ("Platzen") führt neben der Abnahme des Streusignals zu einer Änderung der Absorption des Lösungsmittels infolge Hämoglobinzuführung. Dem wird durch die Wahl eines He-Ne-Lasers (Strahlung im Bereich geringer Absorption) als Streulichtquelle begegnet. Im Anhang 4 (bzw. /81*/) sind die Ergebnisse ausführlich dargestellt. Sie belegen, daß eine photodynamische Wirksamkeit des PP vorliegt und diese mit dem Absorptionsverhalten korreliert. Im Vergleich zum vorher unbestrahlten HpD ist sie jedoch deutlich geringer. HpD (vorher unbestrahlt) zeigt im Aktionsspektrum eine maximale Wirksamkeit bei 630nm-Einstrahlung.

Bei Zugabe der Substanz Metronidazol, die eine Suppression der $^1\text{O}_2$ -Generation bewirkt /28/, wird die Wirksamkeit des HpD nur geringfügig herabgesetzt (Verringerung der Zeitkonstante der Hämolyse) und bestätigt damit die in-vivo-Resultate (s. 3.4.2.). Die Applikation eines HpD-Metronidazol-Gemisches verhindert aber auch die PP-Generation durch die Therapiestrahlung (s. Abb.4.7.II).

Wie Tab. 5.1.I belegt, ist eine zytotoxische Wirkung nicht nur bei $^1\text{O}_2$ -Formation gegeben, sondern kann auch durch Typ-I-Prozesse hervorgerufen werden. Gemäß diesen Daten werden bei der Erythrozyten-Bestrahlung in der Gegenwart von HpD und dem PP verschiedene aktivierte Sauerstoff-Spezies (H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, O_2^-) generiert.

Interessanterweise erhöht sich die photodynamische Wirksamkeit bei 488/514nm-Bestrahlung der HpD-haltigen Zellsuspension zwar im Vergleich zum 630nm-Resultat, jedoch nicht in dem Maße, wie es das Absorptionsvermögen erwarten ließ (wesentlich höherer molarer HpD-Extinktionskoeffizient (s. Abb. 4.1.I)). Im Fluoreszenzspektrum kann bei dieser Einstrahlung (bei üblichen Bestrahlungsdosen) der dem PP zuzuordnende Fluoreszenzpeak beobachtet werden. Untersuchungen an HpD in wässriger Lösung belegen, daß die Bleaching-Rate und die Rate der PP-Bildung eine Abhängigkeit von der Einstrahlwellenlänge entsprechend dem Absorptionsspektrum von HpD zeigen. Sie erreichen somit bei der Einstrahlung in den UV-Bereich maximale und bei Strahlung in den roten Spektralbereich minimale Werte. Die bevorzugte Verwendung von 630nm-Strahlung bei der HpD-PCT findet damit neben der erhöhten Eindringtiefe in Gewebe eine zusätzliche Begründung.

Die Zugabe von Substanzen, die eine PP-Bildung ohne Suppression der photodynamischen Wirksamkeit des HpD verhindern, kann deshalb für eine effektive PCT, insbesondere bei Einstrahlung mit kurzwelliger Strahlung von Interesse sein /76*//.

<u>HpD</u>	Kontrolle	NaN_3 ($10\text{E}-03\text{M}$)	DABCO ($10\text{E}-03\text{M}$)	Katalase ($0,2\text{ mg/ml}$)	NTB ($2 \times 10\text{E}-06\text{M}$)	Thiourea
T_{50}/min	22	29,5	29	40,3	38	-
t_{sw}/min	6,5	8,5	10,5	12	6,8	-
<u>PP</u>						
T_{50}/min	32	40	40	-	48	41
t_{sw}/min	9,4	10,5	18,2	-	9,6	16,5

Tab.5.1.I. Schwellzeit t_{sw} (Zeit bis Erreichen des max. Streusignals) und T_{50} -Zeit einer HpD- und PP- inkubierten Erythrozyten-Suspension (Inkubationszeit: 20min, 633nm, 2mW). NaN_3 und DABCO: $^1\text{O}_2$ -Quencher, Katalase: H_2O_2 -Quencher, NTB: O_2^- -Quencher, Thiourea: OH^- -Quencher

5.2. Messungen zur Triplet-Lebensdauer

Da der T_1 -Zustand Ausgangspunkt der Photooxydationsprozesse ist, wurde untersucht, ob die geringere photodynamische Wirksamkeit des PP mit einer (im Vergleich zum unbestrahlten HpD) geringeren Triplet-Lebensdauer korreliert.

Die Triplet-Lebensdauern wurden mit der Methode der Teststrahlspektroskopie bestimmt, bei der die 2. Harmonische eines Rubinlasers (347nm, 20ns, 20mJ, sättigbarer Absorber) als Anregungsstrahlung diente und ein 1060nm-Teststrahl (T_1 - T_n -Absorption) verwendet wurde. Die Auflösungsgrenze der verwendeten Apparatur betrug 0,5µs; die Messungen erfolgten bei Zimmertemperatur.

Unter atmosphärischen Bedingungen zeigte HpD infolge O_2 -Quenching eine Triplet-Lebensdauer von $\tau < 10\mu s$, während die evakuierte Probe ein biexponentielles Verhalten der Form $I(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2)$ mit $\tau_1 \approx 70\mu s$ und $\tau_2 \approx 700\mu s$ zeigte, Abb. 5.2.1.

Die langlebige Komponente (τ_2) charakterisiert die Deaktivierung des Tripletzustandes (Rate $k_{T,isc}$) der Monomerbestandteile gemäß $[T_1]_t = [T_1]_0 \exp(-tk_{T,isc})$. Sie entspricht den typischen Werten für Porphyrine und Chlorine in wässriger Lösung bei 293K /83/. Die kurzlebige Komponente (τ_1) kann den HpD-Aggregaten zugeordnet werden. Diese Zuordnung findet sich in Übereinstimmung mit dem Fluoreszenzabklingverhalten (s. 5.4.), wo ebenfalls infolge erhöhter strahlungsloser Deaktivierung eine kurze, aggregattypische Komponente vorliegt.

Mit $k_{quench} \approx 1/5\mu s = 2 \times 10^5 s^{-1}$ und $k_2 \approx 1/700\mu s = 1,5 \times 10^3 s^{-1}$ läßt sich die O_2 -Quenchingrate zu $k_q = (k_{quench} - k_2)/[O_2] \approx 6 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$ abschätzen.

In HpD-Lösungen mit einem hohen Anteil an dem Photoprodukt erfolgte eine schnellere Deaktivierung des Triplet-Niveaus (Abb. 5.2.1).

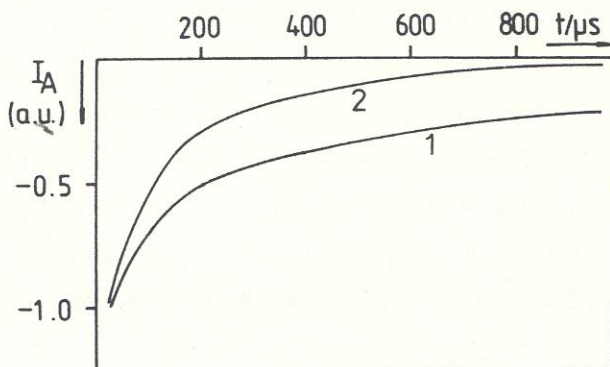


Abb. 5.2.1. Kinetik der Triplet-Deaktivierung evakuiertter HpD-Lösungen 293K. 1: unbestrahlt 2: bestrahlt (PP)
1: $\tau_1 = 73\mu s$, $\tau_2 = 680\mu s$, $A_1 = 55\%$, $A_2 = 45\%$
2: $\tau_1 = 88\mu s$, $\tau_2 = 400\mu s$, $A_1 = 65\%$, $A_2 = 35\%$

Mit der gleichen Apparatur wurde die $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz nachgewiesen (Empfänger: Germaniumdiode PD-106, $\lambda_{\text{reg}}=1270\text{nm}$). Die HpD-D₂O-Lösungen mit hohem PP-Anteil zeigten in Übereinstimmung mit obigen Ergebnissen eine geringere Lumineszenz-Intensität.

Beide Ergebnisse belegen, daß durch die HpD-Bestrahlung Photoprodukte geringer Triplettlebensdauer und geringer Singulett-Sauerstoff-Bildungsrate entstehen und damit eine gegenüber HpD verminderte photodynamische Wirksamkeit zu erwarten ist.

5.3. Chromatographische Untersuchungen*

Mittels Dünnschichtchromatographie (HPTLC RP-18, Fa. Merck, Laufmittel: Methanol/Wasser) und Säulenchromatographie (Sephadex G25) wurden bestrahlte und unbestrahlte HpD-Proben verglichen. Der Nachweis erfolgte durch Fluoreszenzmessung mit der in 4.2. beschriebenen Anlage. Es konnten mehrere verschiedene fluoreszierende Dünnschichtfraktionen (typisch 8-10) deutlich unterschieden werden, wobei die Chromatogramme der PP-haltigen Lösung zusätzliche Fluoreszenzpeaks aufwiesen. Eine Separation des PP mittels Dünnschichtchromatographie war nicht möglich.

Die mit Sephadex durchgeführte Trennung ergab bei den bestrahlten Proben eine relative Erhöhung der Aggregatbestandteile bzgl. der Monomere im Vergleich zur unbestrahlten Probe. Dieses Ergebnis wird durch die im folgenden Kapitel vorgestellten UKZ-Untersuchungen bestätigt. Zudem konnten in der bestrahlten Lösung Fraktionen ermittelt werden, die durch eine stark ausgeprägte 642nm-Fluoreszenz und eine nur geringe Monomerfluoreszenz charakterisiert waren. Die kurze Durchlaufzeit dieser Teil-Lösungen, die bevorzugt den Photoprodukten zugeordnet werden können, deutet auf die Existenz von polymolekularen Verbindungen hin.

Diese Resultat belegen, daß zum einen, mehrere HpD-Bestandteile photochemischen Veränderungen unterliegen, zum anderen, die Photoprodukte höhermolekulare Verbindungen, möglicherweise stabile Dimere, darstellen.

Kürzlich berichteten Vertreter der Photofrin-Herstellerfirma von beobachteten photochemischen Veränderungen einzelner Bestandteile des HpD-Präparates infolge intensiver Bestrahlung /84/. Obige Schlußfolgerungen werden somit bestätigt.

*Die Chromatogramme wurden durch die Sektion Chemie der Universität Jena und durch die HNO-Universitätsklinik Halle erstellt.

5.4. UKZ-Untersuchungen

5.4.1. Experimentelle Anordnung

Um Aussagen zum Anlagerungsverhalten der Bestandteile von HpD in biologischen Systemen und insbesondere weitere Informationen zur Generation der Photoprodukte zu erhalten, wurden zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen im ns- und subns-Bereich an einem Meßplatz der Sektion Physik auf der Basis der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC) durchgeführt.

Als Anregungsquelle dient ein modensynchronisierter Argonionenlaser ($\lambda=514\text{nm}$, $P=400\text{mW}$, Impulsbreite $\approx 100\text{ps}$, Impulsfrequenz: $123,2\text{MHz}$ -entspricht Impulsabstand von $8,12\text{ns}$). Als Nachweissystem wird das SPC 100 (ZOS Berlin) verwendet. Räumlich- ($\approx 0,6\mu\text{m}$, Scanning-Mikroskop), zeitlich- und spektral- (Spekol, $\Delta\lambda=11\text{nm}$) aufgelöste Fluoreszenzmessungen sind möglich. Detailliertere Informationen sind Anhang 5 bzw. /85*/ oder /86,87*/ zu entnehmen.

Die Entfaltung der registrierten HpD-Fluoreszenzkurven $I(t)$:

$$I(t) = G(t) * F(t) * L(t) = F(t) * R(t)$$

mit $L(t)$: Anregungsimpuls, $G(t)$: Gerätefunktion, $R(t)$: Anregungsimpuls-Response, $R(t)=G(t)*L(t)$, $F(t)$: Fluoreszenz,

erfolgte, basierend auf dem Verfahren der iterativen Rückfaltung, unter der Voraussetzung eines mehrfach exponentiellen Abklingenverhaltens mit:

$F(t) = \sum A_i \exp(-t/\tau_i)$. Die Parameter Fluoreszenzabklingzeit τ_i und Amplitude A_i wurden mit dem Programm: "Global Deconvolution of Fluorescence Kinetics" /88/ bestimmt. Dieses Programm erlaubt außer der Entfaltung von Einzelkurven, die globale Entfaltung (Entfaltung mehrerer Fluoreszenzkurven unter Beibehaltung von τ_i , A_i wird variiert) von bis zu 4 Abklingzeiten. Dabei werden durch eine Multiimpulskorrektur auch solche Fälle berücksichtigt, bei denen die Fluoreszenz zwischen zwei Impulsen nicht vollständig abklingt (hier: $\tau > 8,12\text{ ns}$), sowie eine mögliche zeitliche Verschiebung zwischen Anregung und Fluoreszenz (Delay) und spektrale Abhängigkeiten (color shift). Eine umfangreiche statistische Untersuchung (χ^2 -Test, Durbin-Watson-Test und F-Test (Signifikanz der Existenz mehrerer Abklingzeiten) ist zudem Bestandteil der software.

In Abb.5.4.1. sind die Ergebnisse der Entfaltung einer HpD-Fluoreszenzkurve dargestellt, die ein dreifach exponentielles Abklingenverhalten aufweist. Oftmals wurde bei der Fittung zunächst die lange Abklingzeit bestimmt (Fittung im Bereich 6ns - 8ns) und diese dann bei der Entfaltung der gesamten Abklingkurve konstant gehalten. Die Eingangsparameter wurden schrittweise erweitert.

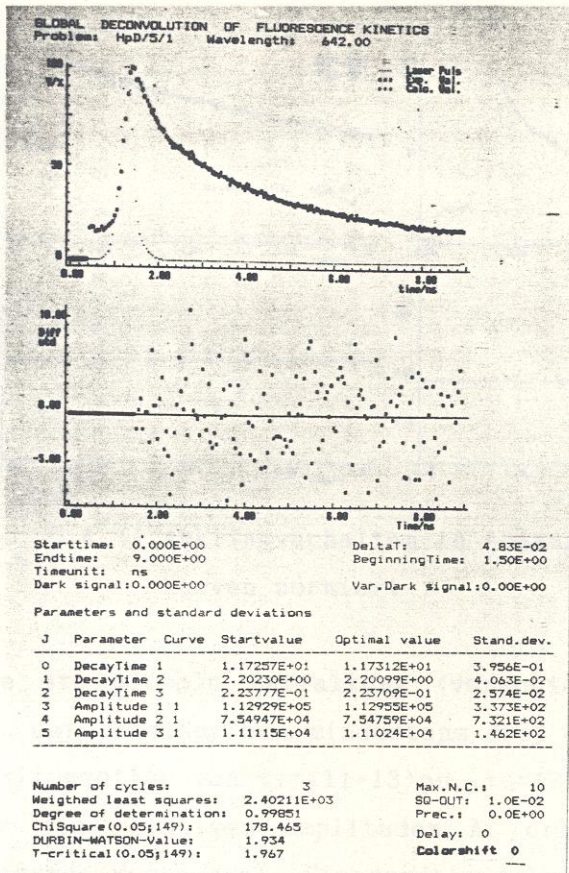


Abb.5.4.1 Ergebnisse der Entfaltung der Fluoreszenz einer $3 \times 10^{-3} \text{M}$ HpD-PBS-Lösung, $\lambda_F = 642 \text{nm}$, normiert ($\Sigma A_i = 100\%$) Die Ergebnisse des F-Testes und die Residuenverteilung (untere Grafik) be-
rechtigen zur Annahme von drei fluo-
reszierenden Komponenten.

Die Fluoreszenzkurven lassen sich in drei zur Verfügung stehende Zeitintervalle I unterteilen, wobei sich die mittlere Fluoreszenzintensität I_F als Funktion von I darstellen läßt. Die Einteilung wurde i.allg. so gewählt, daß Intervall I vorwiegend die Komponenten mit kurzer Abklingzeit und II vorwiegend die Fluoreszenz mit $\tau > 4 \text{ns}$ erfaßt. III umfaßt oft den gesamten Zeitbereich $0 \text{ns} < t < 8,12 \text{ns}$ und ist somit ein Maß für die gesamte mittlere Intensität, s. Anhang 5.

5.4.2. Untersuchungen bei schwacher Anregungsstrahlung

Zunächst wurde das zeitlich- und spektral aufgelöste Fluoreszenzverhalten einer $10 \text{E}-04 \text{M}$ HpD-PBS-Lösung bei sehr schwacher Lichtanregung ($100 \mu\text{W}/5 \text{mm}^2$) untersucht. Dabei zeigen sich Unterschiede des Abklingverhaltens hinsichtlich der untersuchten Fluoreszenzwellenlänge, Abb. 5.4.II.

So weist der kurzwellige rote Spektralbereich ($600 \text{nm} - 620 \text{nm}$), insbesondere der Fluoreszenzpeak bei $\approx 612 \text{nm}$ mit einer Restfluoreszenz bei Eintreffen des nachfolgenden Anregungsimpulses von $I_F > I_{\text{max}}/e$ auf die Existenz einer langlebigen Fluoreszenzkomponente hin. Während der Bereich $630 \text{nm} - 650 \text{nm}$ ein schnelles Abklingverhalten zeigt, ist die zweite, langwellige Fluoreszenzbande durch eine langsamere, von der 612nm -Bande jedoch verschiedenen Kinetik gekennzeichnet.

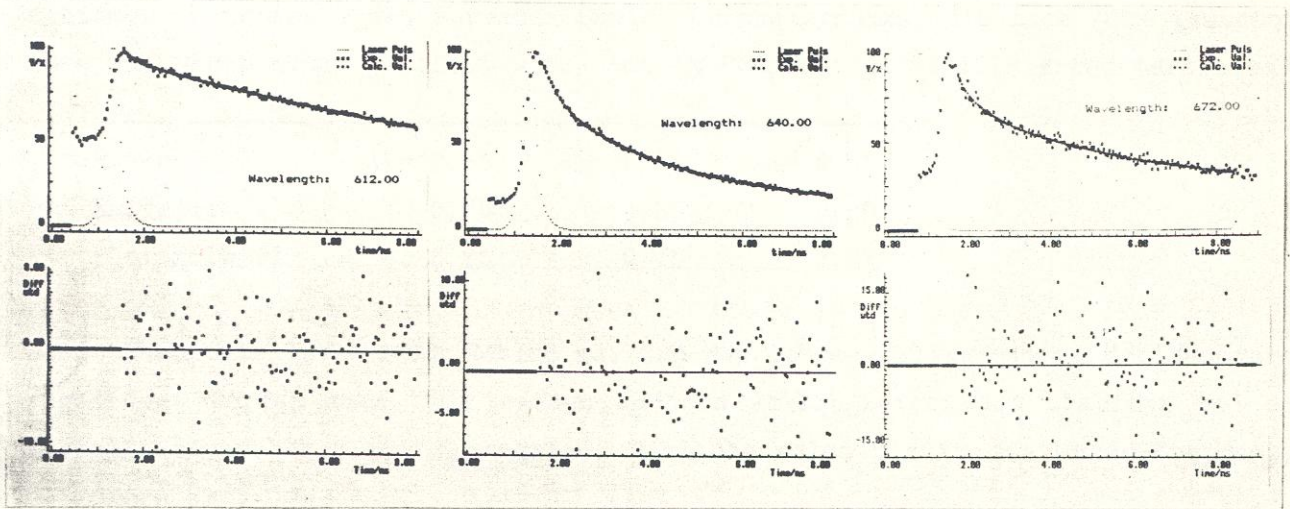


Abb. 5.4.II Abklingverhalten in Abhängigkeit von der Fluoreszenzwellenlänge
Kurven normiert

Wie die globale Entfaltung (verschiedene Fluoreszenzwellenlängen) belegt, muß von der Existenz von mindestens drei verschiedenen, fluoreszierenden Spezies mit Abklingzeiten von $\tau_1 = (11-13)\text{ns}$, $\tau_2 = (2-3)\text{ns}$ und $\tau_3 = (100-300)\text{ps}$ ausgegangen werden. Für die relativen Amplituden A_i erhält man bei dem verwendeten HpD-Präparat folgende Werte (rel. Standardabweichungen: $<0,01A_i$):

612nm:	$A_1 = 0,99$	$A_2 = -$	$A_3 = 0,01$
640nm:	0,69	0,25	0,06
672nm:	0,86	0,10	0,04

Die Komponente 1 ist mit einem Amplitudenanteil von $A_1 > 69\%$ am stärksten vertreten und trägt mit:

$$\frac{\int_0^\infty A_1 \exp(-t/\tau_1) dt}{\int_0^\infty \sum (A_i \exp(-t/\tau_i)) dt} = (A_1 \tau_1) / \sum (A_i \tau_i) > 0,92$$

mit mindestens 90% zur Fluoreszenz (für alle Fluoreszenzwellenlängen) bei. Die Residuenverteilung und die Ergebnisse des F-Testes berechtigen die Annahme der subns-Komponente, obwohl der Amplitudenanteil nur gering ist.

Wie konzentrationsabhängige Messungen belegen, Abb. 5.4.III, erhöht sich der relative Anteil der kurzlebigen Komponenten mit zunehmender Konzentration. Dagegen erniedrigt er sich bei Zugabe von Deaggregation hervorrufenden Medien, wie EtOH, HSA, CTAB oder SDS, wird jedoch nicht vernachlässigbar. Nachfolgend wurden zwei HpD/Halle-Präparate ($c = 10 \times 10^{-4} \text{M}$, $\lambda_F = 640 \text{nm}$) verglichen, die wie chromatographische Untersuchungen (Sephadex) zeigten, sich in ihrem Aggregatgehalt unter-

schieden (Fraktion I des Sephadex-Säulen-Chromatogramms, die nach /35/ insbesondere aus DHB-Dimeren gebildet wird, ist im Präparat Halle II stärker vertreten):

Halle I	$A_1 = 0,84$	$A_2 = 0,10$	$A_3 = 0,06$
Halle II	0,70	0,25	0,05
Photofrin II	0,78	0,15	0,07

Diese Resultate lassen den Schluß zu, daß die lange Abklingzeit τ_1 den Monomeren zugeordnet werden kann, die beiden anderen Abklingzeiten den stabilen und den konzentrationsabhängigen Aggregaten. Möglicherweise stellt die subns-Komponente Oligomere dar.

Yamashita et al. /12/ ordnet dagegen die ≈ 2 ns-Fluoreszenz den Monomeren zu, während Andreoni et al. /89/ aus konzentrationsabhängigen Messungen an HP schlußfolgert, daß die kurze ns-Komponente den Hp-Dimeren zugeordnet werden muß. Eine Abhängigkeit von der Fluoreszenzwellenlänge wurde nicht beachtet. 1988 wurde von /90/ HP in PBS untersucht und ebenfalls ein dreifach-exponentielles Verhalten mit den Abklingzeiten 15ns, 2,5ns und 0,3ns beobachtet, die Monomeren, Verunreinigungen in der Küvette und kurzlebigen HP-Dimeren zugeordnet werden.

Aggregat- und Monomerfluoreszenz unterscheiden sich somit spektral. Der 612nm-Peak stellt eine reine Monomerfluoreszenz dar, während der 675nm-Peak zu einem geringen Teil auch eine Aggregatfluoreszenz beinhaltet. Das Fluoreszenzverhalten bei 640nm, dem Bereich der bei hohen Leistungsdichten zu erwartenden FP-Fluoreszenz, wird durch die kurzlebige Fluoreszenzkomponente 2 wesentlich mitbestimmt. Bei den bisherigen Betrachtungen wurde ein möglicher Einfluß der Anregungsstrahlung nicht beachtet. Bei einer verwendeten Anregungsdosis von $\approx 0,03$ J und einem mehrfachen Erneuern der HpD-Lösung während der Messung kann angenommen werden, daß die angeregte Fluoreszenz die einer HpD-Lösung ohne Photoprodukt entspricht. Die Prüfung aufeinanderfolgender Aufnahmen von zeitaufgelösten Spektren ergab keine Änderung der Spektralform.

Wie in 4.1. erwähnt, kann bei gealterten, dünnen HpD-PBS-Lösungen ein zusätzlicher Fluoreszenzpeak bei 580nm registriert werden. Für ihn wurde ein monoexponentielles Verhalten mit $\tau = (2,48 \pm 0,02)$ ns gefunden. Bei längerer Bestrahlung erfolgte eine rasche Fluoreszenzlöschung, die zu einem Verschwinden des Peaks führte. Die 580nm-Fluoreszenz wurde auch von /91/ beobachtet. Als Ursache für die Entstehung werden hypoxische Bedingungen vermutet.

