

3 Material und Methode

3.1 Material

3.1.1 Photosensibilisatoren

3.1.1.1 Toluidinblau-O

Toluidinblau-O (TB-O) ist ein Thiazin, das durch die in Tab. 1 zusammengestellten Eigenschaften gekennzeichnet ist [106, 129, 192, 224, 271]. Die Strukturformel zeigt Abb. 4

Molekülstruktur	hetero-trizyklisch a. die hetero-trizyklische Struktur besitzt zwei ungeladene Stickstoffatome an gleicher Stelle auf beiden Seiten der Kohlenstoffkette b. zwischen den zwei Stickstoffatomen befinden sich konjugierte Doppelbindungen
Farbstoffgruppe	Thiazine
Molekulare Masse	305.83
Absorptionsmaximum	630 nm (in NaCl) 626 nm (in 96% Ethanol)
Chemische Summenformel	$C_{15}H_{16}ClN_3S$
Singulett-Sauerstoffquantenausbeute	0,54

Tab. 1: Eigenschaften von Toluidinblau-O (TB-O)

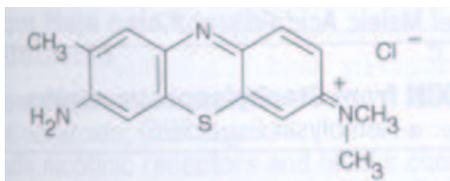


Abb. 4: Strukturformel von Toluidinblau-O (TB-O)

Toluidinblau-O wurde mit einer Konzentration von 10^{-2} oder 10^{-3} Mol entweder in einer Kochsalzlösung 0,9 % oder in 3 % Tylose H₃₀₀ Gel verwendet.

3.1.1.2 Methyleneblau

Das Thiazin Methyleneblau (MB) ist durch die in Tab. 2 aufgeführte Eigenschaften gekennzeichnet [9, 106, 129, 192, 224, 271]. Die Strukturformel zeigt Abb. 5.

Molekülstruktur	hetero-trizyklische Struktur a. die hetero-trizyklische Struktur besitzt zwei ungeladene Stickstoffatome an gleicher Stelle auf beiden Seiten der Kohlenstoffkette b. zwischen den zwei Stickstoffatomen befinden sich konjugierte Doppelbindungen
Farbstoffgruppe	Thiazine
Molekulare Masse	319.9
Absorptionsmaximum	655 nm (in 96 % Ethanol) 664 nm (in NaCl)
Chemische Summenformel	$C_{16}H_{18}ClN_3S$
Singulett-Sauerstoffquantenausbeute	0,55

Tab. 2: Eigenschaften von METHYLENBLAU (MB)

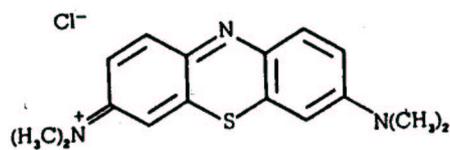


Abb. 5: Strukturformel von METHYLENBLAU (MB)

Methyleneblau (MB) wurde mit einer Konzentration von 10^{-2} oder 10^{-3} Mol entweder in einer 0,9%igen Kochsalzlösung oder in 3%igem Methylcellulose Gel verwendet.

3.1.1.3 Protoporphyrin IX (PPIX)

Protoporphyrin IX (PPIX) ist ein Porphyrin, das durch die in Tab. 3 zusammengestellten Eigenschaften gekennzeichnet ist [57, 106, 241]. Die Strukturformel zeigt Abb. 6.

Molekülstruktur	Tetrapyrrolring bestehend aus Kohlenstoff, Stickstoff und Wasserstoffatomen
Farbstoffgruppe	Porphyrine
Molekulare Masse	562,68
Absorptionsmaximum	625 nm
Chemische Summenformel	$C_{34}H_{34}N_4O_4$
Singulett-Sauerstoffquantenausbeute	0.56

Tab. 3: Eigenschaften von Protoporphyrin IX (PPIX)

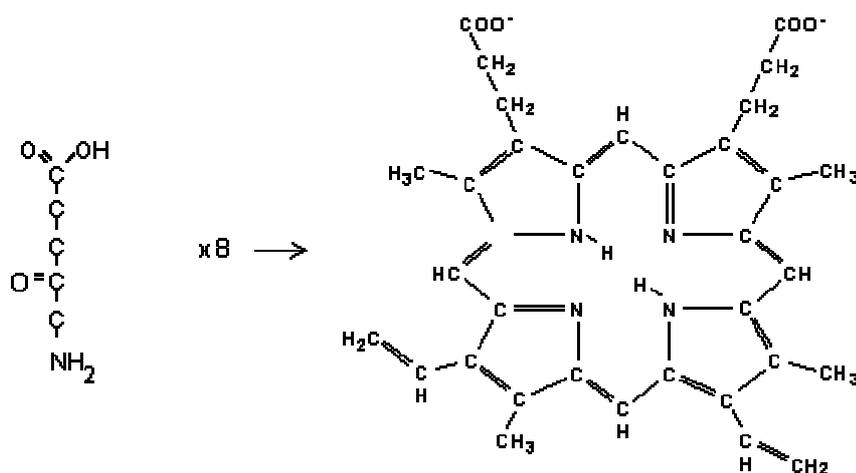


Abb. 6: Strukturformel von PPIX. Im Rahmen des Häm-Synthesesyklus wird aus acht Molekülen 5-ALA ein PPIX-Molekül synthetisiert.

Der Precursor 5-Aminolävulinsäure wurde als 30% in 3%igem H₃₀₀ Tylose-Gel oder als 0,6%ige Lösung in Wasser appliziert.

3.1.2 Lichtquellen

Der **Laser** (**L**ight **A**mplifikation by **S**timulated **E**mission of **R**adiation) ist eine Lichtquelle, die monochromatisches, kohärentes und kollimiertes Licht mit hoher Leistung abgeben kann.

Unter kohärentem Licht versteht man den sowohl zeitlich als auch räumlich phasengleich verlaufende Wellenzüge (Abb. 7)

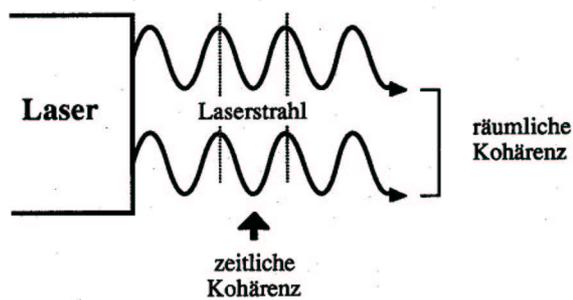


Abb. 7: Kohärentes Licht [54]

Bei kollimiertem Licht verlaufen Lichtstrahlen als Strahlenbündel nahezu parallel und weiten sich auch bei großen Entfernungen nur wenig auf (Abb. 7).

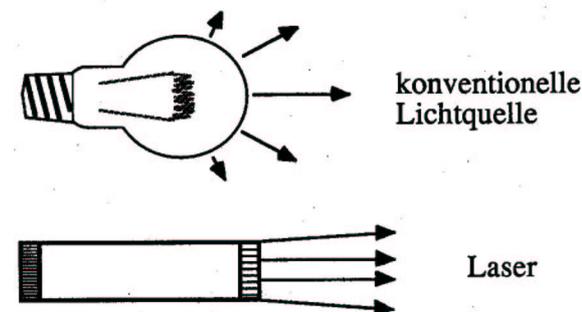


Abb. 8: Kollimiertes Licht [54]

Wenn alle Wellenzüge die gleiche Wellenlänge d. h. die gleiche Frequenz bzw. Energie „Farbe“ des Lichtes aufweisen, spricht man von monochromatischem Licht (Abb.9) [54].

