

Aus dem Lehrstuhl für

Dermatologie

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Michael Landthaler

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

Untersuchungen zur Phototoxizität des wasserlöslichen Photosensibilisators Perinaphtenon
(PNS) in Zellkulturen humaner dermaler Fibroblasten (NHDF)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Zahnmedizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Heike Driemel

2011

Aus dem Lehrstuhl für

Dermatologie

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Michael Landthaler

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

Untersuchungen zur Phototoxizität des wasserlöslichen Photosensibilisators Perinaphtenon

(PNS) in Zellkulturen humaner dermaler Fibroblasten (NHDF)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Zahnmedizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Heike Driemel

2011

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. rer. nat. Tim Maisch

2. Berichterstatter: Prof. Dr.med. Dr.med. dent. Peter Proff

Tag der mündlichen Prüfung: 02.08.2011

Meinen Eltern Barbara und Hermann Bruns

aus Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
2. Literaturübersicht	7
2.1 Historische Entwicklung	7
2.2 Mechanismus der Photodynamischen Therapie (PDT).....	10
2.2.1 Mechanismus auf physikalisch-chemischer Ebene	11
2.2.2 Mechanismus auf biologischer Ebene	12
2.3 Klinische Anwendung	14
2.3.1 Klinische Anwendung der Photodynamischen Therapie (PDT)	14
2.3.2 Klinische Anwendung der Photodynamischen Diagnostik (PDD)	14
2.3.2.1 Photodynamische Diagnostik mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA)	15
2.3.2.2 Autofluoreszenz als diagnostischer Marker	19
2.4 Sauerstoffabhängigkeit der Photodynamischen Therapie (PDT)	21
2.5 Quenchen in der Photodynamischen Therapie (PDT)	22
2.6 Lichtquellen	22
2.6.1 Die Eindringtiefe von Licht in Gewebe	23
2.7 Photosensibilisatoren	25
2.7.1 Perinapthenon in wasserunlöslicher und wasserlöslicher Form (PN und PNS).....	28
3. Ziel dieser Arbeit	30
4. Material und Methoden	31
4.1 Material	31
4.1.1 Zelllinie	31
4.1.2 Photosensibilisatoren	31
4.1.3 Reagenzien und Puffer	32
4.1.4 Zellkulturmedien	33
4.1.5 Technische Geräte und Hilfsmittel	33
4.1.6 Zentrifugen	33
4.1.7 Spektralphotometer	34
4.1.8 Lampen zur Bestrahlung	34
4.1.9 Fluoreszenzmikroskop / Durchlichtmikroskop: Zeiss axio vario tech	34

4.1.10 Farbstoffe	35
4.2 Methoden.....	37
4.2.1 Zellkulturverfahren.....	37
4.2.2 Zellvermehrung	37
4.2.3 Zellüberführung auf die 96-Lochplatte.....	38
4.2.4 Inkubation der NHDF mit dem Photosensibilisator Perinaphtenon (PN)	38
4.2.5 Inkubation der NHDF mit dem Photosensibilisator Perinaphtenon in wasserlöslicher Form (PNS).....	40
4.2.6 MTT-Test.....	41
4.2.7 Lokalisation der Photosensibilatoren mit dem Fluoreszenzmikroskop	41
4.2.8 Zelluläre Aufnahme-Spektroskopie.....	42
4.2.9 Datenverarbeitung	43
5. Ergebnisse.....	44
5.1 Nachweis der zellulären Aufnahme von PN und PNS in NHDF mittels Spektroskopie.....	44
5.1.1 Zelluläre Aufnahme von PN	44
5.1.2 Zelluläre Aufnahme von PNS	45
5.2. Lokalisation von PN und PNS innerhalb der Zelle.....	46
5.2.1 Nachweis der Lokalisation von PN mittels der Fluoreszenzmikroskopie	47
5.2.2 Lokalisation von PNS mittels der Fluoreszenzmikroskopie	47
5.2.3 Kolokalisation von PN und PNS mittels der Fluoreszenzmikroskopie	48
5.2.4 Kolokalisation von PN mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes	49
5.2.5 Kolokalisation von PNS mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes	50
5.3 Phototoxische Wirkung von PN und PNS	
auf normale humane dermale Fibroblasten.....	50
5.3.1 Phototoxische Wirkung von PN und PNS auf NHDF mit Bestrahlung und Überprüfung der Dunkeltoxizität.....	51
5.3.1.1 Phototoxische Wirkung von PN auf NHDF mit 15 minütiger Bestrahlung und Überprüfung der Dunkeltoxizität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.....	51
5.3.1.1.1 Untersuchung der Dunkeltoxizität.....	51
5.3.1.1.2 Lichttoxizität	52

5.3.1.2 Phototoxische Wirkung von PNS auf NHDF mit 15 minütiger Bestrahlung und Überprüfung der Dunkeltoxizität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	54
5.3.1.2.1 Dunkeltoxizität	54
5.3.1.2.2 Lichttoxizität	55
5.3.1.3 PN und PNS in direktem Toxizitätsvergleich anhand des EC-50-Wertes	56
5.3.2.1 Phototoxische Wirkung von PN auf NHDF bei 15 minütiger Inkubation in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer (15 und 30 min)	58
5.3.2.2 Phototoxische Wirkung von PNS auf NHDF bei 15 minütiger Inkubation in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer (15 und 30 min)	60
5.3.2.3 PN und PNS in direktem Toxizitätsvergleich anhand des EC-50-Wertes	62
5.3.2.4 Phototoxische Wirkung von PNS auf normale dermale Fibroblasten bei 30 minütiger Inkubation in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer (15 und 30 min)	63
5.4 Indirekter Nachweis des Reaktionstyps bei der Photooxidation mittels der Quenchersubstanz Natriumazid	66
5.4.1 PN mit Natriumazid bei unterschiedlicher Bestrahlungsdauer (15 und 30 Minuten)	67
5.4.2 PNS mit Natriumazid bei unterschiedlicher Bestrahlungsdauer (15 und 30 Minuten)	69
5.5 Toxizitätsvergleich von PN und PNS anhand der gemessenen Zellvitalität	71
5.6 Gegenüberstellung der Parameter Inkubation und Bestrahlung für beide Farbstoffe	73
6. Diskussion	75
6.1 Spektroskopischer Nachweis zur zellulären Aufnahme von PN und PNS	75
6.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	76
6.3 Phototoxizität von PN und PNS anhand der Ergebnisse	76
6.4 Phototoxizität von PN und PNS anhand physiko-chemischer Eigenschaften	78
6.4.1 Molekulargewicht von PN und PNS	78

6.4.2 Intrazelluläre Lokalisation	79
6.4.3 Zellulärer Transportmechanismus	80
6.4.4 Singulett-Sauerstoff	81
6.4.5 Absorptionsspektrum von PN und PNS	81
6.5 PN und PNS im Vergleich in Hinblick auf eine möglichen klinischen Einsatz	82
7. Zusammenfassung	85
8. Abkürzungsverzeichnis	87
9. Literatur	88
9. Danksagung	105

1. Einleitung

Die Photodynamische Therapie (PDT) basiert auf einem Verfahren, bei dem Licht einer bestimmten Wellenlänge mit einer lichtempfindlichen Substanz in Wechselwirkung tritt. In Gegenwart von molekularem Sauerstoff kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [[Dougherty 1986](#)], die dann unmittelbar oxidativ wirken und eine Schädigung hervorrufen. Die ROS besitzen allerdings eine geringe Halbwertszeit von 100-400 ns, so dass die Zerstörung des Gewebes auf die unmittelbare Umgebung der erzeugten ROS begrenzt ist [[Moan and Berg 1991](#), [Cramers et al. 2003](#)].

Die Fluoreszenzemission der Photosensibilisatoren spielt heutzutage eine wesentliche Rolle in der Tumordiagnostik, während die phototoxische Wirkung für die Tumorthherapie, zum Beispiel zur Behandlung von epithelialen Vorläuferläsionen oder oberflächlich-invasiven Hauttumoren (oberflächliches Basaliom vom Rumpfhauttyp, spinözelluläres Karzinom) genutzt werden kann. Die Photosensibilisatoren können entweder systemisch, wie zum Beispiel das Porfimer-Natrium (Photofrin®), oder topisch, wie die bei der im Überschuss verabreichten 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) sich verstärkt bildenden Protoporphyrine (PPIX), appliziert werden. Sowohl die systemische als auch die topische Gabe des Photosensibilisators führt zu einer selektiven Anreicherung im pathologischen Gewebe, welche vom Gewebe- und Tumortyp bestimmt wird. Die Verteilung des Photosensibilisators im Gewebe wird durch den Akkumulationsindex (Tumor vs. Normalgewebe) beschrieben. Sie liegt bei den meisten Photosensibilisatoren in einem Bereich von 2:1 bis 5:1 [[Pass 1993](#)].

Bei der Auswahl eines Photosensibilisators ist allerdings nicht nur die Tumorselektivität von Bedeutung, sondern auch die Eindringtiefe des Lichtes in das Gewebe. Es ist bekannt, dass das eingestrahle Licht im Bereich von 380-600nm größtenteils von Hämoglobin absorbiert wird, während die Absorption durch Wasser insbesondere im ultravioletten Bereich (unterhalb 300 nm) und infraroten Spektralbereich (oberhalb 1200 nm) eine große Rolle spielt.

Dazwischen liegt das sogenannte therapeutische Fenster. In diesem Bereich (600-800 nm) wird die größte Eindringtiefe für Licht in das Gewebe erreicht.

Neben der Tumorselektivität und möglichst langwelligen Absorptionsbande sind aber auch die Triplet-Quantenausbeute des Photosensibilisators bzw. Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute entscheidende Faktoren für einen guten Photosensibilisator [Schneckenburger 2003]. Für letztere ist das Vorhandensein von Licht und Sauerstoff ausschlaggebend [Ma 1994]. Gute Sensibilisatoren weisen eine Singulett-Quantenausbeute von 0,5 auf [Schneckenburger 2003].

Die Photodynamische Therapie weist in der Tumorthherapie gegenüber den herkömmlichen Behandlungsmodalitäten wie Chirurgie, Chemo- und Radiotherapie folgende entscheidende Vorteile auf:

1. Die PDT ist nicht invasiv.
2. Die PDT beeinträchtigt nicht das umgebende Gewebe.
3. Die PDT ist im Gegensatz zur Radiotherapie beliebig oft wiederholbar.
4. Die PDT eignet sich auch zur Behandlung von Tumoren auf vorbestrahlter Haut.

So findet die PDT heute Anwendung in den verschiedenen medizinischen Fachbereichen wie beispielsweise der Gastroenterologie, der Gynäkologie, der Urologie, der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, der Augenheilkunde und der Dermatologie [Xiang et al. 2001, Schleier et al. 2004, Pauleikhoff und Spital 2005, Babilas et al. 2006, Pinthus et al. 2006, Biel 2007, Braathen et al. 2007, Gross and Wolfson 2008].

2. Literaturübersicht

2.1 Historische Entwicklung

Die Phototherapie und speziell die Photochemotherapie lassen sich als die ältesten überlieferten dermatologischen Behandlungsmodalitäten bis in das antike Ägypten und Indien zurückverfolgen. Schon zu damaligen Zeiten nutzte man den Zusammenhang zwischen biologischem Effekt bestimmter Substanzen und Licht, indem zur Therapie der Vitiligo (Weißfleckenkrankheit) Psoralene auf die betroffenen Hautareale appliziert und diese dem Sonnenlicht exponiert wurden [Spikes1985]. Diese Therapieformen gerieten mit dem Untergang der antiken Hochkulturen zunächst in Vergessenheit.

Erst im Jahr 1900 wurde der Grundgedanke der PDT wieder aufgegriffen, als Raab, ein Schüler von Professor Hermann von Tappeiner, im Rahmen seiner Dissertation am Pharmakologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität in München, über erste photodynamische Effekte berichtete. Er erkannte, dass die Interaktion des Farbstoffes Acridin mit sichtbarem Licht unter Vorhandensein von Sauerstoff durch einen zytotoxischen Effekt zur Abtötung von Paramezien führte [Raab1900].

1903 erfolgte die erste onkologische Anwendung der PDT durch Jesionek und von Tappeiner, die Hautkarzinome mit dem Farbstoff Eosin benetzten und anschließend mit Licht bestrahlten [Tappeiner und Jesionek 1903].

Acht Jahre später sensibilisierte Hausmann Mäuse durch eine subkutane Injektion von Hämatoporphyrins, exponierte die Tiere dem Sonnenlicht und protokollierte erstmalig die phototoxische Wirkung [Hausmann1911].

Im Jahr 1913 belegte Meyer-Betz in einem Selbstversuch die phototoxische Wirkung des Hämatoporphyrins am Menschen. Er injizierte sich 200mg Hämatoporphyrin und ließ sein Gesicht und seinen Unterarm von der Sonne bestrahlen (**Abb.1**). Wenige Minuten später kam

es zur Ödembildung und Juckreiz des lichtexponierten Bereichs sowie zu einer generalisierten Photosensibilisierung für 8 Wochen [[Meyer-Betz 1913](#)].

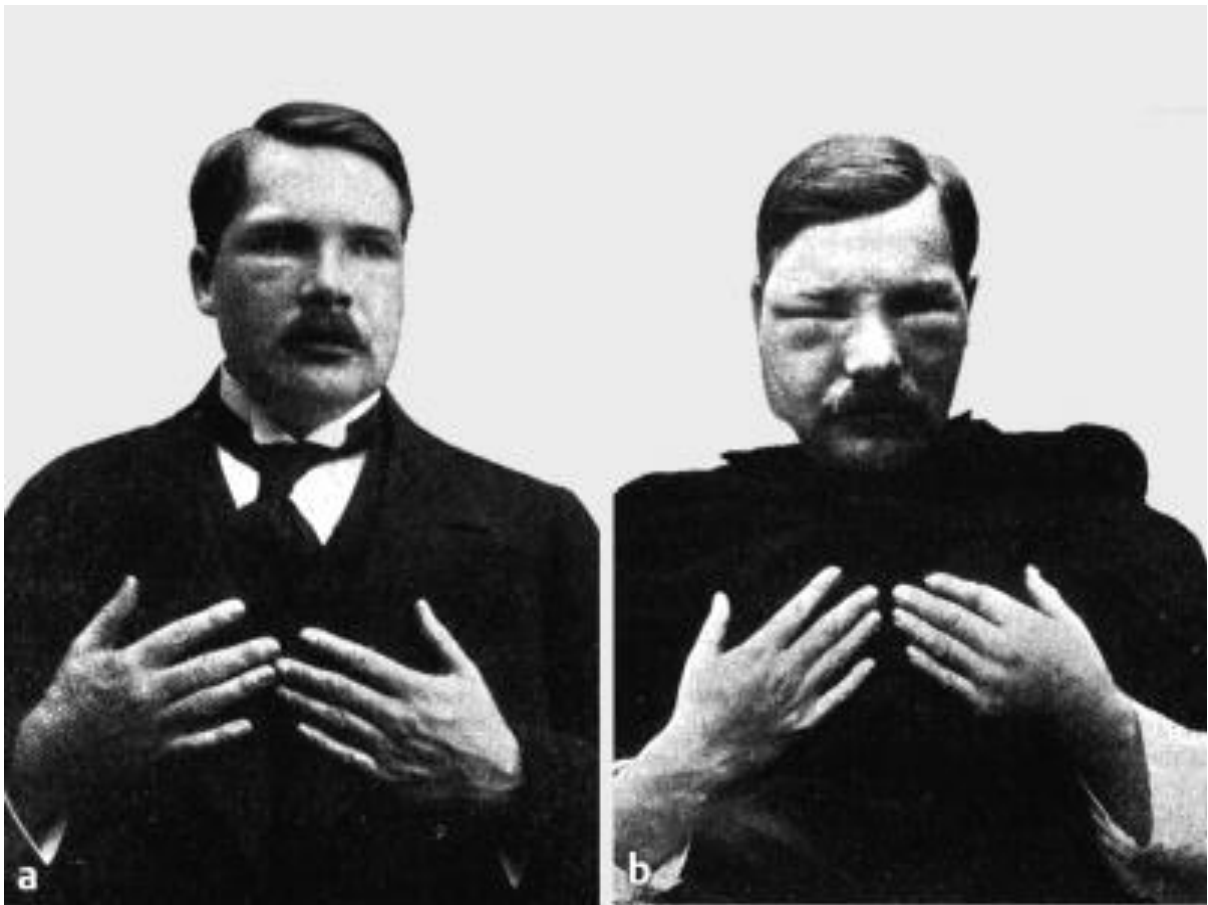


Abbildung 1: Meyer-Betz vor (a) und nach seinem Selbstversuch (b). Nach Injektion von 200 mg Hämatoporphyrin und anschließender Sonneneinstrahlung manifestierten sich ausgedehnte Ödeme im Bereich der sonnenexponierten Gesichtshaut und der Hände [[Kick et al. 1996](#)].