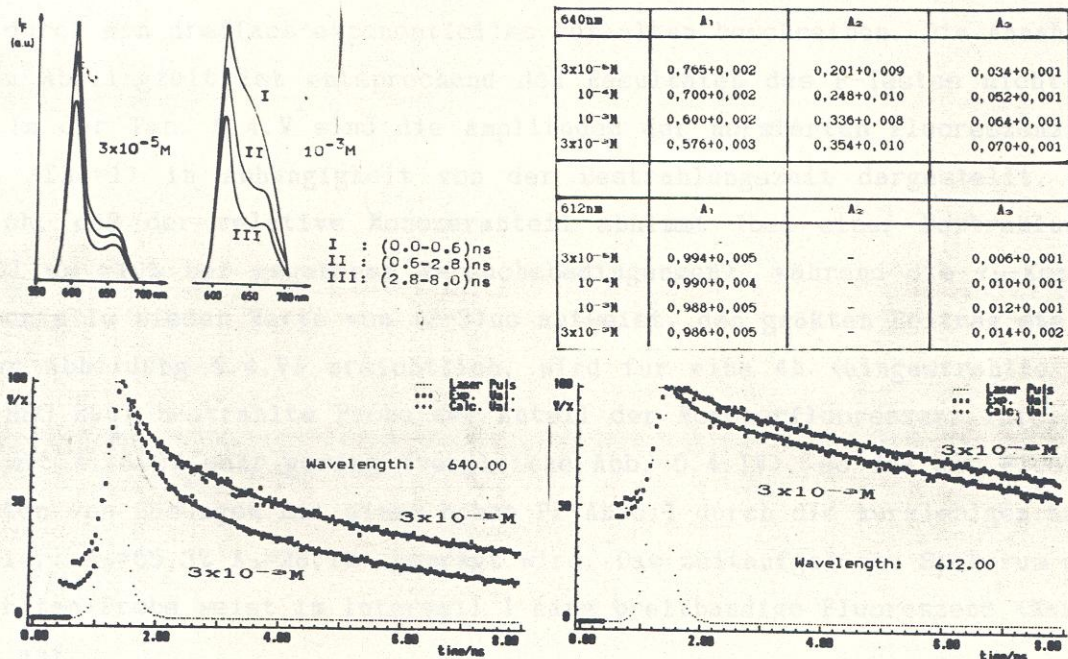


Abb. 5.4.III Zeitaufgelöste Spektren und Abklingkurven von HpD-PBS-Lösungen geringer und hoher HpD-Konzentration, sowie berechnete Amplituden A₁. Die Konzentrationserhöhung von 3x10⁻⁵M auf 3x10⁻³M führt zu einer Verkürzung der Abklingzeiten τ_2 um ca. 10%.

5.4.3. Fluoreszenzverhalten von HpD-Lösungen mit Photoproduktanteil

Wird die Strahlungsdosis der Anregungsstrahlung erhöht, ändern sich infolge der PP-Generation die zeitabhängigen Fluoreszenzspektren. Wie aus Abb. 5.4.IV ersichtlich, dominiert der 642nm-Peak der PP-Fluoreszenz im Zeitintervall I (enthält neben Anteilen der 11ns-Fluoreszenz bevorzugt die der τ_2 -Komponente).

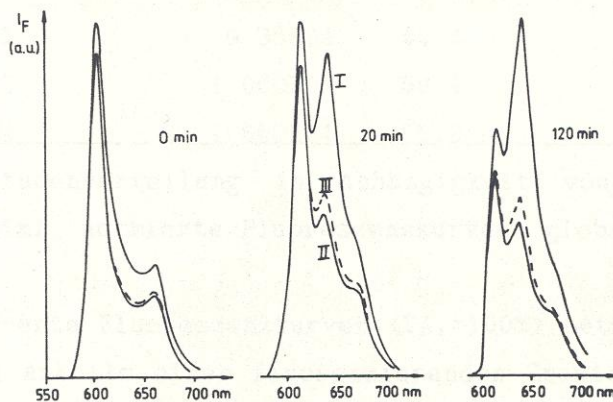


Abb. 5.4.IV Zeitaufgelöste normierte Spektren in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis (80mW, 514nm). I: (0,1-1,0)ns II: (1-7)ns III: (0-7)ns. (0ns: t(I_{F,max}))

Das Abklingverhalten der 642nm-Fluoreszenz der bestrahlten Probe lässt sich ebenfalls durch ein dreifach-exponentielles Verhalten beschreiben. Die Annahme einer vierten Abklingzeit ist entsprechend den Resultaten des F-Testes nicht berechtigt. In der Tab. 5.4.V sind die Amplituden der normierten Fluoreszenzabklingkurven ($\Sigma A_i=1$) in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit dargestellt. Es wird deutlich, daß der relative Monomeranteil abnimmt (bei einer Bestrahlungsdosis von 10J um $\approx 10\%$ bei gegebenen Versuchsbedingungen), während die τ_2 -Komponente, die ebenfalls wieder Werte von (2-3)ns aufweist, den größten Beitrag stellt. Wie aus der Abbildung 5.4.VI ersichtlich, wird für eine 4h (eingestrahelte Energie: 800J, HBO 200) bestrahlte Probe der Anteil der Monomerfluoreszenz infolge Bleaching mit $A_1=6,6\%$ sehr gering (vergleiche Abb. 5.4.IV), so daß das Fluoreszenzverhalten von Lösungen mit einem hohen PP-Anteil durch die kurzlebigen Komponenten (hier: $A_2=65,3\%$ $A_3=28,1\%$) geprägt wird. Das zeitaufgelöste Spektrum der lang bestrahlten Probe weist im Intervall I eine breitbandige Fluoreszenz (Maximum um 642nm) auf.

Bestr.-Zeit	Amplitude	Wert	%	Standardabweichung
0 min	1	1.038E05	58.1	2E02
	2	7.46E04	36.0	8E02
	3	1.22E04	5.9	2E02
2 min	1	1.037E05	50.1	2E02
	2	9.31E04	45.0	7E02
	3	1.02E04	4.9	2E02
4 min	1	1.010E05	48.8	2E02
	2	9.63E04	46.6	7E02
	3	9.6E03	4.6	2E02
6 min	1	9.35E04	44.4	3E02
	2	1.060E05	50.4	7E02
	3	1.069E04	5.2	2E02

Tab. 5.4.V Amplitudenverteilung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis (514nm, 7mW, V=0,04ml, normierte Fluoreszenzkurven, globale Entfaltung)

Bisher wurden normierte Fluoreszenzkurven ($\Sigma A_i=100\%$) betrachtet, die die Bestimmung des relativen Anteils einer fluoreszierenden Spezies ermöglichen. Aussagen zu den absoluten Amplitudenwerten (ohne Normierungsfaktor) sind Tab. 5.4.VIII zu entnehmen.

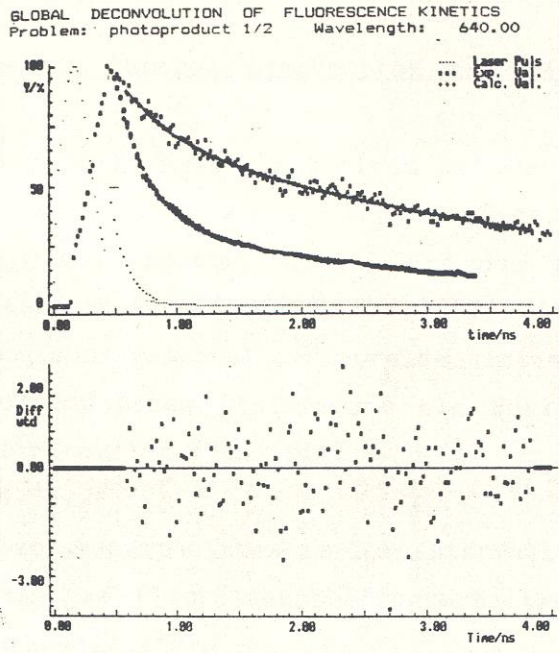
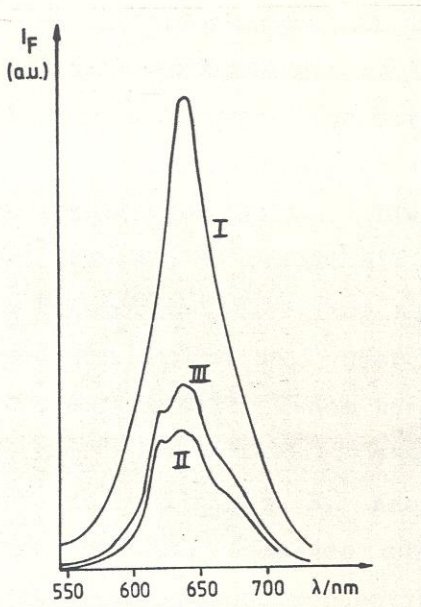


Abb. 5.4.VI Zeitaufgelöste Spektren (I: (0,1-1,2)ns, II: (1,2-7,0)ns, III: (0-8)ns) (0s: $t(I_{F,max})$) und Abklingkurven (Kanalbreite: 20,1ps) einer bestrahlten $10E-04M$ HpD-PBS-Lösung (800J, HBO) im Vergleich mit einer 20J bestrahlten Lösung)

	0J	2,5J (488nm)	250J (HBO)
A_1	1,00	0,51	0,07
A_2	1,00	1,31	0,69
A_3	1,00	1,01	0,71

Abb. 5.4.VII Amplituden A_i (bezogen auf unbestrahlte Probe) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis, $\lambda_F=640nm$

Demnach sinkt der Anteil der langlebigen Komponente infolge Bestrahlung bei einer Bestrahlungsdosis von 2,5J um 50%, während die 2ns-Fluoreszenz absolut ansteigt (30%). Der Anteil der subns-Komponente bleibt annähernd konstant. Die Abnahme der integralen Fluoreszenzintensität ist somit zunächst allein auf ein Monomerbleaching zurückzuführen. Bei geeigneten Bestrahlungsdosen kann infolge Generation des Photoproduktes mit $A_{111} < A_{212}$ zunächst eine Zunahme der integralen Fluoreszenzintensität vorliegen. Nach längeren Bestrahlungszeiten geht die Fluoreszenz aller drei fluoreszierenden Spezies zurück.

Bisher wurde die PP-Bildung in wässrigen Lösungen mit zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen untersucht. Im folgenden Abschnitt soll der Frage nachgegangen werden, ob die photoinduzierte Generation dieser kurzlebigen Spezies auch in der Fluoreszenz HpD-markierter Zellen und am lebenden Tier erkennbar ist.

5.4.4. Untersuchungen an HpD-inkubierten humanen Lymphozyten und EAC-Zellen, sowie in-vivo-Messungen am Tier

Mit dem in Anhang 5 vorgestellten Scanning-Mikroskop mit einem Auflösungsvermögen von $\approx 0,7 \mu\text{m}$, erfolgten zeitlich- und orts aufgelöste Fluoreszenzmessungen an HpD-inkubierten Zellen. Die über den roten Spektralbereich und das jeweilige Zeitintervall (I erfaßt die kurze ns-Komponente, II die Monomere, III den gesamten Bereich zwischen zwei Anregungsimpulsen) gemittelte Fluoreszenzintensität I_F wurde zweidimensional oder als Histogramm eines Linienscans als Funktion des Ortes dargestellt. Zudem wurde ein Zeitparameter $\tau^*(x)$ mit:

$$\tau^*(x) = T / \ln(N_i / N_{i+1})$$

T: Intervallgröße, N_i : Anzahl der Fluoreszenzphotonen im Zeitintervall i, berechnet, der Aussagen zum ortsabhängigen Fluoreszenzabklingverhalten ermöglicht. Für den monoexponentiellen Abfall gilt $\tau^* = \tau_{F1}$.

Bei einer HpD-Konzentration in einer Zellsuspension ($\approx 5 \times 10^6$ Zellen/ml) von (5-20) $\mu\text{g/ml}$ konnten deutliche, räumlich strukturierte Zellfluoreszenzen beobachtet werden, die auf eine HpD-Anlagerung an die Zytomembran und im Zytoplasma/Zellkern zurückzuführen sind. Mit zunehmender Inkubationszeit wurden Veränderungen der Intensitätsverteilung beobachtet, die auf eine verstärkte HpD-Akkumulation im Zellinneren nach ausreichend langer Verweilzeit deuten.

Der Anteil der Autofluoreszenz der Zellen und der Anteil des Streulichtes, der den Teilerspiegel passiert und in den Empfänger gelangt, ergaben Werte von $< 1\%$ der markierten Fluoreszenz und waren somit vernachlässigbar. Für den Fall der EAC-Zellen konnte eine Zellfluoreszenz in einem Bereich von $(22 \pm 2) \mu\text{m}$ (entspricht Zellgröße) in gutem Kontrast (ca. 5:1) zur Fluoreszenz des umgebenden HpD-haltigen Lösungsmittels registriert werden. Das Kontrastverhältnis konnte durch zweimaliges Auswaschen (Zentrifugieren) auf Werte von 50:1 gesteigert werden.

Die Anlagerung des PS konnte auch bei humanen Lymphozyten beobachtet werden und ist damit nicht eine Spezifik der Tumorzellen. Zu diesem Ergebnis gelangte auch Schneckenburger /92/, der Osteosarkom- und Muskelzellen untersuchte.

Die Fluoreszenz der markierten Zellen zeigte ein mehrfach exponentielles Abklingverhalten, wobei die kurzlebigen Komponenten deutlich dominierten und τ^* dadurch Werte zwischen 2ns und 3ns annahm. Durch den Einfluß der Anregungsstrahlung verkürzt sich τ^* mit zunehmender Bestrahlungsdauer. Aus diesen Befunden folgt, daß bereits während der Messung eine PP-Bildung einsetzt. Die Bestrahlungsintensität betrug mit $P = 7 \mu\text{W}$ und $\Delta x = 0,7 \mu\text{m}$ ca. $1,8 \text{ kW/cm}^2$. Ausführliche Ergebnisse der Zelluntersuchungen sind dem Anhang 5 zu entnehmen, sowie /93*/.

Für in-vivo-Messungen wurden narkotisierte Mäuse mit einem soliden EC (freigelegt) verwendet, denen zuvor 20mg/kg HpD i.p. injiziert wurden. In Abb. 5.4.VIII sind Abklingkurven der 630nm-Fluoreszenz (Maximum) dargestellt, für die die Fittung eine Überlagerung fluoreszierender Spezies mit $\tau_1=(13\pm 2)\text{ns}$ und $\tau_2=(1,0\pm 0,3)\text{ns}$ ergab, sowie die Existenz einer subns-Zeitkonstante, die jedoch mit Werten $<90\text{ps}$ eher Streulichtanteilen (die die 514nm-Strahlung reflektierenden dielektrischen Schichten passiert haben) zugeordnet werden kann. Wie den beiden Kurven zu entnehmen ist, führt eine Intensitätserhöhung der Anregungsstrahlung (Fokussierung) zu einer wesentlichen Zunahme der relativen Amplitude A_2 . Das gleiche gilt für die 650nm-Fluoreszenz, nur daß der Anteil der τ_2 -Komponente hier höher ist. Dieses Verhalten korreliert mit den Untersuchungen an HpD-PBS-Lösungen. Nur kann bei der verwendeten Intensität der Anregungsstrahlung von $>10\text{mW}/\text{cm}^2$ in Analogie zu den Zellexperimenten nicht mehr von der Fluoreszenz eines HpD-haltigen Gewebeareals ohne PP-Anteil ausgegangen werden.

Wie die Messungen ergaben, liegt in der Tumorumgebung ein höherer Monomeranteil als im Karzinom vor (gleiche Bestrahlungsdosis der Fluoreszenzanregungsstrahlung). Dies kann einerseits auf eine erhöhte Aggregat-Akkumulation innerhalb des Tumorgewebes zurückgeführt werden (nach /36/ weisen Dimere, insbesondere DHE, und höhere Aggregate eine bevorzugte Tumoranlagerung auf), andererseits kann aber auch durch die Anregungsstrahlung bevorzugt im Tumorgewebe das Photoprodukt generiert werden, da, wie der Vergleich der absoluten Amplituden A_1 zeigt, eine höhere HpD-Konzentration in diesem Gewebe im Vergleich zur Umgebung vorliegt. Die Untersuchungen zur zeitaufgelösten Fluoreszenz in Zellen und im Tumorgewebe zeigen mit zunehmender Bestrahlung einen Rückgang der Monomerfluoreszenz und eine Zunahme kurzlebiger fluoreszierender Komponenten. Diese mit den Ergebnissen der in-vitro Versuche korrelierenden Resultate bestätigen, daß die PP-Generation keine tumor- oder gewebespezifische Erscheinung darstellt.

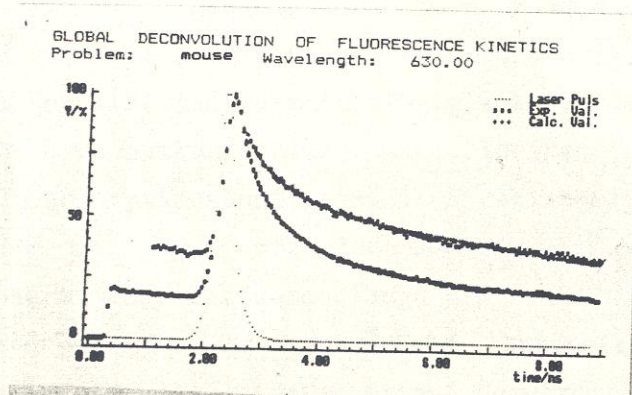


Abb. 5.4.VIII In-vivo Fluoreszenzabklingkurve, 630nm, 4h nach Applikation
Obere Kurve ($I=10\text{mW}/\text{cm}^2$):

$$A_1=91,7\pm 0,1\% \quad A_2=5,6\pm 0,1\% \quad A_3=2,7\pm 0,1\%$$

Untere Kurve ($I=10\text{mw}/\text{mm}^2$):

$$A_1=72,1\pm 0,1\% \quad A_2=20,0\pm 0,1\% \quad A_3=7,9\pm 0,2\%$$

6. Photoakustischer Nachweis von Photosensibilisatoren

6.1. Einleitung

Neben der Fluoreszenzspektroskopie bieten Absorptionsmeßverfahren die Möglichkeit der Lokalisation und Konzentrationsbestimmung von PS in Gewebe. Eine Reihe von Verfahren, die optischen Absorptionsmeßverfahren, beruhen auf Transmissions- und Remissionsmessungen. Absorptionen von $10E-03$ sind prinzipiell nachweisbar, jedoch treten bei der Bestimmung von Absorptionskoeffizienten in biologischem Gewebe (markiert/unmarkiert) einige wesentliche Schwierigkeiten auf:

- 1) Gemessen wird prinzipiell die Extinktion. Das Signal beinhaltet also einen Streulichtanteil, der insbesondere im interessierenden roten Spektralbereich aufgrund der geringen Gewebeabsorption wesentlich wird.
- 2) Transmissionsmessungen erfordern optisch dünne Proben und geringe Anregungsintensitäten (Gefahr der thermischen Schädigung und der photochemischen Umwandlung).

Demgegenüber bieten sich photothermische Meßverfahren an. Das Meßsignal hängt direkt vom Absorptionsvermögen ab. Absorptionen von $10E-05$ und geringer konnten nachgewiesen werden /94/.

Bei den zu untersuchenden Objekten erfolgt nach Strahlungsabsorption infolge vorwiegend thermischer Deaktivierung eine Probenerwärmung. Die Erwärmung kann aber auch durch Folgeprozesse nichtthermischer Deaktivierungen (z.B. Reabsorption von Lumineszenzstrahlung) hervorgerufen werden. Die Wärmeenergie induziert sowohl Temperaturgradienten, als auch eine Änderung des Deformationszustandes der Probe. Probenoberflächentemperatur und thermoelastische Deformation sind, teilweise berührungslos, meßbar. Daraus kann auf die Absorption geschlossen werden, wobei gilt:

$$k\Delta Q - \rho c \dot{Q} - T_0 \alpha_{th} B \frac{\partial}{\partial t} (\text{div } \vec{u}) = -\beta I \quad (1)$$

$\vec{u}$: Verschiebungsvektor, Q : Temperaturdifferenz zur Umgebungstemperatur, k : spezifische Wärmeleitfähigkeit, ρ : Dichte, c : spezifische Wärmekapazität, B : Dehnungskoeffizient, α_{th} : linearer thermischer Ausdehnungskoeffizient, β : Absorptionskonstante, I : Strahlungsintensität.

Für den Fall, daß der Durchmesser des Anregungsstrahls groß gegenüber der thermischen Diffusionslänge $\mu_{th} = (2\alpha/\omega)^{1/2}$ mit $\alpha = k/(\rho c)$ ist, und das T- und das $\vec{u}$ -Feld thermoelastisch entkoppelt sind, läßt sich (1) näherungsweise eindimensional beschreiben /95/:

$$\Omega_{\infty}(x,t) - \dot{\Omega}/\alpha = I(x,t)\beta(x)/k \quad (2)$$

$$Bu_{\infty}(x,t) - \rho \ddot{u}(x,t) = \alpha_m \text{ grad } \Omega \quad (3)$$

Im Fall einer harmonisch modulierten Strahlung beschreiben diese Gleichungen stark gedämpfte Temperaturwellen, die nur aus einer Tiefe von $0 < z < \mu_m$ zu einer modulierten Oberflächentemperatur beitragen sowie ungedämpften Schallwellen.

In Tab.6.1.I sind verschiedene photothermische Meßverfahren aufgelistet und hinsichtlich ihrer Eignung zur Bestimmung von Gewebeabsorptionen verglichen worden:

Verfahren	Möglichkeit der in-vivo Messung	Anforderungen an Probe	Meßtiefe
Laserkalorimetrie	x	kontaktierbar	μ_m
Gaszellenmikrophon-	beschränkt	keine	μ_m
Radiometrie	x	keine	μ_m
Thermische Linse	-	plan	μ_m
Reflexion	-	plan	μ_m
Piezoempfänger	x	kontaktierbar	$\mu_B = 1/\beta$

Tab.6.1.I Vergleich photothermischer Meßverfahren (Strahlung moduliert)

Die Laserkalorimetrie stellt die direkteste Methode der Messung der Oberflächentemperatur dar. Die Messung erfolgt über kontaktierende Temperaturfühler, wie Thermoelemente, Thermistoren und pyroelektrische Empfänger. Bei der Photoakustik wird zwischen direkten (photoakustisches Signal innerhalb der Probe) und indirekten (die Signalentstehung bedarf eines Zwischenmediums) Verfahren unterschieden. Befindet sich die Probe mit einem angeschlossenen Gasraum in Kontakt, können modulierte Gasdruckschwankungen registriert werden (Gaszelle-Mikrophon-Verfahren). Bei der Deformationsmessung durch piezoelektrischer Schallempfänger müssen Probleme der Kontaktierung sowie der pyroelektrische Effekt und der Einfluß der Streustrahlung beachtet werden. Die Radiometrie nutzt die durch Erhöhung der Probenoberflächentemperatur hervorgerufene Änderung des emittierten Strahlungsflusses: $\delta W = 4\epsilon T^3 \delta T$ mit W: Strahlungsenergie, ϵ : Emissionsgrad, σ : Stefan-Boltzmann-Konstante; der durch den Einsatz rauscharmer IR-Empfänger registriert wird. Der durch die modulierte Oberflächentemperatur im anschließenden Gasraum induzierte Brechzahlgradient, bewirkt durch thermische Linsenwirkung Strahlablenkungen und Divergenzänderungen eines Meßstrahles. Die Messung des Effektes verlangt hohe Anforderungen an die Probengeometrie und Strahlführung.

Zudem erfolgt innerhalb der Probe eine Selbstdefokussierung des Anregungsstrahles. Bei stark streuenden Proben ist dieses Verfahren ungeeignet. Für die Vermessung von Gewebeproben ebenso ungeeignet ist die Deformationsmessung durch Reflexion, die die Änderung der Strahlrichtung eines reflektierenden Meßstrahles bei Probenaufheizung ("buckling-effekt") ausnutzt und mittels interferometrischer Messungen prinzipiell die Bestimmung von Deformationsänderungen von $10E-04nm$ ermöglicht. Notwendig ist ein hohes Reflexionsvermögen der Proben.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen zum Nachweis von PS in Tumorgewebe, die auf dem Gaszelle-Mikrophon-Verfahren basieren. Dieses Meßprinzip ist bereits in der Sektion Physik bei der Vermessung dielektrischer Schichten geringer Absorption eingesetzt worden /95,96/. Jedoch sind derzeit nur wenige Anwendungen des photoakustischen Verfahrens in der Medizin bekannt, z.B. bei der Untersuchung des Eindringverhaltens von Sonnenschutzcremen in die Haut /97,98/, oder der Chromophorvermessung der Retina /99/. Eine Applikation bzgl. Hämatoporphyrin IX wurde 1988 veröffentlicht /100/, die Messungen beziehen sich jedoch ausschließlich auf hochkonzentrierte wäßrige Lösungen. Konventionell gefärbte histologische Präparate wurden in /101/ mit einem photothermischen Mikroskop, basierend auf dem Verfahren der Thermischen Linse, vermessen.

Bei dem Gaszelle-Mikrophon-Verfahren steht das absorbierende Präparat mit einem Gasvolumen in thermischen Kontakt, Abb.6.1.II. Bei Einstrahlung einer modulierten Laserstrahlung mit: $I(t)=I_0/2(1+\cos\omega t)$ (harmonische Intensitätsmodulation, näherungsweise durch Chopper), führt der absorptionsbedingte Energietransfer in der Probe gemäß (1) zu gedämpften Temperatur- und nahezu ungedämpften Schallwellen. Nach einer Abschätzung von Walther /102/, ist im niederfrequenten Arbeitsbereich für die Erzeugung der Gasdruckschwankungen δp , die mit empfindlichen Schallempfängern nachgewiesen werden können, nur die Änderung der Oberflächentemperatur wesentlich. Nach /103/ gilt somit:

$$\Omega = \frac{\beta J_0}{2k_s(\beta^2 - \beta_s^2)^2} \left[\frac{(r-1)(b+1)e^{\sigma_s L} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma_s L} + 2(b-r)e^{-\beta L}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s L} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s L}} \right] \quad (5)$$

$$\delta p = \gamma p_0 \Omega \left[\sqrt{2} (L_g a_g T_0)^{-1} e^{i(\omega t - \pi/4)} \right] = Q e^{i(\omega t - \pi/4)} \quad (6)$$

mit: $\sigma_s = (1+i)a_s$, $a_s = 1/\rho c v_s$, $b = k_b a_b / (k_s a_s)$, $g = k_g a_g / (k_s a_s)$, $r = (1-i)\beta / (2a_s)$, γ : Adiabatenkoeffizient und den Indizes: g:Gasraum, s:Probe, b:Substrat

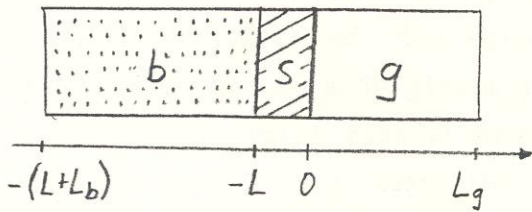


Abb. 6.1.II Schematische Darstellung der Gaszelle

(Meßprobe der Dicke l befindet sich auf Substrat_b)

Mit der entsprechend dem Versuchsaufbau berechtigten Annahme: $g \ll b$ und $b \approx 1$ vereinfachen sich die Gleichungen (5) und (6). Die für das photoakustische Signal wesentliche Größe Q , sowie die Frequenzabhängigkeit und die meßbare Absorption sind für die zusätzliche Annahme einer vernachlässigbaren Untergrundabsorption β_b in Tab. 6.1.III dargestellt.

