

SAMENVATTING

In hoofdstuk 1 wordt een overzicht gegeven van het doel van dit onderzoek. Tumoren van de lippen en de mondholte vormen in Nederland circa 1-2% van alle maligne (=kwaadaardige) tumoren. Per jaar worden in Nederland circa 650 nieuwe gevallen gezien. Het merendeel (>90%) zijn planocellulaire carcinomen (=tumoren uitgaande van het slijmvlies).

Planocellulaire carcinomen van het lippenrood of mondslijmvlies kunnen zijn omgeven of worden voorafgegaan door premaligne afwijkingen. De meest voorkomende premaligne afwijkingen van het slijmvlies zijn leukoplakie en erythroplakie. Behandeling van premaligne slijmvlies afwijkingen kan plaats vinden door middel van chirurgie, cryochirurgie of CO₂ laser behandeling. Behandeling van het planocellulaire carcinoom van de lip of mondholte is tot op heden alleen mogelijk door middel van locoregionale chirurgie, radiotherapie of de combinatie van beide modaliteiten. Aan beide behandelingen zijn echter nadelen verbonden. Om oncologisch verantwoorde marges te verkrijgen treedt bij chirurgische behandeling verlies op van relatief veel gezond omringend weefsel. Chirurgische behandeling, van zelfs kleine tumoren in de mondholte, kan een ernstige mutilatie veroorzaken. Hierdoor kunnen functionele of esthetische problemen ontstaan. Bijwerkingen van radiotherapie in het hoofd-hals gebied zijn: mucositis, verlies van smaak, xerostomie, bestralingscaris, necrose van weke delen, osteoradionecrose en de kans op tumor inductie.

Een nieuwe vorm van behandeling, met minder bijwerkingen, zou van belang kunnen zijn voor de behandeling van tumoren van lip en mondholte. Fotodynamische therapie (PDT, van het engelse Photodynamic Therapy) zou zo'n nieuwe vorm van behandeling kunnen zijn. PDT is een nog experimentele therapie. Het berust op de, min of meer, selectieve opname van een lichtgevoelige stof in tumor en dysplastisch weefsel. Wanneer weefsels, waarin deze lichtgevoelige stof is geaccumuleerd, wordt belicht met licht van een bepaalde golflengte, treedt er een reactie op tussen de lichtgevoelige stof en het licht. Hierdoor kan er necrose van tumorweefsel optreden, met beperkte schade aan de omringende weefsels.

Een tweede eigenschap van de lichtgevoelige stof is dat, als deze wordt beschonen met licht van een juist golflengte, deze zelf ook licht kan uitzenden (=fluorescentie). Deze fluorescentie zou kunnen worden gebruikt voor de lokalisatie van tumoren. Deze toepassing kan, in analogie met PDT, met 'Photo-detection' (PD) worden aangeduid.

Het doel van het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift is tweeledig. In de eerste plaats: onderzoek naar de waarde van PDT als een nieuwe behandelingsvorm van premaligne afwijkingen en planocellulaire carcinomen van het mondslijmvlies. Ten tweede: onderzoek naar de toepasbaarheid van PD, door middel van *in vivo* fluorescentie, als hulpmiddel voor de lokalisatie

van premaligne slijmvlies afwijkingen en planocellulaire carcinomen van het mondslijmvlies. Voor het onderzoek werd gebruik gemaakt van een proefdier-model. In dit model werden met behulp van een carcinogene stof premaligne en maligne afwijkingen van het mondslijmvlies werden geïnduceerd. De doelstellingen van dit onderzoek werden nagestreefd door:

