

Tobias Reuther, Dr. med.
Dr. med. dent.

Tierexperimentelle Untersuchung neuer, makromolekular gekoppelter Photosensibilisatoren für die Anwendung der Photodynamischen Therapie in der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie

Geboren am 03.02.1970 in Kempten/Allgäu
Reifeprüfung am 24.06.1989 in Würzburg
Studiengang der Fachrichtung Zahnheilkunde vom WS 1996 bis SS 2000
Staatsexamen am 03.05.2000 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Mund-Zahn-Kieferheilkunde
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. A.C. Kübler

Trotz einer stetigen Weiterentwicklung der operativen Techniken und der strahlen- wie chemotherapeutischen Therapiekonzepte, konnte die Überlebensrate bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx in den vergangenen Jahrzehnten nicht signifikant verbessert werden.

Daher ist es, neben einer weiteren Verbesserung bereits bestehender Therapieschemata, erforderlich, neue Behandlungsverfahren in die Tumortherapie auf dem Gebiet der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie einzuführen. Diese sollten sowohl verbesserte Heilungsraten bieten, als auch durch eine Schonung von Gewebe- und Organstrukturen dem Erhalt von Funktion und Ästhetik und damit der Lebensqualität der Patienten Rechnung tragen.

So wurde seit Mitte der 80er Jahre die PDT in das therapeutische Spektrum von prämaligen und malignen Neoplasien auf dem Fachgebiet der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie aufgenommen. Da eine Vielzahl von experimentellen und klinischen Studien die Wirksamkeit der PDT auf diesem Indikationsgebiet nachweisen konnten, befassen sich aktuelle Untersuchungen zu diesem Thema mit der Entwicklung und Einführung neuer Photosensibilisatoren mit verbesserter photodynamischer Effektivität.

Die vorliegende Studie befasst sich mit der Etablierung eines geeigneten Tiermodells zur tierexperimentellen Untersuchung der photodynamischen Therapie von humanen Plattenepithelkarzinomen, mit Darstellung, Charakterisierung und dem Vergleich der photodynamischen Wirkung von Photosensibilisatoren der ersten, zweiten und der dritten Generation. Dies soll einen Beitrag zur Einführung neuer, geeigneter Photosensibilisatoren zur Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie darstellen.

Die Arbeitshypothese geht von einem photodynamischen Effekt in Form einer Reduktion des Tumolvolumens, des Erreichens einer Tumorremission oder Verlangsamung der Tumorstadiumsgeschwindigkeit durch die untersuchten Photosensibilisatoren der ersten, zweiten und der dritten Generation aus. Für die gekoppelten PS der dritten Generation werden deutliche Vorteile in der Wirkung, in der Tumorselektivität und in den Nebenwirkungen angenommen.

Ergebnisse der Tierexperimente

Als Wirtstiere für die Transplantation von humanen Tumorzelllinien kommen auch andere immunsupprimierte Mausstämme (z.B. Swiss-Nackt- bzw. SCID-Maus) in Frage. Ausführliche Voruntersuchungen mit verschiedenen Tumorzelllinien und Mausstämmen zeigten jedoch, daß die RAG-2-Maus mit 92,5% die höchste Tumorangehrate und das konstanteste Wachstumsverhalten aufwies.

Bei einer Dosierung des Photosensibilisators Photofrin II von 10 mg/kg Körpergewicht, einer Aktivierungsenergie von 100 J/cm² und einer Inkubationsdauer von 72 Stunden (Gruppe 3) konnten bei 30% der therapierten RAG-2-Mäuse (3 Tiere) histologische Tumorremissionen erzielt werden. Die Reduktion der Tumorumfänge in dieser Versuchsgruppe war signifikant grösser gegenüber der Kontrollgruppe. Bei einer Inkubationsdauer von 24 Stunden und identischen Therapieparametern (Gruppe 2) waren die systemischen Nebenwirkungen jedoch zu hoch (Exitus aller Tiere).

Unvorteilhaft stellte sich bei diesem Photosensibilisator die lange Bestrahlungsdauer mit hoher Belastung der Versuchstiere auf Grund der hohen Aktivierungsenergie und die ausgeprägte Narbenbildung dar, die bei allen überlebenden Mäusen in Versuchsgruppe 3 zum Funktionsverlust des Hinterlaufs führte.

Alle Versuchsgruppen mit freiem m-THPC zeigten Tumorremissionen und deutliche Reduktionen der Tumorumfänge. Im Vergleich der mit m-THPC therapierten Versuchsgruppen ist der Therapieeffekt bei einer PS-Konzentration von 0,8 mg/KG Körpergewicht und 24 stündiger Inkubationszeit (Gruppe 5) am deutlichsten. Hier zeigte ein Versuchstier nach 44 Tagen eine histologische Tumorremission. Rezidive wurden ab dem 20. bis 24. posttherapeutischen Tag in allen Versuchsgruppen beobachtet.

Alle mit m-THPC therapierten Versuchstiere liessen bei Ansprechen der Behandlung eine nur geringe Vernarbung bei voller Funktionstüchtigkeit der Hinterläufe erkennen. Systemische Nebenwirkungen in Form eines bestrahlungsbedingten Exitus waren selten.

Für die gekoppelten Photosensibilisatoren m-THPC-PEG, TCPP-HSA und Bacteriochlorin-PEG konnte weder hinsichtlich des Erreichens einer Tumorremission noch im Hinblick auf eine Reduktion der Tumorumfänge ein positiver Therapieeffekt gezeigt werden.