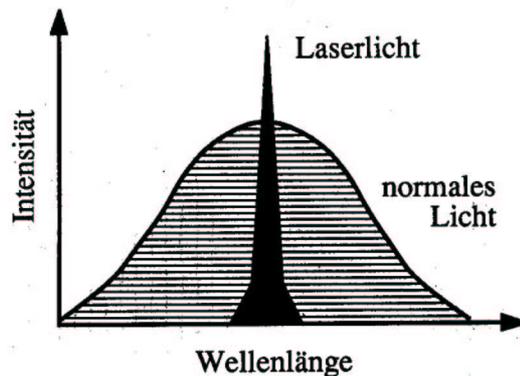


Abb. 9: Spektrale Unterschiede zwischen kohärentem und nicht kohärentem Licht [54]

Durch Zuführung von Energie (z. B. optischer Energie in Form einer Blitzlampe oder elektrischer Energie in Form von Strom) werden Elektronen in einem Lasermedium in einen angeregten Zustand überführt. Diese induzieren die Emission von Photonen. Die freigesetzten Photonen (Lichtquanten) werden über einen Resonator verstärkt. Die ausgesandten Lichtquanten besitzen dieselbe Wellenlänge, Richtung und Phase.

Ein Laser besteht aus einem aktivem Medium, in dem eine induzierte Emission von Photonen hervorgerufen werden kann, einer Pumpquelle als Energielieferant für diesen Effekt und einem Resonatorsystem aus Spiegeln, das diesen Effekt verstärkt. Die Wirkung der Laserenergie wird von verschiedenen Faktoren bestimmt:

1. Von den optischen Eigenschaften des bestrahlten Gewebes z. B. Reflexion, Absorption, Transmission oder Streuung.
2. Von der Wellenlänge der emittierten Strahlung - diese reicht von energiearmer Strahlung im Infrarotbereich bis zu energiereicher Strahlung im ultravioletten Spektralbereich.

3. Von der erreichbaren Energieflächendichte pro Zeit = Leistungsdichte (Abb. 10)

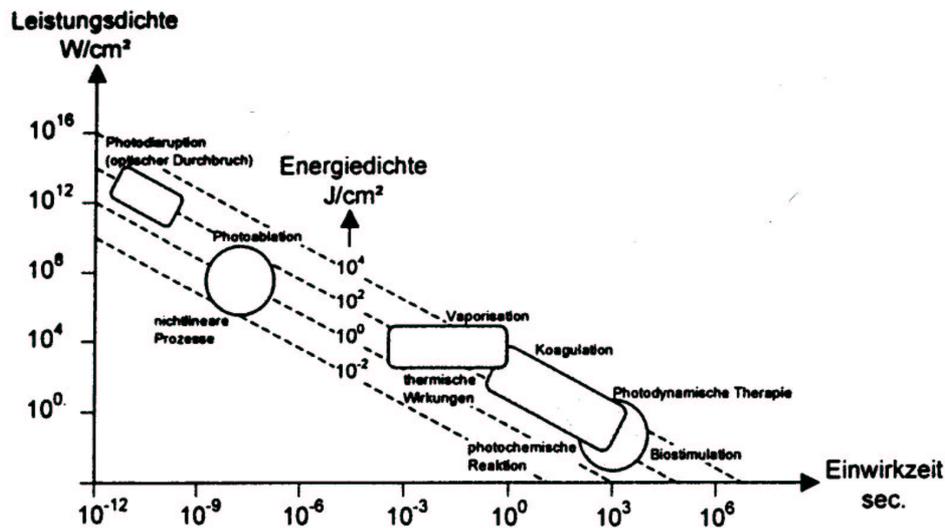


Abb. 10: Gewebewirkungen in Leistungsdichte-Einwirkzeit-Abhängigkeit [54]

3.1.2.1 PDT-Laser

Im Bereich niedriger Leistungs- bzw. Energiedichten ($0,1-100 \text{ mW/cm}^2$) sind im Wesentlichen photochemische Prozesse wirksam. Hierbei führt die Absorption von Licht primär nicht zu einer Erwärmung des Gewebes. Diese durch athermische Laserapplikation erzeugten Effekte in biologischen Materialien werden als „laserinduzierte Biostimulation“ bezeichnet [3].

Unter Einsatz von Photosensibilisatoren kann man diese Laser als Lichtquelle für die PDT benutzen. Auch bei diesen Lasern können mit höherer Leistungs- bzw. Energiedichte photothermisch induzierte Effekte auftreten. Als PDT-Laser werden die folgenden Lasertypen verwendet.

3.1.2.1.1 Farbstofflaser

Beim Farbstofflaser wird ein geeignetes organisches Molekül, z. B. Rhodamin 6-G in einer Lösung zum Lasern gebracht.

Hierbei muss die Farbstofflösung durch optisches Pumpen mit einer Blitzlampe (Blitzlampen-gepumpter Farbstofflaser) oder Laserlicht von einem Festkörperlaser (z. B. KTP-gepumpter Farbstofflaser, Argon-Ion gepumpter Farbstofflaser oder Excimer-gepumpter Farbstofflaser) zum Laserprozess angeregt werden.

3.1.2.1.1.1 Blitzlampen-gepumpter Farbstofflaser

Bei einem Blitzlampen-gepumpten Farbstofflaser wird der Laserstrahl durch eine direkte Anregung mit einer Blitzlampe (Abb. 11) erzeugt.

In dieser Untersuchung wurde das System Photognost der Firma Baasel (München) eingesetzt.

Die Eigenschaften dieses Systems waren [Tab.4]:

Lichtquelle	Blitzlampen-gepumpter Farbstofflaser
Wellenlänge	633 nm
E/pulsmax	1 J/Pulse
Pulslänge	80 μ s
Frequenz	1 bis 10 Hz
Leistung max	10 W
Mode	Gepulst
Zielstrahl	Diodenlaser
Zielstrahl Wellenlänge	670 nm
Leistung des Zielstrahls	0,5 mW
Kühlungssystem	Wasser

Tab. 4: Blitzlampen-gepumpter Farbstofflaser (Photognost, Baasel) geeignet für PPIX (ALA), TB-O

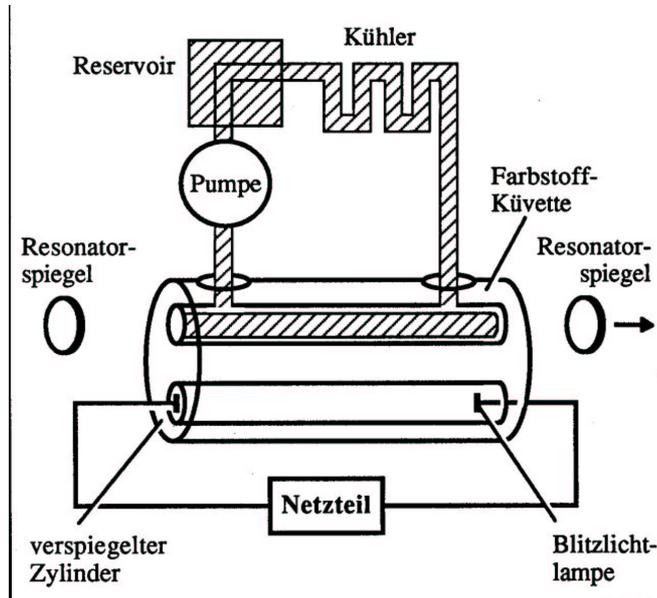


Abb. 11: Aufbau eines Blitzlampen-gepumpten Farbstofflasers [32]

3.1.2.1.1.2 KTP-gepumpter Farbstofflaser

In dieser Arbeit wurde das System Series 600 der Firma Laserscope (USA) eingesetzt. Die Eigenschaften dieses Systems waren [Tab. 5]:

Lichtquelle	KTP-gepumpter Farbstofflaser
Wellenlänge	633 nm
Leistung max	7 W
Mode	kontinuierlich (quasi-cw)
Zielstrahl	KTP
Zielstrahl Wellenlänge	532 nm
Leistung des Zielstrahls	5 mW
Kühlungssystem	Wasser

Tab. 5: KTP-gepumpter Farbstofflaser (Laserscope, 800/600 series), geeignet für PPIX (ALA), TB-O

3.1.2.1.2 Diodenlaser

Bei Dioden-Lasern werden Halbleiterkristalle als aktives Medium verwendet, die bei Anregung kohärente Strahlung im VIS- oder IR-Bereich emittieren [123].

Bei diesen Lasern werden direkt durch elektrischen Strom Photonen erzeugt [54].

In dieser Arbeit wurden 2 Diodenlaser eingesetzt.