Auf die diagnostischen Möglichkeiten des Hämatoporphyrins wies Policard im Jahr 1924 durch hin. Er berichtete über eine charakteristische Rotfluoreszenz des Hämatoporphyrins bei Sarkomen von Ratten unter UV-Licht [[Policard 1924](#)].

1942 injizierten Auler und Banzer Hämatoporphyrin in Tumoren, Metastasen und Lymphbahnen von Ratten und belegten, dass eine exogene Applikation von Hämatoporphyrin zu einer tumorspezifischen Akkumulation führt [[Auler und Banzer 1942](#)]. Figge und

Mitarbeiter bestätigten 6 Jahre später diese Ergebnisse und schlugen Hämatoporphyrin für die PDT als Photosensibilisator vor [[Figge et al. 1948](#)].

Allerdings war die zur Diagnostik und Therapie erforderliche Dosis mit erheblichen Nebenwirkungen und einer zu geringen Tumorselektivität verbunden. Insbesondere die Photosensibilisierung der Haut erforderte, dass die Patienten jegliche Lichtaussetzung wochenlang vermeiden mussten [[Leonhard und Beck 1971](#)].

Daher suchte man bereits frühzeitig nach alternativen Photosensibilisatoren mit höherer Tumorselektivität und geringeren Nebenwirkungen. Im Jahr 1955 synthetisierte Samuel Schwartz ein Gemisch, das er als Hämato-Porphyrin-Derivat (HpD) bezeichnete. Es bestand aus hydrophoben oligomeren Porphyrinen und wies eine höhere Wirksamkeit sowie Tumorspezifität auf [[Schwartz et al. 1955](#)]. Im Jahr 1971 bestrahlte Dougherty Ratten und Mäuse nach systemischer Gabe von HpD und erzielte erstmals experimentell langfristige totale Remissionen von Tumoren [[Dougherty et al. 1975](#)]. Ausgehend von diesen Studien postulierte Dougherty folgende Kriterien, die ein geeigneter Photosensibilisator für die PDT mitbringen soll:

- (1) Keine Toxizität für gesunde Zellen bei therapeutischen Dosen,
- (2) Definierte Aufnahme und Anreicherung im erkrankten Gewebe,
- (3) Aktivierung durch Licht im Wellenlängenbereich von > 600 nm,
- (4) photochemische Aktivität mit oxidierender Schädigung des Gewebes [[Dougherty 1993](#)].

Im Jahr 1978 konnte seine Arbeitsgruppe mittels PDT bei 98 von 113 gegenüber zuvor durchgeführten konventionellen Therapiemaßnahmen resistenten Tumoren unterschiedlicher Entitäten eine Vollremission und bei 13 eine partielle erreichen [[Dougherty et al. 1978](#)].

1992 führten Kennedy und Pottier die 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) in die PDT ein. Sie konnten nachweisen, dass nicht 5-ALA, sondern das im Gewebe aus 5-ALA synthetisierte Protoporphyrin IX die eigentliche photosensibilisierende Substanz darstellt [[Kennedy und Pottier 1992](#)].

Mit Photofrin®, einem HpD, welches als aktive Komponente Dihämatoporphyrinether enthält, wurde 1993 die erste photosensibilisierende Substanz für die Tumorthherapie von Blasenkarzinomen in Kanada zugelassen [[Ackroyd et al. 2001](#)].

Heute repräsentiert die topische PDT ein etabliertes Verfahren bei der Behandlung von oberflächlichen, nicht pigmentierten epithelialen Hauttumoren mit einer Tumordicke < 2-3 mm, wie zum Beispiel Basalzellkarzinomen und initialen spinozellulären Karzinome, epithelialen Vorläuferläsionen, aktinischen Keratosen und Morbus Bowen [[Fritsch et al. 1998](#), [Laetsch et al. 2004](#), [Tschen et al. 2006](#)].

2.2 Mechanismus der Photodynamischen Therapie (PDT)

Die Photodynamische Therapie basiert auf der intrazellulären Akkumulation eines Photosensibilisators. Dieser kann systemisch über die Venen, lokal extra- oder lokal intraoral appliziert und nach einer definierten Einwirkdauer mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt werden. Der Photosensibilisator absorbiert während der Bestrahlung Lichtenergie und erreicht durch Umwandlung den energetisch höheren Singulettzustand S1. Durch interne Konversion, Abgabe von Wärme oder Abgabe von Fluoreszenzlicht wird dieser wieder in den Grundzustand zurückgeführt.

Eine weitere Möglichkeit besteht im Übergang des Photosensibilisators vom exzitieren Singulett-Zustand S1 in den Triplett-Zustand T1 [[Nauta et al. 1996](#)]. Von hier aus erfolgt der für die PDT entscheidende Energietransfer vom angeregten Triplett-Zustand T1 auf benachbarte Moleküle, insbesondere Sauerstoffmoleküle.

2.2.1 Mechanismus auf physikalisch-chemischer Ebene

Auf molekularer Ebene werden zwei photooxidative Mechanismen unterschieden, wobei beiden eine Schädigung von einzelnen Molekülen wie Enzymen und intrazellulären Strukturen und Organellen zugrunde liegt [Mroz et al. 2007].

Die photooxidative Reaktion vom Typ I ist durch einen Elektronentransfer vom Triplettzustand des Photosensibilisators auf ein Substrat charakterisiert. Hierbei werden hochreaktive Radikale erzeugt, die zu einer Oxidation von Biomolekülen und damit zu einer Zellschädigung führen [Henderson and Dougherty 1992] (Tab.1).

Beim Typ II- Mechanismus erfolgt eine direkte Übertragung der elektronischen Anregungsenergie von dem Photosensibilisator auf ein Sauerstoffmolekül. Das Sauerstoffmolekül geht in den angeregten Singulett-Zustand über, während das Sensibilisatormolekül vom angeregten Triplett-Zustand in den Grundzustand umgewandelt wird [Bunting 1992]. Der angeregte Singulett-Sauerstoff ist wie beim Typ-I-Mechanismus zu einer Zellschädigung befähigt. Die Photosensibilisatormoleküle kehren in ihren Grundzustand zurück und sind prinzipiell wieder für die Absorption des Lichts und damit erneut für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies befähigt [Schneckenburger 2003].

Reaktionstyp	Sauerstoff-Spezies
Typ I-Reaktion	Hydroxylradikal
	Hydroperoxid
	Superoxidradikal
Typ II-Reaktion	Singulett-Sauerstoff

Tabelle 1: Dargestellt sind die aktivierten Sauerstoffspezies, die im Falle einer Typ I- oder Typ II- Reaktion entstehen können.

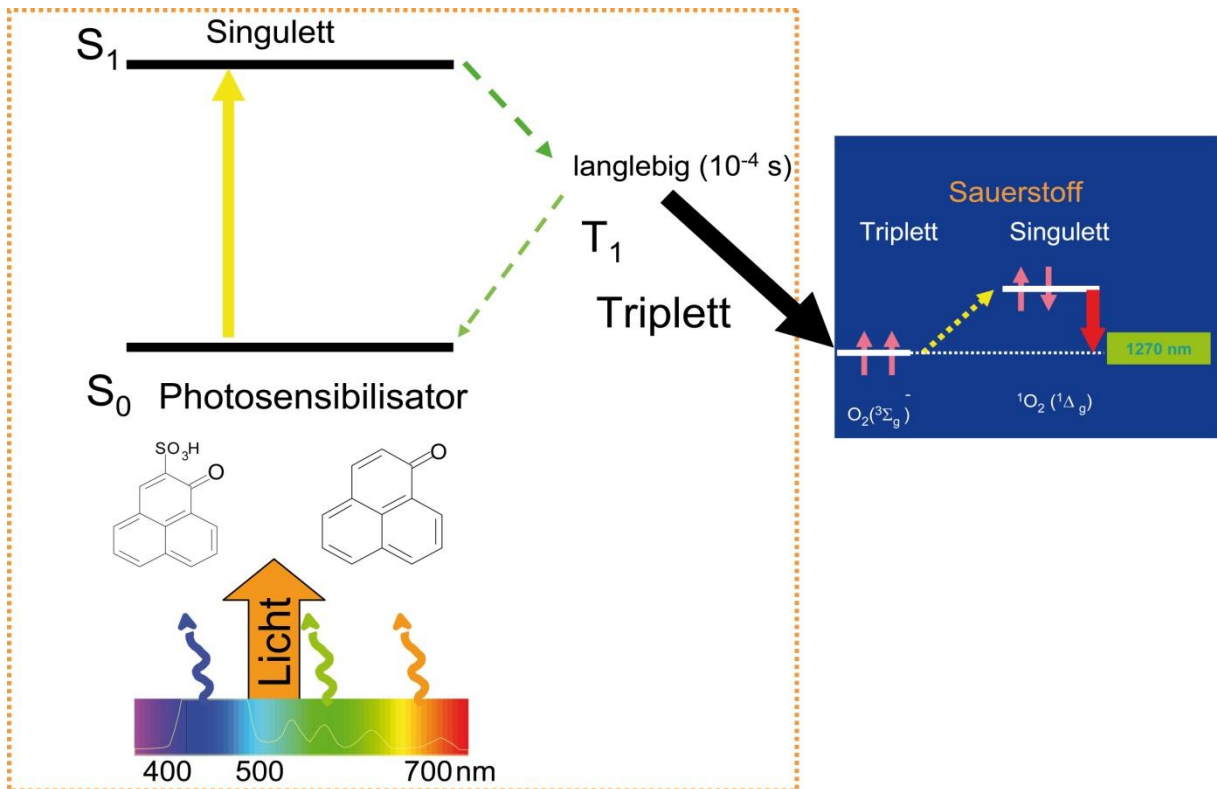


Abbildung 2: Das Schema stellt die elektronischen Zustände eines Moleküls sowie die Umwandlung dieser Zustände dar. S₀ bezeichnet den Grundzustand des Moleküls, S₁ ist der erste angeregte Zustand, welcher durch Absorption eines Anregungsphotons erreicht werden kann. Es kommt dann zu einem Übergang aus dem angeregten Singulettzustand in einen Triplettzustand (T₁). Von hier ist eine Übertragung der Energie auf Sauerstoff zum Singulett-Sauerstoff möglich [Maisch 2007].

2.2.2 Mechanismus auf biologischer Ebene

Die Art der Gewebeerstörung geschieht auf zellulärer, vaskulärer und immunologischer Ebene. Singulett-Sauerstoff, welcher in der Typ II- Reaktion gebildet wurde, ist in der Lage Aminosäuren, Nukleinsäuren, Fettsäuren, Phospholipide und Cholesterin zu oxidieren. Insbesondere Aminosäuren und ungesättigte Fette, aber auch Alkohole, Zucker und Nukleinsäuren verlieren durch die Oxidation ihren biochemischen Charakter, ihre Funktion und ihren Zusammenhalt in organischen Strukturen [Spikes 1988].

Zelluläre Ebene

Durch die oxidative Degradation von Lipiden und Protein-cross-linking wird die Depolarisierung der Membranen verändert. Membranenzyme werden inaktiviert und verlieren ihre katalytische Fähigkeit. Es kommt zu Einstülpungen innerhalb der Plasmamembran und zur Zellschwellung und Zellyse. Die chemische Struktur des Photosensibilisators und dessen Lokalisation entscheidet über die Art der Zellschädigung. Während sich die lipophilen Photosensibilisatoren bevorzugt an Membranen anlagern, sind hydrophile Photosensibilisatoren vornehmlich an der Zerstörung von Lysosomen beteiligt [Kübler 1999]. Die in der PDT zur Anwendung kommenden Porphyrine und Porphyrinderivate lagern sich im Bereich der Plasmamembran an. Anschließend erfolgt der Transport ins Zellinnere. Nur wenige Stunden nach Bestrahlung werden die Schäden licht- und elektronenmikroskopisch sichtbar: Die Zellmembran zeigt Ausstülpungen und weitere Membranen wie die des Zellkerns, der Mitochondrien, der Lysosomen, des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates weisen Schäden auf.

Vaskuläre Ebene

Auf vaskulärer Ebene wird durch die photodynamische Reaktion eine Endothelschädigung der Tumorgefäße induziert, die im Gefäß zur Thrombozytenaggregation, verstärkter Freisetzung vasoaktiver Substanzen, gesteigerter vaskulärer Permeabilität und Gefäßkonstriktion führt. Die Folge ist eine Hypoxie bedingte Nekrose des Gewebes.

Immunologische Ebene

Auf immunologischer Ebene kann über die Ausschüttung von Immunmodulatoren - wie zum Beispiel Interleukin 6 (IL-6) - und Komplementfaktoren eine antitumorale Immunreaktion ausgelöst werden, welche durch die Ausschüttung von TNF-alpha und Phagozytose von opsonierten Zellen eingeleitet wird [Foote 1984, Dougherty et al. 1993, Biel 1996, Gollnick et al. 2003].

2.3 Klinische Anwendung

2.3.1 Klinische Anwendung der Photodynamischen Therapie (PDT)

Die PDT gewinnt heutzutage vor allem in der kurativen Behandlung von epithelialen Vorläuferläsionen, oberflächlichen Tumoren (Eindringtiefe in die Haut max. 3mm) und in der palliativen Tumortherapie zunehmend an Bedeutung [Dissemond und Grabbe 2006, Kvaal and Warloe 2007, Palumbo 2007]. Auch nicht-onkologische Erkrankungen wie die exsudative altersbedingte Makulardegeneration [Pauleikhoff et al. 2005], Akne vulgaris [Gold 2007, Klein et al. 2008] oder Psoriasis vulgaris [Morton et al. 2008] können mit der PDT behandelt werden.

Zur Behandlung von hyperkeratotischen und nicht-pigmentierten aktinischen Keratosen der Gesichts- und Kopfhaut sowie oberflächlichen und nodulären Basalzellkarzinomen dient beispielsweise die PDT mit Metvix® 160mg/g Creme (Wirkstoff: Methyl-Aminolevulinat). Es finden 2 Sitzungen im Abstand von einer Woche statt. Die Creme wird in einer Schicht von ca. 1mm Dicke auf die entsprechende Stelle aufgetragen und 5-10 mm im Randbereich ausgedehnt. Nach dreistündiger, luftdichter Abdeckung erfolgt eine Bestrahlung mit einem kontinuierlichen Spektrum von 570-670 nm und einer Gesamtdosis von 75 J/cm². Lokale Nebenwirkungen am Behandlungsort treten bei 60-80 % der Patienten auf (leicht bis mäßig schmerzhaft Hautempfindungen, Erythem, Ödem, Pruritus, Jucken, Brennen) [Steinbauer et al. 2009].