Bei den Therapiegruppen 15 und 16 mit dem Photosensibilisator m-THPCnPEG (m-THPCnPEG-Dosis 0,4 mg/kg Körpergewicht, Aktivierungsenergie 10J/cm², Inkubationsdauer 24 bzw. 120 Stunden) war die Zeit bis zum Erreichen der Tumorremissionen kürzer gegenüber den Versuchsgruppen mit freiem m-THPC und Photofrin II (signifikant bei Gruppe 15 gegenüber Gruppe 3 und 4). Komplette Tumorremissionen am Ende der Beobachtungszeit wurden nicht beobachtet. Rezidive traten in allen Versuchsgruppen wieder ab dem 10. bis 12. posttherapeutischen Tag auf. Bei Gruppe 18 (m-THPCnPEG-Dosierung 1,2 mg/kg Körpergewicht, Aktivierungsenergie 10J/cm², Inkubationsdauer von 120 Stunden) zeigte sich gegenüber der Kontrolle eine signifikante Reduktion der Tumorumfänge am Tag 44 nach Therapie. Bei Versuchsgruppe 17 verstarben alle Mäuse 2-3 Tage nach Therapie.

Schlussfolgerungen

Das im Rahmen dieser Studie eingesetzte RAG-2-Mausmodell erwies sich als zuverlässig und gut reproduzierbar. Die Zellkultivierung in vitro zeigte sich relativ wenig aufwendig und für die Fragestellung praktikabel. Somit erscheint das vorgestellte Modell für tierexperimentelle Untersuchungen mit dem Plattenepithelkarzinom als sehr gut geeignet.

Der bisher weltweit einzige zur PDT zugelassene Photosensibilisator Photofrin II hat im Tierexperiment auf humane Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle einen deutlichen therapeutischen Effekt. Allerdings fallen die Nachteile von Photofrin II wie hohe Aktivierungsenergie mit konsekutiv langer Bestrahlungsdauer, hohe PS-Dosierungen, geringe Lichtpenetranz auf Grund der relativ kurzen Aktivierungswellenlänge und geringe Tumorselektivität mit langer und ausgeprägter systemischer Sensibilisierung und starker Vernarbung ins Gewicht.

Der Therapieeffekt mit dem Photosensibilisator m-THPC war ebenfalls deutlich ausgeprägt, wobei sich Inkubationszeiten von 24 Stunden als besser wirksam erwiesen als solche von 120 Stunden. Unter Verwendung von m-THPC wurden weniger definitive Tumorremissionen beobachtet als bei Applikation von Photofrin II, was unter Berücksichtigung der grösseren Therapietiefe von m-THPC wegen seiner besseren Lichtpenetranz des zu therapierenden

Gewebes durch die grössere Aktivierungswellenlänge überraschend war. Hier sind weitere in vivo und in vitro Experimente zur Optimierung der Dosierungs- und Bestrahlungsparameter durchzuführen.

Die Vorteile des m-THPC gegenüber Photofrin II lagen in seiner geringeren Aktivierungsenergie und folglich kürzeren Bestrahlungsdauer, den niedrigeren PS-Dosierungen auf Grund des wesentlich höheren Wirkungsgrades von m-THPC und der höheren Tumorselektivität mit kürzerer systemischer Photosensibilisierung und geringerer ästhetisch-funktioneller Beeinträchtigung des bestrahlten Gewebes. Diese Vorzüge des m-THPC gegenüber dem Photofrin II werden in den klinischen Studien zur Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms bestätigt.

Die gekoppelten Photosensibilisatoren m-THPC-PEG, TCPP-HSA und Bacteriochlorin-PEG haben nicht den wegen ihrer günstigeren Pharmakokinetik erhofften therapeutischen Effekt auf das transplantierte humane Plattenepithelkarzinom im vorliegenden Tierexperiment. Sie zeigen keine therapeutische Wirkung.

Ursachen für dieses Phänomen können sein: eine tumorspezifisch gering ausgeprägte Vaskularisation des Plattenepithelkarzinoms ohne Anreicherung des PS im vorliegenden Tumormodell, der geringe Wirkungsgrad der gekoppelten PS mit zu gering gewählter Dosierung, ein Quenching-Effekt mit Inaktivierung des Singulett-Sauerstoffs oder eine intrazellulär ungünstige Lokalisation des gekoppelten Photosensibilisators mit behinderter Wirkung. Zur Klärung dieses überraschenden Ergebnisses sind weitere in vivo und in vitro Experimente notwendig.

Für die Wirkung der PEG-gekoppelten Photosensibilisatoren scheint die Art der Bindung des photochemisch aktiven Agens an das Makromolekül mit dem dadurch verursachten Quenching-Effekt eine bedeutende Rolle zu spielen. So waren die mit m-THPCnPEG erzeugten Tumorremissionen trotz ihrer im Vergleich zu freiem m-THPC und Photofrin II relativ kurzen Dauer eindrucksvoll. Bei hohen Dosierungen mit langen Inkubationszeiten konnten signifikante therapeutische Effekte durch Reduktion der Tumorumfänge nachgewiesen werden. Eine genaue Charakterisierung der Pharmakokinetik muss durch weitere in vivo Versuche erfolgen.

Die in der Arbeitshypothese formulierte verbesserte Wirkung der gekoppelten Photosensibilisatoren gegenüber den bereits in der Klinik verwendeten Agentien Photofrin II und m-THPC lässt sich im vorgestellten Tumormodell des humanen Plattenepithelkarzinoms demnach nicht nachvollziehen, wenngleich sich für m-THPCnPEG ermutigende Ansätze erkennen lassen. Die Idee einer Verbesserung der Eigenschaften der Photosensibilisatoren durch makromolekulare Kopplung erscheint dennoch vielversprechend, so dass eine Überprüfung anhand weiterer in vitro Experimente und eine Erweiterung der Daten durch in vivo Versuche für die Zukunft erstrebenswert erscheinen.