Diese Lasersysteme sind durch die folgenden Eigenschaften gekennzeichnet [Tab. 6, 7]:

Lichtquelle	Dioden
Wellenlänge	670 nm (± 5)
Leistung max.	100 mW
Mode	Cw
Zielstrahl	Dioden
Zielstrahl Wellenlänge	670 nm
Leistung des Zielstrahls	<5 mW
Kühlungssystem	Luft

Tab. 6: Diodenlaser (Mustang bio, Technika, Russland), geeignet für MB.

Lichtquelle	Dioden
Wellenlänge	665 (± 5)
Leistung max.	8 W
Mode	a. cw b. getaktet (einzelne Pulse 0.1-999.9 sec oder 99:59 min:sec)
Zielstrahl	Diodenlaser
Zielstrahl Wellenlänge	670 nm
Leistung des Zielstrahls	3 mW
Kühlungssystem	Luft

Tab. 7: Diodenlaser (AOC PDT 665-8, AOC Medical Systems, USA), geeignet für MB

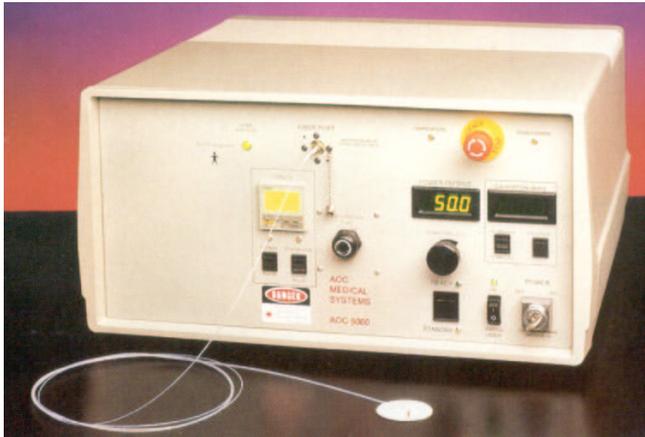


Abb. 12: Foto Diodenlaser (Model AOC PDT 665-8) [10]

3.1.2.2 Thermische Laser

Auf dem Gebiet der medizinischen Laser sind prinzipiell die Laser hoher Leistungsdichte von den Lasern niedriger Leistungsdichte - die so genannten Soft-Laser- zu unterscheiden. Bei den Lasern hoher Leistungsdichte wird die thermisch-destruierende Wirkung von Laserlicht mit sehr hoher Leistungsdichte (bis zu $1\text{MW}/\text{cm}^2$) ausgenutzt. Je nach verwendetem Lasertyp und realisierter Leistung erreicht man eine Koagulation, Karbonisierung oder Vaporisation des bestrahlten Gewebeabschnittes [22].

Für die thermische Wirkung ist die Umwandlung der im Licht enthaltenen Energie in Wärme notwendig. Die Ausbreitung der Wärme im Gewebe hängt unter anderem von der Expositionszeit ab (Abb.10).

3.1.2.2.1 CO₂-Laser

Der thermische Laser, der in dieser Arbeit ausschließlich verwendet wird, ist der CO₂-Laser.

Der CO₂-Laser ist ein Gaslaser mit einem Gemisch aus CO₂ und Stickstoff. Seine Hauptemissionswellenlänge beträgt 10.600nm. Die Strahlung des mittleren Infrarots besitzt eine vollständige Absorption im Wasser, so dass fast die gesamte Strahlung unmittelbar an der Oberfläche absorbiert und in Wärme umgewandelt wird [22]. Als Übertragungssysteme für die Laserstrahlung werden medizinisch entweder der Spiegelgelenkarm oder teilweise flexible Hohlwellenleiter eingesetzt.

Seine Strahlung aber wird in der Regel über ein System von Röhren, die über Gelenke miteinander verbunden sind (Spiegelgelenkarm), weitergeleitet. Im Bereich des Gelenkes dient ein Spiegel zur Strahlenlenkung. Am Ende des Spiegelgelenkarmes befindet sich in der Regel ein Handstück mit fokussierenden Linsen oder Linsensystemen.

3.1.2.2.2 Nd:YAG-Laser

Ein weiterer typischer Vertreter für thermische Laser ist der Nd:YAG-Laser. Dieser Festkörperlaser emittiert Licht im nahen infraroten Wellenlängenbereich. Die Hauptwellenlänge liegt bei 1064 nm und wird deutlich stärker im Blut als im umliegenden Gewebe absorbiert [22]. Der Nd:YAG-Laser wurde in dieser Arbeit jedoch nicht verwendet.

3.1.3 Applikationssysteme

Die Übertragung von Laserstrahlung wird durch Applikationssysteme ermöglicht. Applikationssysteme sorgen für die gewünschte Strahlgeometrie am Applikationsort und ermöglichen nicht zuletzt die einfache Handhabung der Laserstrahlung zur Therapie. Teil des Applikationssystems ist die Lichtleitfaser [70]. Zur Einkopplung

in eine Glasfaser wird das aus dem Resonator austretende Strahlenbündel bzw. der Primärstrahl des Lasers auf das Faserende fokussiert (Abb. 13). Die Brennweite f der Einkoppellinse und der Durchmesser des Laserstrahls bestimmen den Einkoppelwinkel ϵ_0 , in dem die Strahlung in den Lichtleiter eintritt: $\text{tg}\epsilon_0 = d_0/2f$ [70]. Die Abstrahldivergenz der Lichtleitfaser ist durch die Art der Einkopplung in die Faser am Laserkopf und durch die numerische Apertur (Sinus des Öffnungswinkels) der Faser selbst bestimmt. Eine höhere Divergenz ermöglicht einen breiteren Abstrahlwinkel [70].

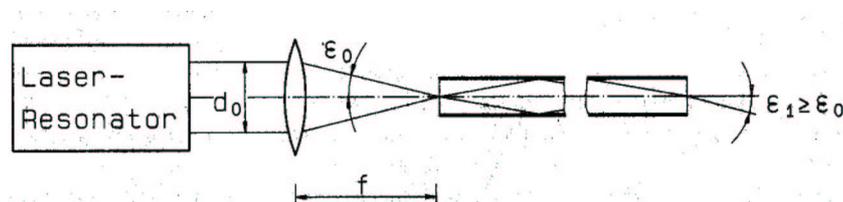


Abb. 13: Einkopplung der Laserstrahlung in einer Glasfaser [70]

In dieser Untersuchung wurden folgende Applikationssysteme angewendet:

3.1.3.1 Bare fiber

Eine bare fiber ist eine frisch gebrochene am Faserende „nackte“ Faser, die vielfältig medizinisch eingesetzt werden kann [20]. Die Laserstrahlung tritt bei einer Faser mit 600 μm Kerndurchmesser unter einem Divergenzwinkel von 8-10 Grad aus. Mit anderen dünneren Kerndurchmessern (z. B 400 μm) treten größere Divergenzwinkel auf.

3.1.3.2 Microlens-Fasern

Mit Microlens-Fasern (Abb.14), bei denen eine Linse fest am Faserende aufgeklebt ist, lässt sich ein Strahlanteil mit höherer Divergenz als mit der bare Fiber erreichen. Auch im Fernfeld resultiert daraus eine gleichmäßige, homogene Ausleuchtung des

bestrahlten Feldes, was insbesondere für die Dosimetrie bei der Photodynamischen Therapie wichtig ist [22]. Diese Faser produziert einen scharf abgegrenzten Lichtpunkt mit homogener Intensitätsverteilung.

Diese Eigenschaften machen die Microlens zu einem idealen Werkzeug für die präzise Bestrahlung einer Reihe von oberflächigen Tumoren für die PDT [248].