2.3.2 Klinische Anwendung der Photodynamischen Diagnostik (PDD)

Die sogenannte „photodynamische Diagnostik“ basiert auf der gezielten Anregung von fluoreszierenden Vitalfarbstoffen, die vermehrt in dysplastischen oder atypischen Zellen aufgenommen, metabolisch aktiviert und in ihrer aktiven Form retiniert werden. Die fluoreszierenden Vitalfarbstoffe (Photosensibilisatoren) werden entweder als exogene

Substanzen appliziert oder sind als sogenannte endogene Fluorophore bereits im Organismus vorhanden.

2.3.2.1 Photodynamische Diagnostik mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA)

In der Dermatologie wird aufgrund der guten Verträglichkeit und hohen Selektivität in erster Linie 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), die körpereigene Ausgangssubstanz der Häm-Synthese, als exogene Substanz appliziert (**Abb.3**). Im Überschuss verabreichtes 5-ALA stimuliert in dysplastischem - und in karzinomatösem Gewebe eine verstärkte Bildung und intrazelluläre Akkumulation des Photosensibilisators Protoporphyrin IX (PPIX), aufgrund des erhöhten Stoffwechsels in malignen Geweben [[Bäumler 2003](#)].

Nach einer definierten Einwirkzeit folgt die Bestrahlung des zu behandelnden Gewebes. Dabei soll die Lichtqualität im Bereich des absoluten Absorptionsmaximums von PPIX liegen, damit eine optimale Aktivierung und Fluoreszenz erfolgen kann. Die Penetrationstiefe der Strahlen korreliert dabei mit der Qualität des Lichtes: je langwelliger die Wellenlänge des Lichtes, desto größer ist die Eindringtiefe der Strahlen in das Gewebe [[Thomas et al. 1992](#)] (**u. s. Abschnitt 1.6.1**). Das fluoreszierende Protoporphyrin IX wird durch kurzfristige Einwirkung von Licht einer Wellenlänge von 405 nm angeregt [[Leunig et al. 1996](#), [Chang and Wilder-Smith 2005](#)]. Die Fluoreszenzbefunde gelten als suspekt und können biopsiert werden [[Driemel et al. 2008](#)] (**Abb.4**).

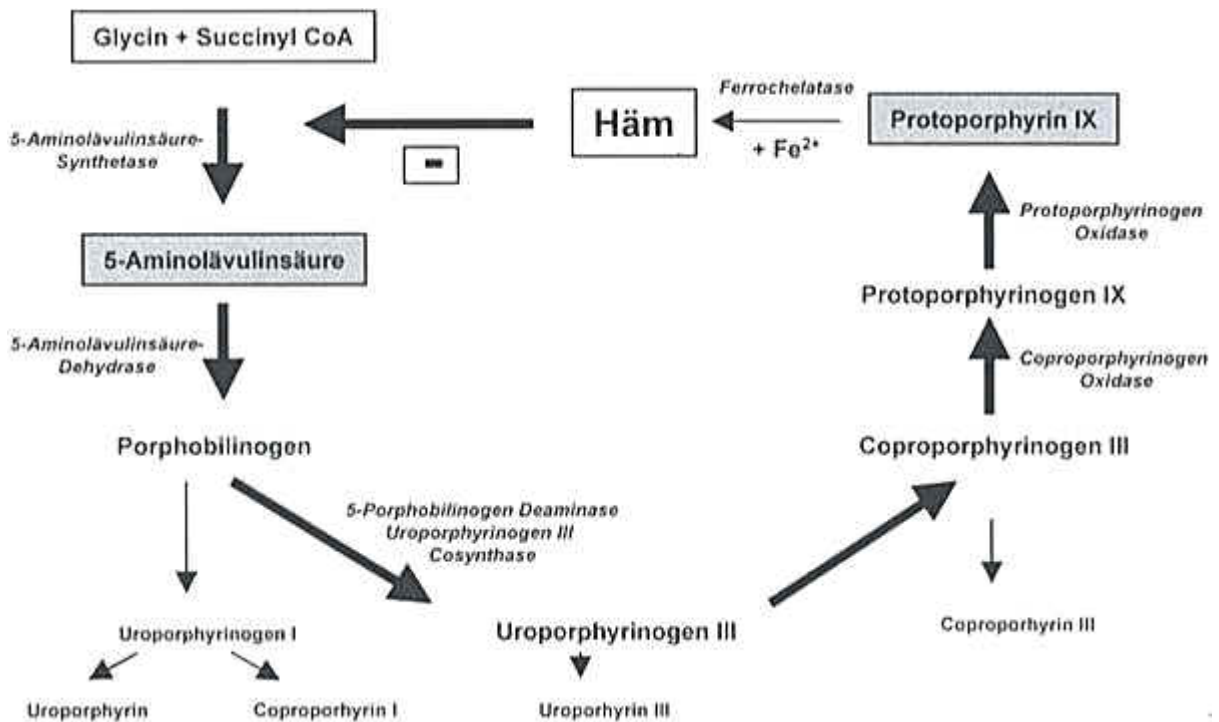


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hämsynthese: 5-ALA ist ein Vorläufer von Häm im körpereigenen Stoffwechsel. Es wird durch das Enzym Aminolävulinsynthase aus Glyzin und Succinat gebildet. 5-ALA selbst ist kein Photosensibilisator, wird aber im Zielgewebe zu Porphyrinen, hauptsächlich Protoporphyrin IX, metabolisiert. Die exogene Zufuhr von 5-ALA bewirkt eine Umgehung des ersten Reaktionsschrittes im Häm-Stoffwechsel. Der negative Rückkopplungsmechanismus (- = negative Rückkopplung) kann umgangen werden.

Die Diagnostik maligner Gewebe mit fluoreszierenden Substanzen wird neben der Dermatologie auch in anderen Fachbereichen der Medizin betrieben.

In der photodynamischen Diagnostik des Mundhöhlenkarzinoms und seiner Vorläuferläsionen wird als photosensibilisierender Farbstoff insbesondere 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) verwendet [Driemel et al. 2007] (Abb.4).

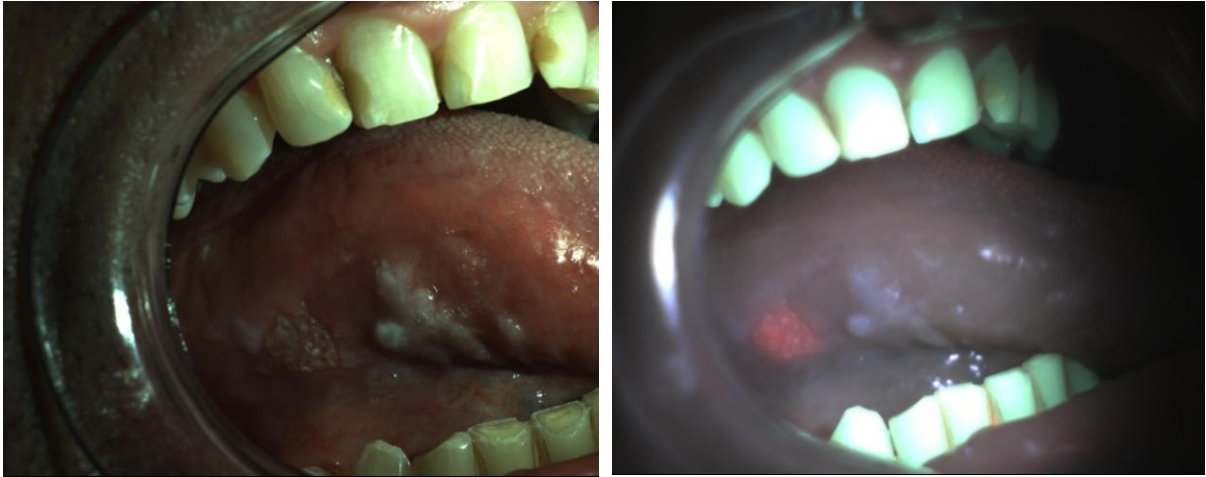
**a****b**

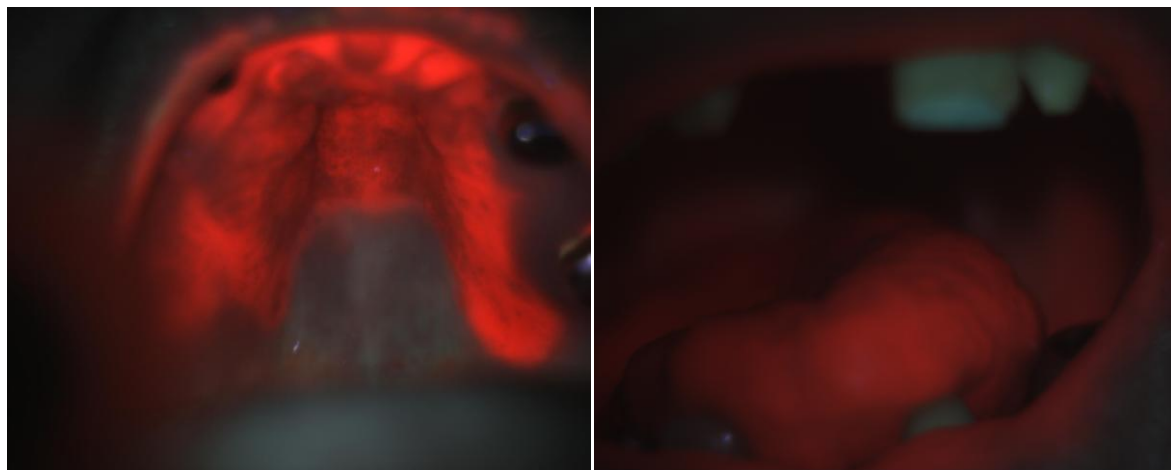
Abbildung 4: Fluoreszenzbefunde einer Leukoplakie und eines Plattenepithelkarzinoms der Zunge (Quelle: Schleier P und Zenk W, MKG-Chirurgie, Universität Jena). **a** Inhomogene Leukoplakie des rechten Zungenrandes. Bei genauer Betrachtung zusätzlich flaches Ulkus distal der Leukoplakie. **b** Im Fluoreszenzbild wird der dorsal gelegene, verrucöse Anteil der Läsion auffällig, während die Leukoplakie nicht markiert wird. Die histopathologische Begutachtung der mittels photodynamischer Diagnostik gezielten Biopsie ergab ein Plattenepithelkarzinom.

In mehreren Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass die photodynamische Diagnostik mit 5-ALA ein Mundhöhlenkarzinom mit hoher Wahrscheinlichkeit als Karzinom erkennen kann (**Tab.2**). Dagegen gelang in denselben Studien eine Einordnung benigner Läsionen als benigne in nur etwa zwei Drittel der Fälle. Die Methode weist folglich zwar eine hohe Sensitivität, aber eine recht geringe Spezifität auf.

Autor	Läsionen	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Positiver Vorher- sagewert [%]	Negativer Vorher- sagewert [%]
Leunig et al. (2000)	58	99	60	77	97
Schleier et al. (2002a)	198	96	73	88	93
Sharwani et al. (2006)	71	84	89	87	87

Tabelle 2: Wertigkeit der Photodynamische Diagnose mit 5-Aminolävulinsäure zur Früherkennung des oralen Plattenepithelkarzinoms

Problematisch sind die falsch positiven Befunde bei Prothesenträgern und insbesondere bei vorbestrahlten Patienten [Zenk et al. 1999, Betz et al. 2002, Schleier et al. 2002], so dass sich die photodynamische Diagnose nicht für die Rezidiv- bzw. Zweitumordiagnostik bei zuvor bestrahlten Patienten eignet [Zenk et al. 1999](Abb.5).



a

b

Abbildung 5: Falsch positive Befunde bei Prothesenträgern und vorbestrahlten Patienten (Quelle: Schleier P und Zenk W, MKG-Chirurgie, Universität Jena). **a** Generalisierte Fluoreszenz der Mundschleimhaut im Oberkiefer bei einem Prothesenträger. **b** Die

generalisierte Fluoreszenz der oralen Schleimhaut eines bestrahlten Patienten macht eine Differenzierung von Tumorgewebe unmöglich.

Da verschiedene Bakterienstämme der Mundhöhle bei Inkubation von 5-ALA ebenfalls Protoporphyrin IX bilden [Doss M et al. 1973, Mashberg et al. 1995], sind im Rahmen der photodynamischen Diagnose professionelle Hygienemaßnahmen zur Erhöhung der Spezifität notwendig [Schleier et al. 2002]. Ein Intervall von ungefähr einer Stunde zwischen professionellen Hygienemaßnahmen und der Applikation des Photosensibilisators 5-ALA sowie von etwa drei Stunden zwischen Applikation des Photosensibilisators 5-ALA und der Bildung einer für die Fluoreszenzmessung ausreichenden Menge an Protoporphyrin IX [Schleier et al. 2002] schränken die Praktikabilität der photodynamischen Diagnose in der ambulanten Tumovor- und -nachsorge aufgrund des hohen Zeitaufwandes stark ein [Hullmann 2010]. Da bereits geringe Mengen Glukose die Bildung von Protoporphyrin IX beeinflussen, wird zudem eine strikte Nahrungskarenz während dieses Zeitraumes von 4 Stunden notwendig [Zenk et al. 1999]. Dieses verlangt ein stringentes Patientenmanagement und ist unter Berücksichtigung der begrenzten Compliance gerade der Patienten mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Mundhöhlenkarzinoms schwierig zu realisieren.

2.3.2.2 Autofluoreszenz als diagnostischer Marker

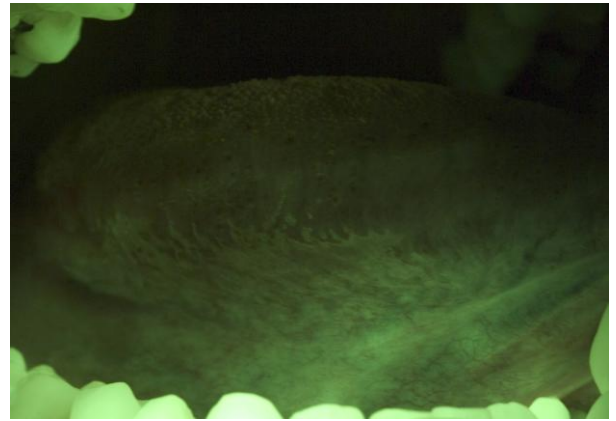
Autofluoreszenz bezeichnet die biologische Eigenschaft von Gewebe, aufgrund endogener Fluorophore, wie z.B. Flavin, Tryptophan, Elastin und Kollagen, bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge zu fluoreszieren [Policard 1924, Betz et al. 1994] (Abb.6). Als charakteristisch für die maligne Transformation gilt eine Reduktion der Fluoreszenz im Grünbereich sichtbaren Lichtes [Poh et al. 2006].