- het inventariseren van de bestaande literatuur over diermodellen met geïnduceerde dysplastische afwijkingen en planocellulaire carcinomen van het mondslijmvlies. Speciale aandacht werd gegeven aan het model met de rat als proefdier en 4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO) als carcinogene stof (*Hoofdstuk 2*);
- onderzoek te doen naar de macroscopische en microscopische veranderingen van het palatumslimvlies van de rat, in relatie tot verschillende applicatie tijden van het carcinogeen 4NQO (*Hoofdstuk 3*);
- vergelijking van de histologische karakteristieken van de 4NQO geïnduceerde, dysplastische afwijkingen op het palatum slijmvlies van de rat met dysplastische afwijkingen van het mondslijmvlies van de mens (*Hoofdstuk 4*);
- het inventariseren van de literatuur betreffende fotodynamische therapie (PDT) en fotodetectie (PD) aangaande de toepasbaarheid voor de behandeling van afwijkingen in de mondholte (*Hoofdstuk 5*);
- het beschrijven van PD door middel van *in vivo* fluorescentie van Photofrin, voor verschillende stadia van geïnduceerde dysplasie en planocellulair carcinoom in het palatumslimvlies van de rat (*Hoofdstuk 6*);
- het beschrijven van de gevolgen van PDT op gezond palatumslimvlies van de rat en de omringende anatomische structuren (*Hoofdstuk 7*);
- beschrijven van het effect van PDT op geïnduceerde, dysplastische afwijkingen en planocellulaire carcinomen van het palatumslimvlies van de rat (*Hoofdstuk 8*).

In hoofdstuk 2 wordt een overzicht gegeven van de literatuur betreffende diermodellen voor het planocellulaire carcinoom van de mondholte. In het algemeen moet onderscheid worden gemaakt tussen diermodellen met getransplanteerde tumoren en die met geïnduceerde tumoren. Het voordeel van een diermodel met geïnduceerde tumoren is dat zowel premaligne voorstadia als wel tumoren worden onderzocht, op localisaties die overeenkomst vertonen met de humane equivalent. Een nadeel is echter dat de inductie in het algemeen arbeidsintensief is en relatief veel tijd vergt.

Het meest beschreven diermodel voor geïnduceerde planocellulaire carcinomen van het mondslijmvlies is het hamster wangzak model. In dit diermodel worden in de wangzak van de hamster, met behulp van het carcinogeen 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA), planocellulaire carcinomen geïnduceerd. Nadelen van dit model zijn: dat de wangzak niet blootstaat aan invloeden die normaal in de mondholte optreden en het daarom twijfelachtig

is of de wangzak wel tot de mondholte zou mogen worden gerekend; het slijmvlies van de wangzak van de hamster vertoont weinig overeenkomst met dat van de mens; en de geïnduceerde tumoren bij de hamster lijken te ontstaan uit papillomen, hetgeen bij de mens niet het geval is. Een diersmodel dat wellicht meer geschikt is dat, waarbij in palatumslimvlies van de rat afwijkingen worden geïnduceerd met het carcinogeen 4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO). In dit hoofdstuk wordt een literatuuroverzicht gegeven van het 4NQO model. Het bleek dat een goede beschrijving van de veranderingen van het palatumslimvlies van de rat in relatie tot verschillende applicatie perioden van het carcinogeen 4NQO ontbrak. Tevens bleek dat vergelijking van 4NQO geïnduceerde veranderingen bij de rat en premaligne afwijkingen van het menselijke mondslijmvlies nog niet was beschreven. Een goede overeenkomst van het 4NQO model met vergelijkbare afwijkingen bij de mens, zou waardevol zijn voor onderzoek van bijvoorbeeld nieuwe behandelingsmethodes.

In hoofdstuk 3 worden de macroscopische en microscopische veranderingen van het palatumslimvlies van de rat beschreven in relatie tot verschillende applicatie perioden van het carcinogeen 4NQO. Het bepalen van de mate van dysplasie aan de hand van een histologisch preparaat is subjectief en kan sterk variëren tussen verschillende waarnemers. De Epitheliale Atypie Index (EAI), zoals beschreven door Smith en Pindborg, is een poging tot standaardisatie. Hierbij wordt de mate van dysplasie beoordeeld aan de hand van een dertiental histologische kenmerken. De subjectiviteit van beoordeling wordt hierdoor verminderd. De mate van dysplasie wordt vervolgens uitgedrukt in een getal zodat vergelijking van verschillende stadia van dysplasie van het slijmvlies mogelijk wordt.