Fall	optisch dick $\mu_B \ll L$	thermisch dick $\mu_{th} \ll L$	μ_B / μ_{th}	Q	$f(\omega)$	$f(\beta_s)$
1	x	-	< 1	$\approx 1 / (a_g a_b k_b)$	$1/\omega$	-
2	x	x	< 1	$\approx 1 / (a_g a_s k_s)$	$1/\omega$	-
3	x	x	> 1	$\approx \beta_s \mu_{th} / (a_g a_s k_s)$	$1/\omega^{3/2}$	$\beta \mu_{th}$
4	-	-	< 1	$\approx \beta_s l / (a_g a_b k_b)$	$1/\omega$	βl
5	-	-	> 1	$\approx \beta_s l / (a_g a_b k_b)$	$1/\omega$	βl
6	-	x	> 1	$\approx \beta_s \mu_{th} / (a_g a_s k_s)$	$1/\omega^{3/2}$	$\beta \mu_{th}$

Tab. 6.1.III Fallunterscheidung bzgl. der Relationen zwischen der therm. Diffusionslänge μ_{th} , der optischen Weglänge μ_B und der Länge l der Probe. Im Fall 1 und 2 liegt Signalsättigung vor (Signal keine Funktion von β).

6.2. Aufbau und Eichung eines photoakustischen Spektrometers

Um eine genügende Differenzierung von Photosensibilisator-Absorption und Gewebeabsorption zu erreichen, sowie Aussagen zum Anlagerungsverhalten (Aggregate, Monomere) zu erhalten, wurde eine Photoakustisches Absorptions- (PAA-)Spektrometer aufgebaut, das photoakustische Signale U_{PAA} in Abhängigkeit von der eingestrahlten Wellenlänge liefert. Zudem ist eine Tiefenauflösung durch Variation der Modulationsfrequenz ω und damit der thermischen Diffusionslänge möglich. Durch periodisches Strahlscanning (mit Kreisfrequenz ω) können zudem laterale Absorptionsdifferenzen bestimmt werden. Auch sind Messungen zum Transmissions- und Streuverhalten der Proben durch eine geeignete Modifizierung des Eintrittsfensters der photoakustischen Zelle mit diesem Spektrometer möglich. Angaben zum Aufbau sind Anhang 6 zu entnehmen, bzw. /104*, 105*/.

Empfindlichkeit. Die Abb. 6.2.1 zeigt den Intensitätsverlauf der Anregungsstrahlung in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Die Aufnahme erfolgte mit der Referenzzelle (Kurve 1) im Vergleich zum Meßgerät LM 2 (Kurve 2). Das photoakustische Signal S_2 zeigt eine erwartete lineare Abhängigkeit von der einfallenden Strahlleistung. Da $A \approx 1$ kann die mittlere einfallende Leistung P_0 gleich der absorbierten P_A gesetzt und eine Empfindlichkeit: $e = S/P_A = S/P_0$, S -photoakustisches Signal (V) bestimmt werden. Gemäß Fall 2, Tab. 6.1.III ist e dabei eine Funktion der Modulationsfrequenz und der thermischen Eigenschaften der Probe, sowie der Probengeometrie. Für die benutzte Zelle ergab sich dabei ein $e(2\pi \times 31 s^{-1}) = (0.20 \pm 0.02) V/W$.

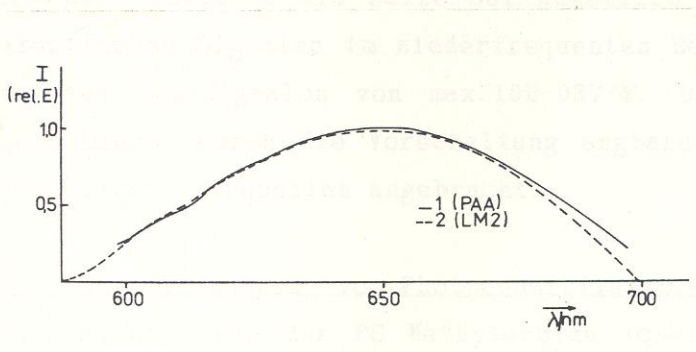


Abb. 6.2.1 PAA-Signal in Abhängigkeit von der Bestrahlungsleistung im Fall der Sättigung bzw. Durchstimmkurve des verwendeten DCM-FSL

Einfluß des Probenvolumens. Eine Änderung des Gasvolumens der Zelle durch Variation von L_2 führt gemäß (6) zu einer theoretischen Signaländerung $\approx 1/V$. Aufgrund der Eigenfrequenzen der PAA-Zelle (abhängig von dem Gasraumvolumen V_1 , dem Gasvolumen V_2 vor der Mikrofonmembran und dem Gaskanal) tritt zudem eine Änderung des Frequenzverhaltens der Zelle auf, die im Bereich der Helmholtzresonanzfrequenz ($f_R \sim V^{-1/2}$) wesentlich wird. Insbesondere bei der Modulation mittels Chopper muß die Existenz von Oberwellen beachtet werden. Wird der Abstand Probenoberfläche-Eintrittsfenster so gering, daß er in den Bereich der thermischen Diffusionslänge des Gases gelangt, kann nicht mehr von adiabatischen Bedingungen ausgegangen werden (Rosenwaigsches Kolbenmodell /106/) und Gleichung (6) wird hinfällig. Eine Volumenänderung der benutzten Gaszelle um den Faktor 2 ergab bei einer Chopperfrequenz von 31 Hz eine Änderung des PAA-Signals um den Faktor 0,7. Bei den verwendeten Proben geringer Abmessung kann deshalb der Einfluß der Probenvolumina vernachlässigt werden.

Einfluß der Chopper-Modulation. Eine Intensitätsmodulation gemäß (4) kann bei Verwendung von Choppern nur näherungsweise realisiert werden. Wie oben angedeutet, können Oberwellen im Bereich der Helmholtz-Resonanz zu Signalverfälschungen

führen. Infolge des Bandpaßverhaltens des lock-in (weitere Frequenzfilter können vorgeschaltet werden) werden die Oberwellen, die zum Signalverlauf gemäß Tab.2. mit $S=1/\omega, 1/\omega^2$ beitragen, unterdrückt. Dadurch kommt es aber zu einem Verlust effektiver Strahlleistung. Die verwendeten Arbeitsfrequenzen sind von der Helmholtz-Resonanzfrequenz der benutzten Gaszelle ($f_R \approx 550\text{Hz}$) weit genug entfernt.

Rauschen. Im niederfrequenten Arbeitsbereich wird das elektronische Rauschen bestimmend. Für die probenfreie Meßzelle (BK-7-Fenster) wurden bei $f=31\text{Hz}$ und der am lock-in einstellbaren Zeitkonstante $\tau=3\text{s}$ folgende normierte Rauschsignale S/P_0 erhalten:

ohne Laserstrahlung: $(6 \pm 3) \times 10^{-5} \text{ V/W}$ mit Laserstrahlung: $(8 \pm 4) \times 10^{-5} \text{ V/W}$
Dagegen reagierte die Zelle auf künstlich induzierte Luftdruckschwankungen und akustischen Signalen im niederfrequenten Bereich (Gebäudeschwingungen) mit normierten PAA-Signalen von $\max. 10^{-3} \text{ V/W}$. Die Einengung des verarbeiteten Frequenzbandes durch die Vorschaltung engbandiger Frequenzfilter ist bei Existenz derartiger Störquellen angebracht.

6.3. Untersuchungen von Photosensibilisatoren in wässriger Lösung

Untersucht wurde der PS Methylenblau ($C_0=10\text{g/l} \approx 3 \times 10^{-2} \text{M}$, Verdünnung mit PBS), der mit einer mittleren Schichtdicke von $d \approx 200\mu\text{m}$ auf das Probenfenster (Substrat) aufgetragen wurde. Abb.2, Anhang 6 zeigt das PAA-Spektrum einer $3 \times 10^{-4} \text{M}$ Mb-Lösung, die als konzentrationsabhängiges Monomer (667nm-Bande)-Dimer (612nm-Bande) -Gemisch vorliegt. Bei vernachlässigbaren nichtthermischen Deaktivierungen ($\theta_{F1} \approx 10^{-2}$) kann die lokale Wärmeleistungsdichte entsprechend (4) mit:

$\beta I(x,t) = 1/2 \beta I_0 \exp(\beta x) (1 + \cos \omega t)$ (7) angenommen werden. Mit der Messung von $S(\lambda)$ ist somit die PS-Konzentration meßbar. Bei den Proben handelt es sich i.allg. mit $d > \mu_{th}$ um thermisch dicke Objekte, für die in Abhängigkeit der untersuchten Konzentration und der verwendeten Wellenlänge die Fälle 2), 3) und 6) gelten.

$\omega / (2\pi) / \text{s}^{-1}$	$\mu_{th} / \mu\text{m}$		C_{Mb} / M	$\mu_B / \mu\text{m} (645\text{nm})$
	Mb	Gewebe		
10	67	47	3×10^{-5}	≈ 3000
31	39	24	3×10^{-4}	≈ 300
100	21	15	3×10^{-3}	≈ 20

Tab.6.3.1 Thermische Diffusionslängen μ_{th} und optische Absorptionslängen μ_B von Methylenblau in PBS (zum Vergleich μ_{th} von Gewebe)

$\alpha_{Mb} = 1,444 \times 10^{-3} \text{cm}^2/\text{s}$ /107/, $\alpha_{Gewebe} = 0,7 \times 10^{-3} \text{cm}^2/\text{s}$; trockene Hornhaut /108/

Abb. 6.3.II verdeutlicht die Signalabhängigkeit von der Konzentration der untersuchten Lösung. Es besteht ein annähernd linearer Zusammenhang $U_{\text{PAA}}/C = \text{const}$ (infolge Aggregation ist keine exakte Proportionalität zu erwarten). Für $c > 10\text{E-}03\text{M}$ tritt eine Abweichung infolge Sättigung auf. So kann für unverdünnte Lösungen (c_0) eine ω^{-1} -Abhängigkeit, für dünne Lösungen dagegen eine $\omega^{-3/2}$ -Abhängigkeit in guter Übereinstimmung mit der Theorie gemessen werden. Aus der Abbildung sind ebenfalls die PAA-Signale des Lösungsmittels und das Rauschsignal der probenfreien Meßzelle ersichtlich. Demnach können $5 \times 10\text{E-}06\text{M}$ Mb-Lösungen bzw. eine Absorption von $\approx 4 \times 10\text{E-}04$ gut nachgewiesen werden. Dieser Wert stimmt mit in der Literatur angegebenen Nachweisgrenzen für photoakustisch untersuchte Flüssigkeiten überein [103].

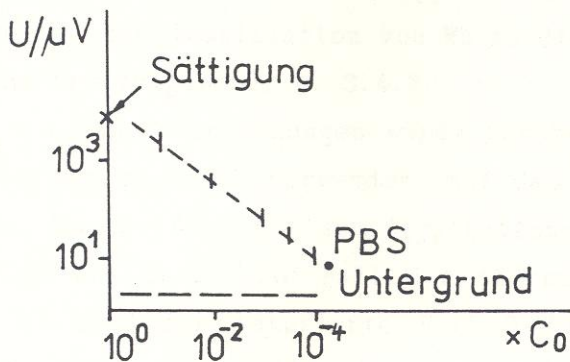


Abb. 6.3.II Abhängigkeit des PAA-Signals von der Konzentration (645nm, $\omega = 2\pi \times 35\text{s}^{-1}$)

In Abhängigkeit von der absorbierten Wärmeenergie erfolgt in der geschlossenen Meßzelle eine Temperaturerhöhung. Dadurch kann es zur Ausbildung von Kondenswasser am Eingangsfenster (Streuung des Anregungsstrahles), zu einer Änderung der thermischen Eigenschaften und der Gasdichte und damit zu veränderten Druckverhältnissen sowie zu einer Konzentrationsabnahme der zu untersuchenden Lösungen kommen, Abb. 6.3.III. Bei der Untersuchung von Gewebeproben kommt es zu Austrocknungen und damit auch zu veränderten Streucharakteristiken.

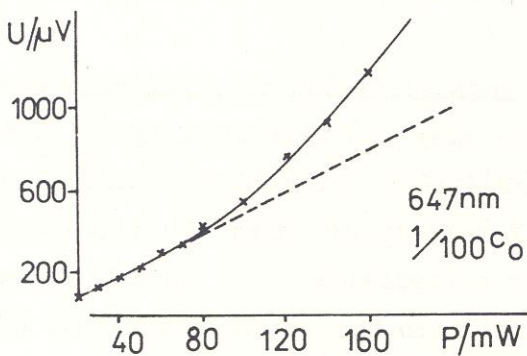


Abb. 6.3.III PAA-Signal in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

6.4. Untersuchungen von markiertem Gewebe

Um die Farbstoffe zu lokalisieren, muß beachtet werden, daß der Nachweis nur bis zu einer Tiefe von μm erfolgen kann. Im Fall der lokalen Applikation (PS lagert sich außen an und diffundiert in das Gewebe), kann der diffusionskontrollierte Stofftransport auch zeitlich- und tiefenaufgelöst nachgewiesen und die PS-Konzentration bestimmt werden. Bei systemischer oder s.c. Applikation kann die Anlagerung, speziell an Tumorgewebe, prinzipiell beobachtet werden, da die Mehrzahl der Tumoren oberflächige Geschwülste darstellen. In größeren Tiefen kann der Sensibilisator durch die Anfertigung von Gewebsschnitten vermessen werden.

Photosensibilisator als Farbstofffilm auf Gewebe

Dieser Fall kann bei lokal applizierten Sensibilisatoren vorliegen, beispielsweise bei der Instillation von Mb in die Harnblase und anschließender Anlagerung an das Urothelgewebe, s. 3.4.3.

Für die PAA-Untersuchungen wurde Gewebe des soliden Ehrlichcarcinoms mit einer Fläche von ca. 25mm^2 verwendet, auf das $5\mu\text{l}$ Methylenblau gleichmäßig aufgebracht wurde. Somit liegt für zum Applikationszeitpunkt eine mittlere Schichtdicke von $d=200\mu\text{m}$ und damit der Fall der thermisch dicken Probe vor. Entsprechend Tab. 6.1.III sind der saturierte Fall 2 für hohe Filmkonzentrationen und die vom Gewebe (Substrat) unabhängigen Signale gemäß Fall 3 und 6 zu erwarten.

Die Abb.3. von Anhang 6 zeigt das gemessene PAA-Spektrum eines $3 \times 10^{-4}\text{M}$ Mb-Filmes. Der Vergleich mit der Lösung gleicher Konzentration (Abb.2.) mit etwa gleichem Probenvolumen läßt eine Signalerhöhung um den Faktor 1,2 erkennen, die durch das Streuverhalten des Substrates erklärbar wird. Bei gegebenen Probenbedingungen ergibt sich eine Filmtransmission von $I(d)/I_0 > 0,8$. Die verwendeten Gewebeproben weisen Remissionswerte von ca. 0,3 auf (s.6.5.). Dadurch erhöht sich aber die reale Strahlungsdichte innerhalb der photoakustisch nachweisbaren Schicht und induziert eine Signalerhöhung.

In Gewebe eingelagerter Sensibilisator

Die Abb.3. zeigt ebenfalls das gemessene PAA-Spektrum des Tumorgewebes. Die erwartete Abnahme des Signals in Richtung zunehmender Wellenlängen ist erkennbar. Die Signalamplitude hängt in starkem Maß vom Feuchtigkeitsgehalt des Gewebes ab (Zunahme um Faktor 2 bei abnehmenden Wassergehalt). Bei der Austrocknung ändern sich die spezifische Wärme und die Dichte, sowie die Streucharakteristik.

Der Signalanstieg von Mb-haltigem Gewebe bis zu dem Maximum $\approx 615\text{nm}$ (gleiche Abb.) deutet auf eine Konzentrationserhöhung bzw. auf eine erhöhte Dimerakkumulation innerhalb der oberen Gewebeschicht. Um Aussagen zur selektiven Anlagerung zu erhalten, wurde Gewebe eines Harnblasentumors und peritumorales Urothelgewebe eines 60jährigen Patienten nach einer 30minütigen Mb-Inkubation und anschließender aqua-dest-Spülung /50% verglichen. Während das Tumorgewebe einen sehr hohen Gehalt an Methylenblau aufwies (Abb.4., Anhang 6), konnte für das Normalgewebe ein Spektrum ähnlich Kurve 3 der Abb.3. registriert und damit ein deutlicher Konzentrationsunterschied in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Fukui et al./17/, belegt werden.

Messungen an $16\mu\text{m}$ und $30\mu\text{m}$ dicken Gewebsschnitten mit Mb-Akkumulation ergaben eine Nachweisgrenze von $c \approx 10E-04\text{M}$ Injektionslösung. Für geringere Konzentrationen konnten keine strukturierten Spektren mehr gemessen werden. Als Ursache muß der bestimmende Einfluß des Streukoeffizienten angesehen werden. In Abschnitt 6.5. wird der Streueinfluß näher betrachtet.

Um Aussagen zur räumlichen Verteilung des PS in Gewebe zu treffen, wurde das photoakustische Spektrometer auf Anregung einer Arbeit von /101/ dahingehend verändert, daß eine Modulation der Strahlrichtung möglich wurde. Zu diesem Zweck wurde der Anregungsstrahl unter einem Einfallswinkel von 45° auf einen Umlenkspiegel gelenkt, der an einer durch einen RC-Generator getriebenen Lautsprechermembran befestigt wurde, Abb. 6.4.I. Das Eingangsfenster der Referenzzelle wurde dabei außen halbseitig schwarz mattiert ($A \approx 1$). Durch Wahl der Arbeitsspannung kann die Auslenkung Δx variiert werden, wobei sich der Bestrahlungsort nach: $x(t) = x_0 + \Delta x(U) \exp(i\omega t)$ darstellen läßt. In der Meßzelle wird das Differenzsignal zwischen benachbarten (Δx) Gewebepartien gebildet. Bestehen Unterschiede im Gehalt des PS längs des Weges Δx , so werden periodische Gasdruckschwankungen induziert.

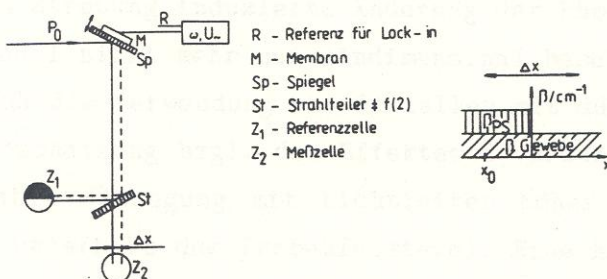


Abb. 6.4.I Schema des periodischen Strahl-Scanning, links und Darstellung einer Absorptionskante, rechts. ($U/P_0 = 0,13\text{V/W}$ für den Übergang Glasträger/Absorber)

Die Abb. 6.4.II zeigt Differenzspektren von markierten und unmarkiertem Gewebe sowie von Gewebepartien innerhalb eines Mb-markierten Gewebes. Da für den Übergang Glas/Glas (probenfreier Meßraum) $S/P < 0,0001 V/W$ gilt, ist der Nachweis von Methylenblau bei den gegebenen Konzentrationen für den gesamten roten Spektralbereich gegeben und die Messung von Konzentrationsunterschieden innerhalb eines markierten Gewebestücks möglich.

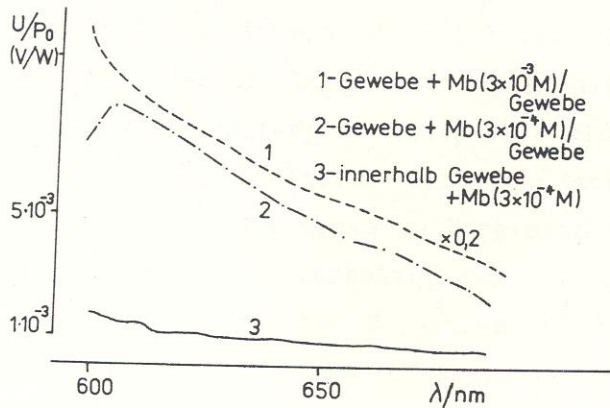


Abb.6.4.II Durch periodisches Strahl-Scanning erhaltende PAA-Differenz-spektren ($\Delta x = 4 mm$)

6.5. Einfluß der Mehrfachstreuung von Gewebe auf das PAA-Signal

Obwohl das PAA-Signal direkt und linear von dem Absorptionsvermögen der Probe abhängt, kann der Einfluß des Streulichtes zu Fehlinterpretationen bzgl. β führen. Strenggenommen gelten die Gleichungen (5) und (6) nur für streufreie Proben. Die Strahlintensität $I(x)$ wurde mit $I(x) = I_0 \exp(-\beta x)$ berechnet, wobei der Streukoeffizient s unberücksichtigt blieb. Insbesondere erfolgt eine Beeinflussung des PAA-Signals durch folgende Effekte:

1. Absorption von Streustrahlung durch den Empfänger
2. Absorption durch die Meßzellwände
3. Mehrfachstreuung in der Probe führt zu einer Erhöhung von I innerhalb der photoakustisch erfaßten Schicht der Dicke μ_{th}
4. Durch die durch Streuung induzierte Änderung der Photonenflußdichte in alle Richtungen, kann I nicht mehr nur eindimensional beschrieben werden.

Einfluß 1 ist durch die Verwendung von Gaszellen mit dünnem Gaskanal vernachlässigbar. Um eine Abschätzung bzgl. des Effektes 2 vorzunehmen, wurde die Zellkammer diffus bestrahlt (Anregung mit Lichtleiter hoher Apertur und stark rückstreuendem Medium unterhalb des Probenfensters). Eine Erhöhung des Rauschsignals um lediglich Faktor 2 wurde festgestellt.

Die Erhöhung der Photonenflußdichte nahe der Strahlumgebung innerhalb der Grenzfläche des streuenden Mediums ist von dem Verhältnis s/β abhängig und kann

nach /109/ für Quotienten >10 wesentlich größer als die einfallende Strahlungsintensität sein. Dabei tritt ebenfalls eine "laterale Verschmierung" (Effekt 4) auf. Befindet sich keine weitere Schicht der Dicke $d > \mu_{th}$ über dem streuenden Medium, trägt die gesamte (erhöhte) Photonenflußdichte innerhalb der Oberflächenschicht ($\langle \mu_{th} \rangle$) zum Signal bei, wobei laterale Streustrahlung innerhalb dieser Schicht auch für Wege $> \mu_{th}$ wesentliche Signalbeiträge stellt. Für große Streukoeffizienten wird das PAA-Spektrum letztlich dem Streuspektrum ähneln.

Für den Fall des Filmes, der sich über einer streuenden Schicht befindet, kann zudem eine Verfälschung der spektralen Charakteristik eintreten, da die rückgestreute Strahlung $I_r = I_0 \exp(\beta l) R$ eine Funktion von $\beta(\lambda)$ ist und somit eine Nivellierung des Spektrums eintritt (schwache Absorptionsbanden erfahren eine Signalerhöhung im Gegensatz zu Bereichen hoher Absorption).

Um Aussagen zum Streuverhalten von biologischem Gewebe zu gewinnen, wurden mit dem gleichen Spektrometer Messungen zur Absorption A, zur Transmission T und zur Streuung (Remission R und Vorwärtstreuung VS) durchgeführt. Entsprechend einem Vorschlag von Dr. Walther, Sektion Physik der FSU, wurde zu diesem Zweck ein Öffnungsfenster der Zelle durch einen Oberflächenabsorber mit $A \approx 1$, $R \approx 0$, der Absorptionsfläche F_s und kleiner transparenter Öffnung (Strahleingang) der Fläche F_0 ersetzt. Der Absorber liefert ein PAA-Signal S_{FS} , wobei gilt:

$S_{FS}(\omega) = e_{FS}(\omega) P_{FS}$ mit $e_{FS}(\omega)$: Empfindlichkeit, P_{FS} : auf F_s auftreffende Strahlungsleistung. F_s stellt damit eine wellenlängenunabhängige Empfängerfläche für auftreffende Streustrahlung dar. Das photoakustische Gesamtsignal S_a setzt sich aus S_a (Signal durch Probenabsorption) und S_{FS} zusammen, wobei zwei verschiedene Empfindlichkeiten e infolge unterschiedlichen thermischen Verhaltens eingehen: $S_a = A_{PAA} P_{a,ea}(\omega) + e_{FS}(\omega) P_{FS}$, A_{PAA} steht für die Absorption in der photoakustisch erfaßten Schicht.

Für die Streumessung befestigt man günstigerweise die Probe außerhalb der Meßzelle ($A_{PAA} \approx 0$), Abb. 6.5.I. Für R, VS und T soll im folgenden gelten:

$$T = \int_{-\beta}^{\beta} 1/P_s^+ dP/d\Omega d\Omega, \quad R = \int_{-\pi}^{\pi} 1/P_s^- dP/d\Omega d\Omega, \quad VS = \int_{\beta}^{\pi} 1/P_s^+ dP/d\Omega d\Omega + \int_{-\pi}^{-\beta} 1/P_s^+ dP/d\Omega d\Omega.$$

In den Tabellen 6.5.II sind die Ergebnisse dargestellt, die mit den verschiedenen Meßanordnungen für das Gewebe des soliden EC-Tumors gewonnen wurden.