Optischer Befund

Autofluoreszenz



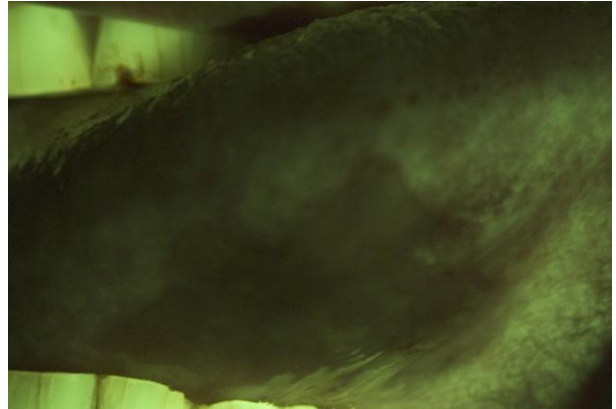
a



b



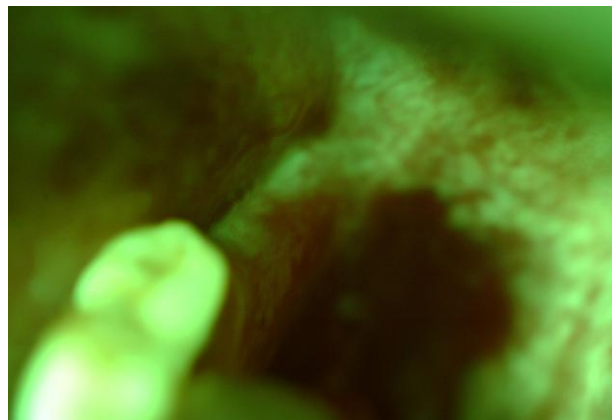
c



d



e



f

Abbildung 6: Autofluoreszenz (Mit freundlicher Genehmigung der Rocker und Narjes GmbH, Köln). **a** Normale Mundschleimhaut. **b** Erhaltene Autofluoreszenz. **c** Leukoplakie mit schwerer Dysplasie. **d** Verminderte Autofluoreszenz. **e** Carcinoma in situ. **f** Fehlende Autofluoreszenz.

Im Gegensatz zur Photodynamischen Diagnose erfordert die Autofluoreszenz keine medikamentöse Gabe von Photosensibilisatoren. Ihr Stellenwert in der Diagnostik epithelialer Tumoren findet sich in den unterschiedlichen medizinischen Teilbereichen in der Erprobung [Baletic et al. 2004, Ohkawa et al. 2004, DaCosta et al. 2005]. Da neben der malignen Transformation auch andere pathologische Prozesse, wie zum Beispiel Entzündungen und Ischämie, den metabolischen Zustand einer Zelle und somit den oxidativen Zustand des Gewebes beeinflussen, ist die Treffsicherheit bislang nicht abschließend untersucht. Erste Ergebnisse für Vorläuferläsionen der Mundschleimhaut weisen aber auf mögliche Vorteile für die Früherkennung auch subklinischer Läsionen hin [Poh et al. 2006, 2007].

2.4 Sauerstoffabhängigkeit der Photodynamischen Therapie (PDT)

Der Wirkungsgrad der PDT hängt ganz entscheidend von der Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), insbesondere von Singulett-Sauerstoff ab [Chekulayeva et al. 2006]. In-vitro-Studien zur Anwendung der PDT in der Tumorthherapie belegen, dass eine erhöhte Gabe von Sauerstoff eine effektivere Schädigung von Tumorzellen bedingt. Dagegen zeigt die PDT bei Abwesenheit von Sauerstoff keinen oder nur einen geringen Effekt auf die Tumorzellen [Calzavara-Pinton et al. 2007].

Die Menge der entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies hängt wiederum ab von der Konzentration und der Quantenausbeute der lichtempfindlichen Substanz [Berlanda et al. 2006], sowie vom Ort des Einbringens, von der Lichtenergie und vom Sauerstoffgehalt. In diesem Zusammenhang lässt sich die Hochdosis-PDT zur Behandlung von Tumoren von der Niedrigdosis-PDT zur Behandlung von Entzündungen unterscheiden.

Die Hochdosis-PDT beinhaltet eine hohe Lichtdosis (100-150 J/cm²) bei hoher Lichtintensität (100-200 mW/cm²) und meist höheren Photosensibilisatorkonzentrationen, während die Niedrigdosis-PDT eine geringere Lichtdosis (10 J/cm²) bei niedriger Intensität (40 mW/cm²) aufweist [Abels 2003].

Neben einer durch Licht angeregten photosensibilisierenden Substanz erfordert die PDT im Gewebe Sauerstoff, wodurch die Entstehung des hochreaktiven Singulett-Sauerstoffs resultiert, welcher als starkes Oxidationsmittel den Zelltod in Form von Apoptose und Nekrose verursacht [Ma et al. 1994]. Darüberhinaus wirkt die PDT sekundär auch auf die Vaskularisation des Gewebes, indem sie zur Thrombenbildung innerhalb des Gefäßes und letzten Endes zum Verschluss des Gefäßes führt [Reed et al. 1989, Jacobs et al. 1990, Fingar 1996].

2.5 Quenchen in der Photodynamischen Therapie (PDT)

Molekularer Sauerstoff, der sich durch die Energieübertragung eines angeregten Photosensibilisators im Zustand des Singulett-Sauerstoffs befindet kann seine Aktivierungsenergie strahlungslos an umgebende Moleküle abgeben und wird so deaktiviert. Dieser Prozess wird als Quenchen bezeichnet. Natriumacid als Quencher der Typ-II-Reaktion verhindert, dass Singulett-Sauerstoff mit zellulären Strukturen reagiert und diese schädigt. Histidin ist im Gegensatz dazu ein Quencher der Typ-I- Reaktion („Radikalfänger“).

2.6 Lichtquellen

Im Gegensatz zu Zeiten Tappeiners und Jesioneks spielt das Sonnenlicht heutzutage eine untergeordnete Rolle für die Photodynamische Strahlentherapie und die Fluoreszenzdiagnostik. Vielmehr wird das natürliche Licht durch künstliches ersetzt und die Wellenlänge genau definiert, um den Zustand eines angeregten Photosensitizers zu erreichen. Je mehr sich die Wellenlänge des applizierten Lichtes dem Absorptionsmaximum des

Photosensibilisators übereinstimmen, desto größer ist die vom Gewebe aufgenommene Energie. Neben der Wellenlänge entscheidet die applizierte Lichtmenge über den gewünschten Effekt der Photodynamischen Therapie und der Fluoreszenzdiagnostik.

Als Bestrahlungsmediatoren können argon- oder kupferdampfgepumpte Rhodaminfarbstofflaser verwendet werden, deren Spektralbereich zwischen 300 und 1200 nm liegt [Landthaler et al. 1993, Lui and Anderson 1992]. Da die Absorptionsbanden der bisher am besten untersuchten Photosensibilisatoren HpD und DHE bei 630 nm liegen, ermöglicht die Einstellung der Laser auf diesen Spektralbereich eine für die PDT optimale Absorption des Lichtes durch die Photosensibilisatoren. Der Emissionsbereich des GolddampfLasers bei 628 nm eignet sich ebenfalls zu Bestrahlung der Sensibilisatoren HpD und DHE [Landthaler et al. 1993].

Nichtkohärente Lichtquellen sind allerdings die entscheidenden Lichtquellen in der PDT, da sie einen großen Spektralbereich erfassen im Gegensatz zu den Lasern, die nur auf eine bestimmte Wellenlänge eingestellt werden können.

In der Dermatologie werden polychromatische Lichtquellen wie 250-W- oder 500-W-Quarz-Halogen-Lampen oder Diaprojektoren bevorzugt, da sie preisgünstig sind und Hautareale gleichmäßig und großflächig erfassen [Kennedy et al. 1992, Wolf et al. 1993, Fijan S. et al. 1995, Wolf et al. 1995, Fink-Puches et al. 1997, Fink-Puches et al. 1998].

2.6.1 Die Eindringtiefe von Licht in Gewebe

Damit eine Behandlung mittels Photodynamischer Therapie erfolgen kann, muss das Licht den in der Haut lokalisierten Photosensibilisator erreichen. Aufgrund physikalischer Gegebenheiten wie Streuung und Absorption gelangt immer nur ein bestimmter Anteil des Lichtes zu den Photosensibilisatoren, welcher vom Gewebetyp und vor allem von der Wellenlänge des Lichtes bestimmt wird. Verantwortlich dafür zeigen sich die verschiedenen, im Gewebe befindlichen Substanzen, die Licht bei unterschiedlichen Wellenlängen

absorbieren. Licht einer Wellenlänge unterhalb von 600 nm wird durch Hämoglobin, Licht der Wellenlänge >1200 nm durch Wasser absorbiert (**Abb.7**). Damit ergibt sich ein so genanntes optisches Fenster zwischen etwa 600-1100 nm, in dem Photosensibilisatoren für die PDT eingesetzt werden sollten (**Abb.7**).

Die Eindringtiefe von Licht in Gewebe bei der die Strahlungsintensität auf 37 % des Ausgangswertes vermindert ist, bezeichnet man als optische Penetrationstiefe (**Tabelle 3**).

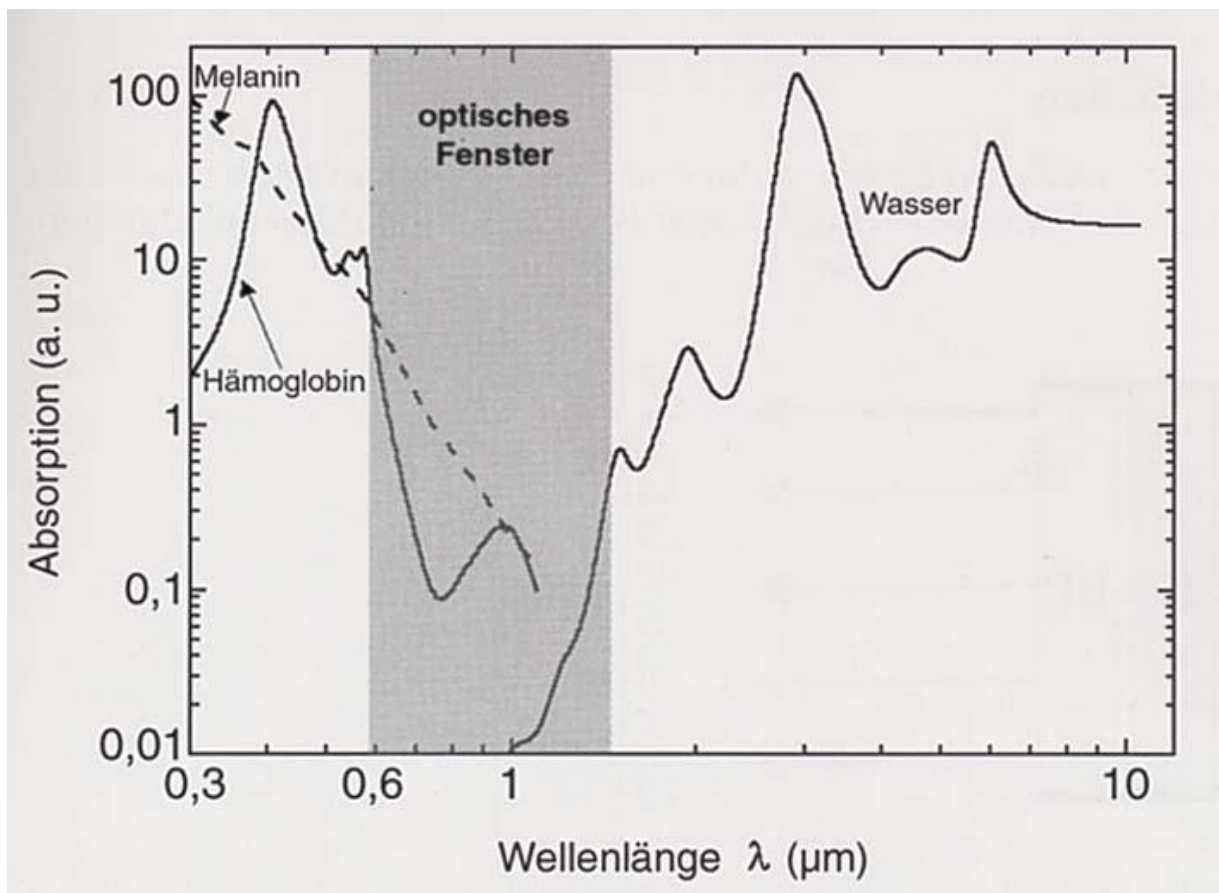


Abbildung 7: Die minimale Absorption von Licht im Bereich 600-1100 nm durch die körpereigenen Chromophore wie Hämoglobin, Melanin oder Wasser wird als optisches Fenster von Gewebe bezeichnet. In diesem Bereich kommt es zur stärksten Absorption von Licht durch den Farbstoff (z.B. PPIX) [Bäumler 2003].

Wellenlänge [nm]	Optische Penetrationstiefe
400 nm	<1 mm
514 nm	0,5-2 mm
630 nm	1-6 mm
700-800 nm	5-10 mm

Tabelle 3: Dargestellt sind die optischen Penetrationstiefen in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichtes [[Anderson RR et al. 1981](#)].

2.7 Photosensibilisatoren

Photosensibilisatoren sollten gewisse Voraussetzungen erfüllen, um Anwendung in der PDT zu finden. Einerseits sollte eine hohe Phototoxizität vorliegen, die sich aus der interzellulären Lokalisation und Konzentration ergibt, andererseits darf keine bis nur geringfügige Dunkeltoxizität des Photosensibilisators gegeben sein. Er soll leicht verfügbar, chemisch stabil und pharmakokinetisch unbedenklich sein. Zudem sollte die Lichtabsorption des Photosensibilisators im roten Bereich (zwischen 650 und 800 nm) liegen. Der Wirkstoff soll sich selektiv im erkrankten Gewebe anreichern und die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute bei therapeutischer Anwendung soll möglichst hoch sein. Nach Phototherapiebehandlung soll der Farbstoff durch den Organismus rasch wieder ausgeschieden werden können [[Franck et al. 1994](#), [Franck und Nonn 1995](#)].

Die Aufnahme des Photosensibilisators im Gewebe erfolgt je nach Wirkstoff entweder aktiv über die spezifische Membranaffinität oder passiv über die verminderte Clearance der Substanz [[Zhong et al. 2003](#)]. Die besten Eigenschaften als photoaktive Substanz zeigen amphiphile Aktivatoren, da sie sich sowohl an lipophilen als auch an hydrophoben Strukturen anlagern können [[MacDonald and Dougherty 2001](#)].

Nach Verabreichung des Photosensibilisators und Einhaltung der entsprechenden Wartezeit ergibt sich eine Verteilung im Gewebe, die sich anhand des Akkumulationsindex (A_p) errechnen lässt ($A_p = \text{Akkumulation im Tumorgewebe} : \text{Akkumulation im gesunden Gewebe}$). Das Verhältnis zwischen Anreicherung im pathologischen und gesunden Gewebe liegt bei den meisten Photosensibilisatoren in einem Bereich von 2:1 bis 5:1 [Pass 1993].

Die zu diesem Verhältnis beitragenden Mechanismen konnten noch nicht ausreichend geklärt werden. Sie liegen aber vermutlich darin begründet, dass aufgrund der höheren Tumervaskularisierung eine erhöhte PS-Zufuhr gegeben ist und durch den niedrigeren pH-Wert eine höhere Retention des Wirkstoffes durch verminderte Löslichkeit im sauren Milieu erfolgt. Zudem ist der PS-Abtransport aufgrund unterentwickelter Tumorlymphgefäße geschwächt. Makrophagen und tumorassoziierte Monozyten verstärken zudem die Aufnahme vom Photosensibilisator in das Tumorgewebe.