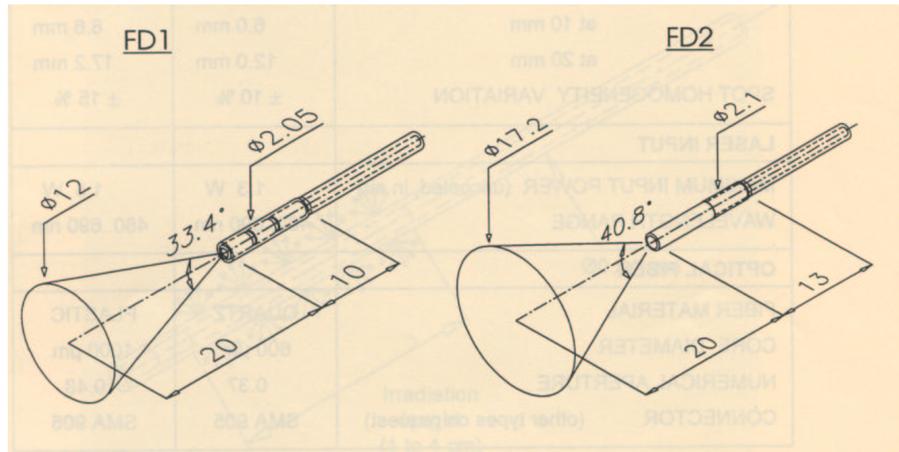


Abb. 14: Microlens-Faser [174]

3.1.3.3 Fokussierhandstück (FH)

Sowohl an einen Spiegelgelenkarm als auch an einer Faser lassen sich Fokussierhandstücke (FH) anschließen. Auch mit einem FH (Abb. 15, 16) lässt sich eine definierte Bestrahlungsfläche einstellen, wobei in der Regel ein FH aufgrund seiner optischen Charakteristiken eine größere Distanz zum Objekt benötigt als die Microlens-Faser. Der Fokus lässt sich durch Abstandsänderung des Handstückes von der Gewebeoberfläche variieren. Aufwendige Linsensysteme realisieren weitestgehend homogene Leistungsdichteverteilungen in der optischen Abbildung.

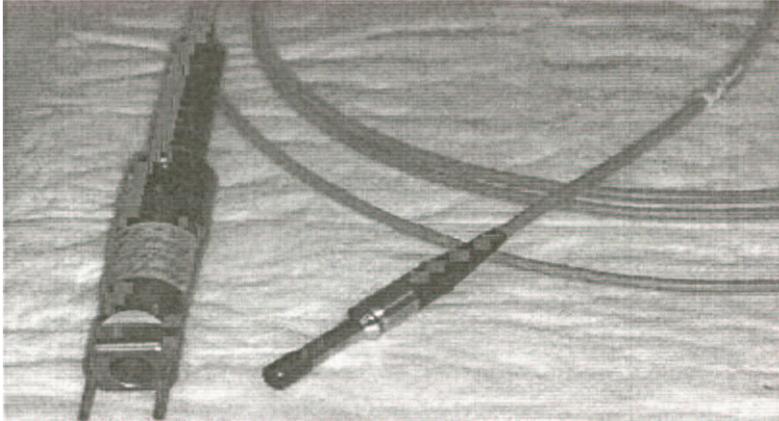


Abb. 15: Fokussierhandstück (Photognost). Der Laser-Applikator besteht aus einem Lichtwellenleiter mit einem Durchmesser von 600 μm .

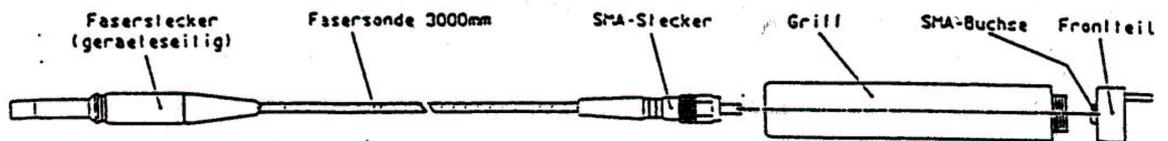


Abb. 16: Fokussierhandstück (Photognost)

3.1.3.4 Isotrope Applikatoren verschiedener Länge

3.1.3.4.1 Zylindrische Applikationssysteme

Sie stellen Systeme zur zylindrischen Applizierung von Laserlicht für die Photodynamische Therapie und interstitielle Therapie dar.

Der Applikator (LightsticTM 360° diffusor faser, Laserscope), (Abb. 17) besteht aus dem eigentlichen Lichtleiter (Faserkerndurchmesser 0,4 mm, Länge 12 m, SMA 905 Einkopplung laserseitig) und dem zylindrischen Lichtapplikator. Dieser besteht aus einem Spezialkunststoff (Patent) mit eingefügten Streukörpern. Diese homogenisieren das über die Faser in den Applikator eingestrahlte Licht und

verteilen es gleichmäßig in einem 360°-Winkel radiär zur Achse des Applikators. Unterstützt wird dies durch eine Verspiegelung der Frontflächen, die den Lichtaustritt nach vorne verhindert und das Licht in den Applikator reflektiert. Auch dieses reflektierte Licht wird letztlich in einem 360°-Winkel abgestrahlt.

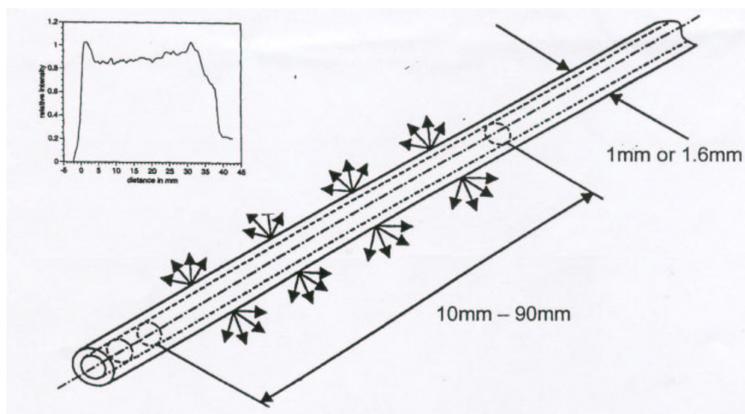


Abb. 17: Zylindrische Applikationssysteme [174]

3.1.3.4.2 Hemizylindrische Applikationssysteme

Diese Applikatoren entsprechen den 180°-Lightstics™ (Lightstic™ 180° diffusor faser, Laserscope). Bei dem hemizylindrisch abstrahlenden Applikator ist zusätzlich der halbe Umfang des Applikators durch eine Goldfolie verkleidet. Durch diese Folie wird das Licht auf die gegenüberliegende Seite reflektiert.

3.1.4 Spektralphotometer

Zur Erstellung der Absorptionsspektren wurde ein UV/VIS -Spektrometer (UV-160 Shimadzu, P/N 204-04550) verwendet. Dieses für Messungen im Wellenlängenbereich von 190-1100 nm geeignete Zweistrahlphotometer verfügt über eine interne Mikrocomputerelektronik, die das Arbeiten mit verschiedenen vorprogrammierten Messmethoden erlaubt.

Als Lichtquelle dienen vorjustierte Deuterium- und Tungsten-Halogenlampen mit automatischem Lampenwechsel, als Monochromator fungiert ein holographisches Konkavgitter. Die Messdaten werden intern zu Grafiken aufbereitet, die anschließend über einen Plotter ausgedruckt werden können.

Für die spektralphotometrischen Messungen wurden Küvetten aus Quarzglas verwendet.

Die Konzentrationen der Farbstoffe in den NaCl-Lösungen für die spektrophotometrische Messungen betragen für alle Proben 10^{-5} Mol.

3.1.5 UMSP-Mess-System

Das UMSP (Universal **M**ikroskop-**P**hotometer, Carl Zeiss) ist ein Mess-System, das die Transmissionseigenschaften einzelner Objekte im Durchlicht messen kann.

Das UMSP 50 ist mit einem Gittermonochromator ausgestattet.

Als Lichtquelle dienten je nach Wellenlängenbereich unterschiedliche Lichtquellen (HAL 100, Wellenlängenbereich 400-2200 nm, XB075, Wellenlängenbereich: 380-780 nm). Die gewünschte Wellenlänge wurde mit Hilfe eines Gittermonochromators (Monochromator 1: Wellenlängenbereich 230-1050 nm) eingestellt. Die Detektion des transmittierten Lichtes erfolgte mit zwei ebenfalls in verschiedenen Wellenlängenbereichen arbeitenden Photometern. (TYP: PMT für den Spektralbereich 230-850 nm und Typ PbS für den Spektralbereich 600-2100 nm).