Demnach beträgt der Anteil VS+T der 200 μ m-Probe mehr als 70% und nimmt mit zunehmender Schichtdicke d zugunsten der Remission R ab. $R - R_{\infty} \approx 30\%$ vergrößert sich mit der Zunahme von d nicht mehr wesentlich.

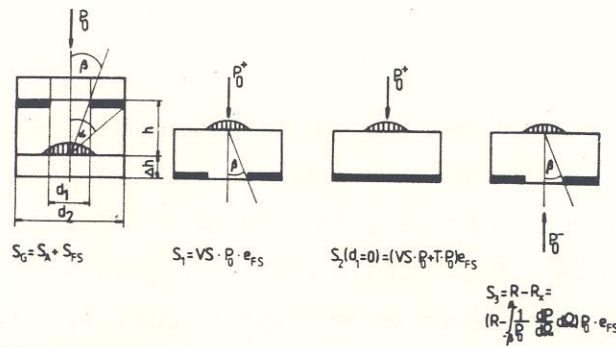


Abb. 6.5.I Schema der Meßzelle, $F_S = \pi/4(d_2 - d_1)$, $d_2 = 17\text{mm}$, d_1 und h variierbar, i.allg. $2\alpha(d_1, h) \approx 1,7\pi$ sr und $2\beta(d_1, h) \approx 0,2\pi$ sr, links und realisierte Meßanordnungen zur Erfassung der Streustrahlung, rechts

Signal	Gewebe, $d = (200 \pm 20)\mu\text{m}$			Gewebe, $d = (400 \pm 20)\mu\text{m}$		
	ohne Probe	mit Probe	Ergebnis	ohne Probe	mit Probe	Ergebnis
S_1	$0,03 \pm 0,01$	$2,8 \pm 0,2$	$VS \approx 0,41$	$0,03 \pm 0,01$	$2,5 \pm 0,2$	$VS \approx 0,37$
S_2	$6,8 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,3$	$T \approx 0,32$	$6,8 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,2$	$T \approx 0,23$
S_3	$0,03 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,2$	$R - R_1 \approx 0,19$	$0,03 \pm 0,01$	$2,0 \pm 0,2$	$R - R_1 \approx 0,30$

Tab. 6.5.II Streuergebnisse von Tumorgewebe unterschiedlicher Dicke d , $P_0 = 34\text{mW}$, $\lambda = 650\text{nm}$, $\omega = 2\pi \cdot 28\text{s}^{-1}$, $e_{FS} = 0,20\text{V/W}$, Mittelwerte von 3 Messungen

R beinhaltet auch den Anteil direkter Reflexion an der Grenzschicht Luft/Gewebe bzw. Gewebe/Glas. Mit den Brechzahlen $1,33 < n_{\text{Gewebe}} < 1,55$ (je nach Feuchtigkeitsgehalt), bleibt der Einfluß jedoch gering.

Die $400\mu\text{m}$ -Probe wurde vergleichend am Streulicht(TIS-)meßplatz der Sektion Physik, FSU, vermessen. Die Meßanordnung besteht im wesentlichen aus einem modulierten He-Ne-Laserstrahl (633nm) und einer Ulbrichtkugel, in die das in den rückwärtigen Halbraum gestreute Licht (=Remission) der Probe mittels Coblentzkugel abgebildet und dort durch SEV und lock-in registriert wird. Als Vergleichsstandard dient MgO . Für R ergab sich der Wert $0,33 \pm 0,02$, wobei der Fehler aus der Ortsabhängigkeit von R innerhalb der Probe resultiert, und stimmt damit näherungsweise mit dem PAA-Spektrometer gemessenen Wert unter Berücksichtigung der erfaßten Raumwinkel überein.

Das Remissionsspektrum ergab im Bereich $600\text{nm} - 680\text{nm}$ einen monotonen langsamen Abfall in Richtung kürzerer Wellenlängen. Vergleichsmessungen am specord M40 (Reflexionseinsatz) bestätigen diese Abhängigkeit und zeigen zudem, daß dieser Abfall ein Minimum bei 570nm bis 580nm , ein weiteres bei 540nm bis 550nm erreicht, die den Absorptionsbanden des Hämoglobin entsprechen (s. Abb.2.2.I).

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden physikalische Aspekte der PCT und der Diagnostik von Tumoren behandelt. Nach einem einleitenden Kapitel werden Kriterien für die Auswahl geeigneter PS erarbeitet und ausgehend von diesen, in Kap. 3 tierexperimentelle Ergebnisse vorgestellt, die mit verschiedenen Sensibilisatoren gewonnen wurden, welche im langwelligen roten Spektralbereich mit molaren Absorptionskoeffizienten $\epsilon > 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ über ausgeprägte Absorptionsbanden verfügen. Insbesondere zeigt sich hier die Eignung des Thiazinfarbstoffes Methylenblau, der inzwischen zur PCT von Patienten mit Harnblasentumoren eingesetzt wird. In den Kapiteln 4 und 5 werden Untersuchungen mit einem aggregatangereicherten HpD-Präparat der DDR-Produktion vorgestellt, insbesondere werden photoinduzierte Änderungen des Spektralverhaltens diskutiert.

Bestrahlung induziert in HpD-Lösungen sowie in HpD-angereichertem Gewebe, einschließlich dem intrazellulären Bereich, einen Bleaching-Prozess und photochemische Umwandlungen, die die Generation fluoreszierender Photoprodukte bewirken. Der Prozess der PP-Bildung verläuft irreversibel. In wässriger Lösung liegt das Maximum der breitbandigen PP-Fluoreszenz bei 642nm, in Gewebe und intrazellulär verschiebt es sich um 10nm bis 20nm in den längerwelligen Bereich. Die generierten Produkte absorbieren bevorzugt im Bereich um 400nm, dem Hauptabsorptionsgebiet der Monomere. Dies bewirkt zunächst nur eine geringe Änderung des Absorptionsverhaltens bei dieser Wellenlänge während der Bestrahlung, obwohl eine Abnahme der Fluoreszenzintensität der Monomerbande bei 612nm zu beobachten ist.

Von Interesse für die PCT sind die langwellige Verschiebung und die photoinduzierte Zunahme des Absorptionsvermögens im roten Spektralbereich. Wie gezeigt werden konnte, sind die Photoprodukte photodynamisch aktiv, ihre zytotoxische Wirkung ist jedoch im Vergleich zum unbestrahlten HpD wesentlich geringer. Wie weiterführende Untersuchungen belegen, sind als Ursache die verminderte Triplettlebensdauer und die geringere Rate der $^1\text{O}_2$ -Generation anzusehen.

Die PP-Bildung ist an die Existenz von Sauerstoff gebunden. Dieses Resultat steht im Widerspruch zu /79/. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen an 10^{-4} M HpD-PBS-Lösungen zeigen, daß die Rate der PP-Bildung für O_2 -Werte kleiner 10^{-4} M sehr empfindlich von geringen Anteilen von Sauerstoff abhängt. Unter der Voraussetzung gleicher HpD-Konzentration hat diese Abhängigkeit möglicherweise Bedeutung für die Diagnostik des Sauerstoffstatus von biologischem Gewebe, insbesondere von Tumorgewebe. Wie die Experimente weiter vermuten lassen,

hängt die PP-Bildung, als auch die Fluoreszenzlöschung, dabei im wesentlichen von Singulett-Sauerstoff oder dessen Folgeprodukte ab. Die Quantenausbeute der PP-Generation wird somit von dem Produkt der ISC-Quantenausbeute, der Effizienz des Singulett-Sauerstoff bildenden Energietransfers sowie der Effizienz der Wechselwirkung von 1O_2 und der aktiven HpD-Spezies abhängen.

Die PP-Bildung kann durch die Zugabe des als Elektronenakzeptor wirkenden Metronidazol zur PS-Applikation verhindert werden, wobei aktivierte Metronidazol-HpD-Verbindungen durch den Typ-I photodynamisch aktiv werden.

Wie die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen ergeben, kann die 612nm-Bande von HpD in wässriger Lösung (im Gegensatz zu der 675nm-Bande), allein den HpD-Monomeren zugeordnet werden. Das Photobleaching der Monomere führt demnach zu einer Reduzierung des Intensitätsverhältnisses $I_F(612nm)/I_F(675nm)$, bis hin zu Werten <1 . Bei geringer Bestrahlungsdosis der Fluoreszenzanregungsstrahlung können in Abhängigkeit von der Wellenlänge drei fluoreszierende Spezies mit Abklingzeiten im subns- und ns-Bereich ermittelt werden, wobei die kurzlebigen Komponenten den Aggregaten zuzuordnen sind. Chromatographisch werden allerdings 8-10 verschiedene fluoreszierende Komponenten bestimmt. Die Untersuchungen gestalten sich somit infolge des Multikomponentengemisches HpD äußerst schwierig.

Bestrahlte HpD-Lösungen werden in ihrem Abklingverhalten durch die kurzlebigen Komponenten geprägt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitkonstanten der PP und denen der Aggregate unbestrahlter Lösungen kann jedoch nicht ermittelt werden (Äquivalenz der Zeitkonstanten). Dies erschwert die Untersuchungen. Die kurzen PP-Fluoreszenzabklingzeiten sowie die geringe Triplettelebensdauer und die Ergebnisse der Sephadex-Säulenchromatographie lassen vermuten, daß es sich bei den generierten PP um polymolekulare Verbindungen handelt, möglicherweise um Dimere.

Bei Fluoreszenzmessungen muß eine mögliche photochemische Änderung der HpD-Moleküle, induziert allein durch die Fluoreszenzanregungsstrahlung, in Betracht gezogen werden. Da die Kopplung von HpD an HSA, insbesondere an LDL, sowie die Anlagerung an Membranen (Micelle-Untersuchungen), eine Monomerisierung bewirken und zudem angenommen wird, daß nach genügend langer intrazellulärer Verweilzeit auch DHE deaggregiert [110], muß der in den intrazellulären und in-vivo SPC-Messungen bestimmte hohe Anteil an kurzlebigen fluoreszierenden Komponenten, neben einer bevorzugten Aggregatakkumulation, auch als Ausdruck einer erfolgten PP-Generation gewertet werden. Die kurzweilige Fluoreszenzanregungsstrahlung bei der Fluoreszenzdiagnostik kann damit die Effektivität einer möglichen nachfol-

genden PCT herabsetzen. Auch bei der Fluoreszenzdiagnostik von Tumoren muß das Photobleaching und die PP-Bildung beachtet werden, insbesondere wenn aus stationären oder zeitaufgelösten Messungen auf die HpD-Konzentration, bzw. auf Konzentrationsunterschiede geschlußfolgert werden soll.

Eine andere Möglichkeit des Nachweises von PS in biologischem Gewebe, wird in Kapitel 6 vorgestellt. Mit einem photoakustischen Absorptionsspektrometer, das auf dem Gaszelle-Mikrophon-Verfahren beruht, wurde der PS Methylenblau in Tumorgewebe untersucht.

Der Einsatz der photoakustische Absorptionsspektroskopie eignet sich dort, wo die Anlagerung von Photosensibilisatoren geringer Fluoreszenzquantenausbeute (HpD-Aggregate, Phäophorbid a ...) in biologischem Gewebe untersucht und/oder Aussagen zum Absorptionsverhalten getroffen werden sollen. Gegenüber der optischen Absorptionsmessung kommen auch optisch opake (d.h. $\beta L < 1$, β : Absorptionskoeffizient, L: Gewebedicke) Gewebestücke als Untersuchungsobjekt in Frage, solange sie thermisch dick sind, d.h. solange $\mu_{th} L$ gilt und die Bedingung $\mu_{th}/\mu_B < 1$ (μ_{th} : thermische Diffusionslänge, μ_B : optische Eindringtiefe) erfüllt ist (nichtsaturierter Fall). Zudem entfällt eine Beschränkung auf bestimmte Probenkonfigurationen. Das bedeutet, Untersuchungen verschiedener Gewebsschnitte sowie von PS in wässriger Lösung sind möglich. Die mit dem PS Methylenblau durchgeführten Messungen belegen, daß der Farbstoff in den Konzentrationsbereichen $5 \times 10^{-6} \text{ M} < c < c_{\text{satt}}$ mit dem vorgestellten PAA-Spektrometer meßtechnisch erfassbar ist, wobei c_{satt} eine von der Modulationsfrequenz und der Bestrahlungswellenlänge abhängige Größe ist, für die der Fall der Sättigung eintritt.

Lagert sich Mb von außen an das Gewebe an, dieser Fall tritt z.B. bei der Instillation des PS in die Harnblase zum Zweck einer PCT-Behandlung auf /50%/, kann das Objekt zunächst als Zweischichtsystem mit Mb als Farbstoffilm bzw. als Meßprobe und das Gewebe als Substrat aufgefaßt werden. Mit einer genügend hohen Modulationsfrequenz ω läßt sich der nichtsaturierte Fall einstellen, so daß entsprechend der Theorie von Rosencwaig /101/, das photoakustische Signal lediglich eine Funktion des Absorptionskoeffizienten β_{Mb} ist, nicht aber Gewebeparameter einfließen. Infolge der im Gewebe vorhandenen Mehrfachstreuung des durch den Mb-Film transmittierten Lichtstromes muß jedoch der Anteil der Remission beachtet werden, der zu Signalerhöhungen und spektralen Verfälschungen führen kann.

Prinzipiell läßt sich durch ω -Variation die Diffusion des PS in das Gewebe verfolgen. Die Messung von Differenzen im Mb-Gehalt benachbarter Gewebepartien läßt sich mit der Methode des periodischen Strahl-Scanning realisieren. Bei der

Untersuchung des Anlagerungsverhaltens von Mb an einen humanen Blasen-tumor ge-genüber peritumoralem Gewebe, konnten deutliche Konzentrationsunterschiede fest-gestellt werden. Damit werden die Ergebnisse von /17/ bestätigt, die eine Korre-lation von Mb-Färbung und Grading von Harnblasentumoren gefunden hatten.

Genügend strukturierte Absorptionsbanden konnten für Mb-haltiges Gewebe nur bei Applikations-Konzentrationen von $\geq 10^{-4} \text{M}$ registriert werden. Als Ursache ist der zunehmende Streueinfluß zu ansehen, wobei für $s/\beta \gg 1$ (s : Streukoeffizient) der Anteil des Streulichtes, der in der photoakustisch erfaßten Schicht absorbiert wird, das PAA-Signal wesentlich beeinflusst. Um das Streuverhalten von bio-logischem Gewebe, insbesondere des Ehrlichcarcinoms näher zu charakterisieren, wurde das PAA-Spektrometer derart modifiziert, daß Aussagen zu Streuintensitä-ten, der Streuerverteilung und der spektralen Abhängigkeit möglich wurden. Wie gezeigt, liegt der Wert für die Streuung bei den betrachteten unmarkierten Proben und Wellenlängen um mehr als eine Größenordnung höher als der der Absorp-tion. Mit dem Remissionswert von $\approx 0,3$ für genügend dicke Proben, wird somit auch das Signal des bei lokaler Applikation vorliegenden dünnen Mb-Filmes beeinflusst. Prinzipiell lassen sich mit dem vorgestellten Spektrometer auch in-vivo-Messungen durchführen, wobei dann offene photothermische Meßzellen zur Anwendung kommen /106/. Jedoch müssen dann zusätzliche Rauschquellen wie Muskeltonus oder Strömungsgeräusche des Blutes in Rechnung gesetzt werden.

Literatur

- /1/ Wissensspeicher Lasertechnik. Fachbuchverlag Leipzig (1982)
- /2/ N.P.Furzikow. Tissue spectral properties and ablation in laser angioplasty. 5.Symposium Optical Spectroscopy. Eisenach (1988) Vortrag L14
- /3/ E.Knoth, R.König. Excimerlasereinsatz zur experimentellen Laserangioplastik Z.exp.Chir.Transplant.künstl.Organe. 20(1987)238-240
- /4/ H.Porteder, H.Strassel, G.Stanek, K.Vinzenz. Einsatz des He-Ne-Lasers zur Förderung der Wundheilung. österr.Z.Stomatol. 80(1983)333-339
- /5/ B.Hauswald, H.Langer. Zweijährige Erfahrungen mit Nadel- und Laserakupunktur bei Rhinopathiaallergica. VIII.Kongreß für Otorhinolaryngologie und cervico-faciale Chirurgie der DDR. Poster.
- /6/ W.Dietzel, H.Meffert, N.Sönnichsen. Treatment of Psoriasis with HpD and longwave ultraviolet light. studia biophysica. 94(1983)45-46
- /7/ H.Berg, F.A.Gollmick, W.Dietzel, F.Böhm, H.Meffert, N.Sönnichsen. Photodynamic hematoporphyrin therapy of psoriasis. In /14/:337-343
- /8/ K.C.Smith (ed.). Topics in Photomedicine. Plenum Press. NY. (1984)
- /9/ D.R.Doiron, C.J.Gomer (ed.). Porphyrin Localization and Treatment of Tumors Alan R. Liss. NY. (1984)
- /10/ D.Kessel, T.J.Dougherty (ed.). Porphyrin Photosensitization. Plenum Press. NY. (1983)
- /11/ R.L.Lipson, E.J.Baldes. The photodynamic properties of a particular HpD. Arch.Dermatol. 82(1960)508
- /12/ M.Yamashita, M.Jomura, S.Kobayashi, T.Sato. Picosecond Time Resolved Fluorescence Spectroscopy of HpD. IEEE QE-20, 12(1984)1363-1369
- /13/ W.R.Potter, T.S.Mang. Photofrin II levels by in vivo fluorescence photometry. In /9/: 177-186
- /14/ G.Jori, C.Perria. Photodynamic Therapy of Tumors and other Diseases. Libreria Progetto. Padova (1985)
- /15/ K.König. Diplomarbeit (1985) FSU Jena
- /16/ H.Berg, W.Jungst. Photodynamische Wirkung auf das solide Ehrlich-Karzinom. Naturwiss. 18(1966)481-482
- /17/ I.Fukui et al. In vivo staining test with Methylene Blue for Bladder Cancer J.Urol. 130(1983)252-255
- /18/ J.F.Evensen, J. Moan, A. Hindar, S. Sommer. Tissue distribution of ^3H -HpD and its main components, ^{67}Ga and ^{131}I -albumin in mice bearing Lewis Lung Carcinoma. In /9/: 541-562

- /19/ G.Firnaeu et al. ^{64}Cu Labelling of HpD for non-invasive in-vivo measurements of tumour uptake. In /9/: 177-186
- /20/ A.Andreoni, R.Cubeddu, S.DeSilvestri, P.Laporta, O.Svelto. Two-step Laser Activation of HpD. Chemical Phys. Lett. 1(1982)37
- /21/ C.S.Foote. Mechanisms of photooxygenation. In /9/: 3-18
- /22/ K.R.Weishaupt, C.J.Gomer, T.J.Dougherty. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent of photoinactivation of the murine tumor. Cancer Res. 36(1976)2326
- /23/ J.Moan, E.O.Peterson, T.Christensen. The mechanism of photodynamic inactivation of human cells. Br.J.Cancer 39(1979)398-407
- /24/ G.R.Buettner, M.J.Need. Hydrogen peroxide and hydroxyl free radical production by HpD, ascorbate and light. Cancer Lett. 25(1985)297-304
- /25/ M.A.J.Rodgers. Photochem. Photobiol. 1(1983)99
- /26/ J.G.Parker. Optical detection of the photodynamic production of singlet oxygen in vivo. Lasers Surg. Med. 6(1986)258
- /27/ K.König, V.Bockhorn. The effect of Nitroimidazoles and photochemotherapy on solid Ehrlichcarcinomas. Radiobiol.Radiother. In Druck.
- /28/ M.Bazin, R.Santus. Selective Type I Photooxidations in Mixtures of Porphyrines and electrophilic Nitroimidazoles. Photochem.Photobiol. 3(1986)235-242
- /29/ J.A.Parrish, R.R.Anderson. Considerations of selectivity in laser therapy. In: K.A.Arndt, J.M.Noé, S.Rosen (ed). Cutaneous Laser Therapy. John Wiley & Sons. Chichester, Brisbane, Toronto (1983): 41-51
- /30/ D.Kessel. Determinants of HP-catalyzed photosensitization. Photochem.Photobiol. 36(1982)99
- /31/ L.O.Svaasand, D.R.Doiron, T.J.Dougherty. Temperature rise during photoradiation therapy of malignant tumors. Med.Phys. 1(1983)10
- /32/ K.Poehner, K.Eitner, K.H.Donnerhacke, G.Kutzner. Vorrichtung zur thermischen Beeinflussung schwer zugänglicher Stellen. Patent DD 156417
- /33/ K.König, W.Dietel. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels für die thermische Behandlung von tumorösem Gewebe. Patent DD 259351
- /34/ J.Moan. Porphyrin Photosensitization of cells. In: /14/: 102-112
- /35/ T.J.Dougherty. Review. Photosensitizers: Therapy and Detection of malignant tumors. Photochem.Photobiol. 6(1987)879-889
- /36/ D.Kessel. Proposed Structure of the tumor-localizing fraction of HpD. Photochem.Photobiol. 2(1986)193-196

- /37/ A.Andreoni, R.Cubeddu, S.DeSilvestri, P.Laporta, G.Jori, E.Reddi. Hematoporphyrin Derivative: Experimental evidence for aggregated species. Chem.Phys.Lett. 88(1982)33-36
- /38/ R.König, J.Lademann, K.König. Anordnung zur Photochemotherapie und Fluoreszenzdiagnostik. Patent WP A 61 B/ 303 6367
- /39/ L.O.Svaasand. Thermal and optical dosimetry for photoradiation therapy of malignant tumors. In: A.Andreoni, R.Cubeddu. Porphyrines in Tumor Phototherapy. Plenum Publishing Corporation (1984)261-279
- /40/ B.C.Wilson, W.P.Jeeves, D.M.Lowe, G.Adam. Light propagation in animal tissues in the wavelength range 375nm-825nm. In /9/:115-132
- /41/ C.J.Gomer, T.Dougherty. Determination of ^3H - and ^{14}C -HPD distribution in malignant and normal tissue. Cancer Res. 39(1979)146-151
- /42/ E.J.Land. Current topics. Porphyrin Phototherapy of human cancer. Int.J.Radiat.Biol. 3(1984)219-223
- /43/ K.König, V.Bockhorn, U.Krause, W.Dietel, H.Schubert, P.Lotz, L.P.Löbe. Photodynamic therapy with HpD on mice with solid Ehrlichcarcinomas. Arch.Geschw. 1(1989)1-6
- /44/ L.P.Löbe, U.Krause, P.Lotz, K.König, W.Dietel, J.Barth. Photodynamic therapy with the HpD-Halle II. Results of animal experiments. International Conference: Photodynamic Therapy and Medical Laser Application. London (1988) Vortrag 141
- /45/ E.Magdon. Zum gegenwärtigen Stand des Einsatzes von Radiosensitizern in der Strahlentherapie aus strahlenbiologischer Sicht. Radiobiol.Radiother. 6(1980)778-787
- /46/ H.Berg. Photodynamic tumor therapy and cancer multistep therapy. Photochem.Photobiol.B 2(1988)404-405
- /47/ G.R.Buettner, 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
- /48/ K.König, 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
- /49/ K.König, V.Bockhorn, W.Dietel. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur photochemotherapeutischen Behandlung, gleichzeitiger Diagnose und Grading-Bestimmung. Patent 3013883.
- /50/ K.König, W.Dietel, V.Bockhorn, A.Möller. Laserpilotanlage zum Einsatz in der Urologie. medizintechnik 2(1989)50-51
- /51/ B.Röder. Beiträge zur Photophysik und photodynamischen Aktivität von Porphyrinen-dargestellt am Beispiel von Phäophorbid a. Prom.B. Berlin (1986)

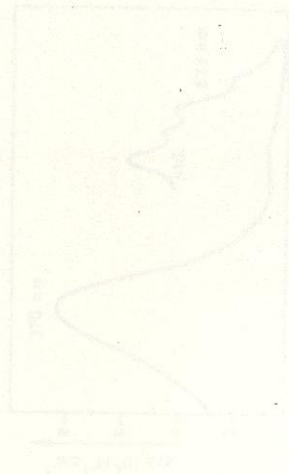
- /52/ B.Röder, G.Wischnewski, S.Nicklisch, H.Meffert, E.Slawatiki. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels. Patent DD-348282.
- /53/ G.P.Gurinovich et al. Structural damages of erythrocytes photosensitized by chlorins and porphyrines. *Biophysica* XXXIII 2(1989)314-317
- /54/ K.König, V.Bockhorn, W.Dietel, H.Schubert. Photochemotherapie an tierexperimentellen Tumoren mit verschiedenen Photosensibilisatoren. *Zeitschr. Urol. Nephrol.* In Druck.
- /55/ E.Knoth, K.König, W.Grassme, W.Dietel, K.H.Donnerhacke. HpD induzierte Tumorfloreszenz. *Z.Erkrank.Atm.Org.* 170(1988)170-184
- /56/ A.E.Profio. Laser Excited Fluorescence of HpD for Diagnosis of Cancer. *IEEE-QE-20*, 12(1984)1502-1507
- /57/ A.Andreoni, R.Cubeddu. Photophysical Properties of Hematoporphyrin and its derivatives and their use in tumorphototherapy. In: W.deGruyter. *Optical Properties and Structure of Tetrapyrroles*. Bln. NY. (1985)
- /58/ W.J.M.van der Putten, M.J.C.van Gemert. HpD fluorescence in vitro and in an animal tumour. *Phys.Med.Biol.* 6(1983)633-638
- /59/ K.König, W.Dietel. Lichtleitereinkopplungsgerät zur Fluoreszenzdiagnostik, Phototherapie und Photochemotherapie. *medizintechnik* 1(1988)1-2
- /60/ S.Montan, S.Svanberg, K.Svanberg. Multicolor imaging and contrast enhancement in cancer-tumor localization using laser-induced fluorescence in HpD-bearing mice. Conference on Lasers and Electro-Optics. Baltimore, USA. (1985) S.82
- /61/ A.E.Profio, O.J.Balchum. Fluorescence Diagnosis of Cancer. In: D.Kessel. *Methods in Porphyrin Photosensitization*. Plenum Publishing Corporation. (1985)43-50
- /62/ R.R.Alfano et al. Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue. *IEEE* 12(1984)1507-1511
- /63/ J.Wilde, J.Wilde. Hämatoporphyrin-Eine neue Möglichkeit der Tumordiagnostik bei zentralen Bronchialkarzinomen. Übersichtsartikel. *Z.Erkrank.Atm.org.* 166(1986)5-12
- /64/ Y.Hayata, T.J.Dougherty. Lasers and HpD in cancer. Tokyo-NY. Igaku-Shoin (1983)
- /65/ D.Dolphin. *The Porphyrines*. Academic Press NY. (1978)
- /66/ H.Lullis, D.Trincker. Taschenbuch der Physiologie Bd III/2. Gustav-Fischer-Verlag (1977)
- /67/ W.Dietel, K.König. Anordnung zur Photochemotherapie, Phototherapie und Fluoreszenzdiagnostik. Patent DD 254139