Eine Übersicht der im klinischen Alltag verwendeten Photosensibilisatoren ist in Tabelle 4 dargestellt. Photosan 3[®] und Photofrin[®] als Photosensibilisatoren der „ersten Generation“ gehören dieser Gruppe (HPD) an. Sie weisen allerdings nur eine geringe Selektivität zwischen gesundem Gewebe und Tumor auf [Berenbaum et al. 1986]. Die optimale Absorption dieser Sensibilisatoren liegt bei 405-420 nm. In diesem Bereich dringt Licht aber nur bis maximal 1 mm in das Gewebe ein, weshalb die Therapie auf Tumoren mit dieser maximalen Dicke beschränkt bleibt. Im langwelligeren Bereich des Absorptionsspektrums zeigen sich mehrere Absorptions-spitzen im Bereich zwischen 500-700 nm.

Photofrin[®] (Fa. Meduna, Isernhagen, Deutschland) wird intravenös verabreicht und 48 Stunden danach mit rotem Licht der Wellenlänge 630 nm bestrahlt. Der entscheidende Nachteil von Photofrin[®] liegt jedoch in der langen posttherapeutischen Lichtsensibilisierung der Haut, weshalb den Patienten für 6 Wochen jede Form der Lichtaussetzung untersagt ist. Aus diesem Grund wurde die klinische Anwendung in der Vergangenheit stark eingeschränkt [Schleier et al. 2004].

Zur zweiten Generation der Photosensibilisatoren zählen unter anderem das Benzoporphyrinderivat (BPD), meso-Tetraphenylpopyrin (TPPS4), Zink-Phtalozyanin, Chlorine (mTHPC, Handelsname Foscan[®]) und Aminolävulinsäure (ALA). Der Vorteil dieser Generation liegt in der schnelleren Anreicherung im Tumorgewebe begründet. Zudem liegen die Absorptionsbanden vermehrt im langwelligen Bereich, so dass dickere Tumoren behandelt werden können. Die Photosensibilisierungsdauer liegt im Gegensatz zu den Photosensibilisatoren der ersten Generation bei 1-2 Tagen.

Der Wirkstoff mTHPC wird seit 1989 in klinischen Studien am Patienten erprobt [Bonnet et al. 1989, Moan 1990]. THPC zeigt eine größere Gewebeeindringtiefe als Hämatoporphyrinderivate, weist eine geringere Lichtsensibilisierungsdauer von 2 Wochen nach Injektion auf. Die Substanz ist im Vergleich zu Photofrin[®] mit einem höheren Anteil lipophiler Substanzen gekennzeichnet. Daher erfolgt die intrazelluläre Aufnahme schneller, die Retention ist stärker und die Anreicherung im Gewebe erhöht. Die Verteilung von mTHPC in der Zelle erfolgt im Plasma ohne Einbeziehung der Kernmembran [Dougherty 1987, Ma et al. 1994].

Eine Sonderstellung nimmt ein Metabolit der Hämsynthese, 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), ein. 1990 kam 5-Ala erstmals zum Einsatz. Das geringe Molekulargewicht von 5-ALA (Levulan[®], Molmasse: 167,6 g/mol) und später von Methyl-Aminulävulinsäure als Hydrochlorid (MAL, Metvix[®], Molmasse: 181,6 g/mol) ermöglichen ein gutes Eindringen durch die pathologisch veränderte Epidermis von Hauttumoren. 5-ALA stellt ein Zwischenprodukt der Hämbiosynthese von Säugetieren dar und ist selber nicht die eigentliche photosensibilisierende Substanz. Vielmehr wird es im Gewebe in Protoporphyrin IX (PPIX) umgewandelt [Kennedy and Pottier 1992]. Es zeichnet sich durch eine hohe Selektivität bezüglich des tumorösen Gewebes aus und findet daher auch Anwendung in der Photodynamischen Diagnostik.

Kurzname	Substanz	Handelsname	Absorptionswellenlänge
HPD	Hämatoporphyrinderivat	Photofrin [®]	630 nm
BPD-MA	Benoporphyrinderivat Monoacid Ring A	Verteporfin [®]	690 nm
ALA	5- Aminolävulinsäure	Levulan [®]	400-450 nm
MAL	Methylaminolävulinsäure	Metvix [®]	630 nm
mTHPC	Mesotetrahydroxyphenylchlorin	Foscan [®]	652 nm

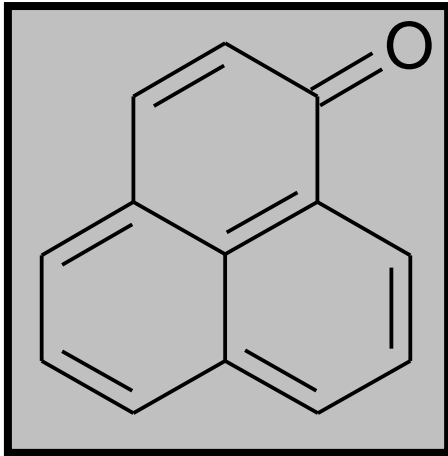
Tabelle 4: Dargestellt ist eine Übersicht der häufig im klinischen Bereich verwendeten Photosensibilisatoren [Okutsu et al. 2000].

2.7.1 Perinaphtenon in wasserunlöslicher und wasserlöslicher Form (PN und PNS)

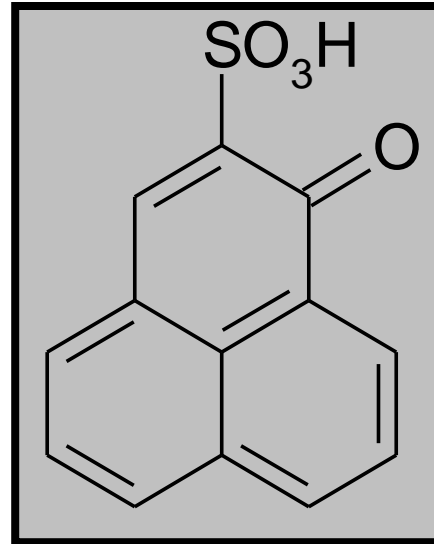
In der vorliegenden Arbeit wurde mit den Photosensibilisatoren PN und PNS gearbeitet. Perinaphtenon (PN, Arcos Organics, New Jersey, USA) ist als Referenzstruktur für die Bildung von Singulett-Sauerstoff bekannt. Das Molekulargewicht liegt bei 180 g/mol. Das Absorptionsspektrum liegt zwischen 360-420 nm. Das Molekulargewicht von PNS beträgt 260,27 g/mol und das Absorptionsmaximum liegt bei 367nm. **Abbildung 8b** zeigt die Strukturformel von PNS.

PN ist ein unpolares, aromatisches Keton. In **Abbildung 8a** ist die Strukturformel von PN dargestellt. Es besitzt als Grundgerüst drei aromatische Ringe, die als Phenalen bezeichnet werden. Über eine Doppelbindung ist ein Sauerstoffatom an ein C-Atom gebunden. PN ist in H₂O unlöslich. Eine weitere Eigenschaft des gelben Farbstoffes ist seine Absorptionsfähigkeit im UV-Bereich.

Die sulfonisierte Form des PN stellt das wasserlösliche PNS (**Abb.8b**) dar. Es ist ein negativ geladenes Derivat von PN und besitzt die Fähigkeit Singulett-Sauerstoff in wässrigen Medien zu generieren.



a



b

Abbildung 8a und b: Die Abbildungen zeigen die Strukturformeln von PN und PNS. Die Hydrogensulfid - Gruppe ist für die Hydrophilie von PNS verantwortlich.

3. Ziel dieser Arbeit

Zusammenfassend gilt zu sagen, dass die PDT sich nicht nur zur Tumorvisualisierung und Tumorelimination einer Vielzahl unterschiedlicher Tumoren eignet, sondern ebenso zur Behandlung benignen oder entzündlicher Erkrankungen herangezogen werden kann. Als Beispiele sind hier die Psoriasis vulgaris oder die Akne vulgaris zu nennen [Bisonette R. et al 2002, Itoh Y et al. 2001]. Somit ist die PDT in der heutigen Zeit von großem Interesse und auch zukünftig wird ihr eine bedeutende Rolle in der Behandlung und Diagnostik vielzähliger Erkrankungen zukommen. Damit hat sich das Verfahren der PDT in den letzten Jahrzehnten zu einer denkbaren Alternative für palliative aber auch kurative Behandlungsansätze innerhalb der Tumorthherapie entwickelt. Die Bedeutung neuer Photosensibilisatoren gilt es unter dem Aspekt ihrer chemischen, physikalischen und pharmakologischen Eigenschaften jedoch noch unter Beweis zu stellen, bevor diagnostische oder therapeutische Ansätze für jeweilige diskutiert werden können.

In der vorliegenden, in Zellkulturen humaner dermaler Fibroblasten (NHDF) durchgeführten Studie sollen die wasserunlösliche und die wasserlösliche Form von Perinaphtenon (PN und PNS) als zwei neue potentielle Photosensibilisatoren für die Photodynamik näher charakterisiert und miteinander verglichen werden. Hierzu sollen für beide Perinaphtalene

1. ihre zelluläre Aufnahme mittels Spektroskopie gemessen,
2. ihre Lokalisation innerhalb der Zelle mittels Fluoreszenzmikroskop bestimmt,
3. ihre toxische Wirkung auf die humanen dermalen Fibroblasten mit und ohne Bestrahlung (Dunkeltoxizität) untersucht,
4. ihre toxische Wirkung auf die Zellkulturen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Konzentration getestet und
5. der vorherrschende photooxidative Mechanismus (Typ-II) indirekt durch Verwendung der Quenchersubstanz NaN_3 analysiert werden.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zelllinie

Normale humane dermale Fibroblasten (NHDF) (Cambrex Biotechnologie, Walkersville, USA)

4.1.2 Photosensibilisatoren

Perinaphtenon (PN)

Perinaphtenon (Arcos Organics, New Jersey, USA) ist als Referenzstruktur für die Bildung von Singulett-Sauerstoff bekannt [Okutsu et al. 2000]. Das Molekulargewicht von PN beträgt 180,21 g/mol. Das Absorptionsspektrum von PN liegt ca. zwischen 360 und 420 nm (**Abb.9**).

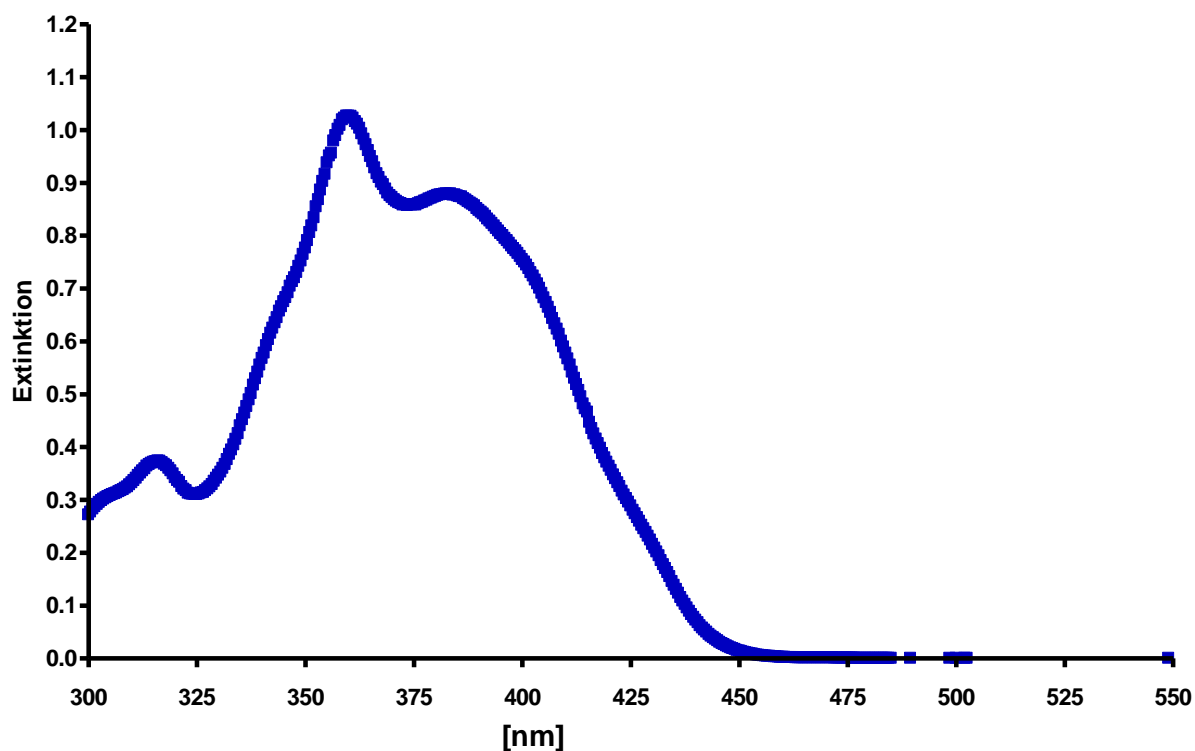


Abbildung 9: Dargestellt ist das Absorptionsspektrum von PN

Perinaphtenon in der wasserlöslichen Form (PNS)

PNS wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für organische Chemie (Prof. König) der Universität Regensburg synthetisiert. Die Synthese von PNS erfolgte nach dem Protokoll von Nonell et al. [Nonell et al. 1993].

Das Molekulargewicht von PNS beträgt 260,27 g/mol und das Absorptionsmaximum liegt bei 367nm (Abb.10).

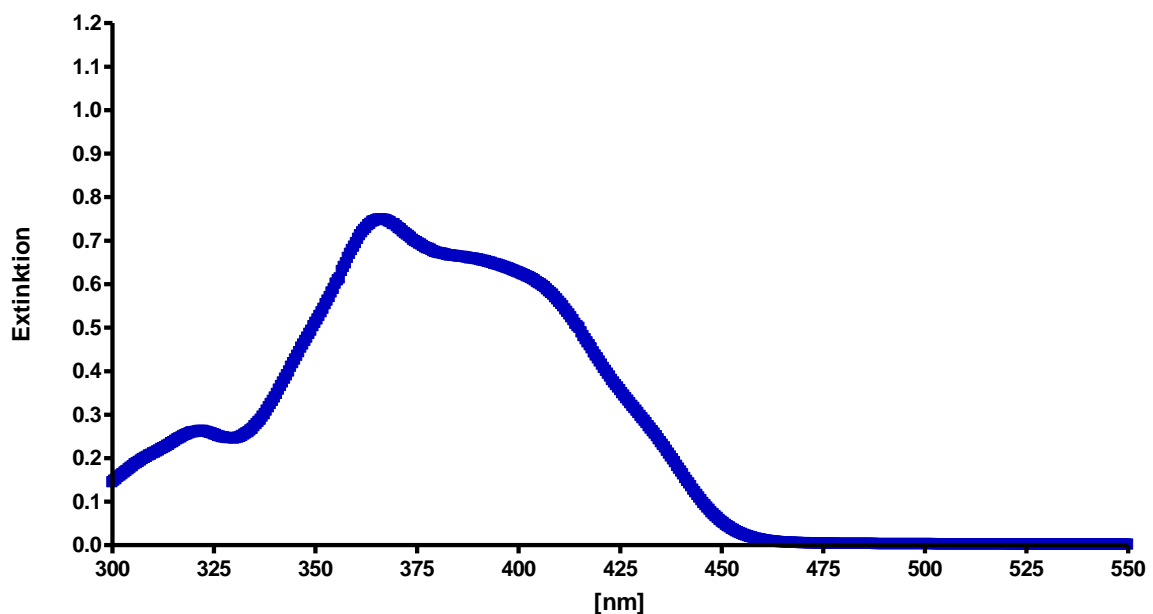


Abbildung 10: Dargestellt ist das Absorptionsspektrum von PNS

4.1.3 Reagenzien und Puffer

Reagenzien

- *Natriumazid (NaN₃)* (Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Bei Natriumazid handelt es sich um eine Quenchersubstanz zum indirekten Nachweis von Singulett-Sauerstoff (Typ-II-Reaktion).
- *Triton-x-100* als 1%-ige Lösung (200µl Triton-x-100 + 19,8ml PBS) (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- *EDTA-Lösung* (Gibco/invitogen, Karlsruhe, Deutschland)

- *MTT-Reagenz (3[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,-diphenyl-tetrazoliumbromid)*, 5mg/ml in PBS (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)
- *SDS Sodiumdodecylsulfat 20%* in H₂O (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)

Puffer

- *PBS („phosphate buffered saline“)* von Biochrom (Berlin, Deutschland); hierbei handelt es sich um einen physiologischen Phosphatpuffer mit folgender Zusammensetzung:
8000 mg/l NaCl, 1150 mg/l Na₂HPO₄, 200 mg/l KCl, 200 mg/l KH₂PO₄

4.1.4 Zellkulturmedien

- *FGM-2 BulletKit* (Cambrex Biotechnologie; Walkersville, USA)
- *FKS* ist fetales Kälberserum (PAN Biotech GmbH: Aidenbach, Deutschland)

4.1.5 Technische Geräte und Hilfsmittel

- *Mikroskop*, Vario Axio Tech von Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
- *Neubauer-Zählkammer* (VWR, Darmstadt)
- *Elisa-Reader (Enzym-linked Immunoabsorbent Assay-Reader)* (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland)
- *Objekttträger*, Micro Slides, white (Surgipath, Richmond, USA)
- *Kürvetten*, Curvettes, 10x4x45mm, No.67.742 (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- *96-Well-Mikrotitrierplatte*, Cat.No. 3598 (Costar Corning, New York, USA)

4.1.6 Zentrifugen

- *Zentrifuge* Biofuge Stratos von Heraeus (Nürnberg, Deutschland)
- *Tischzentrifuge* Mini Spin von Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

4.1.7 Spektralphotometer

- *Spektralphotometer DU ® 640* von Beckman (Fullerton, USA)

4.1.8 Lampen zur Bestrahlung

- *Lampe UV 236* (λ_{em} : 380 - 480nm) von Waldmann Medizintechnik (Villingen-Schwenningen, Deutschland). **Abb. 11** zeigt das Emissionsspektrum der Lampe UV 236. Die Lampe hat eine Leistung von $15,3 \text{ mW/cm}^2$.