Uit de resultaten van ons onderzoek bleek dat de mate van dysplasie toeneemt als functie van de applicatie periode van het carcinogeen 4NQO. De EAI nam toe van een waarde 7 na 2 weken applicatie tot 42 na 26 weken applicatie van het carcinogeen. Na 26 weken applicatie werd in alle gevallen planocellulaire carcinomen waargenomen. Bij ratten waar de applicatie van het carcinogeen op een eerder moment werd gestopt, ontwikkelden zich uiteindelijk toch planocellulaire carcinomen. Het bleek dat korte applicatie perioden aanleiding gaven tot lange latentie perioden voor het ontstaan van carcinomen en omgekeerd leidden lange applicatie perioden tot korte latentie perioden. Hieruit kan worden geconcludeerd dat de geïnduceerde afwijkingen echt premaligne van aard zijn en niet berusten op reactieve veranderingen van het slijmvlies.

In hoofdstuk 4 worden dysplastische afwijkingen van het palatum van de rat histologisch vergeleken met dysplastische afwijkingen van het mondslijmvlies bij de mens. Vierentwintig, willekeurig gekozen, gevallen van dysplasie van

menselijk mondslijmvlies werden histologisch vergeleken met die van 24 ratten, die 12, 16, 20 of 26 weken waren bestreken met het carcinogeen 4NQO. Humane dysplasie en bij de rat geïnduceerde dysplasie met gelijke of vrijwel gelijke EAI waarden werden onderling vergeleken. Het doel was om na te gaan of gevallen met een vergelijkbare mate van dysplasie waren samengesteld uit dezelfde histologische kenmerken. Het bleek dat er een grote mate van overeenkomst bestond tussen geïnduceerde dysplastische afwijkingen van het palatumslijmvlies van de rat en dysplastische afwijkingen van het mondslijmvlies van de mens. Van de dertien histologische kenmerken, die in de EAI worden beoordeeld, bleken er negen identiek te zijn.

Het 4NQO model van geïnduceerde afwijkingen van het palatumslijmvlies van de rat vertoont derhalve een goede overeenkomst met dysplastische afwijkingen van het mondslijmvlies van de mens. Het model is representatief voor premaligne afwijkingen en planocellulaire carcinomen van het mondslijmvlies.

In hoofdstuk 5 wordt een literatuuroverzicht gegeven over fotodynamische therapie (PDT) en fotodetectie (PD). Het mechanisme van PDT berust op foto-oxydatie van weefsel. Deze is het gevolg is van de interactie tussen de lichtgevoelige stof en licht van geschikte golflengten. Aanvankelijk werd gebruik gemaakt van Hematoporfyrinederivaat (HpD) als lichtgevoelige stof. Veel vaker wordt tegenwoordig in preklinische en klinische studies Photofrin gebruikt. Photofrin is afgeleid van Hematoporfyrinederivaat maar heeft een hogere fotodynamisch activiteit. Na intraveneuze toediening van de lichtgevoelige stof verdeelt deze zich over het gehele lichaam. Na een bepaalde (latentie) tijd bevindt zich meer van de lichtgevoelige stof in tumor- en dysplastisch weefsel dan in omringend normaal weefsel. De lichtgevoelige stof kan zich ook in andere weefsels zoals bijvoorbeeld de huid ophopen. Deze accumulatie in de huid is echter zodanig dat er na blootstelling aan zon- of ander fel licht een sterke reactie van de huid kan ontstaan. Deze langdurige (6-8 weken) lichtgevoeligheid van de huid is een van de belangrijkste nadelen van de PDT met Photofrin. Helaas is het precieze mechanisme achter de opname van dit soort stoffen in (tumor)weefsels nog deels onbekend.

Lichtgevoelige stoffen absorberen meestal licht van verschillende golflengten. Porfyrynes hebben hun hoogste absorptie in het blauw-groen deel van het spectrum. Voor PDT met behulp van porfyrynes wordt klinisch echter meestal rood licht gebruikt. De reden hiervoor is dat de penetratie van licht in weefsel toeneemt met de golflengte en er dus zo in theorie een groter weefsel volume mee kan worden behandeld. In principe kan iedere lichtbron worden gebruikt, zolang deze maar geschikte golflengten produceren die de lichtgevoelige stof kunnen activeren. Er wordt echter veelal gebruik gemaakt van lasers in

combinatie met een kleurstof laser. Deze genereren licht van gedefinieerde golflengten met voldoende vermogen.