- /68/ Y.Yanming et al. Characteristic autofluorescence for cancer diagnosis and the explanation of its origin. Conference on Lasers and Electro-Optics. Baltimore, USA. (1985) S.84
- /69/ W.Lohmann, E.Paul. In situ detection of Melanomas by fluorescence measurements. *Naturwissenschaften* 75(1988)201-202
- /70/ K.König, W.Dietel. In vivo autofluorescence investigations on animal tumors. *Neoplasma* 36(1989)135-138
- /71/ A.Barel, G.Jori. Role of high-, low- and very low-density lipoproteins in the transport and tumor delivery of HP in vivo. *Cancer Lett.* 32(1986)145-150
- /72/ K.König, W.Dietel. Laserinduzierte Tumorfluoreszenzdiagnostik am Beispiel des soliden Ehrlichcarcinoms. *Arch.Geschwulst.* In Druck.
- /73/ K.König, W.Dietel. Fluorescence Investigations on Animal Tumors. Fifth Symposium Optical Spectroscopy. Eisenach. (1988) Poster SOS-P-81
- /74/ T.Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann.Phys.* 6(1948)55-75
- /75/ T.G.Truscott, A.J.McLean, A.M.R.Phillips, W.S.Foulds. Detection of HpD and HP excited states in cell environments. *Cancer Letters* 41(1988)31-35
- /76/ W.Dietel, K.König. Laser stimulated in vivo Fluorescence of animal tumors. Second International Conference on Laser Scattering Spectroscopy of Biological Objects. Pecs, Hungaria. (1988)
- /77/ W.Dietel, K.König. Photobleaching of the HpD fluorescence and photoproduct formation in-vivo and in solution. Third Congress of the European Society for photobiology. Budapest, Hungaria. (Sept. 1989) Angemeldet.
- /78/ W.Dietel, K.König, E.Zenkevich. Photobleaching of HpD Fluorescence and Formation of Photoproduct in-vivo and in solution. Eingereicht.
- /79/ J.Rotomskiene, R.Kapociute, R.Rotomskis, G.Jonusauskas, T.Szito, A.Nizhnik. Light-Induced Transformations of HP-Diacetate and HP. *Photochem. Photobiol.B* 2(1988)373-379
- /80/ J.C.Ravey. The first Extrema in the radiation pattern of the light scattered by Micrometer-Sized Spheres and Spheroids. *J.Colloid.Sci.* 2(1984) 435-446
- /81/ K.König, A.Felsmann, W.Dietel, M.Boschmann, S.N.Cherenkevich, T.Zorina: Photodynamic activity of the HpD-photoproduct. Eingereicht.
- /82/ K.König. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels für die photodynamische Behandlung von Tumorerkrankungen. Patent eingereicht
- /83/ A.P.Losev, E.I.Sagun. Triplet-Triplet energy transfer between chlorophyll a molecules and its derivatives. *J.Prikladnei Spectroscopii* 5(1976)815-821

- /84/ Z.J.Petryka, J.C.Bonnier. Photosensitizers used in photodynamic therapy-
their bleaching in vitro. Intern. Conference: Photodynamic therapy and
Medical Laser Application. London (1988). Vortrag 458.
- /85/ I.Bugiel, K.König, H.Wabnitz. Investigation of cells by fluorescence laser
scanning microscopy with subnanosecond time resolution. Lasers in the Life
Sciences 3(1989)1-7
- /86/ W.Gärtner, B.Gröbler, D.Schubert, H.Wabnitz, B.Wilhelmi. Fluorescence scan-
ning microscopy combined with subnanosecond time resolution.
Exp.Tech.Phys. In Druck.
- /87/ K.König, H.Wabnitz. Fluoreszenzuntersuchungen mit zeitlicher, spektraler
und räumlicher Auflösung an HpD in unterschiedlicher Umgebung. In Vorbe-
reitung
- /88/ J.Opfermann, H.Reichel. Programmbeschreibung "Globale Entfaltung der
Fluoreszenzkinetik", Jena 1988
- /89/ A.Andreoni, R.Cubeddu, S.DeSilvestri, G.Jori, P.Laporta, B.Reddi. Time Re-
solved Fluorescence Studies of HP in different solvent systems.
Z.Naturforsch. 38c(1983)83-89
- /90/ S.Kinoshita, T.Seki, T.F.Liu, T.Kushida. Fluorescence of hematoporphyrin
in living cells and in solution. JPhotochem.Photobiol. B-5(1987)765-768-
2 (1988) 105-207
- /91/ F.Ricchelli, L.I.Grossweiner. Properties of a new state of hematoporphyrin
in dilute aqueous solution. Photochem.Photobiol. 5(1984)599-606
- /92/ H.Schneckenburger, M.Frenz, Y.Tsuchiya, U.Denzer, L.Schleinkofer. Picosecond
Fluorescence Microscopy for Measuring Chlorophyll and Porphyrin Components
in Conifers and Cultured Cells. Lasers in the Life Sciences 1(1987)299-307
- /93/ I.Bugiel, K.König, H.Wabnitz. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an
Zellen mit sub-ns-Zeitauflösung. Zeitschrift der HUB, Berlin. In Druck.
(Vortrag PDT-Schule. HUB, Berlin. (1988))
- /94/ A.C.Tam. Applications of photoacoustic sensing techniques. Rev.Mod.Phys.
58(1986)381-431
- /95/ H.G.Walther. Beiträge zur Messung und Interpretation des Streulichtes und
der Absorption von dielektrischen Schichten und Oberflächen.
Prom.B. (1987) Jena
- /96/ E.Welsch. Beiträge zur photothermischen Signalberechnung, Messung und In-
terpretation von Materialeigenschaften, besonders der Absorption in opti-
schen Dünnschichtelementen. Prom.B. Jena. Eingereicht.
- /97/ K.Giese, A.Nicolaus, B.Sennhenn, K.Kölmel. Photoacoustic in vivo study of
the penetration of sunscreen into human skin. Can.J.Phys 64(1986)1139-1141
- /98/ K.Kölmel, B.Sennhenn, K.Giese, J.Frans. Photoakustische Spektroskopie als
neues Verfahren zur Bestimmung der Hautpenetration lokal angewandter Phar-
maka. Arzneim.-Forschung/Drug Res. 36/II(1986)1711-1712

- /99/ F.Boucher, R.M.LebLANC, S.Savage, B.Beaulieu. Depth-resolved chromophore analysis of bovine retina and pigment epithelium by photoacoustic spectroscopy. Appl.Optics 4(1986)515-520
- /100/ R.Pottier, A.Lachaine, M.Pierre, J.C.Kennedy. A new electronic absorbance band in concentrated aqueous solutions of HPIX detected by photoacoustic spectroscopy. Photochem.Photobiol. 5(1988)669-674
- /101/ D.S.Burgi, N.J.DovichI. Submicrometer resolution images of absorbance and thermal diffusivity with the photothermal microscope. Appl. Optics 1(1987)4665-4669
- /102/ H.G.Walther. Eigenschaften eines photoakustischen Dünnschicht-Absorptionsmeßplatzes. Exp.Technik der Physik 6(1984)531-538
- /103/ A.Rosencwaig. In: Advances in electronics and electron physics. Academic Press. 46(1978)207-311.
- /104/ K.König, E.Welsch, H.G.Walther. Photoacoustic absorption measurements on marked tissue. Fifth Symposium Optical Spectroscopy. Eisenach. (1988) Poster SOS-P-51.
- /105/ K.König, E.Welsch, H.G.Walther. Photoakustisches Absorptionsspektrometer. medizintechnik 1(1989)15-18
- /106/ A.Rosencwaig. Photoacoustics and Photoacoustic spectroscopy. Chichester, Brisbane, Toronto. J.Wiley a. Sons (1980)
- /107/ J.F.McClelland, R.M.Kniseley. Signal saturation effects in photoacoustic spectroscopy with applicability to solid and liquid samples. Appl.Phys.Lett. 8(1976)467-469
- /108/ K.Kölmel, B.Sennheim. Evaluation of drug penetration into the skin by photoacoustic measurement. J.Soc.Cosmet.Chem. 37(1986)375-385
- /109/ O.F.Helander. Optical Spectroscopy using an open photoacoustic cell. Linköping Studies in Science and Technology. Dissertations 90 (1983).
- /110/ H.Schneckenburger, I.Feyh, A.Götz, M.Frenz, W.Brendel. Quantitative in-vivo measurement of the fluorescent components of Photofrin II. Photochem.Photobiol. 5(1987)765-768
- /111/ M.H.DePaula, M.A.Carvalho, L.M.Alves, M.A.Aegerter. An open-ended photothermal cell for in-vivo measurements. J.Appl.Phys. 61(1987)2617-2620

An dieser Stelle möchte ich Dr.sc.nat. W.Dietel, OA Dr.med. V.Bockhorn,
Dr. E.Welsch, Dr.sc.nat. H.G.Walther, Frau Dr. H.Wabnitz , P.Dorn und
Frau H.Fietze für ihre Unterstützung danken.
Mein besonderer Dank gilt meinem betreuenden Hochschullehrer
Prof.Dr. B.Wilhelmi.



Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Jena, den 06.07.89

... *Karlheinz König*

¹Department of Physics ²Clinic of Urology ³Centre for Experiments on Laboratory Animals, Friedrich-Schiller University Jena, GDR, ⁴ENT-Clinic, Martin-Luther University Halle, GDR

Photodynamic therapy with haematoporphyrin derivative on mice with solid Ehrlichcarcinomas

K. König¹, V. Bockhorn², U. Krause³, W. Dietel¹, H. Schubert⁴, P. Lotz¹, L. P. Löbe³

(Received: April 8th, 1988)
(Revised: June 15th, 1988)

Summary

The tumor-toxic effect of the photosensitizer HpD/Halle activated by laser radiation was demonstrated. Solid Ehrlichcarcinoma was used as model. Investigations into the tumor growth, the HpD-distribution after different kinds of drug administration by means of fluorescence measurements, the phototoxicity and the reduction of tumor masses after HpD application and laser irradiation were carried out.

Introduction

Photodynamic therapy (PDT) and fluorescence diagnosis of tumors is a clinical method which uses photosensitizing dyes (photosensitizers) combined with light and laser irradiation in particular (1). The photosensitizers cause cytotoxic reactions when activated by light as a result of photooxidation processes. A characteristic fluorescence irradiation is emitted. When the dye accumulates in malignant tissue more than in normal tissue, selective therapy and diagnosis becomes possible. The most commonly used photosensitizer is a mixture of special porphyrines and their aggregates (haematoporphyrin derivative, HpD) (2).

The aim of these investigations was to examine the efficiency of the HpD produced in our own lab. It mostly consists of aggregates. The HpD was applied to tumor-bearing mice. It was subsequently activated by special red laser irradiation. The solid Ehrlichcarcinoma was chosen as the tumor model. The conditions were varied in order to design a model as a prerequisite for applying photochemotherapy in the treatment of humans.

Materials and Methods

Animals

The experiments were performed on male ICR mice with an average weight of 20 g. The animals (VEB Versuchstierproduktion Schönowalde) were fed ad libitum on standard pellets R 13. They had permanent access to water. The temperature in the plastic cages was about 22 °C. Anaesthesia was achieved by an i.m. injection of a 0.05 ml mixture consisting of Rompun[®] (5%), Ursotamin[®] (10%) and physiological saline (1:3:6).

Tumor

Solid Ehrlichcarcinoma was induced by a s.c. injection of 7 day old Ehrlichascites cells from a donor mouse. 0.125 ml of the cellular suspension was mixed with heparine and saline (cont. 10⁶ cells/ml) and given subcutaneously. After 4 days, the tumors could be microscopically observed on the shaved skin surface.

Sensitizer

Haematoporphyrin derivative (HpD) was prepared from bovine blood as described previously (1, 3, 4). A drug with an enriched component of the aggregates, especially DHE-dimers, was obtained by gel filtration chromatography on Sephadex G 25 coarse (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Sweden). The final solution mixture was adjusted to pH 7.4 and refilled with saline to a concentration of 5 mg/ml.

Laser equipment

Figure 1 shows the absorption spectrum of the used HpD. In the red range only a small absorption peak is displayed (around 620–625 nm). This red and the nearly infrared range is particularly relevant to

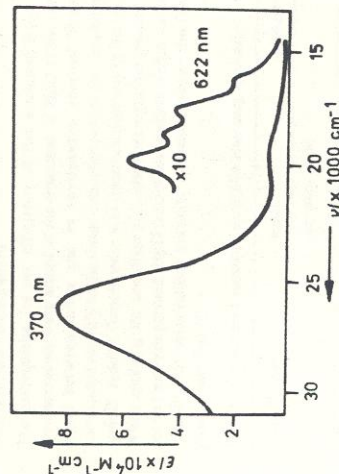


Fig. 1. Absorption spectrum of HpD in PBS (pH = 7.4)

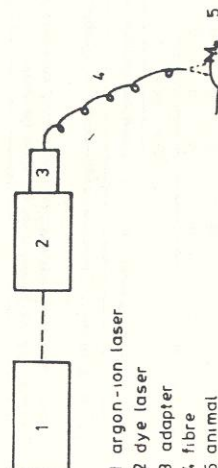


Fig. 2. Arrangement of laser equipment

photodynamic therapy since it shows that a high tissue penetration is attained there. One can obtain a red shift of so-called Q bands (absorption bands in the spectral range 450–700 nm) of HpD when the photosensitizer accumulates in the tissue. Hence, the most efficient wavelength also for the treatment of more deeply lying tumors is about 630 nm. In this experimental arrangement, a helium-neon laser (HNA 188, CZ Jena, 632.8 nm, P = 60 mW) or an argon-ion laser pumped dye laser (ILA 120, CZ Jena/FSL 100) ZWZ Academy of Sciences of the GDR, Berlin) was used. The active medium used for the dye laser was rhodamine 6G and kresyle violet or DCM, as well (P = 300 mW, 630 nm). The laser beam was coupled to a 200 micrometer single optical fibre. The end illuminated a region of about 1 cm², including the tumor (Fig. 2).

For fluorescence investigations, UV radiation of the same argon-ion laser (about 50 mW, 364 nm) was

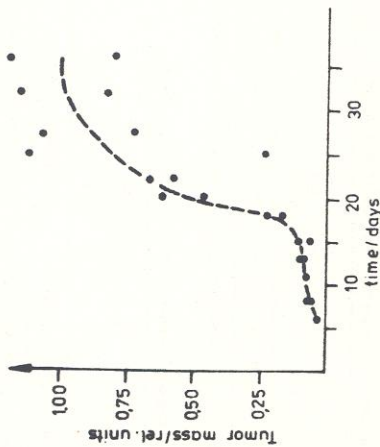


Fig. 3. Tumor growth in dependence on the period after application of EAC-cell suspension

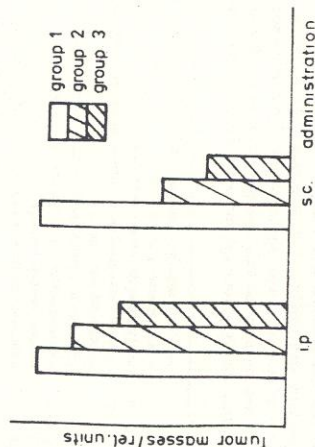


Fig. 4. Tumor masses after drug administration and laser irradiation: group 1: control animals; group 2: animals with drug application but without irradiation; group 3: drug and light application

used. The laser was linked to a special device which produced a background-free excitation irradiation (5) and a fluorescence detector system consisting of a fibre, a monochromator, a multiplier, and a lock-in device.

Treatment

24 hours before starting the PDT treatment, the mice received an i.m. or s.c. injection (around the tumor mass) of HpD. The period of light exposure was 30 min. Some experiments were performed at 24 hour intervals (see Tab. III and IV). The animals were divided into three groups. They were kept under the same conditions. The first group consisted of controls (no drugs, no irradiation), the second one received the drug only without laser irradiation. In former experiments no detectable influence of laser radiation alone was recorded ($\lambda = 640-700$ nm, $P = 100-200$ mW/cm²). For evaluation the mice were sacrificed on the 10th day (experiment with i.p. application of HpD, see: Results) or 15th day (s.c. application) after their last treatment. The tumor was removed and its weight was determined.

Results

Tumor growth

Figure 3 displays the dependency of tumor mass and time after the application of EAC-cell suspension in the group of untreated animals. Two tumor weights were determined per day. The tumors grow slowly within the first 13-15 d, followed by a period of rapid growth. They were characterized by an increasing amount of auto-necrotic tumorous tissue. After 4-6 weeks, the animals died from the large, necrotic/ulcerated tumors. The treatment started on the 5th day post implantation. At this time the tumors could be clearly detected macroscopically. They were also in a therapy-sensitive phase. Earlier attempts at treatment which were started in a progressed stage of tumor growth failed in this experimental model.

Fluorescence investigations

The prerequisite for the efficiency of the sensitizer HpD is its accumulation in tumor tissue. The measurements were aimed at the detection of HpD in the tumor and at the gradient of the fluorescence signal between tumor and its environment (normal tissue). The fluorescence intensity is said to correspond roughly to the tissue concentration of the sensitizer. After giving HpD i.v. or i.p., the visible, typical, reddish fluorescence was found exclusively in the tumor marking the limits of the malign tissue. When applying the sensitizer s.c., the concentration gradient between tumorous and normal tissue was not so clearly expressed. HpD did not accumulate within the tumor when applied superficially. In order to quantify our observations intensity measurements of the fluorescence were carried out (5 animals per group) (see Tab. I).

Table I Fluorescence signal obtained 24 h after drug application

administration	signal (arbitrary units)	gradient
i.v.	50 ± 10	10
i.p.	45 ± 10	8
s.c.	$100^* \pm 15$	5*
superficial	~ 5	signal too weak

superficial: HpD was painted on the skin above the tumor
gradient: signal (tumor/signal (0.5 cm away), *: dependent on injection point

Table II Toxic rate (%) dependent on light energy ($c = 50$ mg/kg BW)

group	HpD	IR (min)	n	Lethal rate after treatment (%)			
				24 h	48 h	72 h	10 days
1	-	-	10	0	0	0	0
2	*	-	10	0	0	0	0
3	*	30	9	70	90	100	100
4	*	10	15	30	67	67	67

IR: irradiation; n: number of animals

Photodynamic therapy

At the beginning, toxic experiments on tumor-bearing animals by i.p. administration of undiluted HpD solution (50 mg/kg BW) and laser irradiation ($\lambda = 633$ nm, $P = 50$ mW) were carried out (See Tab. II). After the administration of HpD alone no visible effects were observed. Both the drug administration and laser irradiation show the typical response of a photosensitizer. A strong dependence on the applied light dose was observed. Subsequently, we used a drug dose of 10 mg/kg BW in the following PDT treatments.

Table III shows the results of photodynamic therapy after i.p. administration and Table IV those after s.c.

Table III Tumor masses after PDT (i. p. administration, 2 irradiations, P = 100 mW)

group	HpD	IR (min)	n	Average tumor mass (mg)	v (mg)
1	-	-	11	524	192
2	*	-	7	453	193
3	*	30	10	358	239

IR: irradiation, n: number of animals, v = standard deviation

Table IV Tumor masses after PDT (s.c. administration, 3 irradiations, P = 100 mW)

group	HpD	IR (min)	n	Average tumor mass (mg)	v (mg)
1	-	-	7	1,160	504
2	*	-	4	608	214
3	*	30	10	393	164

IR: irradiation, n: number of animals, v = standard deviation

Table V Macroscopical and histological effect of the PDT (30 min exposure, 24 h after s.c. application/5 mg/kg BW HpD)

1. day:	expressed, circumscribed edema, pale skin, greyish, starting necroses
3. - 5. day:	recurrent edema, clear peritumorous inflammation, formation of a haemorrhagic scab above the tumor, progressing necroses
10. - 15. day:	slight accompanying inflammation, hardly any vital tumor tissue
after 20. day:	expulsion of the haemorrhagic scab, a new increase of tumor mass and tumor necrosis (complete), respectively, in single cases

application (see Fig. 4, too). The mice which had received s.c. injections were killed on the 15th day after the last laser treatment because they suffered from strong edema and inflammation before. The group with i.p. administration also suffered edema, inflammation and slight erythema but these alterations of the irradiated area disappeared in the week following exposure. These effects may be explained by the higher HpD concentration in the tumor tissue after s.c. application.

In order to prove whether the reductions of tumor masses were also based on hyperthermic effects (6) the temperature during the treatment was measured by means of thermocouples. A temperature increase of less than 5 K was obtained. During the irradiation a change in colouring (greyish) of the tumor area was noticed. Tumorfree parts of the exposed area didn't show this reversible effect.

Treatment with HpD alone without any laser irradiation reduced the tumor mass (group 2). These results are in agreement with investigations on other photosensitizers (7, 8). Photodynamic therapy with laser radiation increases the effect of tumor mass reduction compared to untreated tumors.

Statistics: Statistically significant differences in the experiment with s.c. administration were shown by the Analysis of Variance ($F = 13.54 > F_{1,10} = 5.78(0.01)$) and by the nonparametric u-test (Mann-Whitney statistic, $u = 3.5 < U_{1,10} = 5(0.001)$, comparison between groups 3 and 1). For the experiment with i.p. administration the Student's t-test was used. There was a significant difference ($p = 0.10$) between group 1 and 3 but the difference in tumor mass between group 2 and 3 was not significant.

Histological investigations

Some of the treated tumors were examined histologically by LM. Necrosis and cell destructions were observed. However, only some tumors were completely destroyed. In Table V macroscopical and histological effects are listed.

Discussion

The tumor-toxic effect of the photosensitizer HpD used with laser irradiation (by means of special dye and gas-ion lasers) on solid Ehrlichcarcinomas was demonstrated. The tumor mass reduction could be verified significantly in the treated animals. A cytotoxic effect of HpD alone (i.p. and s.c. application) without any laser irradiation was found to be in accordance with other studies (7, 8). The laser irradiation increases the cytotoxic effect depending on light dose and wavelength.

Light of the wavelength 632 nm was used for its high tissue penetration. In this case the temperature rise is negligible. Earlier investigations that we have conducted using the green light of an argon-ion beam (514 nm and 488 nm) and of a copper-vapour laser (510.6 nm) also led to a significant reduction of the tumor mass (as reported e.g. by Bellnier et al. too (9)), but there was also a strong hyperthermic effect (caused by the absorption of blood and HpD) which added to the photooxidation reactions.

During the PDT experiments a reversible change in the colour of the irradiated tumor was noticed. This effect may be partially due to circulatory stasis within the stroma of the tumor. The accumulation of the fluorescing compounds of HpD within the tumor and surrounding tissue was determined by fluorescence technique. Assuming that the fluorescence signal corresponds to the concentration of HpD, a ratio between tumor and normal tissue can be calculated. Our maximum values of about 10:1 (24 h after i.p. administration) were established by other authors (2).

The HpD concentration after s.c. application (around the tumor mass) inside the tumor is diffusion-dependent, but higher than that of i.p. administration. Because of this a greater cytotoxic effect by the use of the photosensitizer alone can be expected. However, in this case the small difference between the concentration of the dye in the tumor and its surrounding tissue has negative effects on the selectivity of the therapeutic strategy.

The essential efficacy of our self-made HpD linked to laser irradiation of appropriate wavelength in photodynamic therapy was proven in these animal experiments.

Acknowledgements

The authors are grateful to Miss P. Dobermann for technical assistance.