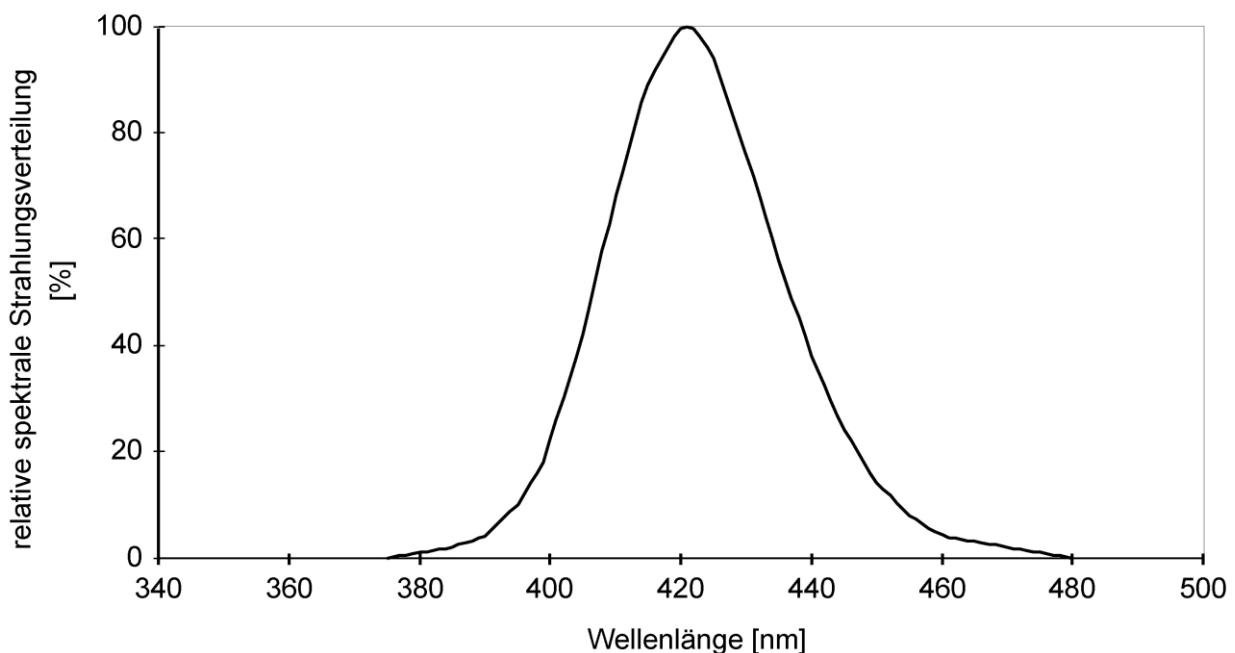


Abbildung 11: Emissionsspektrum der Lampe UV 236

4.1.9 Fluoreszenzmikroskop / Durchlichtmikroskop: Zeiss axio vario tech

Mit dem Emissionsspektrum einer Quecksilberdampfampe wurde mit Hilfe entsprechender Wellenlängenfilter für Anregung und Emission die fluoreszierenden Nachweisstoffe (wie zum Beispiel Höchst) detektiert (**Abb. 12**). Der Anregungsfilter besitzt seine höchste Transmission im Absorptionsbereich des Farbstoffs. Der dichroide Strahlteilerspiegel reflektiert das

gefilterte Anregungslicht auf die Probe. Das von dort ausgehende Fluoreszenzlicht wird vom Strahlteilerspiegel nicht reflektiert und durch den Emissionsfilter von Resten des Anregungslichts und allem anderen, nicht zur Fluoreszenz des jeweiligen Farbstoffes gehörigem, Licht spektral getrennt. Die so entstandenen Fluoreszenzbilder jedes Farbstoffes wurden von einer CCD-Kamera (PCO, Kelheim) aufgenommen und per Bildverarbeitung (Image Pro Plus 5.0 Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) zusammengefügt.

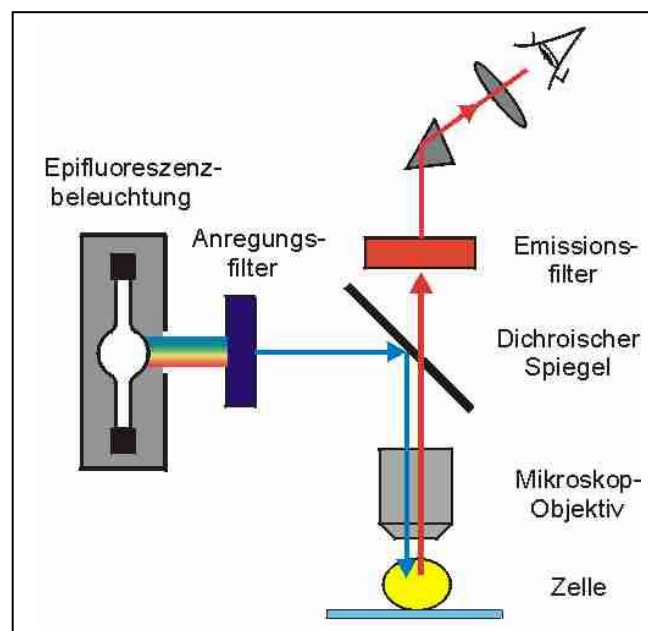


Abbildung 12: Die Abbildung zeigt schematisch den Strahlenverlauf eines Fluoreszenzmikroskopes [<http://www.sinnesphysiologie.de/methoden/fluo/epifluol.jpg>].

In der vorliegenden Studie wurde das Fluoreszenzmikroskop Zeiss axio vario tech, (Göttingen, Deutschland), mit den entsprechenden Filtern verwendet (s. **Tabelle 5**).

4.1.10 Farbstoffe

- *Höchst* ® 33342

Hierbei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, mit dessen Hilfe Nukleinsäuren nachgewiesen werden können (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

- *Lysotracker® Green DND-26*

Hierbei handelt es sich um einen Farbstoff mit dessen Hilfe Lysosomen angefärbt werden können (Molecular Probes Eugene, OR, USA). Er ist ein azidophiler Fluoreszenzfarbstoff, der in sauren Kompartimenten der Zelle (Lysosomen) akkumuliert.

- *Rhodamin ® 6G*

Dieser Farbstoff wird zur Anfärbung von Mitochondrien verwendet (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

Die **Tabelle 5** gibt eine Liste der verwendeten Anregungs- und Emissionsfilter (Omega Optical, Brattleboro, USA) sowie der dichroiden Spiegel (Omega Optical) wieder. Die jeweilige Filterbezeichnung enthält die Zentralwellenlänge sowie die Halbwertsbreite (zum Beispiel hat der Filter 695AF55 eine Zentralwellenlänge von 695 nm und eine Halbwertsbreite von 55 nm). Die Farbstoffe Hoechst 33342, Rhodamin 6G und LysoTracker Green sind Organellfarbstoffe die sich bei Zellen im Zellkern, Mitochondrien und Lysosomen anlagern.

Farbstoff	Anregungsfilter [nm]	Dichroider Spiegel [nm]	Emissionsfilter [nm]
Höchst 33342	365 ± 50	400	450 ± 58
LysotrackerGreen	500 ± 25	525	530 ± 45
Rhodamin 6G	540 ± 30	570	545 ± 35
PN/PNS	350 ± 50	400	600 ± 80

Tabelle 5: Liste der für die Kollationsaufnahmen verwendeten Anregungs- und Emissionsfilter sowie der dichroiden Spiegel für die verwendeten Farbstoffe Höchst, LysotrackerGreen, Rhodamin, PN und PNS.

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkulturverfahren

Normale humane dermale Fibroblasten wurden von Cambrex Biotechnologie (Walkersville, USA) bezogen. Die mittels Stickstoff tiefgefrorenen Fibroblasten wurden bei 37°C aufgetaut. Anschließend erfolgte die Überführung der Zellen in das Kulturmedium FGM-2 BulletKit (Cambrex Biotechnologie; Walkersville, USA) mit Zusatz von 2 % fetalem Kälberserum, 0,1 % Insulin, 0,1 % Gentamicin/Amphotericin-B sowie 0,1% Fibroblasten-Wachstumsfaktor.

Nach dem die aufgetauten Zellen zentrifugiert wurden (1200 U/min, 5 min), konnte der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert werden. T25 oder T75- Zellkulturflaschen dienten als Behältnis zur Verwahrung der sich vermehrenden Zellen im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂ in H₂O- gesättigter Atmosphäre). Mediumwechsel erfolgte in regelmässigen Abständen dreimal pro Woche.

4.2.2 Zellvermehrung

Normale humane dermale Fibroblasten müssen 2-3 Tage postkonfluent sein, um sie passagieren zu können. Unter Passagieren der Zellen versteht man, die konfluent vorliegenden Zellen von einer Zellkulturflasche zu verteilen. Dieses Vorgehen dient der Vermehrung der Zellanzahl.

Zunächst wurde das überschüssige Zellkulturmedium verworfen. Es folgte die Waschung der Fibroblasten mit Hilfe von PBS (ca.10 ml). Die adhärent wachsenden Fibroblasten wurden mit ca. 3ml Trypsin / Ethylendiaminintetraeazetat (EDTA) –Lösung (Gibco/invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) innerhalb 5 min vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Durch Zugabe von FGM-2 BulletKit wurde die Trypsinaktivität gestoppt. Nach Sedimentierung der Zellen durch zentrifugieren (1200 U/min, 5min) erfolgte die Resuspension des Pellet in Medium und die Verteilung auf neue Zellkulturflaschen im Verhältnis 1:3.

4.2.3 Zellüberführung auf die 96-Lochplatte

Pro Ansatz wurden 10^4 Zellen auf jede Vertiefung verteilt. Dazu waren vorerst die gleichen Schritte nötig, wie schon bei der „Zellvermehrung“ (s. 4.2.2) geschildert. Anschließend wurde zur Zählung der Fibroblasten mit der Pasteur-Pipette 10 μ l Zellmediumgemisch dem Gefäß entnommen und auf eine Neubauer-Zählkammer überführt. Mit Hilfe des Mikroskops konnten die Fibroblasten gezählt und auf die Lochplatten überführt werden (10 4 Zellen in 100 μ l Medium pro Vertiefung).

Die 96-Mikrotitrierplatte wurden über Nacht in den Brutschrank (37°C, 5% CO₂ in H₂O gesättigter Atmosphäre) gestellt.

4.2.4 Inkubation der NHDF mit dem Photosensibilisator Perinaphtenon (PN)

Zum Ansetzen einer 4mM Stammlösung des Farbstoffes wurden Reaktionsgefäße (Blue caps) mit 5,94 ml destilliertem H₂O befüllt und 0,005g Perinaphtenon hinzugegeben. Die Auflösung des Photosensibilisators erfolgte im Ultraschallbad bei 30°C für 2h.

Anschließend wurden 1200 μ l DMSO (Dimethylsulfoxid) hinzugegeben entsprechend einer Endkonzentration von 20% DMSO Konzentration, um PN komplett lösen zu können.

Die folgende Konzentrationsreihe wurde für die Phototoxizitätsexperimente verwendet (Tabelle 6):

Konzentration	Farbstofflösung	Medium ohne Serum
400 µmol	200 µl Stammkonzentration	1,8 ml
200 µmol	800 µl Stammkonzentration	15,2 ml
150 µmol	5,6 ml (200)	1,9 ml
100 µmol	4,5 ml (200)	4,5 ml
75 µmol	2,5 ml (150)	2,5 ml
50 µmol	2,5 ml (100)	2,5 ml
20 µmol	1,0 ml (100)	4 ml
10 µmol	0,5 ml (100)	4,5 ml

Tabelle 6: Dargestellt ist die verwendete Konzentration von PN mit der dazugehörigen Verdünnungsreihe. Die Farbstofflösung der Stammkonzentration beträgt 4mM.

Das Arbeiten mit dem Photosensibilisator erfolgte unter sterilen Bedingungen einer Sterilisationswerkbank ohne Lichteinfluss, da der Farbstoff lichtempfindlich ist.

Für den Versuchsaufbau wurden zwei 96-Mikrotitrierplatte verwendet. Eine diente als Kontrollplatte (Dunkelkontrolle, „ohne Licht“), das heißt die Zellen wurden mit PN in den oben genannten Konzentrationen versetzt und entsprechend der angegebenen Zeitpunkte inkubiert. Zeitgleich wurden die Zellen in der anderen Mikrotitrierplatte ebenfalls mit dem Farbstoff inkubiert und zusätzlich bestrahlt. In beiden Fällen wurden die Platten aus dem Brutschrank entnommen und das überschüssige Medium wurde abgesaugt. Darauf folgend wurden je 100µl Medium ohne Hinzugabe von 2 %igem Kälberserum auf die Löcher durch Vertiefungen gegeben, sowie 100µl/well aus der Verdünnungsreihe. Dabei diente eine Reihe mit je 8 Vertiefungen für eine Konzentration. Die Inkubation der Fibroblasten mit dem Photosensibilisator erfolgte in der für den jeweiligen Versuch angesetzten Dauer (5, 15, 30 min) im Brutschrank.

Nach wiederholter Entnahme aus dem Brutschrank wurden die Zellen mit 100 µl PBS/well gewaschen und erneut mit 100µl PBS/well versetzt. Anschließend konnte die Bestrahlung (je nach Versuch 15- oder 30 min) stattfinden. Anschließend wurde der PBS-Überschuß abgesaugt und 100µl FGM2BullKit/well auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert, bevor die Zellvitalität bestimmt wurde.

