

illumination scheme used. This suggests that endothelial cells respond differently to ALA and MAL-PDT and further investigation is needed to determine the role of endothelial cells in the response to light fractionated ALA-PDT.

In **Chapter 9** the effect of different illumination schemes was investigated on different cell lines *in-vitro*. Cells were exposed to ALA and illuminated with one or two light fractions delivered at 2, 3 and/or 5 hours. In the case of light fractionation the cells remained to be exposed to ALA during the dark interval. The fluences used for the light fractions in this study were chosen so that the PDT induced damage was expected to be similar to that found in *in-vivo* studies. The cell survival after PDT was determined by the mitochondrial activity using the MTT assay. The results showed a strong correlation between cell survival and with the duration of ALA exposure; PDT delivered at 5 hours was more effective compared to 2 or 3 hours. None of the investigated light fractionation schemes was more effective than a single light fraction delivered at 5 hours. The increased effectiveness of light fractionated ALA-PDT found *in-vivo* in the clinic or in pre-clinical models is not observed *in-vitro*.

In **Chapter 10** the results obtained in these studies are discussed in the context of the current concepts in the literature and future perspectives are presented.

Samenvatting

In **hoofdstuk 2** is het effect van verschillende belichtingschema's onderzocht in een solide tumormodel. Een experimentele rat tumor, het rhabdomyosarcoom, werd onderhuids op de dij van de rat getransplanteerd en behandeld wanneer het tumorvolume ongeveer 50 mm³ was. ALA werd intra veneus toegediend in een dosis van 200 mg/kg en de tumoren werden transdermaal belicht met rood licht. Het tumorvolume werd dagelijks gemeten om de uitstel van de groei, gedefinieerd als de tijd die de tumor nodig had om het dubbele van zijn behandelvolume te bereiken, te berekenen. Een onbehandelde controle tumor had een verdubbelingstijd van 1.7 ± 0.1 dagen. De groei werd significant vertraagd na een ALA-PDT behandeling met een enkele belichting (100 J cm^{-2} bij 100 mW cm^{-2} , 2.5 uur na ALA toediening) tot 6.6 ± 1.2 dagen. Belichting eerder na ALA toediening (na 1 uur), een lagere licht intensiteit (25 mW cm^{-2}), een hogere lichtdosis (200 J cm^{-2}) of zelfs gefractioneerd belichten met korte donker intervallen had geen significant effect of deze groeivertraging. Alleen de gefractioneerde ALA-PDT behandeling waarbij twee licht fracties gegeven werden op 1 en op 2.5 uur na ALA toediening (met 100 J cm^{-2} bij 100 mW cm^{-2}) resulteerde in een significante groeivertraging van 18.9 ± 2.9 dagen.

In **hoofdstuk 3 en 4** zijn de belichting parameters van de twee licht fracties gevarieerd in een poging om het meest optimale belichtingsschema te bepalen met topicale toediening van ALA. Dit onderzoek werd uitgevoerd op het haarloze muizen model. De PpIX

fluorescentie en fotoblekingskinetiek is gemeten voor, tijdens en na PDT. De reactie van de huid werd dagelijks gescoord volgens een huid schade score tabel. De resultaten laten zien dat de PpIX fluorescentie kinetiek na een enkele belichting afhankelijk is van de gebruikte lichtdosis; belichting met een hoge licht fluentie resulteerde in meer PpIX fotobleking gevolgd door een lagere PpIX fluorescentie toename in de tijd na PDT. Dit resultaat correleerde met de visueel gescoorde huidschade na PDT. Het effect van de verschillende gefractioneerde belichtingschema's werd vergeleken met het effect van een enkele belichting. De lichtparameters die gebruikt worden voor de eerste en tweede lichtfractie hebben een significante invloed op de effectiviteit van de behandeling. Hierbij lijkt de schade die door de eerste belichting wordt veroorzaakt een bepalende factor aangezien verschillende belichtingschema's met een gelijke cumulatieve licht dosis even effectief zijn wanneer de PDT schade van de eerste fractie gelijk is. Voor de haarloze muizen huid is het optimale gefractioneerde belichtingschema als volgt: topicaal ALA voor 4 uur, een eerste lichtfractie van 5 J cm^{-2} bij 50 mW cm^{-2} gevolgd door een donker interval van 2 uur en een tweede lichtfractie van 95 J cm^{-2} bij 50 mW cm^{-2} .