Na geactiveerd te zijn door het (laser)licht, kan de lichtgevoelige stof zelf ook licht gaan uitzenden (=fluorescentie). Deze fluorescentie zou kunnen worden gebruikt voor de lokalisatie van tumoren. Voor fluorescentie doeleinden wordt veelal gebruik gemaakt van excitatielicht met een geringe intensiteit, om zo eventuele fotodynamische schade te vermijden. De opbrengst van het fluorescentielicht is daardoor echter zeer gering, zodat geavanceerde detectieapparatuur nodig is. Een bijkomend probleem is dat weefsels van nature ook kunnen fluoresceren. Deze zogenaamde autofluorescentie kan de lokalisatie bemoeilijken.

Aanvankelijk werd PDT voornamelijk toegepast voor behandeling van de huidafwijkingen die gemakkelijk bereikbaar waren voor het laserlicht. Met de ontwikkeling van endoscopen werden echter ook aanvankelijk minder toegankelijke gebieden, zoals longen, blaas en oesophagus bereikbaar. Hoewel de mondholte goed bereikbaar is voor het laserlicht, is er toch nog betrekkelijk weinig onderzoek gedaan naar de mogelijkheden van PDT en PD van premaligne slijmvliesafwijkingen en planocellulaire carcinomen van dit gebied.

Gebaseerd op deze literatuurstudie lijkt PDT vooral toepasbaar te zijn voor de behandeling van kleine, oppervlakkig groeiende tumoren. Ook dysplastische afwijkingen van het slijmvlies van de mondholte lijken goed met PDT behandeld te kunnen worden. Er bleek geen indicatie voor PDT van grote tumoren van de mondholte. Als palliatieve behandeling blijkt PDT veelal teleurstellende resultaten op te leveren.

In **hoofdstuk 6** wordt het onderzoek beschreven naar de mogelijke waarde van fotodetectie (PD) van dysplastische afwijkingen en planocellulaire carcinomen van het mondslijmvlies.

Inductie van de diverse stadia van dysplastische afwijkingen van het palatumslijmvlies en uiteindelijk planocellulaire carcinomen vond plaats op de wijze zoals beschreven in hoofdstuk 3. De lichtgevoelige stof Photofrin werd gebruikt in een concentratie van 2,5 mg/kg lichaams gewicht. Voorafgaand aan de toediening van Photofrin werd van iedere rat een opname van de autofluorescentie van het palatumslijmvlies gemaakt. Fluorescentie opnames werden 24 uur en 48 uur na toediening van de licht gevoelige stof gemaakt. Om de storende invloed van autofluorescentie te minimaliseren werd de fluorescentie geëxciteerd met licht van twee verschillende golflengten (460 nm en 500 nm). Door middel van digitale subtractie van de verkregen fluorescentie opnamen werd de invloed autofluorescentie deels onderdrukt. Van ieder palatum werd tevens de mate van dysplasie bepaald met behulp van de Epitheliale Atypie Index (EAI).

De fluorescentie intensiteit, bleek 24 en 48 uur na toediening van Photofrin toe te nemen met toenemende 4NQO applicatie perioden. Voor EAI waarden groter dan 15 bleek er een significant verschil te bestaan tussen de fluorescentie waarden verkregen na toediening van Photofrin en die zonder Photofrin.

De autofluorescentie nam ook toe bij toenemende mate van dysplasie van het epitheel. Echter, het fluorescentie signaal was altijd hoger wanneer Photofrin was toegediend. De resultaten van dit onderzoek laten zien dat PDT met Photofrin in staat is om geïnduceerde dysplasie en planocellulaire carcinomen van het epitheel van het palatum van de rat zichtbaar te maken. Photofrin lijkt bij te dragen tot een verhoging van de sensitiviteit van deze vorm van detectie. Het blijkt echter ook mogelijk te zijn om autofluorescentie te gebruiken voor detectie van premaligne en maligne afwijkingen van het mondslijmvlies.