4.2.5 Inkubation der NHDF mit dem Photosensibilisator Perinaphtenon in wasserlöslicher Form (PNS)

Zur Herstellung einer 4mM Lösung wurden 0,011g PN mit 11 ml H₂O angesetzt. Die Stammkonzentration wurde jedesmal frisch angesetzt.

Die folgende Verdünnungsreihe wurde angewendet (**Tabelle 7**):

Konzentration	Farbstofflösung	Medium ohne FKS
1600 µmol	10,4 ml Stammkonzentration	2,6 ml
800 µmol	7 ml	7 ml
400 µmol	8 ml	8 ml
200 µmol	10 ml	10 ml
150 µmol	9 ml	3 ml
100 µmol	5 ml	5 ml
75 µmol	3 ml	3 ml
50 µmol	0,075 ml Stammkonzentration	6 ml
20 µmol	1 ml	9 ml
10 µmol	3 ml	3 ml

Tabelle 7: Dargestellt sind die verwendeten Konzentrationen von PNS mit der dazugehörigen Verdünnungsreihe für die Phototoxizitätsexperimente.

Das Vorgehen mit PNS beinhaltete selbige Schritte wie die Inkubation der NHDF mit dem Photosensibilisator PN. Die Inkubationszeiten betragen 5, 15, 30 und 60 min, die Bestrahlungsdauer 15 und 30 min.

4.2.6 MTT-Test

Dieser Test beruht auf der Reduktion von Tetrazoliumsalz zu gefärbten Formazanen als Indikator für die Vitalität durch mitochondriale Enzyme [Mosmann 1983].

Proportional zur Aktivität der Dehydrogenasen bildet sich in den Zellen unlösliches Formazan. Der Test erfasst ausschließlich lebende Zellen, wobei die Signalstärke vom Aktivierungsgrad der Zelle abhängig ist. Die Methode wurde von Cole [Cole 1986] und Carmichael et al. [Carmichael et al. 1987] beschrieben.

Es wurden 10 µl / well 3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) mit der Konzentration 5mg/ml zum Medium in die Wells der Mikrotitrierplatte gegeben. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank erfolgte die Zugabe von 100µl Natriumdodecylsulfat (20 % in H₂O) über Nacht bei 37°, um das unlösliche Formazan wieder in Lösung zu bringen. Die Auswertung der optischen Dichte erfolgte mittels *Elisa-Reader* bei 540 nm. Die gemessenen OD-Werte bei 540 nm der Dunkelkontrolle ohne PS-Inkubation wurden auf 1 normiert (100% Vitalität) und die OD-Werte der einzelnen Proben in Relation dazu gesetzt. Je größer der Wert der optischen Dichte ist, umso vitaler sind die Zellen.

4.2.7 Lokalisation der Photosensibilatoren mit dem Fluoreszenzmikroskop

Zur Darstellung der Lokalisation der Photosensibilatoren PN und PNS wurden 10⁶ Fibroblasten mit 3ml FGM₂BulletKit auf Glasobjektträgern in Kultur gebracht und über Nacht im Brutschrank belassen. Nach einmaliger Waschung der Zellen mit PBS wurden die Fibroblasten in 1ml Medium ohne FKS belassen. Die Inkubation erfolgte mit je 1ml PN und PNS in einer 4mM Stammkonzentration, woraus sich eine Endkonzentration von 2mM ergibt.

Die Inkubationszeiten betragen jeweils 15- und 60 min. Zur Darstellung des Zellkerns wurden der Zellmediumsuspension 100µl des Farbstoffs Höchst 3342 in einer Konzentration von 10 µM zugefügt (15 min).

Für die Färbung der Lysosomen bzw. Mitochondrien wurden 8 µmol LysoTrackerGreenGND-26 und 50ng/ml Rhodamin6G verwendet. Die Inkubationszeiten betragen 2h für LysoTrackerGreen und 5 min für Rhodamin bei 37°C. Alle Inkubationen erfolgten in der feuchten Kammer.

Mit Hilfe einer CCD-Kamera gekoppelt mit dem Fluoreszenzauflichtmikroskop (Vario axio Tech) wurden Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen getrennt voneinander aufgenommen. Die Belichtungszeit für die Durchlichtaufnahmen betrug 0,016s, die für die Fluoreszenzaufnahmen 2,5s. Um die Fluoreszenzintensität nicht zu verfälschen (ausbleichen), erfolgte dieser Schritt in einem abgedunkelten Raum. Im Anschluss wurden die Fluoreszenzaufnahmen und die entsprechenden Durchlichtaufnahmen mit dem Programm „Image Pro Plus 5.1“ übereinandergelagert und beurteilt.

Für die Durchlichtaufnahme wurden die Proben von unten durchstrahlt und ebenfalls auf eine CCD-Kamera (PCO, Kehlheim) abgebildet.

4.2.8 Zelluläre Aufnahme-Spektroskopie

500µl des jeweiligen Farbstoffes (je 50µmol, 100µmol und 200µmol) wurden mit 500µl Zellsuspension (5×10^5 Zellen) versetzt, um eine Endkonzentration von je 25, 50 und 100µmol zu erhalten. Die Inkubationszeiten für jeden Photosensibilisator betrug 5 min, 15 min und 60 min. Anschließend erfolgte das Zentrifugieren bei 3000 U/min für 5min, um den Überstand absaugen zu können. Das verbliebene Zellpellet wurde in 1ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt und das Zellpellet mit 1ml 10 % igem Triton-x-100/PBS resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert, um die Zellen zu lysieren.

Nach 5 minütigem Zentrifugieren (10.000Upm) wurde der Überstand mittels Pipette abgesaugt und in eine Küvette gegeben. Auch das verbliebene Zellpellet wurde aufbewahrt. Die Messung der Absorption im Überstand der einzelnen Proben erfolgte mittels Spektralphotometrie. Das Pellet wurde ebenfalls in 10%igem Trithon-x-100/PBS resuspendiert und die Absorption gemessen.

Die verschiedenen Absorptionsspektren wurden anschließend verglichen.

Die Pufferlösung alleine (10 %igem Trithon-x-100/PBS) sowie die Überstände lysierter Bakterien ohne Farbstoffinkubation dienten zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz.

Als Kontrolle wurde das Absorptionsspektrum der Farbstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen alleine gemessen.

4.2.9 Datenverarbeitung

Mit den NHDF-Zellen wurden für jede Bedingung jeweils 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Für eine Farbstoffkonzentration standen jeweils 8 Vertiefungen in der 96-Mikrotitrierplatte zur Verfügung. Somit erhielt man pro Versuch und pro Bedingung 8 OD-Werte, aus denen der Mittelwert und die Standardabweichungen berechnet wurden. Die somit erhaltenen 3 Mittelwerte (3 Versuche) wurden als unabhängige Daten betrachtet und der weiteren Analyse zugeführt. Hierbei wurden die entsprechenden Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen berechnet und graphisch dargestellt.

Pro Versuch wurden die absoluten OD-Werte der unbestrahlten Kontrollen (Medium+Zellen) auf 1 normalisiert und alle Werte darauf relativiert. Der EC_{50} – Wert gibt die Farbstoffkonzentration an, bei der 50% der Zellen abgetötet werden konnten. Zur Verdeutlichung wurde der EC_{50} – Wert als horizontale schwarze Linie in die Graphik eingezeichnet. Wenn Mittelwerte mit Standardabweichungen unter dem EC_{50} – Wert lagen, wurde die photodynamische Inaktivierung als effektiv angesehen.

Zur Datenverarbeitung und statistischen Analyse wurde das Programm Excel verwendet.

5. Ergebnisse

5.1 Nachweis der zellulären Aufnahme von PN und PNS in NHDF mittels Spektroskopie

Eine Voraussetzung in der PDT ist die Farbstoffaufnahme in die Zelle. Die Nachweise zur Aufnahme der Photosensibilisatoren PN und PNS in die normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) erfolgten mittels Spektroskopie.

5.1.1 Zelluläre Aufnahme von PN

Normale humane dermale Fibroblasten (NHDF) wurden mit 4 mM/ml Perinaphtenon für 5-, 15- und 60 min inkubiert, dreimal gewaschen und anschließend wurde die Absorption der Zelllösungen spektroskopisch gemessen.

Die Spektroskopie bestätigte die Aufnahme von PN in NHDF nach 5, 15 und 60 minütiger Inkubation. Mit zunehmender Inkubationszeit zeigte sich eine Zunahme der relativen Absorption und dadurch die Farbstoffanreicherung in der Zelle (**Abb. 13**).

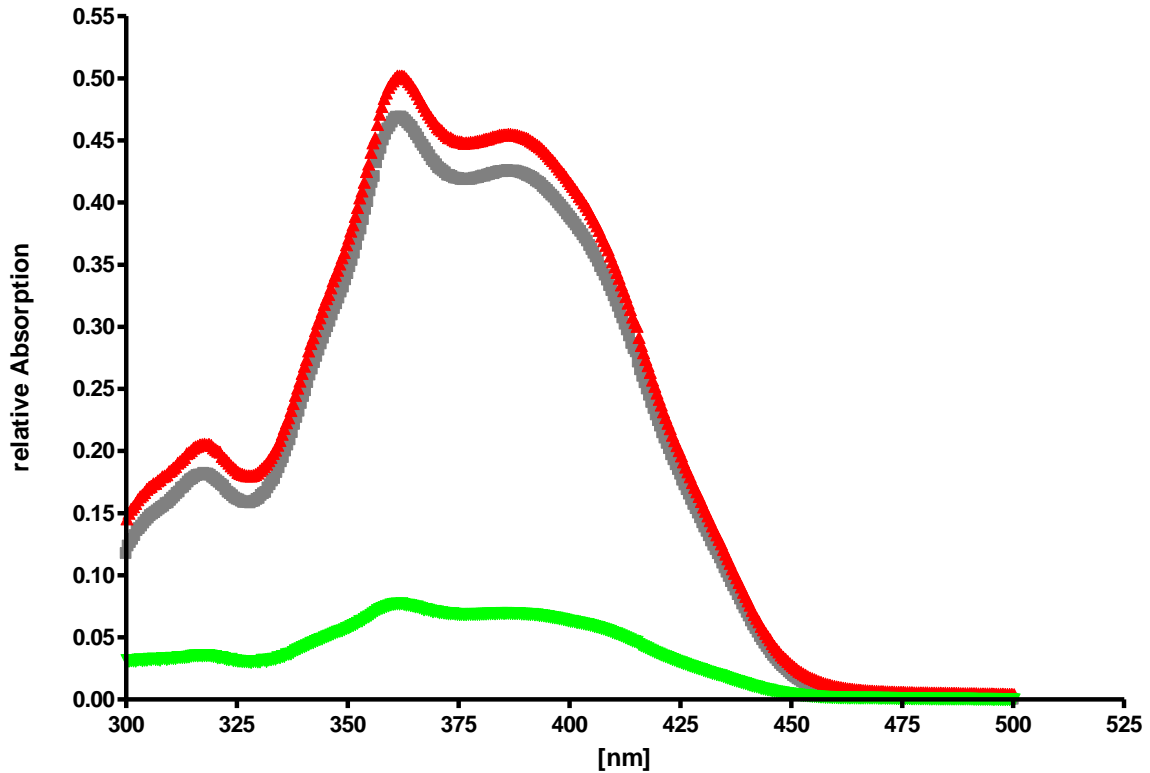


Abbildung 13: Absorptionsspektrum von PN nach Inkubation mit NHDF: Die NHDF wurden mit 4 mM/ml PN für 5 (grün), 15 (grau) oder 60 min (rot) inkubiert, dreimal gewaschen und nach Trennung von Überstand und Pellet wurde die Absorption spektroskopisch gemessen. Gezeigt sind hier die Spektren der lysierten Zellpellets.

5.1.2 Zelluläre Aufnahme von PNS

Normale humane dermale Fibroblasten (NHDF) wurden mit 4mM/ml PNS 5-,15- und 60 Minuten inkubiert. Die Absorption des jeweiligen lysierten Zellpellets wurde mit dem Spektralphotometer gemessen. Nach 5 minütiger Inkubation ließ sich kein Absorptionsspektrum in den lysierten Zelllösungen erkennen (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigte sich nach 15 min und nach 60 min eine Aufnahme. Mit längerer Inkubationszeit erhöhte sich dabei die relative Absorption (**Abb. 14**).

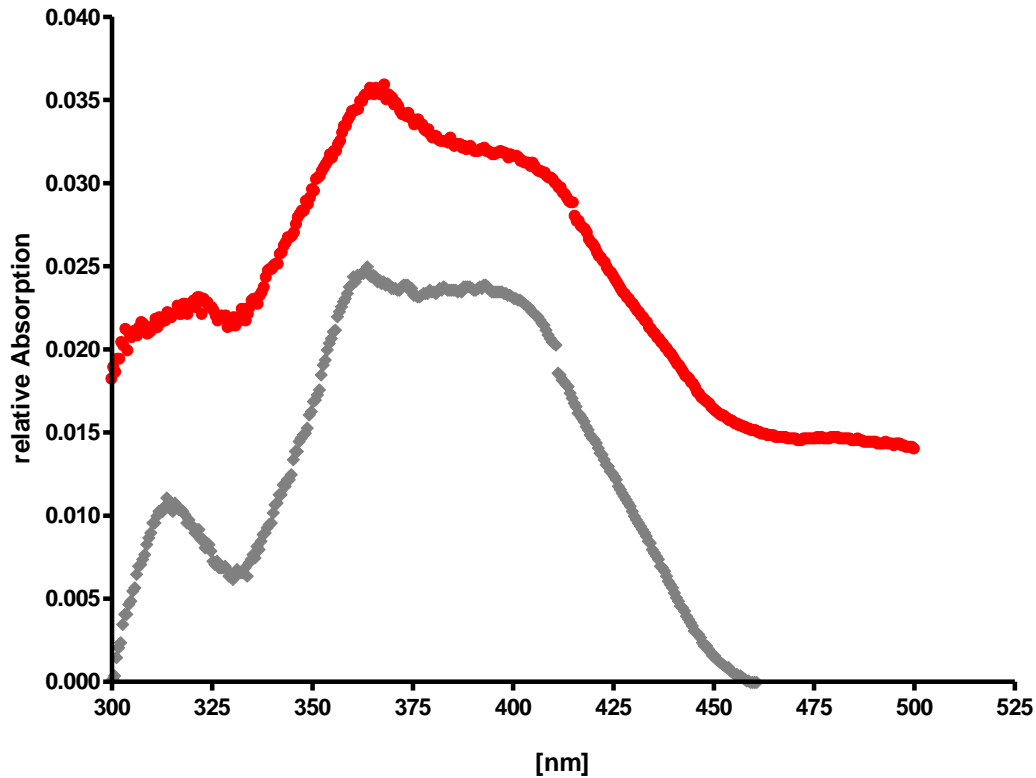


Abbildung 14: Die Absorption im Pellet nach 15- (grau) und 60 minütiger (rot) Inkubation von 200 $\mu\text{M/ml}$ PNS. Bei der 5-minütigen Inkubation konnte kein Absorptionsspektrum gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt konnte sowohl für PN als auch für PNS eine Aufnahme in die Zelle in Abhängigkeit von der Inkubationszeit gezeigt werden.

5.2. Lokalisation von PN und PNS innerhalb der Zelle

Nachdem gezeigt werden konnte, dass beide Farbstoffe von den Zellen aufgenommen wurden, sollte im nächsten Schritt die Lokalisation der Farbstoffe näher charakterisiert werden.