References

1. Dougherty, T. J., Kaufmann, J. E., Goldfarb, A., Weisshaupt, K. R., Boyle, D. G., Mittelman, A.: Photodynamic Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. *Cancer Res.* 38 (1979), 2628-2635.
2. Dornon, D. R., Gomer, C. J.: Porphyrin Localization and Treatment of Tumors. New York: Liss, (1983).
3. Dougherty, T. J., Boyle, D. G., Weisshaupt, K. R.: Photodynamic therapy-clinical and drug advances. in: Kessel, D. and Dougherty, T. J., Porphyrin Photosensitization. New York and London. (1983), 3-13.
4. Dougherty, T. J., Potter, L., Weisshaupt, K. R.: The structure of the active component of hematoporphyrin derivative. in: Dornon, D. R. and Gomer, C. J. (eds.), Porphyrin Localization and Treatment of Tumors. New York. (1984), 301-314.
5. König, K., Dietel, W.: Lichtleitersinkkopplungsgerät zur Fluoreszenzdiagnostik. *Phototherapie und Photochemotherapie. Medizintechnik* 28 (1988), 1-2.
6. Svansson, L. D., Dornon, D. R., Dougherty, T. J.: Temperature rise during photodynamic therapy of malignant tumors. *Med. Phys.* 1 (1983), 10-19.
7. Berg, H. W.: Jungstand: Photodynamische Wirkung auf das solide Ehrlich-Karzinom. *Naturwissenschaften* 18 (1966), 481-482.
8. König, K., Bockhorn, V., Dietel, W., Schubert, H.: Photodynamic therapy of animal tumors with the photosensitizer Methylene Blue using a Krypton laser. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 113 (1987), 301-303.
9. Bellnier, D. A., Prout, G. R., Lin, C. W.: Effect of 514.5-nm Argon Ion Laser Radiation on Hematoporphyrin Derivative-Treated Bladder Tumor Cells in Vitro and in Vivo. *JNCI* 3 (1985), 617-625.

Address of the first author:

K. König
Friedrich-Schiller University
Department of Physics
Max-Wien-Platz
Jena
GDR - 6900

Rapid communication

Photochemotherapy of animal tumors with the photosensitizer Methylene Blue using a krypton laser

K. König¹, V. Bockhorn², W. Dietel¹, and H. Schubert³

¹ Department of Physics, ² Clinic of Urology, ³ Centre for Experiments on Laboratory Animals, Friedrich-Schiller University, Jena, German Democratic Republic

Summary. The cytotoxic effect of the photosensitizer Methylene Blue activated with long wavelength laser radiation has been investigated using mice with solid Ehrlichcarcinomas. A krypton laser was used as a light source emitting laser radiation at 647 nm and 676 nm. The red spectral range is important for photochemotherapy because it is easily transmitted through tissue. A significant tumor reduction, including complete tumor destruction, has been achieved.

Key words: Photochemotherapy – Photosensitizer – Methylene Blue – Laser

Introduction

The development of laser and fiber techniques has provided new possibilities for tumor therapy. On the one hand high-power lasers act as an "optical scalpel" by thermal and ablative effects, on the other hand low-power lasers are better used for photochemotherapy. In this case, laser radiation activates special dyes (photosensitizers) which can cause cytotoxic reactions. If the dye accumulates in malignant tissues more than in normal ones, selective therapy is then possible. Photosensitizers of greater importance are dyes with a strong absorption in the red or the infrared region (range of high tissue penetration). In this way it is also possible to treat more deeply lying tumors. The most widely used photosensitizer with tumor-localizing properties is a mixture of different porphyrins and their aggregates called hematoporphyrin, HpD (Kessel 1984). Selective destruction of tumors via photochemotherapy with HpD and lasers has been demonstrated by several clinical groups (Dougherty et al. 1978; Hayata et al. 1982).

HpD has some disadvantages, however. It poorly absorbs red light and consists of an active component which has not yet been synthesized in a pure form. Furthermore, HpD stays in the body over a long period of time and causes skin photosensitivity. Therefore the search for alternative photosensitizers is of great interest (Doiron and Gomer 1983).

This paper deals with investigations on the photochemical action of Methylene Blue, which strongly absorbs longer wavelength red light. Its cytotoxicity in connection with light was verified in 1966 (Berg and Jungst 1966). The cytotoxic effect of Methylene Blue was noticed in animal tumors following intratumoral application and excitation with a high-pressure xenonlamp. Because a correlation between the staining of tissue with Methylene Blue and the histological grading was found (Fukui et al. 1983) the question arises, in what respect does Methylene Blue act as a photosensitizer in photochemotherapy by radiation with red light.

The aim of these investigations was to examine the cytotoxic effects of Methylene Blue activated with long wavelength laser radiation. The solid Ehrlichcarcinoma has been used as an animal tumor model in these experiments.

Materials and methods

Chemicals. The Methylene Blue used in this investigation was a component of the drug Coloxyl® produced by SPOFA United Pharmaceutical Plants Prague. The drug was diluted with isotonic NaCl solution and injected by intratumoral (into and around the tumor mass) administration (0.25 ml). In order to get a better dye diffusion, dimethyl sulfoxide was added.

Animals and tumor model. The tumors were solid s. c. Ehrlichcarcinomas in male ICR mice, induced by injection of 0.2 ml Ehrlichascites cells (5×10^6 cells/ml). The treatment followed 4 days after administration of the tumor cell suspension. Tumors were macroscopically noticed at this time on the shaved skin of the mice and were in the early stage of expansion.

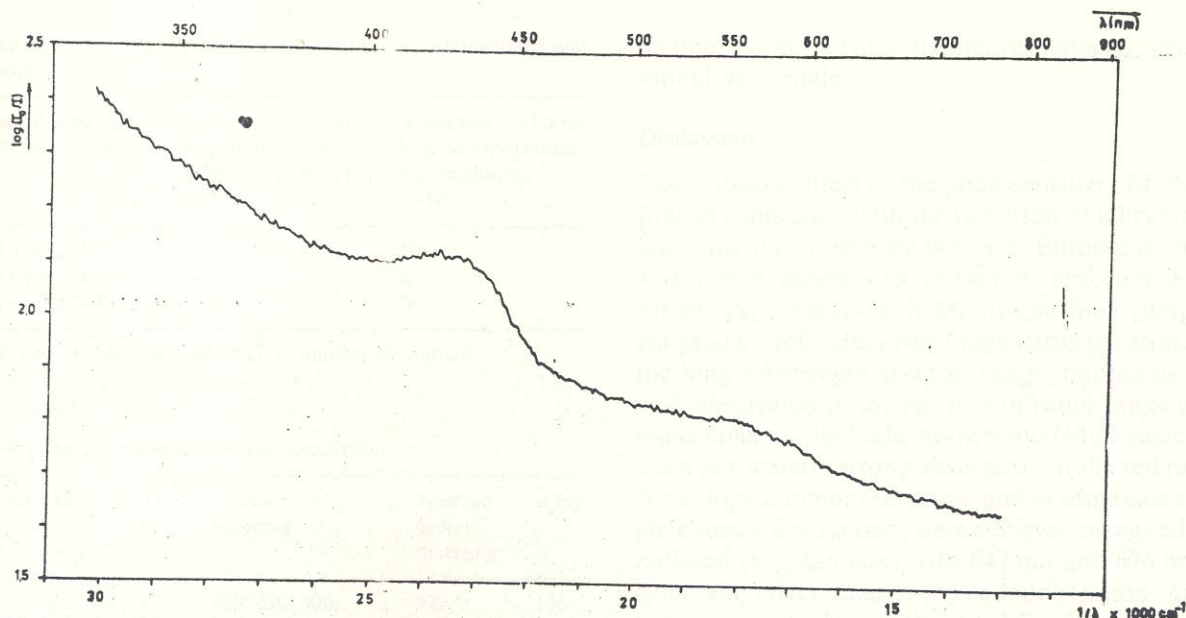


Fig. 1. In vivo absorption spectrum of dermal tissue obtained by measurement of the 0.1-mm thick ear of a white mouse

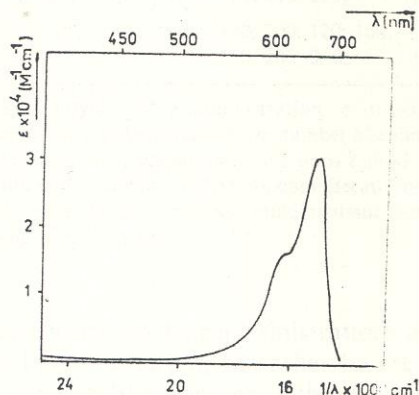


Fig. 2. Absorption spectrum of Methylene Blue (concentration $c = 3 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$; diluted with phosphate-buffered saline, pH 7.2)

The mice were fed ad libitum with standard pellets R 13 (VEB Versuchstierproduktion Schönwalde, GDR) and had permanent access to water. They were housed in plastic cages, temperature 22° to 25°C . During treatment the mice were anesthetized (Rampoon®, Ur-sotamin®, NaCl).

Laser. The light source was selected taking into consideration the absorption spectrum of the dye and the tissue transmission. Figure 1 shows the absorption spectrum of dermal tissue. Because of the absorption of hemoglobin and pigments, there is only a small penetration of short-wave visible light into blood-containing tissue. In order to treat largely and deeply lying (millimeter range) malignant tissues, penetration of the light is a necessity. Therefore, the longer wavelength red and near infrared region is especially suitable for light penetration into the tumor tissue.

Methylene Blue shows a strong absorption band in the red spectral range (Fig. 2). A krypton laser was chosen as a light source emitting radiation at 647 nm and 676 nm. The ratio of the intensities of the lines was 4:1. The laser beam was coupled to a 200 μm step-index

single optical fiber. The fiber tip was fixed so that the laser light illuminated the tumor completely. The beam had an intensity of 100 to 200 mW and a diameter of approximately 1 cm.

Treatment. At 30 min after intratumoral injection of Methylene Blue the tumors were irradiated for 10 to 30 min at intervals of 24 h. The animals were divided into different groups kept under the same conditions. The first group consisted of animals without drug administration and without laser irradiation, the second group received intratumoral drug therapy without irradiation, and the third group received both drug administration and laser treatment (see Table 2). With laser irradiation alone ($P = 200 \text{ mW}$, irradiation time: 30 min, $\lambda = 647 \text{ nm}$, 676 nm) no detectable influence on the growth of the tumors was observed.

According to other authors (Berg and Jungstand 1966) and our own investigations, an appropriate time for beginning the treatment should be after the first macroscopical appearance of the tumor and before the necrotic stage. The mice were killed 10 days after treatment and the weights of the tumors determined.

Results

At first the lethal rate 10 days after treatment was determined, dependent on the applied dose of Methylene Blue and laser irradiation (see Table 1). The radiation power used was 100 mW (80 mW at 647 nm and 20 mW at 676 nm), irradiation time was 10 min, 4 irradiations being applied in a period of 24 h. The drug was injected s.c. 30 min before irradiation of animals which had tumors. Response typical of a photosensitizer was observed.

In the following investigations, a drug dose of 25 mg/kg body weight was used. The sensitizer was now used in the treatment of solid Ehrlichcarcinoma. Table 2 shows the tumor masses after 4 laser irradiations ($P = 150 \text{ mW}$, $t = 30 \text{ min}$ in a period of 24 h).

Table 1. Lethal rate dependent on the drug dose administered and irradiation

Injected dose of Methylene blue	Lethal rate (%) after drug administration without irradiation <i>n</i> = 10	Lethal rate (%) after drug administration and irradiation <i>n</i> = 10
250 mg/kg BW	0	90
125 mg/kg BW	0	50
25 mg/kg BW	0	0

BW: body weight (around 20 g), *n*: number of animals**Table 2.** Tumor masses after laser irradiation

Group	MB	IR	<i>n</i>	Tumor mass/mg	Average tumor mass/mg	σ /mg
1	—	—	6	930; 690; 900; 840; 1140; 1040;	923	156
2	×	—	6	560; 420; 490; 400; 600; 290;	460	114
3	×	×	8	170; 200; 120; 100; 150; 200; 0; 0;	118	80

MB: Methylene Blue administration, σ : standard deviation, IR: irradiation with krypton laser, *n*: number of animals, tumor mass 0: not detectable by preparation (in groups 2 and 3 one animal showed tumor infiltration into the peritoneum. Because of no clear limitation with respect to the normal surrounding tissue these animals were not included in the table)

There were two drug administrations only, one before the first irradiation, the other before the third one. Methylene Blue therapy without laser treatment reduced the tumor mass (group-2) and this reduction depended on the drug dose and the number of administrations. The results obtained are in agreement with investigations of other authors (Berg and Jungstand 1966). Photochemotherapy using a krypton laser (with laser radiation of 647 nm and 676 nm) increased these effects significantly (group-3). In the present investigation, a tumor reduction of about 90% was achieved. As a side effect of the irradiation, edema, erythema, and partial inflammation were observed for a time of 1 to 2 weeks. The animals without exposure (group-2) showed no visible side effects.

The tumors were examined histologically and the treated animals (group-3) showed necroses and cell destruction. Temperature measurements by means of thermocouples inside the tumor mass indicated a temperature increase smaller than 4°C during the irra-

diation period. Thus thermally induced necroses should be excluded.

Discussion

The cytotoxic effect of the photosensitizer Methylene Blue in connection with the radiation of a krypton laser was shown in mice with s.c. Ehrlichcarcinoma. The tumor model was chosen in accordance with former experiments with Methylene Blue (Berg and Jungstand 1966). Because of high tissue penetration in the long wavelength spectral range, photosensitizers with absorption in the red and infrared range are of importance in photochemotherapy. (Methylene Blue has a particularly strong absorption in the red range). A significant tumor reduction, and in some cases complete tumor destruction, were achieved using red laser radiation (krypton laser with 647 nm and 676 nm). A cytotoxic effect caused by administration of the photosensitizer alone without any irradiation has been noted by other authors (Berg and Jungstand 1966). The photochemotherapy with Methylene Blue activated with long wavelength laser light can be of clinical importance mainly for the treatment of bladder tumors. Fukui et al. reported on the instillation of Methylene Blue in the bladder of 129 patients with bladder carcinoma and found a correlation between the extent of staining and the histological grading (Fukui et al. 1983). Selective photochemotherapy is then possible. In addition, the instillation of photosensitizers into the bladder can considerably reduce side effects due to sensitivity of the skin to light. Furthermore, laser light can be directed into the bladder via light fibers and endoscopes. We have initiated treatment with the photosensitizer Methylene Blue on patients with bladder tumors, the results of which will be published in the future.

References

- Berg H, Jungstand W (1966) Photodynamische Wirkung auf das solide Ehrlich-Karzinom. *Naturwissenschaften* 18:481-482
- Doiron DR, Gomer CJ (1983) Porphyrin localization and treatment of tumors. Liss, NY
- Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR (1978) Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 38:2628-2635
- Fukui I, Yokokawa M, Mitani G, Ohwada F, Wakui M, Washizuka M, Tohma T, Igarashi K, Yamada T (1983) In vivo staining test with Methylene Blue for Bladder Cancer. *J Urol* 130:252-255
- Hayata Y, Kato H, Konaka C, Ono J, Takizawa N (1982) Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer. *Chest* 81:269-277
- Kessel D (1984) HP and HPD: Photophysics, Photochemistry and Phototherapy. *Photochem Photobiol* 39:851-859

Received July 28, 1986/Accepted December 10, 1986

Lichtleitereinkopplungsgerät zur Fluoreszenzdiagnostik, Phototherapie und Photochemotherapie

Von Karsten KÖNIG und Wieland DIETEL

Aus der Sektion Physik der Friedrich-Schiller-Universität
Jena

Die Fluoreszenzdiagnostik und Photochemotherapie von Tumoren hat sich in den letzten Jahren vor allem durch die Entwicklung der Laser- und Lichtleitertechnik als neue aussichtsreiche Methode der Erkennung maligner Geschwülste und deren Behandlung erwiesen. Durch die tumorselektive Anlagerung photodynamisch wirksamer und fluoreszierender Substanzen, z. B. des Photosensibilisators Hämatoporphyrinderivat (HpD), ist es möglich, Tumoren im Frühstadium zu erkennen, ihre Ausdehnung zu erfassen und durch lichtinduzierte chemische Reaktionen zu behandeln [1].

Für die Anregung der Fluoreszenz als auch für die Durchführung der Photochemotherapie wird Laserstrahlung geeigneter Wellenlänge und Leistung in Lichtleiter eingekoppelt und im allgemeinen über Endoskope den interessierenden Gewebepartien, z. B. im Bronchial- oder Urogenitaltrakt, zugeführt.

Die Tumorfluoreszenz ist wegen der geringen Fluoreszenzquantenausbeute der verwendeten Photosensibilisatoren relativ schwach. Diese schwache Tumorfluoreszenz wird von der Untergrundstrahlung des Lasers überlagert. Untergrundstrahlung entsteht bei den Edelgasionenlasern durch die spontane Emission des angeregten Plasmas. Sie muß bei den empfindlichen Fluoreszenzuntersuchungen berücksichtigt werden.

An der Friedrich-Schiller-Universität wurde ein Lichtleitereinkopplungsgerät (LLEG) entwickelt, das es gestattet, die

Fluoreszenz ohne verfälschenden Untergrund anzuregen und zu registrieren. Zudem kann es für die Durchführung der Photochemotherapie und Phototherapie verwendet werden.

Geräteaufbau

Das LLEG besitzt neben einer Linse geeigneter Brennweite und einer Justiereinheit für den Lichtleiter eine einfache Vorrichtung mit spektraler Winkeldispersion zur Abtrennung des störenden Untergrundes. Bild 1 zeigt die Prinzipskizze.

Die Verbindung Laser—LLEG erfolgt mit einem handelsüblichen Universaladapter (1), dessen Möglichkeit der x,y-Verstellung und Verkippung eine Zentrierung des Gerätes gestattet. Der Laserstrahl (2) passiert die beiden Prismen (3 und 4), die aus Quarzglas SQ₁ gefertigt und so geschnitten sind, daß der Strahl sie möglichst unter dem Brewsterwinkel durchsetzt. Damit werden die Verluste infolge Reflexion gering gehalten. Die Basisbreite beträgt etwa 10 mm.

Durch die Winkeldispersion der Prismen wird die unerwünschte, zur Laserstrahlung langwellig verschobene spontane Strahlung (5) von der Laserstrahlung abgetrennt. Der in einer Buchse (8) gehaltene und durch einen x,y-Versteller (9) und einen z-Versteller (10) justierbare Lichtleiter (7) befindet sich im Fokus der Linse (6) (Fokus für Arbeitswellenlänge).

Durch die Ablenkung der langwelligen spontanen Strahlung wird diese nicht auf die Eingangsfläche des Lichtleiters fokussiert und somit nicht eingekoppelt. Die abgelenkte Untergrundstrahlung des Lasers kann auch mit einer entsprechenden Lochblende abgetrennt werden.

Die Elemente (3 und 4) sind zweckmäßigerweise auf einer magnetgehalteten Dreipunktauflage (11) befestigt, die bei Entfernung eine anderweitige Verwendung der Laserstrahlung — z. B. den Einsatz als Pumpstrahlung für einen mit der Anlage kombinierten Farbstofflaser — gestattet. Die Dreipunktauflage ermöglicht einen schnellen, reproduzierbaren Ein- und Ausbau der Prismeneinheit mit Mikrometergenauigkeit.

Die Laserstrahlung passiert in diesem Fall die Öffnung (12). Um eine Modulierung der Laserstrahlung zum Zweck einer empfindlichen lock-in-Nachweisteknik der Fluoreszenzstrahlung oder auch einer Impuls-Therapie-Strahlung zu gewährleisten, ist der Einsatz eines mechanischen Modulators (chopper) vorgesehen. Er wird in den Schlitz (13) eingeführt.

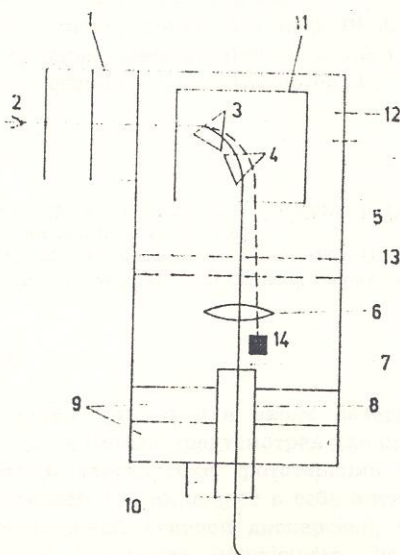
Spontane Strahlung oder Nebenreflexe von den Laserspiegeln, die ebenfalls durch den chopper moduliert werden, können als Referenzsignal und zur Leistungsmessung verwendet werden. Zu diesem Zweck ist eine Photodiode (14) angeordnet.

Die Bereitstellung einer Pilotstrahlung für die Lichtleiterjustierung sowie eines Ein-Aus-Schalters wird zweckmäßigerweise durch eine Mechanik realisiert, die innerhalb des Laserresonators angeordnet ist. Dieses intracavity-Element kann auch als Schalter für einen mit der Anlage kombinierten Farbstofflaser verwendet werden.

Ergebnisse

Das Gerät wird bei uns zur Fluoreszenzmessung von tumorösem Gewebe und zur Photochemotherapie genutzt. Als Tumor-

Bild 1: Prinzipskizze des Lichtleitereinkopplungsgerätes (LLEG)



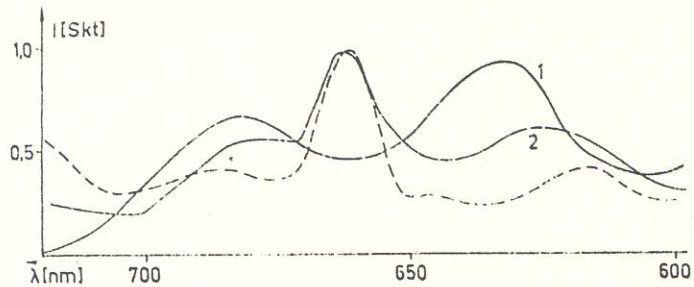


Bild 2: Fluoreszenzspektrum von biologischem Gewebe nach Anreicherung mit dem Photosensibilisator HpD bei Anregung mit Strahlung der Wellenlänge 514 nm
 1 — Fluoreszenzspektrum mit Abtrennung der spontanen Plasmastrahlung (Einsatz des LLEG)
 2 — Spektrum ohne Abtrennung
 --- Messung der spektralen Zusammensetzung der spontanen Plasmastrahlung des Lasers

modell dient das solide Ehrlich-Carcinom, das subcutan Mäusen induziert wird. Nach HpD-Applikation wird die Zeit- und Ortsabhängigkeit der Fluoreszenz gemessen und das Spektrum bestimmt. Als Anregungsstrahlung dient die modulierte Strahlung eines Argonionenlasers ILA-120 bei 514 nm, die dem zu untersuchenden Gewebe mit einer 200-µm-Stufenindexfaser aus dem KWO Berlin zugeführt wird. Die langwellige spontane Strahlung wird mit dem beschriebenen LLEG abgetrennt.

Die Nachweisordnung besteht aus einem Lichtleiter hoher Apertur (KWO Berlin) zur Übertragung des modulierten Fluoreszenzsignals, einem Prismenmonochromator, einem rot-empfindlichen Sekundärelektronenvervielfacher und dem lock-in-Verstärker unipan aus der VR Polen.

Bild 2 zeigt gemessene Fluoreszenzspektren von HpD-sensibilisiertem Gewebe 24 Stunden nach der Applikation des Photosensibilisators. Im Vergleich ist das Spektrum der gleichen Gewebepartie ohne Einsatz des LLEG und damit ohne Abtrennung der Untergrundstrahlung des Lasers dargestellt.

Mit dem gleichen Gerät wird die Photochemotherapie durchgeführt. Dabei wird die Strahlung der Wellenlänge 514 nm als Pumpstrahlung für den Einsatz eines Rhodamin-B-Farbstofflasers (ZWG der AdW) genutzt. Die Umstellung erfolgt durch Entfernen der Dreipunktaufgabe. Die erneute Montage ermöglicht eine reversible Einstellung des Strahlenweges zum Zwecke der Fluoreszenzdiagnose.

Die Photochemotherapie mit dem Photosensibilisator HpD führt zu einer signifikanten Reduktion der Tumorfeuchtgewichte gegenüber Kontrolltumoren [2].

Literatur

- [1] Doiron, D. R.; Gomer, C. J.: Porphyrin Localization and treatment of tumors. Liss, N. Y., 1983
- [2] König, K.; Bockhorn, V.; Dietel, W.; Krause, U.: Photochemotherapy in mice with solid Ehrlichcarcinomas. Im Druck

Резюме

Представлен прибор для ввода лазерного излучения в световоды, который предусмотрен для применения в флуоресцентной диагностике, фототерапии и фотохимиотерапии опухолей. Он включает в себя оптическое устройство со спектральной угловой дисперсией, которое позволяет обеспечить отделение мешающего фонового излучения лазера и ввод спектрально чистого лазерного излучения

в световоды. Применением прибора можно ощутимо улучшить измерительную чувствительность флуоресцентно-диагностических устройств. Изложены возможности применения прибора при установлении диагноза и фотохимиотерапии солидных карцином Эрлиха.

Summary

A device for coupling laser beams into light guides is described which has been designed for use in the fluorescence diagnostics, phototherapy and photochemotherapy of tumours. It comprises an optical component that permits a spectral angular dispersion. This makes it possible to split off the interfering background radiation of the laser and to couple the spectrally pure laser radiation into the light guide. It will substantially improve the measuring sensitivity of fluorescent diagnostics facilities. Applications in the diagnostics and photochemotherapy of solid-cell Ehrlich carcinoma are pointed out.

Anschrift der Verfasser:

Dipl.-Phys. Karsten KÖNIG
 Dr. sc. nat. Wieland DIETEL
 Friedrich-Schiller-Universität
 Sektion Physik
 Max-Wien-Platz
 Jena, 6900

Photodynamic activity of the HpD-photoproduct

K. König¹, A. Felsmann¹, W. Dietel¹, M. Boschmann², S. N. Cherenkevich³,
T. Zorina³

¹ Department of Physics and Centre of Laser Application in Medicine,
Friedrich Schiller University Jena, Germ. Dem. Rep.

² Institute of Biochemistry, Medical Academy Magdeburg, Germ. Dem. Rep.

³ Institute of Physics, Belorussian University Minsk, USSR

Introduction

Hematoporphyrin derivative (HpD), a mixture of different porphyrins and their chemically and physically bound aggregates, is the photosensitizer mostly used in the photodynamic therapy of tumors (Doiron and Gomer 1983; Hayata and Dougherty 1983; Kessel 1986).