In **hoofdstuk 5** is onderzocht of neutrofielen een rol spelen in de effectiviteit van ALA-PDT. Subcutaan groeiende tumoren werden behandeld met systemische ALA-PDT onder normale en neutropene condities. Neutropenie werd bereikt door de dieren te behandelen met anti-granulocyten-serum. Op verschillende tijdstippen na ALA toediening en na PDT werd de PpIX fluorescentie bepaald in tumor en normaal weefsel. Voor de twee verschillende behandelingschema's die zijn onderzocht (de enkele en de dubbele belichting) werd als functie van de tijd na behandeling het aantal neutrofielen in het bloed en in de tumor bepaald. Dit werd gecorreleerd aan de effectiviteit van de behandeling. De fluorescentie intensiteit van PpIX gaf een piek op 2.5 uur na ALA toediening in de tumor. Vergelijkbaar met de resultaten behaald in de muizen studie met topicaal ALA (hoofdstuk 3) was de mate van bleking tijdens en fluorescentie toename na PDT afhankelijk van de licht dosis van de behandeling. Het aantal neutrofielen in de behandelde tumor en in circulatie nam significant toe na PDT en was afhankelijk van de effectiviteit van de behandeling: hogere toename van het aantal neutrofielen na een effectievere behandeling. Behandeling met anti-granulocyten-serum voorkwam dat het aantal neutrofielen toenam na PDT maar dit leidde niet tot een verlaging van de effectiviteit. Deze resultaten geven aan dat de schade die ALA-PDT veroorzaakt niet afhankelijk is van de aanwezigheid van neutrofielen in het behandelvolume dan wel in het bloed. Neutrofielen lijken niet bij te dragen aan de effectiviteit van ALA-PDT.

In **hoofdstuk 6** is onderzocht of de terugkeer in fluorescentie die waargenomen wordt na PDT het gevolg is van locale re-synthese, dan wel een herverdeling in PpIX elders gesynthetiseerd, is. Voor dit onderzoek werd gebruik gemaakt van het zogenaamde kamertjes model (skin-fold observation chamber) waarin de PpIX fluorescentie als functie van de ruimtelijke locatie in het weefsel werd onderzocht. Er werd geen correlatie gevonden tussen de mate waarin PpIX fluorescentie terugkeerde ten opzichte van de afstand van een

bloedvat. In een andere groep werd het weefsel gedurende 1 uur na PDT gekoeld tot 10-12°C. Het is bekend dat bij deze temperatuur de enzym activiteit en de ophoping van PpIX na ALA toediening geremd is. De terugkeer in fluorescentie na PDT bleek significant lager in deze groep. Uit deze resultaten blijkt dat de PpIX fluorescentie toename na PDT behandeling het gevolg is van lokale re-synthese.

In **hoofdstuk 7 en 8** is het effect van een gefractioneerde belichting bij MAL-PDT beschreven. MAL, een ALA ester, wordt steeds meer toegepast in de kliniek en aangezien de effectiviteit van ALA-PDT beter is na een gefractioneerde belichting is onderzocht of dit ook het geval is bij MAL-PDT. Voor dit onderzoek werd gebruik gemaakt van het haarloze muizen model en de gevonden licht parameters voor ALA-PDT voor een enkele en een gefractioneerde belichting. De fluorescentie kinetiek van PpIX na toediening van MAL bleek niet anders dan die na ALA, zowel tijdens de topicale applicatie als tijdens PDT en in de donkere periode tussen de twee licht fracties in. Anders dan bij ALA was er bij MAL geen verschil in de visueel gescoorde huidschade na een enkele of een gefractioneerde belichting. Omdat is aangetoond dat ALA in de circulatie komt na topicale toediening en MAL niet, kan ook de lokale distributie van MAL en ALA anders zijn. Dit gegeven zou een rol kunnen spelen bij de gevonden verschillen. Fluorescentie microscopie liet echter geen duidelijk verschil zien in de PpIX distributie in de huid na MAL of na ALA. Ook de histologische response leek in eerste instantie niet te verschillen. Het enige verschil is de hoeveelheid oedeem beoordeeld op 2.5 uur na PDT; ALA-PDT leidt tot meer oedeem dan MAL-PDT. Hieruit zou afgeleid kunnen worden dat endotheel cellen anders reageren op een ALA behandeling dan op een MAL behandeling. Meer onderzoek is nodig om de rol van endotheel cellen in de effectiviteit van ALA-PDT te onderzoeken.

In **hoofdstuk 9** is het effect van gefractioneerd belichten op verschillende cellijnen *in-vitro* onderzocht. Cellen werden met ALA geïncubeerd en één of twee keer belicht op 2, 3 en/of 5 uur. In het geval van een gefractioneerde belichting bleven de cellen geïncubeerd met ALA in het donkere interval tussen de twee belichtingen. De lichtdosis en lichtintensiteit die gebruikt werden voor de *in-vitro* belichtingen werden zodanig gekozen dat de door PDT geïnduceerde schade vermoedelijk vergelijkbaar was met de *in-vivo* gevonden schade. Cel overleving na PDT werd bepaald door de mitochondriale activiteit te meten met behulp van de MTT-test. Er werd een sterke correlatie gevonden tussen de ALA incubatie periode en de effectiviteit; PDT op 5 uur geeft meer cel dood dan PDT op 2 uur. Geen van de onderzochte gefractioneerde belichtingen was effectiever dan een enkele belichting op 5 uur. De verbeterde effectiviteit van gefractioneerde ALA-PDT die *in-vivo* gevonden werd in pre-klinische modellen en in de kliniek, werd *in-vitro* niet gevonden.

In **hoofdstuk 10** worden de resultaten van dit proefschrift besproken in het licht van de huidige opvattingen beschreven in de literatuur en worden toekomstige perspectieven genoemd.