In hoofdstuk 7 wordt de dosimetrie van licht en het effect van PDT op het normale palatumslimvlies van de rat en omringende anatomische structuren beschreven. Ten gevolge van een selectieve opname van de lichtgevoelige stof in tumor weefsel zou PDT weinig tot geen schade mogen geven aan omringende normale weefsels. Normale weefsels zijn echter wel degelijk in staat om ook de lichtgevoelige stof op te nemen. Hierdoor kunnen ook normale weefsels beschadigd raken. Een optimale combinatie van de dosis licht- en lichtgevoelige stof zou bij kunnen dragen tot verhoging van de selectiviteit van de behandeling. Photofrin werd bij 80 normale ratten in verschillende concentraties (0, 2,5, 5 of 10 mg/kg) toegediend, waarna na 24 uur het palatum werd belicht met diverse licht doses (0, 25, 50, 100, of 200 J/cm²). Er werden twee verschillende excitatie golflengten (514,5 nm en 625 nm) gebruikt. De effecten werden twee dagen of twee maanden na de behandeling onderzocht. Dit om zowel de directe schade als ook de potentiële genezing op termijn te kunnen beoordelen. De resultaten van het onderzoek laten zien dat het normale slijmvlies van het palatum en ook de omringende structuren zoals bot, gebitselementen, vaten en zenuwen wel degelijk schade ondervonden. De mate van schade bleek zowel van de lichtdosis als van de dosis lichtgevoelige stof af te hangen. Hogere doses gaven meer schade. Twee dagen na de behandeling bleek het effect van licht van 625 nm dat van 514,5 nm te overtreffen. Na twee maanden was dit effect juist omgekeerd. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat licht van 625 nm licht dieper doordringt in de weefsels. Hierdoor is licht van 625 nm in staat schade te veroorzaken in een groter gebied van de bovenkaak. Licht met een golflengte van 514,5 nm wordt echter veel effectiever geabsorbeerd door porfyryne moleculen. Hierdoor kunnen de schade effecten sterker zijn. Voor beide golflengten licht bleek de combinatie van 2,5 mg/kg Photofrin en 100 J/cm² als lichtdosis een acceptabele schade te veroorzaken.

Daarnaast werd bij zes ratten onderzoek verricht naar de verdeling van licht in het normale slijmvlies en de omringende structuren van het palatum. Verstrooiing en reflectie van licht kunnen de uiteindelijke lichtdosis in het weefsel beïnvloeden. In het geval van licht van 514,5 nm gaf dit aanleiding tot een tweemaal zo hoge dosis licht in het slijmvlies ten opzichte van de primaire bundel. Voor licht van 625 nm bleek dit zelf driemaal zo groot te zijn. Ook in de omringende structuren bleek er sprake van een hogere lichtdosis. Dit zou mede de oorzaak kunnen zijn voor de waargenomen schade aan normale weefsels.

In hoofdstuk 8 wordt het effect van PDT op geïnduceerde dysplastische afwijkingen en planocellulaire carcinomen van het palatum-slijmvlies van de rat beschreven. Het onderzoek werd verricht bij in totaal 80 ratten. Met behulp van het carcinogeen 4NQO werden, zoals eerder beschreven, dysplastische afwijkingen en planocellulaire carcinomen in het palatum slijmvlies van de rat geïnduceerd. De dosis Photofrin bedroeg 2,5 mg/kg. De lichtdosis was 100 J/cm². Er werden twee golflengten licht gebruikt (514,5 nm en 625 nm). De helft van de ratten werd twee dagen na behandeling opgeofferd, de overigen na twee maanden. Deze twee periodes waren gekozen om het directe schade effect te kunnen vergelijken met het effect na een periode waarvan gedacht mag worden dat herstel kan optreden.

Twee dagen na PDT vertoonden vrijwel alle ratten een uitgebreide erythemateuze verandering van het epitheel van het intermolare gebied. Teven was er sprake van lokale ulceratie en necrose. Deze effecten bleken voor beide gebruikte golflengten licht vrijwel identiek. Opvallend was dat het behandelingsresultaat goed overeen kwam met het belichte gebied, waarbij een scherpe afgrenzing ten opzichte van omringend, niet behandeld weefsel duidelijk waarneembaar was.