3.1.6 Axiophot-Mikroskop

Für die mikroskopische Untersuchungen wurde ein Durchlichtmikroskop (Axiophot, Zeiss, Jena) verwendet, bei dem im durchfallenden Licht beobachtet wird. Es war mit einer Mikroskop-Kamera (MC 80) und einer automatisierenden Belichtungssteuerung ausgestattet.

3.1.7 Präparate

Die Proben für Penetrationsuntersuchungen mit dem Axiophot waren: 6 Biopsien von normaler Mundschleimhaut aus operativen Entfernungen von dritten Molaren, 2 Fibrome, 2 Leukoplakien, 4 Condylomata acuminata (Tab. A1).

Die verwendeten Proben für Penetrationsuntersuchungen mit dem UMSP waren: 2 Leukoplakien, 3 Condylomata acuminata (Tab. A1).

3.2 Methode

3.2.1 Spektralphotometrische Untersuchungen

Zur Ermittlung der Photobleachingeffekte im Wellenlängenbereich 500-800 nm wurden die Absorptionseigenschaften der Farbstoffe TB-O und MB in einer Kochsalzlösung 10^{-5} Mol vor und nach Bestrahlungen spektralphotometrisch ermittelt. Das Absorptionsverhalten der bestrahlten Lösungen wurde in Kooperation mit der Apotheke im Krankenhaus Neukölln mit einem Spektralphotometer (UV/VIS-Spektrometer UV-160, Shimadzu (P/N 204-04550)) untersucht. Bei der Absorptionsphotometrie wird die Lichtschwächung bei Durchstrahlung eines Objektes wellenlängenselektiv gemessen.

Der Absorptionskoeffizient kennzeichnet die Fähigkeit eines Moleküls, Energie zu absorbieren und ist abhängig von der jeweiligen Verbindung (chemische Struktur des Moleküls) sowie von der Wellenlänge des einfallenden Lichtes.

Grundlage dieser photophysikalischen Zusammenhänge ist das Lambert-Beer'sche-Gesetz:

$$E = \log I_0/I = e \cdot c \cdot d$$

E.....Extinktion

I_0Intensität des einfallenden Lichtes

I.....Intensität des transmittierten Lichtes

e.....molekulare Extinktionskoeffizient

c.....Konzentration in Mol/Lit

d.....Schichtdicke

$\log I_0/I$ wird als Extinktion E oder optische Dichte [93] bezeichnet. Die Angabe des Wertes für die Absorption erfolgt ohne Einheiten, da nur der Quotient von Relevanz ist .

Für die spektralphotometrischen Untersuchungen wurden die Proben nach dem folgendem Schema vorbereitet:

Für die Bestrahlung wurden Probengefäße aus Glas mit einer Höhe von 4,5 cm und Innendurchmessern von 2,5 cm benutzt. Es wurden 22 Proben mit 2 ml einer 10^{-5} Mol Lösung von Methylenblau und 44 Gefäßproben mit 2 ml einer 10^{-5} Mol Lösung von Toluidinblau - O in 0,9 % NaCl-Lösung vorbereitet.

Die Farbstofflösungen wurden in die mit Aluminiumfolie umhüllten Probengefäße unter Lichtschutz abgefüllt. Jeweils 11 Proben wurden einem Versuch zugeordnet, 10 Proben bestrahlt, 1 Kontrolle wurde nicht bestrahlt.

Oberhalb des Bestrahlungsfeldes wurde die Faser so an einem Stativ befestigt, dass eine Fläche mit dem Durchmesser 2,5 cm an der Basis der Probengefäße ausgeleuchtet wurde. Die Lösungen wurden mit unterschiedlicher Lichtdosis bestrahlt (s. Anhang-Tabelle A2-A3).

Die applizierte Leistungsdichte für den Diodenlaser und den KTP-gepumpten Farbstofflaser war $0,12 \text{ W/cm}^2$, bei einer Leistung von 0,6 Watt und einer Fläche von $4,91 \text{ cm}^2$. Die applizierte Leistungsdichte für den Blitzlampen-gepumpten Farbstofflaser war $0,12 \text{ W/cm}^2$, bei einer mittleren Leistung von 0,6 Watt, Energie von 0,15 J/Puls, einer Frequenz von 4 Hz sowie einer Fläche von $4,91 \text{ cm}^2$.

Als Maß des laserinduzierten Photobleachings wurde die relative Abnahme der Absorption nach der Bestrahlung bei 500-800 nm bestimmt.

3.2.2 Penetrationsmessungen mit dem Axiophot-Mikroskop

Die Penetrationstiefen von TB-O und MB in normaler und veränderter Mundschleimhaut wurden an Gefrierschnitten im Durchlichtmikroskopie untersucht. Die Untersuchung mit dem Axiophot (Carl Zeiss) wurde bei 10-, 20-, oder 40-facher Vergrößerung durchgeführt und die Farbstoffverteilung und die Penetrationstiefe der Farbstoffe fotodokumentiert.

3.2.3 Transmissionsmessungen mit dem UMSP

Die wellenlängenabhängigen relativen Transmissionseigenschaften der in der Untersuchung verwendeten Präparate mit MB und TB-O angefärbtem Gewebe wurden mit einem computergesteuertem (Hewlett Packard TYP 9121) Mikroskop-Photometer (Typ UMSP-80, Carl Zeiss) [108] untersucht.

Die Untersuchungen dienten der Bestimmung der Penetrationstiefe bzw. der Konzentrationsbestimmung der PS (MB+TB-O) im Epithel des Präparates. Mit Hilfe eines computergesteuerten Objektisches wurde jedes Objekt rasterförmig gescannt und die Transmission in einem Querschnitt von 1 µm Durchmesser ermittelt. Es wurde das Messprogramm APAMOS zur Steuerung der Messungen verwendet.

Messprogramm APAMOS

Das APAMOS-Programm (APAMOS = **A**utomatische **P**hotometrische **A**nalyse **M**ikroskopischer **O**bjekte durch **S**canning) ermöglicht die Messung der lokalen Transmission einer beweglichen Probe bei festgelegter Wellenlänge im Durchlicht.

Hierbei wird der Objektisch mittels zweier Schrittmotoren in xy-Richtung bewegt, so- dass ein vorher festgelegter Teil der Probe punktförmig durch den Lichtstrahl geführt wird. Der Abtastvorgang erfolgt kammartig, d. h bei der Messung wird die

Probe stets in einer Richtung ohne Umkehrlose bewegt (Scans). Die Schrittweite zwischen den Messpunkten kann zwischen 0,25 und 31,75 μm in Inkrementen von 4,25 μm gewählt werden. Als Ergebnis der Messung kann eine skalierte XY-Grafik oder eine unskalierte 3D-Darstellung der relativen Transmissionsintensitäten oder deren Kehrwerte auf einem Drucker oder Plotter ausgegeben werden. In der Darstellungen der einzelnen Scans wird der als „absorbance“ bezeichnete Kehrwert der Transmissionswerte dargestellt. Mit diesen Angaben wird der Kehrwert der lokalen Transmission während der Scans gekennzeichnet.

Jede einzelne Messung dauerte maximal zwei Minuten. Die Scans wurden außerhalb des Gewebeschnittes gestartet und gingen auch über den Gewebeschnitt hinaus. Die Einstellungen des UMSP für diese Messungen wurden wie folgt festgelegt:

Durchmesser des Messflecks (Spot)	1 μm
Breite des Messspaltes am Monochromator	20 nm
Schrittweite	10 μm
Objektiv	Ultrafluor 10x (UF 10)
Standard	Objektträger

Tab. 8: Einstellungen des UMSP

Die Einheit μm wird vom Programm in den Ausdrucken mit my angegeben und deshalb auch in der Beschriftung der Abbildungen verwendet.

Vorbereitung der Präparate

Direkt nach der Entnahme der Probe erfolgte die topische Applikation von TB-O (6 Präparate) bzw. MB (4 Präparate). Sowohl TB-O (10^{-3} oder 10^{-2} M) als auch MB (10^{-3} oder 10^{-2} M) wurden einmal (1x) auf die Gewebeprobe für 10 Min appliziert (Tab. A1). 4 Präparate (Kontrollgruppe) wurden ungefärbt gelassen. Das restliche TB-O bzw. MB wurde mit einem Kochsalz-getränkten Tupfer entfernt. Die 14 entnommenen Biopsien wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis

zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt.