The absorption spectrum of HpD consists of a broad band (Soret band) in the UV/violet range and four smaller absorption bands in the visible range. The absorption coefficient decreases with higher wavelength and is less than $2 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$ (molecular weight for HP-monomer ≈ 600) in the red range. However, the red spectral region is important for therapy because of high tissue transmission.

In order to increase the therapeutic effect, other photosensitizers are investigated with a stronger absorption in the red/NIR spectral range, e.g. phthalocyanines (Lier et al. 1983), Methylene Blue (König et al. 1987), phaeophorbide a (Röder et al. 1987) or chlorine *es* (Gurinovich et al. 1987; Gurinovich et al. 1988).

Recently it was found that during strong light exposure mainly in the UV/violet spectral range, HpD changes its fluorescence and absorption properties (Moan and Kessel 1988; Rotomskiene et al. 1988; Kinoshita et al. 1988; König and Dietel 1989). Besides a bleaching process, some new absorption bands in the red spectral range occur as a result of the formation of a stable fluorescent photoproduct, especially about 635-640 nm in aqueous solutions (Dietel and König 1989). In cells and tumors the absorption and fluorescence spectrum is red-shifted due to a different environment micropolarity (e.g. Beltramini et al. 1987).

The aim of the present paper is to report on the photodynamic activity of an irradiated HpD-solution containing a high content of the formed photoproduct.

Materials and Methods

Chemicals. The HpD used was kindly provided by Dr. Lotz, ENT clinic of Halle university, GDR. The effectivity of this drug was proved as described elsewhere (König et al. 1989; Löbe et al. 1988). In order to form the photoproduct a 10^{-4} M HpD-solution (diluted with PBS, pH=7.4) was irradiated by the 488 nm radiation of an argon-ion laser (type ILA 190, Carl Zeiss Jena, dose: 200 J). Fig. 1 shows the fluorescence spectra of HpD in dependence on the irradiation time. Note the increase of an additional fluorescence band around 640 nm due to the formation of the fluorescent photoproduct. There are changes in the absorption spectra especially in the red spectral range, fig. 2. The absorbance in this range increases and a new absorption maximum is formed about 640 nm. The final concentration of the unirradiated (fresh) HpD in the cell suspension was 10^{-5} M. The Nitroimidazole used was Metronidazol (Efloran, KRKA Jugoslavia).

Cells. Human erythrocytes were obtained from a hospital blood bank. The blood cells were diluted in a PBS solution (pH= 7.4) up to a cell concentration of 10^6 /ml. An Ehrlichascites cell suspension obtained from the Centre for Experiments on Laboratory Animals at Jena was used with the same concentration.

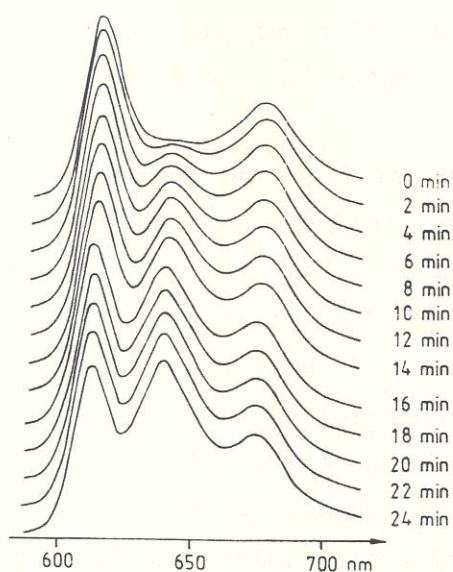


Fig. 1 Fluorescence spectrum of 10^{-4} M HpD-PBS-solution, pH 7.4 dependent on irradiation time (488 nm, 100 mW, 1ml). Note the formation of the fluorescence peak around 640nm.

Hepatocytes were isolated as described by Berry and Friend 1969 with the modifications reported by Seglen 1976. Male, 24 hours starved Wistar rats were used as liver donors. Hepatocytes (1.6×10^6 /ml) were stored in KREBS-RINGER bicarbonate medium, pH 7.4, at 0°C. The photodynamic action on the cells after

incubation of HpD and HpD-photoproduct (incubation time; 15min) was examined by irradiation at 514nm and at 600-670nm (DCM dye-laser). The kinetics of lysis of erythrocytes was measured by means of small angle light scattering. The cell damage of the rat cells was determined by Trypan Blue staining in a final concentration of 0,25% and the damage of the Ehrlich ascites cells was controlled by measurement of the density and volume of the Ehrlich-Ascites-Carcinoma (EAC) formed after i.p. injection, and the growth of the solid form of this tumor after s.c. injection of these treated cells to male ICRmice. During the illumination the cell suspension was continuously stirred.

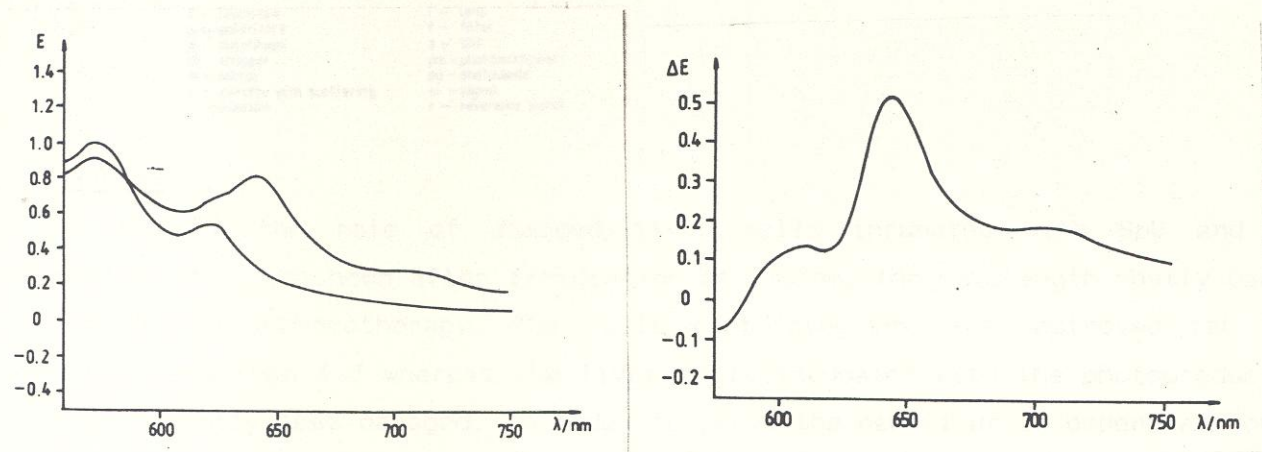


Fig.2 Absorption spectrum of a fresh unirradiated (10E-04M) and irradiated HpD-PBS solution, left, and the difference spectrum, right. Three additional maxima in the red range occur during irradiation (photoproduct).

Experimental set-up. An optical multichannel analyzer (OMA 284, Centre of Scientific Instruments, Berlin) was used for absorption and fluorescence measurement as described by König and Dorn (1989). Fig. 3 shows the set-up for studying the photodynamic cell damage induced by an DCM-dye laser emitting radiation from 590 to 720 nm. For the determination of the lysis of erythrocytes the scattered light of a Helium-Neon laser beam at 633 nm (power less than 1 mW, no influence relatively to the dye-laser irradiation) was measured at an angle of 3° in respect to the approximation of Fraunhofer diffraction and the geometric form and size of the erythrocytes. For more details, see (Ravey 1984; Gurinovich et al, 1988).

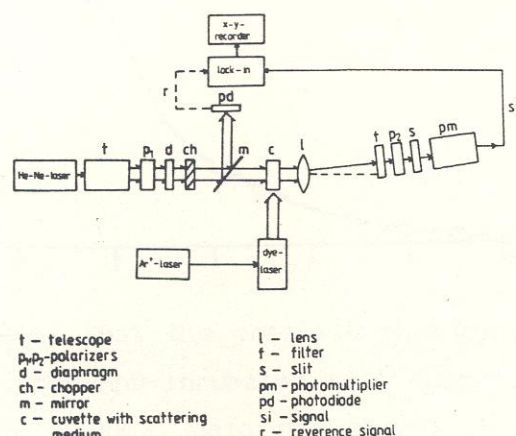


Fig.3 Experimental set-up for the small angle light scattering on erythrocytes.

Results

In fig. 4 the rate of damaged liver cells incubated with HpD and HpD-photoproduct is shown after irradiation at 630 nm, the wavelength mostly used in the HpD photochemotherapy. The cells containing HpD are destroyed for light doses less than 4 J whereas the liver cells incubated with the photoproduct are significantly less damaged. In order to prove the behaviour in dependence on the wavelength especially in the region of the absorption maximum of the photoproduct around 640-650 nm, the photohemolysis was determined by the sensitive method of small angle scattering.

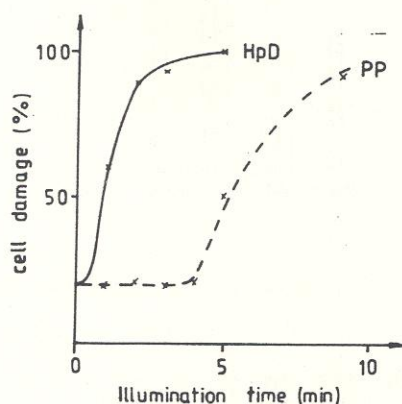


Fig. 4 Cell damage by photo-dynamic action of HpD and HpD-photoproduct on isolated liver cells (630nm irradiation, 15 mW) dependent on illumination time.

Fig. 5 shows the scattering signal in dependence on the irradiation time. In the beginning of the irradiation the signal remains constant due to the constant form and number of the scattering cells. After that the signal rises indicating the period of transformation of the erythrocytes to a spheric form and finally the signal goes down to zero due to the process of hemolysis.

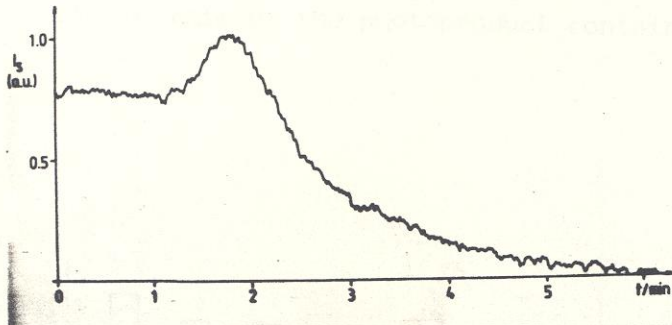


Fig. 5 Time-dependent scattering signal of HpD incubated erythrocytes during irradiation, 15 mW, 630nm.

Fig. 6 shows that the greatest photodynamic activity in the red spectral range occurs in the HpD-incubated cell suspension during 630 nm irradiation ($T_{50}(620 \text{ nm}) < T_{50}(630 \text{ nm})$, data not shown). However, the T_{50} -values (time where the rate of hemolysis amounts 50%) of the photoproduct containing samples are very high. A minimum occurs around 640 - 650 nm due to the absorption behaviour. In this spectral region the photodynamic activity is equal to or slightly higher than that for HpD containing cells.

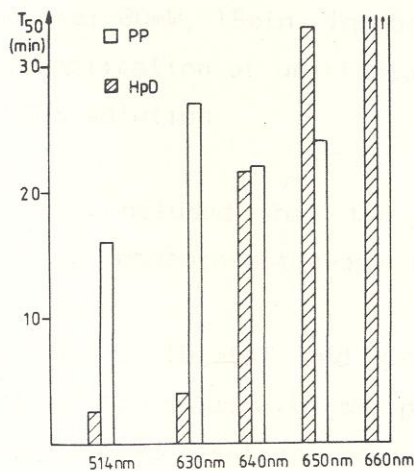


Fig. 6 T_{50} -rates dependent on the wavelength.

HpD: unirradiated solution

PP: photoproduct (HpD irradiated)

In order to verify the results with red light exposure on tumor cells, EAC cells were irradiated after incubation of the photosensitizer. Fig. 7, left, shows the densities of the EAC-suspensions one week after the i.p. application of 0.25 ml of the irradiated cells in mice in comparison *with* three different control groups (group 1: only irradiation of cells, no drug/ group 2: only HpD-incubation, no irradiation/ group 3: only photoproduct-incubation, no irradiation). Fig. 7, right, shows the wet tumor weights one week after s.c. injection of EAC cells of

the same treated cell suspensions. In agreement with the results above no higher phototoxic rate of the photoproduct containing cells could be observed.

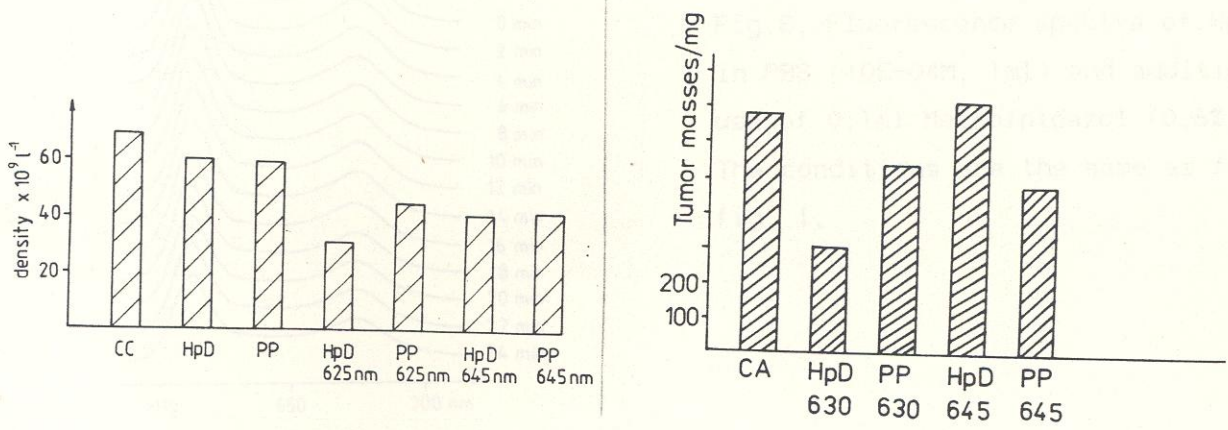


Fig.7. Densities of the EAC-cell suspension after i.p. application, left, and tumor weights after s.c. application of treated EAC cells to mice (light exposure; 30mW, 15min, incubation time; 30min), right. HpD: application of unirradiated solution, PP: application of irradiated HpD-PBS solution

So it can be concluded that the formation of the photoproduct reduces the efficacy of the photochemotherapy in spite of stronger absorption in the red range.

Former experiments (Dietel and König 1988) show that the formation of the photoproduct is connected with the presence of singlet oxygen. In order to avoid the photoproduct generation during irradiation the electrophilic substance Metronidazol was added which suppressed the singlet-oxygen generation (Bazin and Santus 1986). No formation of a new absorption or fluorescence band could be observed, see fig. 8. As shown recently the additional use of this Nitroimidazole does not avoid the photodynamic action (König and Bockhorn 1989).

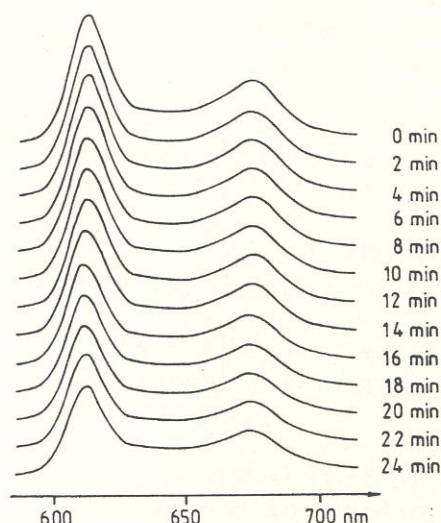


Fig.8. Fluorescence spectra of HpD in PBS (10E-04M, 1ml) and additional use of 0,1ml Metroinidazol (0,5%). The conditions are the same as for fig. 1.

Discussion

As shown in these experiments with different cell types the photodynamic activity of the HpD-photoproduct is not so high as that of HpD although the photoproduct has a stronger absorption in the red spectral range. HpD incubated cells show the greatest lethal rate for 630 nm irradiation whilst the photoproduct incubated cells show the greatest rate at around 640-650 nm due to its absorption behaviour. However, this rate is smaller than that of the HpD incubated cell suspension.

The formation of the photoproduct in cells and tumour tissue can occur during short-wavelength irradiation as shown in fluorescence measurements (König and Dietel 1989). This formation is connected with the presence of oxygen (Dietel and König 1988). This fact can be of interest for the measurement of the oxygen status of tumor tissue.

In the photochemotherapy the formation of the photoproduct can be prevented. The additional injection of Metronidazol inhibits its formation. Nitroimidazoles and HpD form chemically bound complexes which are photodynamically active by type-I photooxidation (Bazin and Santus 1986). The generation of singlet oxygen is suppressed. Especially in the case of hypoxic tumor areas, the photochemotherapy is then possible and effective as shown by (König and Bockhorn 1989).

References

- Bazin M, Santos R (1986) Selective Typ I Photooxydation in Mixtures of Porphyrines and electrophilic Nitroimidazoles. *Photochem Photobiol* 3:235-242
- Beltramini M, Firey PA, Ricchelli, F, Rodgers MAJ, Jori G (1987) Steady-State and Time Resolved Spectroscopic Studies on the Hp-Lipoprotein Complex. *Biochem* 26:6852-6858
- Berry MN, Friend DS (1969) High Yield Preparation of Isolated Rat-liver Parenchymal Cells. *J Cell Biol* 43:506-520
- Dietel W, König K (1988) Laser stimulated in-vivo fluorescence of animal tumors. Second International Conference on Laser Scattering Spectroscopy of Biological Objects, Pecs, Hungary
- Dietel W, König K (1989) Photobleaching of the HpD fluorescence and photoproduct formation in vivo and in solutions. Paper on the Third Congress of the European Society for Photobiology, Budapest
- Doiron DR, Gomer CJ (1983) Porphyrin localization and treatment of tumors. Liss, NY
- Gurinovich GP, Zhakov IG, Kostewich GA, Kochubejew GA, Sarzhevskaja MV, Frolov AA (1987) Singlet oxygen and cancer phototherapy. *Vestnik Akademii Medicinskie Nauk SSSR* 12:13-17 (in russian)
- Gurinovich GP, Zorina TE, Zorin VP, Sarzhevskaya MV, Cherenkevich SN (1989) Structural damages of erythrocytes photosensitized by chlorins and porphyrines. *Biophysica XXXIII* 2:314-317 (in russian)
- Hayata Y, Dougherty TJ (1983) Lasers and HpD in cancer. Igaku-Shoin, Tokio NY
- Kessel D (1986) Photosensitization with derivatives of haematoporphyrin. Review. *Int J Radiat Biol* 6:901-907
- Kinoshita S, Seki T, Kushida T (1988) Fluorescence of HP in Living cells and in solution. *Photochem Photobiol* 8 2:195-208
- König K, Bockhorn V, Dietel W, Schubert H (1987) Photochemotherapy of animal tumors with the photosensitizer Methylene Blue using a krypton laser. *J Cancer Res Clin Oncol* 113:301-303
- König K, Bockhorn V, Krause U, Dietel W, Schubert H, Lotz P, Löbe LP (1989) Photodynamic therapy with HpD on mice with solid Ehrlichcarcinomas. *Arch Geschwulstforsch* 1:1-6
- König K, Bockhorn V (1989) The effect of Nitroimidazoles and photochemotherapy on solid Ehrlichcarcinomas. *Radiobiologia Radiotherapia*, In press
- König K, Dietel W (1989) Laserinduzierte Tumorfluoreszenzdiagnostik am Beispiel des soliden Ehrlichcarcinoms. *Arch Geschwulstforsch*, In press

König K, Dorn P (1989) Einsatz des Optischen Vielkanalanalysators in der Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie von Photosensibilisatoren, medizintechnik, In press

Lier van JE, Ali H, Rosseau J (1986) Phtalocyanines labeled with Gamma-Emitting Radionuclides as possible Tumor Scanning Agents. In: (Doiron and Gomer 1986, pp 315-319)

Löbe LP, Krause U, Lotz P, König K, Dietel W, Barth (1988). Photodynamic therapy with the HpD Halle 2. Results of animal experiments, Paper 141 on the International Conference on photodynamic therapy, London

Moan J, Kessel D (1988) Photoproducts formed from Photofrin II in cells, Photochem Photobiol B 1:429-436

Ravey JC (1984) The first Extrema in the radiation pattern of the light scattered by Micrometer-Sized Spheres and Spheroids, J Colloid Sci 2:435-446

Röder B, Wabnitz H (1987) Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy of Hematoporphyrin, Mesoporphyrin, Phaeophorbide a and Chlorin e₆ in Ethanol and Aqueous solution, Photochem Photobiol B 1:103-113

Rotomskiene J, Kapociute R, Rotomskis R, Jonusauskas G, Szito T, Nizhnik A (1988) Light-Induced Transformations of HP-Diacetate and HP, Photochem Photobiol B 2:373-379

Seglen PD (1976) Preparation of Isolated Rat Liver Cells, Meth Cell Biol 13:29-83.

Lasers in the Life Sciences 3(1), 1989, pp. 1-7

Reprints available directly from the publisher

Photocopying permitted by license only

©1989 Harwood Academic Publishers GmbH

Printed in the United States of America

Investigation of Cells by Fluorescence Laser Scanning Microscopy with Subnanosecond Time Resolution

I. BUGIEL, K. KÖNIG, and H. WABNITZ

Friedrich-Schiller-Universität Jena, Sektion Physik, Max-Wien-Platz 1, Jena, 6900, German Democratic Republic

(Received November 16, 1988; January 23, 1989)

The spatial distribution of the fluorescence decay time τ (" τ -image") together with that of the mean fluorescence intensity I_F is obtained in fluorescing cell objects using an experimental arrangement consisting of a mode-locked argon ion laser, a microscope equipped with a scanning stage, and a time-correlated single photon counting system. As an example, Ehrlich ascites carcinoma cells incubated with Photofrin II were investigated. One- and two-dimensional scans of the fluorescence intensity as well as the fluorescence decay time are presented which show significant variations of the decay process as a function of the position within the cell.

KEYWORDS: laser scanning microscopy, fluorescence decay time, hematoporphyrin derivative, photodynamic tumor therapy

INTRODUCTION

Fluorescence microscopy is widely used in biology and medicine for the study of auto-fluorescence or fluorescence of attached probe molecules in cells and tissues in order to get information on morphological and functional properties of the object.

Another source of information on the molecular level can be opened if relaxation processes (e.g., the fluorescence decay) are investigated with high time resolution [1]. Parameters of the fluorescence decay are sensitive to the configuration of molecular species, their mobility, and various interactions with the environment.

A combination of high spatial and temporal resolution can be achieved if the excitation is performed by a focused spot of a pulsed laser source and the fluorescence is measured by a time-resolving detection system. Because of the high required sensitivity, time-correlated single photon counting (TCSPC) [2] is advantageously applied. This method usually allows a time resolution of a few 100 ps and offers rather short measuring times if a mode-locked continuous-wave laser is used as high repetition rate excitation source.

Docchio *et al.* [3] as well as Schneckenburger [4], Rodgers *et al.* [5, 6], and Minami *et al.* [7] equipped subnanosecond fluorometers with a microscope and studied the fluorescence decay in a fixed small object region selected by the focused laser spot.

The approach of the present paper is to use primarily the concept of laser scanning microscopy: The object is illuminated point by point by a focused laser beam and the corresponding response is detected at each point. Not only reflected, transmitted, or fluorescence intensities, but also other physical parameters derived from the detected signal can be used for the construction of an image after data processing. Obviously, an image can be formed from parameters of the fluorescence decay (*e.g.*, " τ -image"). So the aim of this work was to display the decay time τ together with the mean fluorescence intensity I_F as a function of the position of the object with respect to the laser spot. This should allow to compare the information contained in I_F and τ and to get a survey of the spatial extension of variations of these two quantities.

EXPERIMENTAL ARRANGEMENT AND METHOD

A scheme of the setup is shown in Figure 1. A mode-locked argon ion laser (ILA 120 from Kombinat VEB Carl Zeiss Jena equipped with an acousto-optic modelocker) is used as excitation source which provides a continuous train of picosecond pulses (pulse duration, $t_p \approx 100$ ps; pulse separation, $T = 8.1$ ns, $\lambda = 514.5$ nm).

After attenuation the laser beam is focused onto the object by the objective of an epimicroscope JENALUMAR. A single additional negative lens at the entrance of the beam into the microscope is used to focus the laser in the object plane and to obtain a rather flat intensity distribution in the objective pupil which yields high spatial resolution. The resolving power as derived from the scan across a straight edge was found to be $0.6\text{--}0.7 \mu\text{m}$ for a high aperture objective (Apochromat $50\times/0.95 \infty/0.17\text{-A}$).

The fluorescence originating from the object is collected in backward direction by the objective and passes through a dichroic plate and color filters for eliminating scattered light. In the image plane a pinhole which is larger than the image of the laser spot removes background and scattered light.

The setup for time-resolving detection of fluorescence by the method of TCSPC consists of the electronic system SPC 100 (ZOS Berlin) and the photomultiplier FEU-77 (U.S.S.R.).