Twee maanden na PDT was er sprake van een grotere verscheidenheid aan klinische manifestaties van het epitheel van het intermolare gebied. Deze bestond uit: intact epitheel met aanwijzingen voor littekenweefsel, lokaal blootliggend bot omgeven door intact epitheel en gevallen waarin sprake was van tumorgroei.

Het microscopische effect twee dagen na PDT bestond uit oedeem, bloeding en necrose van het epitheel van het behandelde gebied. De necrose van het epitheel was echter in veel gevallen niet volledig. Vaatschade werd in vrijwel alle gevallen aangetroffen. Deze bestond voornamelijk uit een vasculair oedeem. Ook bleek er schade te zijn opgetreden aan andere structuren, zoals het palatumbot, sinus/neus epitheel en de pulpa van de molaren. Er kon geen verschil tussen beide golflengten of duur van de 4NQO applicatie periode worden vastgesteld.

Twee maanden na PDT bestonden de microscopische veranderingen uit: onregelmatiger opbouw van het epitheel, een dicht bindweefsel in de submucosa en epitheliale cysten in de submucosa. In meerdere gevallen bleek er sprake van partieel verlies van palatumbot. Vasculaire veranderingen bestonden voornamelijk uit hypertrofie van de vaatwand, vasculaire recanalisatie, tot volledig verlies van de grote vaten van het palatum. Neuronale proliferatie werd tevens waargenomen.

Bij 6 van de 20 ratten uit de 514,5 nm groep bleek er 2 maanden na behandeling geen aanwijzingen te bestaan voor dysplasie van het epitheel of voor tumorgroei. Dit bleek bij slecht 2 van de 20 ratten in de 625 nm groep het geval te zijn. Tumorgroei werd aangetroffen bij 4 van de 20 ratten in de 514,5 nm groep en bij 7 van de 20 in de 615 nm groep.

Het bleek dat PDT (in dit model, met de hier gekozen behandelingsparameters) niet in staat was om in alle gevallen dysplasie en planocellulaire carcinomen afdoende te behandelen. Naast (beoogde) schade aan het epitheel, trad er ook irreversibele schade op aan weefsel in de nabijheid van het epitheel. Verlies van bot en schade aan de gebitselementen zijn hier voorbeelden van. De hoge incidentie van dysplasie en planocellulaire carcinomen, 2 maanden na de behandeling, valt echter mogelijk voor een deel te verklaren uit een nadeel van het diermodel. Na applicatie van het carcinogeen 4NQO treedt er verspreiding van het carcinogeen op door de mondholtte en blijft het effect niet beperkt tot het intermolare gebied. Hierdoor treden, in meer of mindere mate ook veranderingen op in de andere slijmvliesgebieden in de mondholtte. Regeneratie van het epitheel van het intermolare gebied na PDT komt deels voort uit ingroei van epitheel vanuit de wel door 4NQO veranderde, maar niet door PDT behandelde randen. Het is daarom moeilijk om het echte behandelingsresultaat van PDT voor dysplasie en planocellulair carcinoom in dit diermodel vast te stellen. Een diermodel waarin dysplasie of invasieve tumor groei van het palatum-slijmvlies op een meer beperkte wijze zou kunnen worden geïnduceerd (of getransplanteerd) zou mogelijk deze vraag beter kunnen beantwoorden. Verder dient te worden opgemerkt dat Photofrin misschien niet de meest geschikte stof is voor PDT. Met name de langdurige lichtgevoeligheid van de huid is een beperkende factor voor klinische toepassing. Voordat PDT veilig en effectief zal kunnen worden toegepast voor curatieve behandeling van premaligne en maligne afwijking van het mondslijmvlies is aanvullend onderzoek nodig. Dit (dier)onderzoek zal zich met name moeten richten op nieuwe lichtgevoelige stoffen, lokale applicatie van de lichtgevoelige stof, optimalisatie van de dosimetrie van zowel het licht als de lichtgevoelige stof en beperking van schade aan de omringende normale weefsels.