Da eine Anreicherung von ALA zur Bildung von PPIX vitales Gewebe erfordert, konnte keine In-vitro-Untersuchung zur Penetrationstiefe durchgeführt werden.

Zur Bestimmung der Penetrationstiefe wurden von den 5x5-mm-Gewebeblöcken, 10- μm -Gefrierschnitte mit einem Mikrotom-Kryostat II angefertigt.

Zur Beurteilung der Penetrationstiefe im Epithel wurden die 14 Gefrierschnitte mit dem folgenden Schema vorbereitet:

Kollektive A: Präparate für die mikroskopische Untersuchung (Axiophot)

Kollektive B: Präparate für die Untersuchung mittels UMSP

Die mikroskopische Untersuchung der 14 Präparate wurde mittels Axiophot vorgenommen (Tab. A1). Die 5 bereits für die Penetrationsmessungen (Axiophot) verwendeten Präparate (Tab. A1) wurden für die Messung mittels UMSP weiter verwendet .

Nach Bestimmung der Penetrationstiefen wurden die Schnitte mit saurer Hämalaun-Lösung nach Mayer angefärbt, um einen sicheren Bezug zwischen der bestimmten Penetrationstiefen und den histologischen Strukturen zu ermitteln. Die Schnitte wurden für 5 Min bei Raumtemperatur nach der Vorschrift von Burck [34] angefärbt.

Nach der Färbung erfolgte die Einbettung in Kaiser`s-Glyceringelatine.

Die Ergebnisse wurden photographisch dokumentiert.

3.2.4 Prinzipien der Photodynamischen Therapie (PDT)

Das Wirkungsprinzip der PDT beruht auf der Energieübertragung von Licht auf einen Photosensibilisator.

Gleichung	Lebensdauer/Zeitkonstante (s)
(1) $^1\text{Sens} + h\nu \rightarrow ^3\text{Sens}^*$	10^{-9}
(2) $^3\text{Sens}^*$	$>10^{-6}$
(3) $^3\text{Sens}^* + ^3\text{O}_2 \rightarrow ^1\text{Sens} + ^1\text{O}_2$	$10^{-6} - 10^4$

Abb. 18: Schema der photodynamischen Reaktion [252]

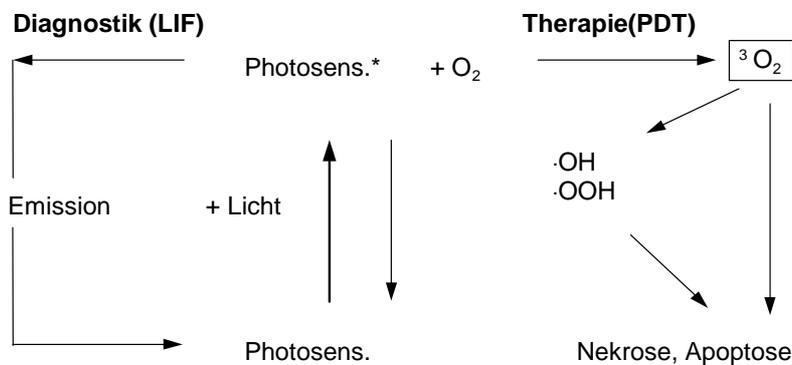


Abb. 19: LIF- und PDT-Mechanismus

Unter Einfluss von Licht und Sauerstoff reagieren die photosensibilisierenden Substanzen nach den in (Abb. 18, 19) angegebenen Reaktionswegen .

Die bei der photodynamischen Therapie eingestrahlenen Photonen $h\nu$ regen den im Gewebe verteilten Photosensibilisator ($^1\text{Sens}$) aufgrund seines für das einfallende Licht hohen Absorptionsvermögens an (Gleichung 1).

Der primäre Schritt ist die Absorption eines Photons durch den Photosensibilisator $^1\text{Sens}$. Aus dem angeregten $^3\text{Sens}^*$ -Zustand heraus sind verschiedene Reaktionsvariante möglich [202]:

- Fluoreszenz
- Strahlungsloser Übergang in den Grundzustand sowie
- Erneute Absorption eines Photons aus dem $^3\text{Sens}^*$ -Niveau

Innerhalb von ns (Abb. 16) geht das angeregte Sensibilisatormolekül gemäß Gleichung (2) in einen metastabilen Triplett-Zustand mit wesentlich längerer Lebensdauer über. Der Aufenthalt im Triplettzustand (im Mikrosekundenbereich) dauert im Vergleich zu anderen Anregungszuständen (im Piko- und Nanosekundenbereich) relativ lange an und bietet deshalb ideale Voraussetzungen als Ausgangspunkt für photochemische Reaktionen, wie z. B. die Anregungsenergie auf ein Sauerstoffmolekül zu übertragen. Die Wechselwirkung zwischen dem Sensibilisator im Triplettzustand und dem molekularem Sauerstoff nimmt bei dem Prozess der Photosensibilisierung eine zentrale Stellung ein [251, 252]. Der angeregte Sauerstoff nimmt den energetisch höheren Singulett-Zustand mit einer relativ langen Lebensdauer an (Gleichung 3).

Der angeregte PS-Molekül im Triplettzustand kann mit dem Sauerstoff im Triplettzustand reagieren und diesen in den angeregten Singulettzustand überführen. Das Grundprinzip des photodynamischen Effekts basiert auf der Bildung von Radikalen und Singulett-sauerstoff. Hierbei sind zwei unterschiedliche Mechanismen zu unterscheiden. Typ I beschreibt eine chemische Reaktion mit Bildung von Superoxid und OH-Radikalen (Abb. 20, 21). Dies ist auch die Reaktion, die bei der Strahlentherapie wegen der hohen Photonenergie auftritt. Bei Typ II handelte es sich um einen reinen Energietransfer von einem angeregten Molekül auf ein anderes Molekül.

Aufgrund der besonderen Konfiguration des Sauerstoffs im Triplettzustand gelingt dies unter der Bildung von Singulett-sauerstoff. Die Generierung von Singulett-sauerstoff spielt bei den photochemischen Reaktionen eine dominierende

Rolle. Dieser aktivierte Sauerstoff löst nun Oxidationen von Molekülen der Zelle, Zellorganellen und Zellmembranen und damit eine Zytolyse aus (Abb. 16).

Die Sauerstoffradikale können die Zellmembranen, Mitochondrien, die Zellkernmembranen zerstören, aber sie können nicht die Doppelhelix der DNA auseinanderbrechen. Das unterscheidet sie besonders von den Typ-I-Radikalen, die diese Eigenschaften besitzen.

Normalerweise ist der Prozess der Singulett-Sauerstoffgenerierung generell katalytisch, d. h. der PS regeneriert sich nach Energieabgabe an den Sauerstoff wieder und steht für einen nächsten Zyklus bereit. Bei hoher Laserenergie oder durch Reaktion mit Radikalen kann es jedoch zu einer direkten Destruktion des Moleküls kommen. Insbesondere die Farbstoffe TB-O, MB und ICG (Indocyanin Green) können schon bei höheren Lichtenergien ausbleichen. Wenn der gesamte Photosensibilisatorvorrat im Gewebe durch den Bleichungsprozess aufgebraucht wurde, wird auch durch weitere Photonen kein Effekt erzeugt, d. h. weitere Belichtung, die den Photosensibilisator ausbleicht, führt nicht zu einer Steigerung der Effektivität.

Untersucht man Photobleaching-Effekte mittels ESR (Elektron Spin Resonanz), so findet bei kontinuierlicher Bestrahlung einer Probe von MB und TB-O zunächst ausschließlich die Generierung von Singulett-Sauerstoff und Sauerstoffradikalen statt. Bereits schon nach einer geringen Gesamtenergie bilden sich Kohlenstoff-zentrierte Radikale, die auf die direkte Zerstörung des Farbstoffs (Photobleaching) unter Bestrahlung hinweisen.