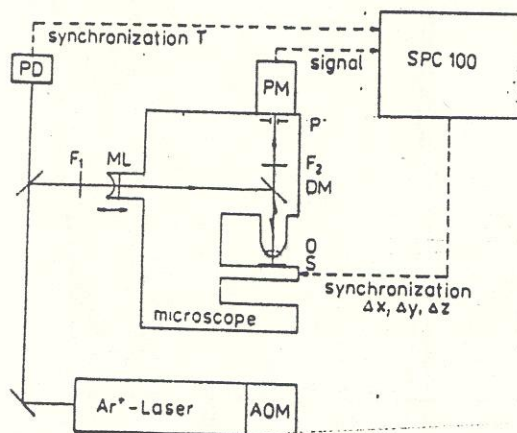


FIGURE 1 Experimental arrangement. AOM = acousto-optic modelocker; PD = photodiode; F_1 = attenuator; ML = matching lens; DM = dichroic mirror; O = objective; S = scanning stage; F_2 = block filters; P = pinhole; PM = photomultiplier; SPC 100 = electronic system for TCSPC

INVESTIGATION OF CELLS BY FLUORESCENCE

3

For a more detailed description see [8]. Single photon events are accumulated in a multi-channel memory (256 channels per curve, maximum 65535 counts per channel, channel width usually 48.3 ps or 20.1 ps) yielding a histogram which represents the fluorescence decay. The time resolution of the whole system as given by the halfwidth of the response to scattered excitation light amounts to about 300 ps. Taking advantage of the high repetition rate of the excitation of ≈ 120 MHz, a rather high count rate up to 2×10^5 /s can be processed which renders possible short measuring times. On the other hand, this corresponds to the detection of one photon per more than 600 excitation pulses. This elucidates the high sensitivity of the method.

For object scanning on x - y stage with a minimum step width of $0.5 \mu\text{m}$ is supplied to the microscope. The synchronization of step motion and measurement is realized by programs for the microprocessor of the system SPC 100.

This experimental arrangement allows two operation modes:

1) Recording of decay curves at fixed object position in a usual TCSPC measurement. For measuring times in the order of a few minutes decay curves with an excellent signal-to-noise ratio and a large dynamic range can be accumulated which are suited for a very accurate and detailed analysis of the time course of the relaxation process.

2) Much faster recording of one- and two-dimensional plots of the mean fluorescence intensity I_F and the fluorescence decay time τ while scanning the object. This is achieved by an interval method (cf. [9]) which gives a rather accurate estimate of τ (under the assumption of a single exponential decay law) within a measuring time per object step of about 1 s.

Three time intervals are chosen in the following way (cf. Fig. 2): Interval I begins after the

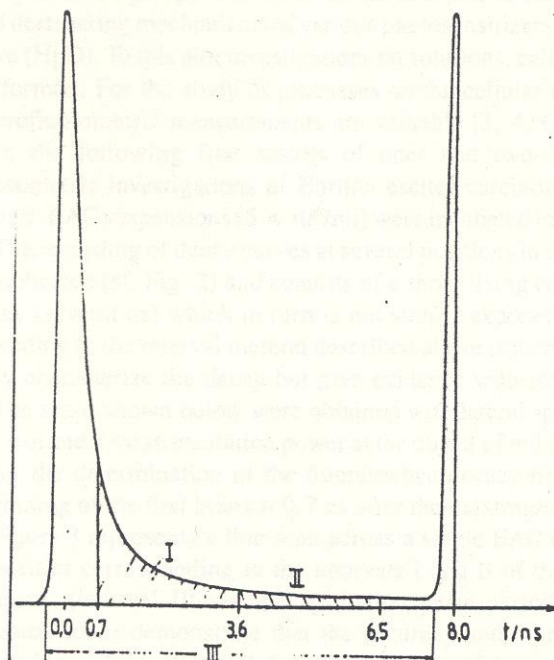


FIGURE 2 Fluorescence decay curve for an Ehrlich Ascites carcinoma cell with Photofrin II. The intervals for the following spatial scans are indicated.

end of the excitation pulse in order to suppress scattered excitation light and to be sure of free decay. Interval II of equal width ΔT begins just after the end of interval I. Interval III covers the whole excitation pulse period.

With these assumptions the parameter τ of the decay law

$$iF(t) = iF(0) \times \exp(-t/\tau) \quad (1)$$

and the stationary fluorescence intensity I_F (mean value over the whole excitation period) can be obtained by

$$\tau = \frac{\Delta T}{\ln(N_1/N_2)} \quad (2)$$

$$I_F \propto N_3 \quad (3)$$

from the sums of counts within the three intervals. After each object step only these sums have to be evaluated and stored instead of the whole decay curve.

The information content of the measurements can still be increased by additional spectral analysis of the fluorescence whereby a reduction of about 10 nm can be already sufficient, or by spatial depth discrimination with the help of a pinhole in the image plane with a size near the extension of the imaged laser focus which allows optical sectioning with a depth resolution comparable to the lateral resolution [10, 11].

APPLICATION IN THE INVESTIGATION OF INTRACELLULAR HPD FLUORESCENCE

Fluorescence diagnostics and photodynamic therapy of tumors is a field of intense work of many research groups. Particular attention is paid to the elucidation of the tumor localizing and destructing mechanisms of various photosensitizers, especially hematoporphyrin derivative (HpD). To this aim investigations on solutions, cell suspensions, and tumor models are performed. For the study of processes on the cellular and subcellular level time-resolved microfluorometric measurements are valuable [3, 4, 6, 12-14].

In the following first results of one- and two-dimensional time-resolved microfluorometric investigations of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) cells with HpD are presented. EAC suspensions ($5 \times 10^6/\text{ml}$) were incubated in a Photofrin II solution for one hour.

The recording of decay curves at several positions in cells revealed that the decay is rather complicated (cf. Fig. 2) and consists of a short-living component (below 1 ns) and a slower decay (several ns) which in turn is not simply exponential. The decay time τ determined according to the interval method described above is therefore only a mean value that cannot fully characterize the decay but give evidence with respect to variations.

The scans shown below were obtained with lateral spatial resolution (spot size) of about $0.7 \mu\text{m}$ and a mean excitation power at the object of $\approx 7 \mu\text{W}$. The width of the intervals I and II for the determination of the fluorescence decay time τ was chosen to be 2.9 ns, the beginning of the first interval 0.7 ns after the maximum of the excitation pulse (cf. Fig. 2).

Figure 3 represents a line scan across a single EAC cell (five times the same cell). The intensities corresponding to the intervals I and II of the decay curve as well as the mean intensity (interval III—whole excitation pulse period) are given together with τ . The repeated scans demonstrate that the accuracy and reproducibility of the measurement is satisfying. Within the cell there is a region of lower intensity which can be probably

INVESTIGATION OF CELLS BY FLUORESCENCE

5

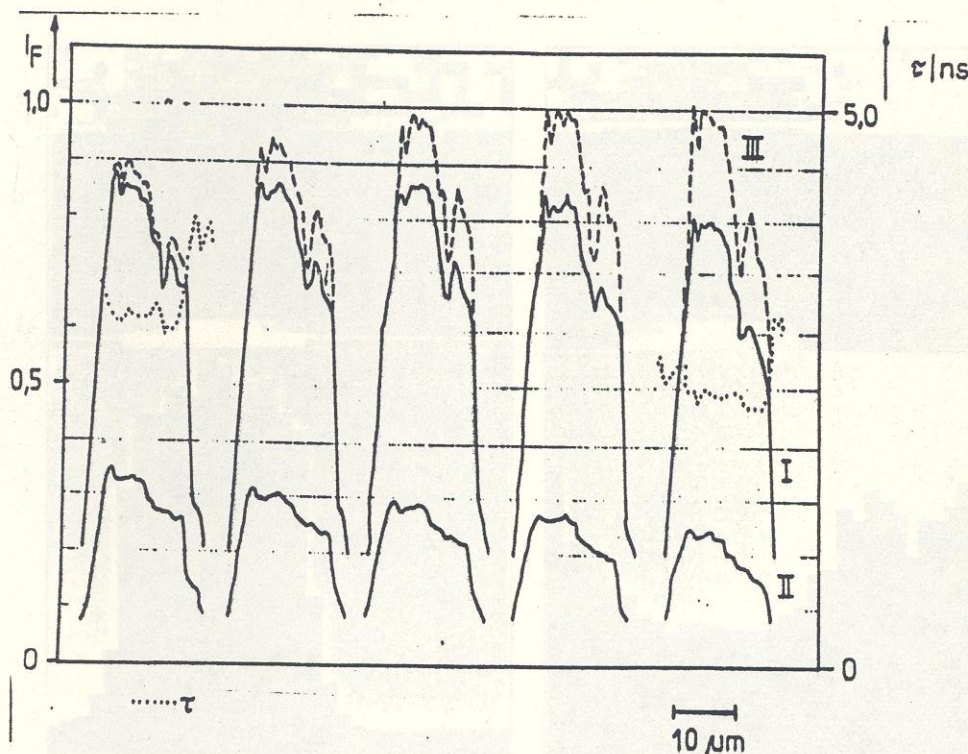


FIGURE 3 Line scan of an EAC cell (5 times the same cell), step width $0.5 \mu\text{m}$. The intensities in the intervals I, II, and III are depicted together with τ .

identified with the nucleus. The differences between successive scans are due to photoinduced processes. Whereas the intensity in the intervals I and II decreases, $I_F(\text{III})$ is increasing which can be explained by an increase in the amplitude of a short-living component not covered by the intervals I and II. The decay time τ also offers reproducible structures not simply correlated with those in the intensity but with a tendency to increase at the cell boundary. Similar relations can be seen in a two-dimensional scan of another cell (Fig. 4).

CONCLUSIONS

These preliminary results demonstrate first of all that the method and its experimental realization described above are suited for obtaining distinct one- and two-dimensional pictures of I_F and τ for relevant cell objects. Conclusions concerning the spatial distribution of photosensitizers, components of them or other molecular species giving further insight into mechanisms of their uptake and photodynamic action should be possible.

However these measurements also revealed that individual cells of the same suspension behaved differently with respect to the value and spatial distribution of I_F and τ . Therefore reliable conclusions can only be drawn after the investigation of a greater number of cells of an as much as homogeneous suspension.

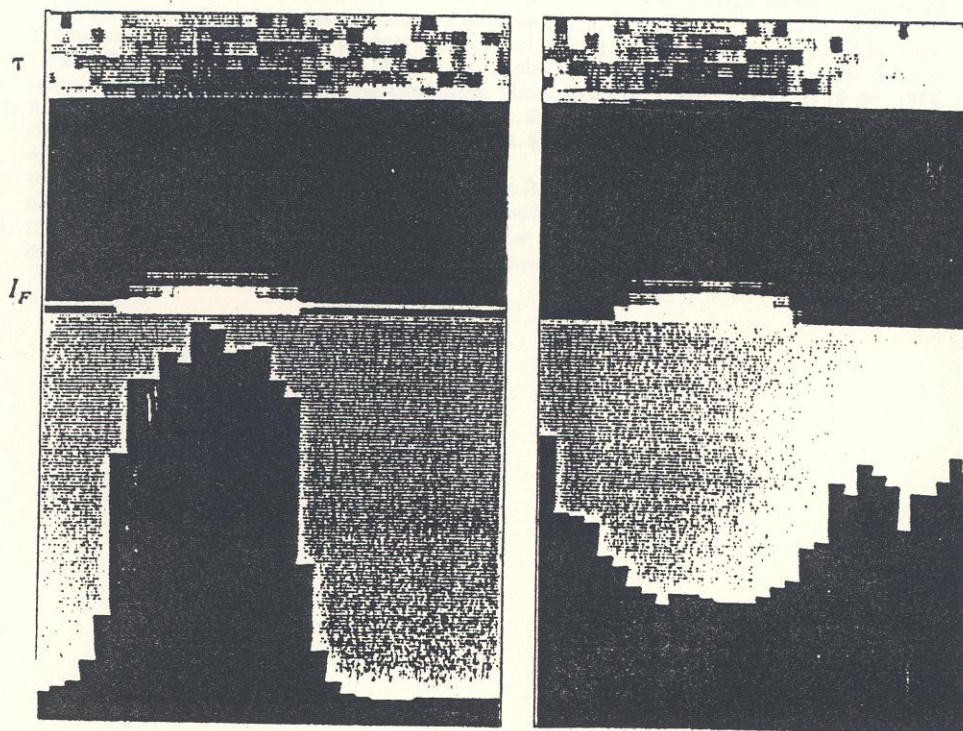


FIGURE 4 Two-dimensional scan of a part of an EAC cell, step width $1\ \mu\text{m}$. Upper part: $\tau(x, y)$ and $I_F(x, y)$, lower part: histograms along the lines indicated in the upper part.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. H. Schubert for providing the EAC cell suspensions and Prof. B. Wilhelm for helpful discussions.

References

1. R. B. Cundall and R. E. Dale (eds.): *Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy in Biochemistry and Biology*. New York, London: Plenum Press, 1983.
2. D. V. O'Connor and D. Phillips: *Time-Correlated Single Photon Counting*. London: Academic Press, 1984.
3. F. Docchio, R. Ramponi, C. A. Sacchi, G. Bottiroli, and I. Freitas: An automatic pulsed laser microfluorometer with high spatial and temporal resolution. *J. Micr.* 134 Pt. 2, 151-160, 1984.
4. H. Schneckenburger: Time resolved microfluorescence in biomedical diagnosis. *Opt. Engin.* 24, 1042-1044, 1985.
5. M. A. J. Rodgers and P. A. Firey: Instrumentation for fluorescence microscopy with picosecond time resolution. *Photochem. Photobiol.* 42, 613-616, 1985.
6. R. Ramponi and M. A. J. Rodgers: An instrument for simultaneous acquisition of fluorescence spectra and fluorescence lifetimes from single cells. *Photochem. Photobiol.* 45, 161-165, 1987.
7. T. Minami, M. Kawahigashi, Y. Sakai, K. Shimamoto, and S. Hirayama: Fluorescence Lifetime Measurements under a microscope by the time-correlated single photon counting technique. *J. Luminescence* 35, 247-253, 1986.
8. W. Becker, D. Schubert, and H. Wabnitz: Fluorescence lifetime measurement by a time-correlated single photon counting system and a synchronously pumped dye laser. *Proc. IVth Intern. Symp. "UPS-85"*, Reinhardtsbrunn, in: *Teubner-Texte zur Physik, Vol. 10.*, -Leipzig: BSB B. G. Teubner Verlagsges. 1986, pp. 77-80.

Fotoakustisches Absorptionsspektrometer

INVESTIGATION OF CELLS BY FLUORESCENCE

7

9. W. Gärtner, B. Gröbler, D. Schubert, H. Wabnitz, and B. Wilhelm: Fluorescence scanning microscopy combined with subnanosecond time resolution. *Exp. Techn. Phys.*, in press. 36(1988) 443-457
10. T. Wilson and A. R. Carlini: State of the detector in confocal imaging systems. *Opt. Lett.* **12**, 227-229, 1987.
11. R. W. Wijnaendts van Resandt, H. J. B. Marsman, R. Kaplan, J. Davoust, E. H. K. Stelzer, and R. Stricker: optical fluorescence microscopy in three dimensions: Microtomoscopy. *J. Micr.* **138** Pt. 1, 29-34, 1985.
12. R. Ramponi, F. Docchio, C. A. Sacchi, G. Bottiroli, and R. Supino: Fluorometric studies of hematoporphyrin-derivative in cells and solution. "Eur. Conf. on Optics, Opt. Systems and Appl.," Amsterdam 1984, *SPIE* Vol. 492, pp. 151-160.
13. H. Schneckenburger, J. Feyh, A. Götz, M. Frenz, and W. Brendel: Quantitative in vivo measurement of the fluorescent components of photofrin II. *Photochem. Photobiol.* **46**, 765-768, 1987.
14. H. Schneckenburger and T. P. U. Wustrow: Intracellular fluorescence of photosensitizing porphyrins at different concentrations of mitochondria. *Photochem. Photobiol.* **47**, 471-473, 1988.

Von Karsten KÖNIG, Eberhard WELSCH und Heinz-Günter WALTER

Bild 1 zeigt den schematischen Aufbau des verwendeten fotoakustischen Absorptions(PAA)-meßplatzes. Als Laserlichtquelle dient ein Argonionenlaser (1) — gepumpter Farbstofflaser (2).

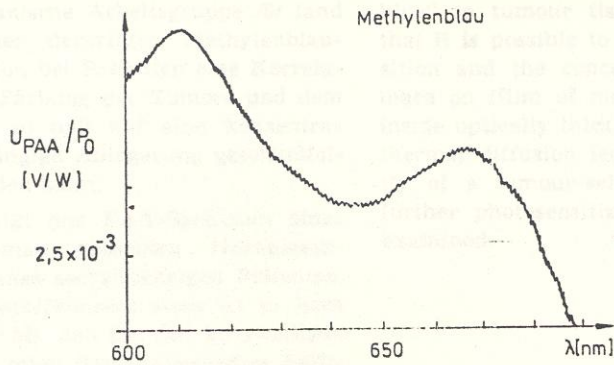


Bild 2: PAA-Spektrum des Fotosensibilisators Methylenblau
(LM: NaCl, $c = 3 \times 10^{-4}$ M, $f = 31$ Hz)

Das aktive Medium DCM (LM: Ethylenglykol) gestattet die Durchstimmbarkeit im Wellenlängenbereich von 600 bis 700 nm. Als Durchstimmelement dient ein Lyotfilter, das von einem Schrittmotor angetrieben wird.

Die maximale Laserleistung beträgt 300 mW bei einer Wellenlänge von 645 nm und einem Wirkungsgrad von 15 bis 20 Prozent. Die Intensitätsmodulation der Strahlung erfolgt über einen spannungsregulierbaren Chopper (10 bis 1 000 Hz) (4).

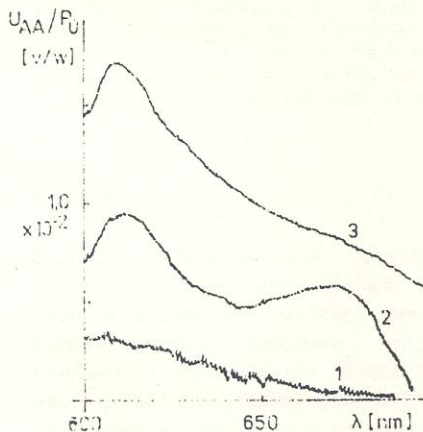


Bild 3: PAA-Spektren von Tumorgewebe (solides Ehrlichcarcinom) mit Methylenblauakkumulation ($f = 31$ Hz)
1. Gewebe ohne Methylenblau
2. Gewebe mit Methylenblaufilm
3. Methylenblauanreicherung in Gewebe

Die schwingungsfrei aufgestellten PAA-Zellen (7) und (10) bestehen aus einem Aluminiumblock, der auch das Kondensatormikrophon MK 201/MV 201 (VEB Mikrophontechnik Gefell) aufnimmt.

Der Gasraum (Länge 2 oder 4 mm, Durchmesser 32 mm) wird durch das Eintrittsfenster und Probenhalterung fest verschlossen. Durch eine dünne

Bohrung von 1,5 mm Durchmesser und 8 mm Länge ist das Gasvolumen mit dem Mikrophon verbunden. Als Gas wird einfacherweise Luft verwendet.

Das fotoakustische Signal hängt von den thermischen und optischen Parametern der untersuchten Probe sowie von der Chopperfrequenz und der Phasenverschiebung zur modulierten eingestrahlten Lichtwelle ab $/1/$, wobei der zu messende Absorptionskoeffizient linear eingeht.

Die Zelle (10) dient als Referenzzelle. Sie enthält ein Präparat hoher Absorption (optische Wellenlänge $\mu a = 1/a < \mu_{th}$, α -Absorptionskoeffizient), arbeitet somit im Sättigungsbereich und weist damit eine der Eingangsleistung proportionale Signalamplitude S_z auf. S_z dient der Leistungsmessung und erlaubt durch Quotientenbildung (13) der mit den Lock-in-Nanovoltmetern (UNIPAN, VRP) (10) und (12) aufbereiteten Mikrophon Ausgangssignale die Bereitstellung von korrigierten PAA-Spektren, die mit dem xy-Schreiber (14) registriert werden. Die Probendicke d kann größer als die optische Weglänge μa sein.

Die Fotodiode SP 103 (8) dient der Bereitstellung der lock-in-Referenzspan-

nung und der Messung der Arbeitsfrequenz (9).

Ergebnisse

Die Anlage wird zur Lokalisation und zur Konzentrationsbestimmung von Fotosensibilisatoren in Tumorgewebe genutzt. Bild 2 zeigt ein PAA-Spektrum des Fotosensibilisators Methylenblau, der in wässriger Lösung als konzentrationsabhängiges Monomer-Dimer-Gemisch vorliegt. Sowohl aus der Intensität als auch aus dem Spektrenverlauf (Bandenmaximum der Monomere: 667 nm, Maximum der Dimere: 612 nm) kann auf die Sensibilisatorkonzentration geschlossen werden.

Die Nachweisgrenze liegt bei $c = 5 \times 10^{-6}$ M bei einer thermischen Diffusionslänge von 30 μ m. Das entspricht einer nachgewiesenen Absorption von etwa 9×10^{-4} .

Bild 3 zeigt PAA-Spektren von Tumorgewebe des soliden Ehrlichcarcinoms der Maus. Für den Fall des unmarkierten Präparates (Kurve 1) kann die erwartete Verringerung der Gewebeextinktion in Richtung zunehmender Wellenlänge gezeigt werden.

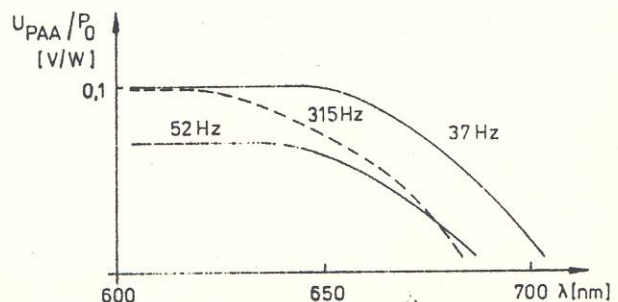
Liegt Methylenblau als Flüssigkeitsfilm mit einer Dicke größer der thermischen Diffusionslänge (Kurve 2) auf dem Gewebe, werden dem Bild 1 ähnliche Spektren erhalten. Die Gewebeabsorption trägt dann nicht zum Signal bei, jedoch führt die Rückstreuung des Gewebes (etwa 30 Prozent im roten Spektralbereich bei den verwendeten Präparaten) zu einer Signalerhöhung.

Kurve 3 zeigt methylenblauhaltiges Gewebe (Konzentration der Injektionslösung: $1,7 \times 10^{-4}$ M. Die Spektren- und Intensitätsänderung deutet auf eine Konzentrationszunahme innerhalb der obersten Gewebeschicht hin.

Ein weiteres Untersuchungsobjekt ist die Anlagerung des Fotosensibilisators an Tumore der humanen Harnblase nach dreißigminütiger Instillation einer

Bild 4: PAA-Spektrum eines methylenblaugefärbten Harnblasentumors. Für den kurzwelligen roten Spektralbereich tritt infolge einer hohen Farbstoffkonzentration Sättigung ein.

(— — — normiert auf Maximum der 37-Hz-Kurve)



Dipl.-Phys. Karsten KÖNIG
Sektion Physik
Friedrich-Schiller-Universität
Max-Wien-Platz
Jena, 6900

hochprozentigen Methylenblaulösung und anschließender aqua-dest-Spülung. Eine japanische Arbeitsgruppe /5/ fand nach einer derartigen Methylenblau-Applikation bei Patienten eine Korrelation der Färbung der Tumore und dem Grading, so daß auf eine konzentrationsabhängige Anlagerung geschlußfolgert werden kann.

Bild 4 zeigt das PAA-Spektrum eines Methylenblau gefärbten Harnblasentumors eines sechzigjährigen Patienten. Die Farbstoffkonzentration ist so hoch ($c > 10^{-3}$ M), daß für den kurzwelligen Teil des roten Spektralbereiches Sättigung eintritt. Der Sättigungsbereich ($\mu_a < \mu_{th}$) kann durch die Wahl geringerer thermischer Diffusionslängen (höhere Chopperfrequenz) eingeengt werden.

tion is demonstrated on the example of adding the photosensitizer "methylene blue" to tumour tissues. It is shown that it is possible to determine the position and the concentration of phar-maca on (film of methylene blue) and inside optically thick tissues within the thermal diffusion length. The possibility of a tumour-selective addition of further photosensitizers is at present examined.

Literatur

- /1/ Rosenzweig, A., und Gersho, A.: Theory of the photoacoustic effect with solids. *Journal of Applied Physics* 1 (1976), S. 64-69
- /2/ Giese, K.; Nicolaus, A.; Sennheim, B., und Kölmel, K.: Photoacoustic in vivo study of the penetration of sunscreen into human skin. *Can. J. Phys.* 6 (1980), S. 1139
- /3/ Doiron, D. R., und Gomer, C. J.: Porphyrin Localization and treatment of tumors. *Liss. N. Y.*, 1983
- /4/ König, K.; Bockhorn, V.; Dietel, W., und Schubert, H.: Photochemotherapy of animal tumors with the photosensitizer Methylene Blue using a krypton laser. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 113 (1987), S. 301-303
- /5/ Fukui, I.; Yokokawa, M.; Mitani, G.; Ohwada, F.; Wakui, M.; Washizuka, M.; Tohma, T.; Igarashi, K., und Yamada, T.: In vivo staining test with Methylene Blue for Bladder Cancer. *J. Urol.* 130 (1983), S. 252-255

Резюме

Описано измерительное устройство, которое позволяет регистрацию спектров поглощения с применением фотоакустической техники «газовая ячейка» — «микрофон». Использование устройства продемонстрировано на примере присоединения фотосенсибилизатора «метиленовый синий» к опухолевой ткани. Показана возможность определения местоположения и концентрации лекарств на оптически толстой ткани (пленка красителя) и внутри нее в пределах длины тепловой диффузии. В настоящее время ведутся исследования по опухоли-селективному присоединению дальнейших фотосенсибилизаторов.

Summary

A measuring arrangement is described which allows to record absorption spectra, using the photoacoustic gas cell — microphone technique. Its applica-