Mit Zunahme der Gesamtbestrahlungsdosis fällt parallel zur Bildung von Kohlenstoff-zentrierten Radikalen die Generierung von Singulett-Sauerstoff ab. Die Lösung hellt auf und wird transparent. Die durch Photobleaching entstandenen Produkte des Farbstoffes sind nicht mehr in der Lage, Singulett-Sauerstoff zu produzieren [5].

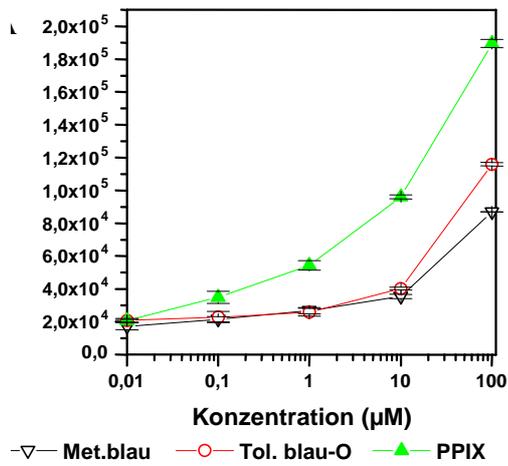


Abb. 20: Generierung von Singulett-Sauerstoff (1A) in Abhängigkeit von der Konzentration des Photosensibilisators [5]

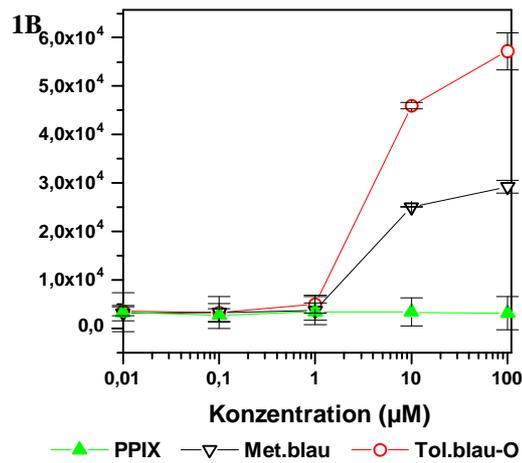


Abb. 21: Generierung von OH-Radikalen (1B) in Abhängigkeit von der Konzentration des Photosensibilisators [5].

3.2.5 Klinische Untersuchung

3.2.5.1 Patientenkollektiv

In dieser Auswertung wurden 14 Patienten mit Leukoplakien, 7 Patienten mit rezidivierender benigner Aphthosis (RBA) und 5 Patienten mit oralem Lichen ruber einbezogen. Diese Patienten wurden direkt wegen individueller Indikationen von der HNO-Abteilung und der Abteilung für Mund-Kieferchirurgie des Krankenhauses Neukölln und von niedergelassenen Ärzten und Zahnärzten zur PDT überwiesen. Der Beobachtungszeitraum betrug 2, 6, 12, 18 und 24 Monate.

Bei Therapieresistenz erfolgte die Anwendung weiterer Methoden (CO₂-Laserexzision bzw. -Vaporisation, Exzision, medikamentöse Behandlung). Die Auswahl der Patienten erfolgte nach folgenden Kriterien (Tab. 9, 10, 11):

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> - Bestehende Leukoplakia simplex -Leukoplakia verrucosa ohne Zeichen maligner Veränderungen (Sicherung durch Biopsie) -Ausreichender mundhygienischer Status -Korrektter Sitz der Prothese bzw. des Zahnersatzes 	<ul style="list-style-type: none"> -Bekannter schwerer Vitaminmangel -Zeichen maligner Veränderungen der Schleimhaut, schwere Dysplasie, Carcinoma in situ

Tab. 9: Leukoplakie: Einschluss- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> - Brennende Schmerzen - Lokalisierte Erosionen in der Mundhöhle - Klinische und histologische Sicherung der Diagnose oraler Lichen planus (Sicherung durch Biopsie) 	<ul style="list-style-type: none"> - Zeichen maligner Veränderungen der Schleimhaut, schwere Dysplasie, Carcinoma in situ

Tab. 10: Oraler Lichen planus: Einschluss- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> - Bestehende aphthöse Veränderungen der Schleimhaut -Ausreichender mundhygienischer Status -Korrektter Sitz der Prothese bzw. des Zahnersatzes 	<ul style="list-style-type: none"> -Konfluierende, nekrotisierende Aphthen -Zeichen maligner Veränderungen der Schleimhaut, schwere Dysplasie, Carcinoma in situ -Bekannter schwerer Vitaminmangel, -Bekannte ausgeprägte Eisenmangelanämie -Malabsorptionssyndrom

Tab. 11: Benigne rezidivierende Aphthosis: Einschluss- und Ausschlusskriterien

3.2.5.2 Dokumentation

Anamnese

Bei der ersten Konsultation wurde eine vollständige klinische Anamnese erhoben, die Diagnose gestellt und folgende Daten dokumentiert:

1. Ort der Läsion(en)
2. Größe (Durchmesser) der Läsion(en) in cm
3. Vorbehandlung (nein, ja, welche)
4. Beginn der klinischen Symptome
5. Biopsie; Histologie; Klassifikation der Läsion
6. Klinische Symptome (Brennen, Schwellung, Bläschen, Erosionen, andere)
7. Fotodokumentation

Die Punkte 6 und 7 wurden bei jeder Nachbehandlung/Kontrolle erneut dokumentiert. Aufgrund der klinisch eindeutigen Diagnose konnte bei der Rezidivierende benigne Aphthosis (RBA) auf eine Probeentnahme (Punkt 5) verzichtet werden.

Die Dokumentation erfolgte nach dem Schema der Abb. 22 und der Tab. A4, A5, A6.

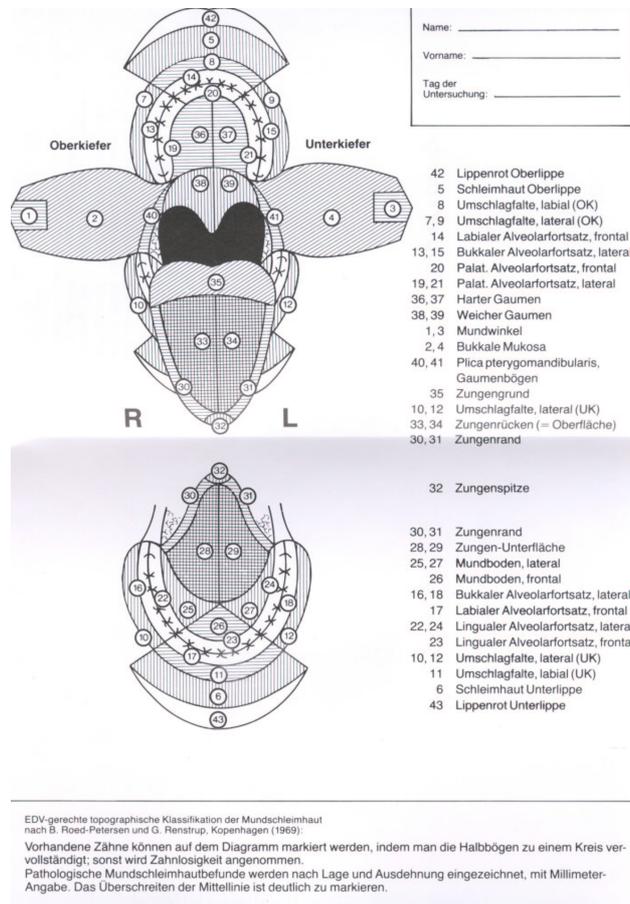


Abb. 22: Dokumentationsbogen [195]

3.2.5.3 Mikrobiologische Tests

Abstriche (Institut für Mikrobiologie und Serologie, Krankenhaus Neukölln) und der Oricult-N Test [13] wurden für den mikrobiologischen Nachweis verwendet. Der Oricult-N Test ist ein Dipslide-Test, der objektiv das Vorkommen von Hefepilzen im Abstrichgebiet registriert. Er besteht aus einem Dip-slide mit Nickerson-Medium.

3.2.5.4 Applikation der PS

Die topische Applikation erfolgte im Bereich der Leukoplakie und paraläsional nach Modifikation des Schemas von Mashberg in folgender Weise [Tab. A7, A8, A9]:

1. Der Patient spülte mit Wasser zweimal für 20 Sek.
- 2a. Der Patient spülte mit 3%iger Essigsäurelösung für 20 Sek. oder
- 2b. Mittels Neurowatte oder Wattestäbchen oder dünner Gazetupfern wurde 3 % Essigsäure auf die Fläche appliziert.
3. Die Flächen wurden gründlich mit Gazetupfern getrocknet, um eine Verdünnung der PS-Lösung oder des PS-Gels zu verhindern.

TB-O-/ MB-Lösung/Gel

4a. Die PS-Lösung oder Gel wurde mehrfach mittels Wattestäbchen, topisch im Bereich der Läsion appliziert.

Zur Klärung der Fragestellung, ob eine verlängerte Einwirkzeit eine verbesserte Wirkung zur Folge hat, wurde die Inkubationszeit von 10 Min. bis 60 Min. variiert.

4b. Bei disseminierten Befunden spülte der Patient mit der MB- oder TB-O -Lösung

Zur Beeinflussung der Speichelsekretion wurde bei einem Patienten Atropin parenteral verabreicht.

5-ALA-Lösung/-Gel

4c. Der Patient spülte für 15 Min. mit der ALA-Lösung (0,6%ige Lösung)

4d. Das ALA-Gel (30 % in 3%igem H₃₀₀ Tylose-Gel) wurde topisch auf jedem Bestrahlungsfeld mittels Neurowatte appliziert. Teilweise bei, aus stärkerem Speichelfluss resultierender, Verdünnung wurde ALA mehrfach appliziert. Die Inkubationszeit zwischen der Applikation und der Bestrahlung betrug 180 Min.

Zum Schutz vor der Bestrahlung während der ALA-PDT wurde die Lippe mit Zinkpaste, Kompressen und Alufolie abgedeckt. Gleichzeitige Kühlung mit CPAC (continuous compressed air cooling) reduzierte die Schmerzen während der ALA-PDT. Am Ende der Behandlung wurde Gelicain (Lidocain)-Gel 2 % auf die behandelte Fläche appliziert und dem Patienten Panthenol-Lösung mitgegeben.

3.2.5.5 Bestrahlungsprotokoll

Es wurde auf der Basis des Excel-Programms eine funktionelle Tabelle erarbeitet. Die Tabelle wurde bei jeder PDT Sitzung aufgerufen und entsprechend der Bestrahlungsfläche die Zeit und die benötigte Leistung ermittelt (Abb.23, Tab. A7, A8, A9).

Für die Berechnung der bestrahlten Fläche A einer Läsion mit einem Radius r während der Bestrahlung wurden folgende Formeln eingesetzt :

- | | |
|---|---------------------------------|
| a.: mit einem zylindrischen Applikator | $A = 2 (\pi r^2) + 2 \pi r l$ |
| b: mit einem hemizylindrischen Applikator | $A = 2 (\pi r^2) + 2 \pi r l/2$ |
| c: mit einer microlens | $A = \pi r^2$ |

Die Leistungsdichte (LD) errechnet sich nach:

$$LD (\text{Watt}/\text{cm}^2) = \text{Leistung (Watt)} / \text{bestrahlte Fläche (cm}^2\text{)}$$

Die jeweils gewählte Dosimetrie ist in der Tabelle A7, A8, A9 zusammengestellt. In der Regel wurde bei einer LD von $0,1 \text{ W}/\text{cm}^2$, eine Gesamtdosis von $100 \text{ J}/\text{cm}^2$ verwendet.

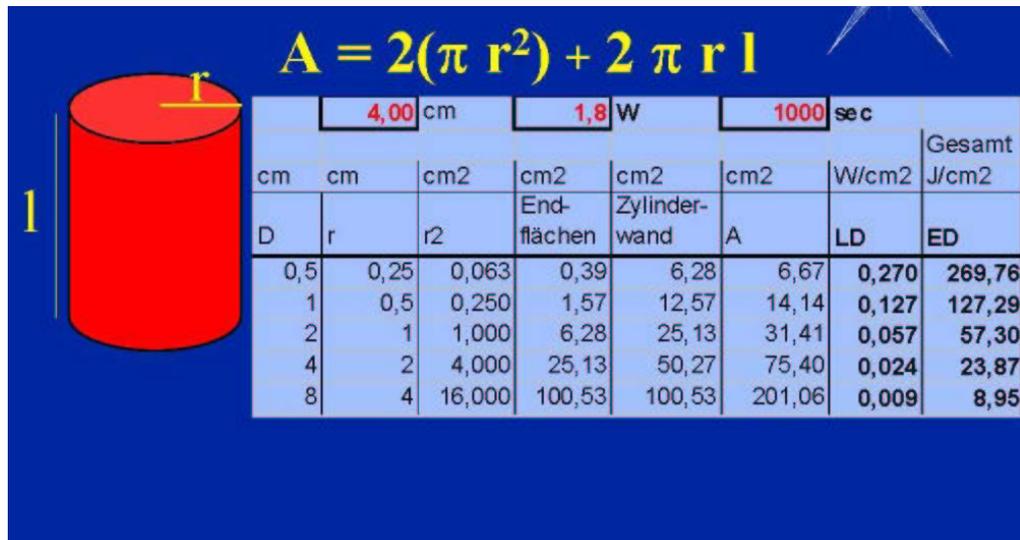


Abb. 23: Bestrahlungsprotokoll mit einem zylindrischen Applikator

3.2.5.6 Auswertung

Bei jeder Kontrolluntersuchung wurden die Symptome dokumentiert:

Die beobachteten Symptome wurden in einer Skala von 0 bis 3 bewertet (Tab.15) und bei jeder Untersuchung wurde der Umfang der Läsionen (Durchmesser) in cm erfasst.

In einem Symptom-Score wurden die Erosionen, die Bläschen, der Schmerz und die Schwellung entsprechend mit einem Faktor 4, 3, 2, 1 multipliziert.

Aus den Symptomen $S_{TBO}/S_{MB}/S_{ALA}$ PDT wurden die Größe $S_{TBO}, S_{MB}, S_{ALA}, S_{CO_2}$ als Symptom-Score wie folgt berechnet:

a=Anzahl der behandelten Patienten

nach TB-O-PDT: S_{TB-O}

nach MB-PDT: S_{MB}

nach ALA-PDT: S_{ALA}

nach CO₂-Laserbehandlung: S_{CO_2}

$S = 1*(1*Schwellung+2*Bläschen+4*Erosionen+3*Schmerz)/a$

Schwellung	Bläschen	Erosionen	Schmerz
0=keine	0= keine	0=keine	0=kein
1=leicht	1=wenige	1= wenige/kleine oberflächliche	1=mild
2=mäßig	2=viele	2= viele/große	2=stark
3=stark	3=viele konfluierende	3=viele tiefe	3=sehr stark

Tab. 12: Klassifikation der Symptome nach der lokalen PDT

Behandlungsergebnis

Bei jeder Kontrolluntersuchung wurde das Behandlungsergebnis nach folgenden Kriterien bewertet:

CCR (Clinical Complete Remission) = ohne Rezidiv

Nachbeobachtungszeitraum der Lokalisation ≥ 6 Monate

Bei der Diagnose Rezidivierende benigne Aphthosis (RBA) war die CCR klinisch (ohne Probeentnahme) zu beurteilen.

NED (No Evidence of Disease) = klinisch ohne Zeichen der Erkrankung

R (Response) = Besserung des Befundes

NR (No Response) = keine Veränderung des Befundes

PD, RD (Progression of Disease), (Recurrence of Disease). = Progression, Rezidiv

Nachbeobachtungszeitraum der Lokalisation ≥ 6 Monate

Patientenbewertung

Das subjective Empfinden der Patienten nach der PDT im Vergleich zu anderen Therapieformen (CO₂-Lasertherapie) wurde ebenfalls bei der ambulanten Kontrolluntersuchung ermittelt. Die Patienten wurden gebeten, zu folgenden Fragen ihre Einschätzung zu geben.

- 1) Belastung durch den Eingriff,
- 2) Besserung der Symptome
- 3) Zufriedenheit mit der Therapie