Der Nachweis der intrazellulären Lokalisation des Farbstoffs Perinaphtenon in wasserunlöslicher Form (PN) und wasserunlöslicher Form (PNS) erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops. Es sollte geklärt werden, ob beide Farbstoffe die gleiche

intrazelluläre Lokalisation aufwiesen. Dazu wurden Kolo­kalisations­experimente mit den Farbstoffen Höchst 33342, Lyso­tracker Green und Rhodamin 6/G durch­ge­führt. Höchst 33342 diente der Anfärbung der Zellkerne, Lyso­tracker Green zur Kennzeichnung der Lyso­so­men und Rhodamin zur Darstellung der Mitochondrien.

5.2.1 Nachweis der Lokalisation von PN mittels der Fluoreszenzmikroskopie

PN stellte sich nach 60 minütiger Inkubationsdauer diffus im Plasma verteilt dar

(Abbildung 15 A).

5.2.2 Lokalisation von PNS mittels der Fluoreszenzmikroskopie

Auch für PNS ließ sich nach 60 minütiger Inkubationsdauer eine diffuse intraplasmatische Verteilung nachweisen. Das Fluoreszenzsignal war dabei schwächer ausgeprägt als bei PN

(Abbildung 15 B).

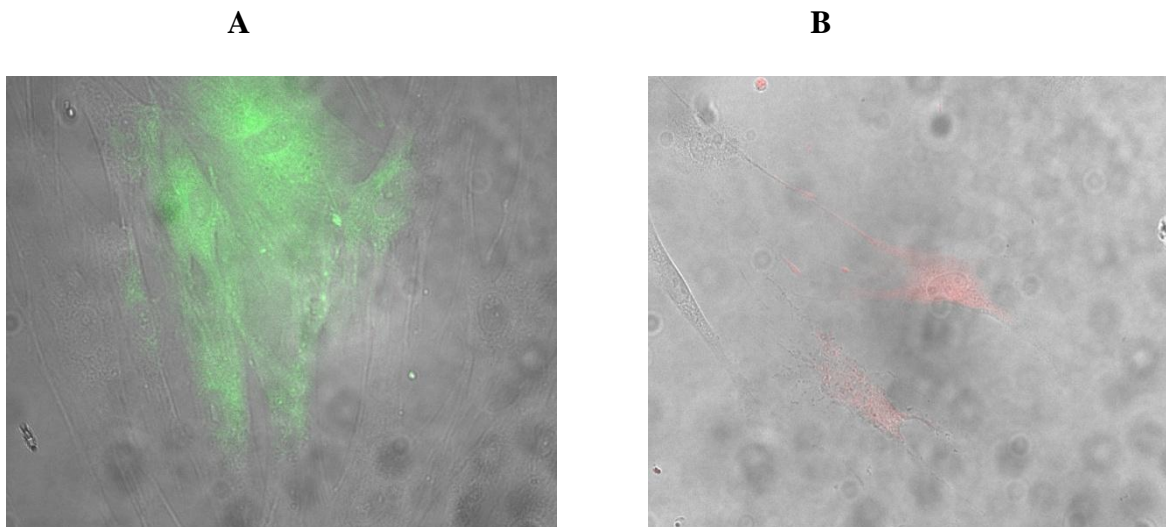


Abbildung 15 A und B: Nachweis von PN und PNS bei NHDF. NHDF-Zellen wurden mit den Photosensibilisatoren PN und PNS (4mM/ml) für eine Stunde versetzt und anschließend mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops beurteilt. Für beide Farbstoffe zeigte sich eine diffuse Verteilung im Zytoplasma.

5.2.3 Kolokalisation von PN und PNS mittels der Fluoreszenzmikroskopie

Nachdem für beide Farbstoffe eine diffuse Verteilung im Zytoplasma festgestellt worden war, wurden zur näheren Spezifizierung Kolokalisationsversuche durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit den beiden Farbstoffen inkubiert und parallel mit den Fluoreszenzfarbstoffen Höchst 33342, LysoTracker Green und Rhodamin 6/G gefärbt. Im Kontrollversuch konnte gezeigt werden, daß Höchst 33342 die Zellkerne markiert, LysoTracker Green die Lysosomen und Rhodamin 6/G die Mitochondrien (**Abbildung 16**). Bei der Fluoreszenzfärbung mit Rhodamin 6/G ließen sich fadenförmige Markierungen um den Zellkern erkennen, deren Ausläufer bis an die Zellmembran reichten (**Abbildung 16 C**).

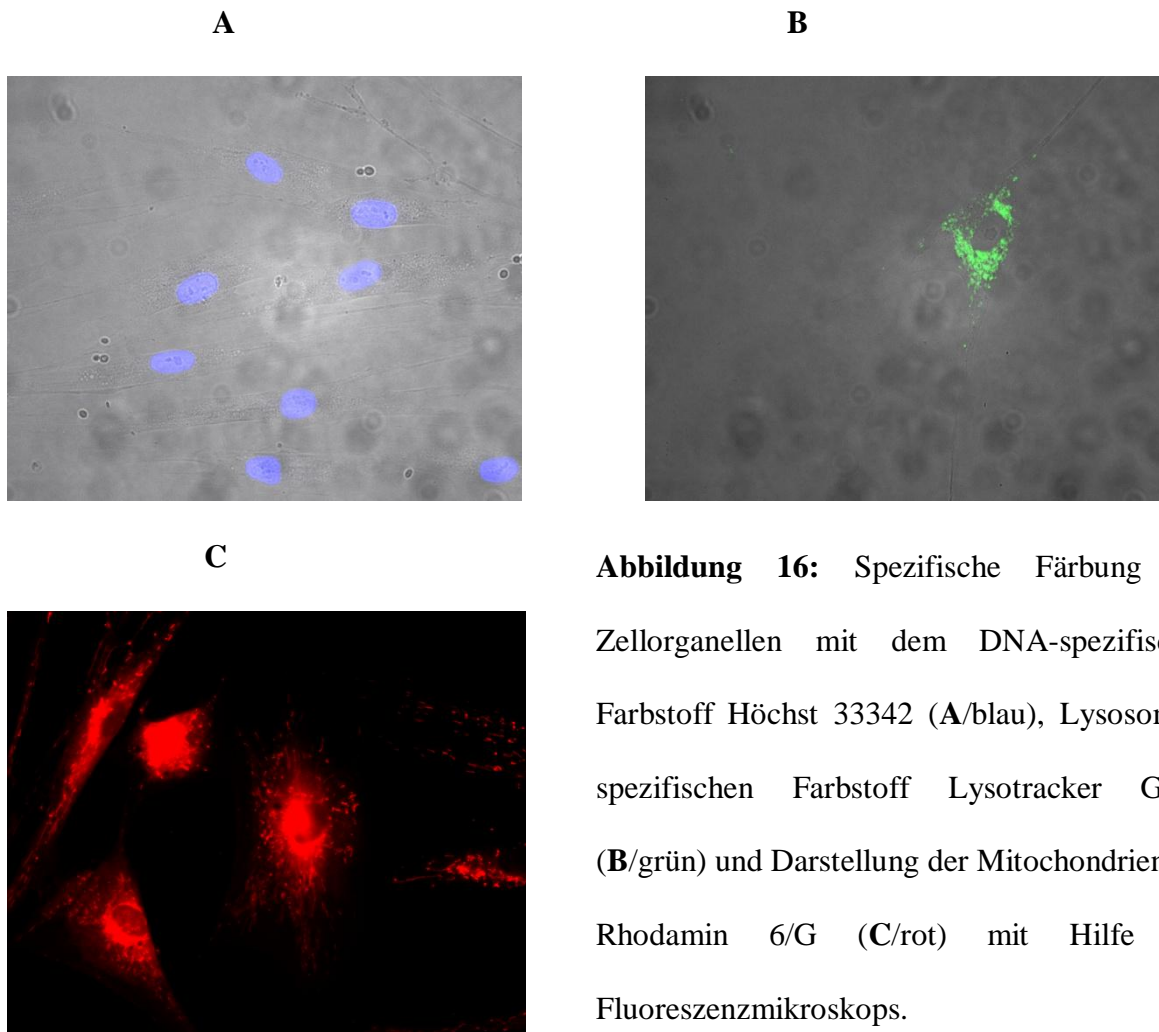


Abbildung 16: Spezifische Färbung der Zellorganellen mit dem DNA-spezifischen Farbstoff Höchst 33342 (A/blau), Lysosomen-spezifischen Farbstoff LysoTracker Green (B/grün) und Darstellung der Mitochondrien mit Rhodamin 6/G (C/rot) mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops.

5.2.4 Kolokalisation von PN mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes

Weder der DNA-spezifische Farbstoff Höchst 33342 noch der lysosomen-spezifische Farbstoff LysoTracker Green noch der mitochondrien-spezifische Farbstoff Rhodamin 6/G ließ eine Kolokalisation zu PN erkennen. PN zeigte sich ausschließlich diffus im Zytoplasma verteilt, ohne jegliche Beziehung zu den Zellorganellen.

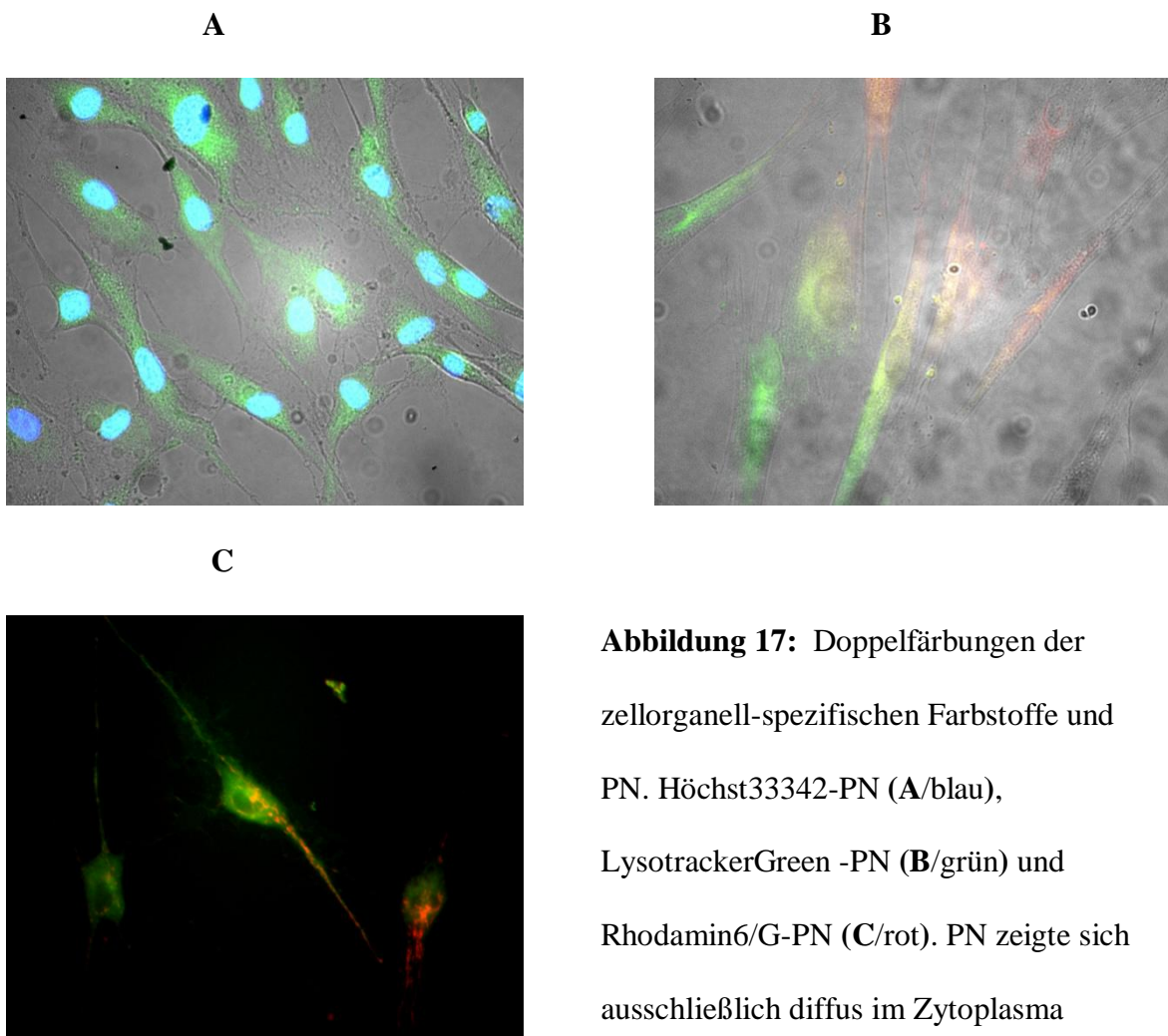


Abbildung 17: Doppelfärbungen der zellorganell-spezifischen Farbstoffe und PN. Höchst33342-PN (A/blau), LysoTrackerGreen -PN (B/grün) und Rhodamin6/G-PN (C/rot). PN zeigte sich ausschließlich diffus im Zytoplasma

5.2.5 Kolokalisation von PNS mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes

Untersuchungen zur Kolokalisation der zellorganellen-spezifischen Farbstoffe und PNS zeigten keine Übereinstimmung der Lokalisation von PNS und den zellorganell-spezifischen Farbstoffen (Daten nicht gezeigt).

5.3 Phototoxische Wirkung von PN und PNS auf normale humane dermale Fibroblasten

Nachdem gezeigt wurde, dass die Zellen den Farbstoff aufgenommen haben und beide innerhalb des Zytoplasmas lokalisiert sind, soll anschließend die zytotoxische Wirkung auf die Fibroblasten getestet werden.

Die Phototoxizität der beiden Photosensibilisatoren wurde anhand der Konzentration, der Inkubationszeit und der Bestrahlungsdauer bestimmt (**Tab.8**). Als Kontrollen wurden Zellen in identisch behandelten 96-Mikrotiterplatten mitgeführt, die ebenfalls mit PN und PNS inkubiert, aber nicht bestrahlt wurden (Dunkelkontrollen).

<u>PN</u> , Konzentration: 50-, 75-, 100-, 150-, 200- und 400µmol				<u>PNS</u> , Konzentration: 50-, 75-, 100-, 150-, 200-, 400-, 800- und 1600µmol			
		<i>Bestrahlung [min]</i>				<i>Bestrahlung [min]</i>	
		15	30			15	30
<i>Inkubation [min]</i>	5	✓	–	<i>Inkubation [min]</i>	5	✓	–
	15	✓	✓		15	✓	✓
	30	✓	–		30	✓	✓
	60	–	–		60	✓	–

Tabelle 8: Dargestellt sind die Parameter, anhand derer die Toxizität der Farbstoffe PN und PNS gemessen wurden. (-)= nicht durchgeführt, (✓)= getestet

5.3.1 Phototoxische Wirkung von PN und PNS auf NHDF mit Bestrahlung und Überprüfung der Dunkeltoxizität

Die Toxizitätsversuche dienen dem direkten Vergleich der Parameter Bestrahlungsdauer und Inkubation in Abhängigkeit von der Konzentration für beide potentiellen Sensibilisatoren. Zudem erfolgt eine Gegenüberstellung von PN und PNS bezüglich ihrer toxischen Eigenschaften.

5.3.1.1 Phototoxische Wirkung von PN auf NHDF mit *15 minütiger Bestrahlung* und Überprüfung der Dunkeltoxizität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

5.3.1.1.1 Untersuchung der Dunkeltoxizität

Der Farbstoff PN in wasserunlöslicher Form lässt keine Dunkeltoxizität erkennen (**Abb.18**). Unter Berücksichtigung der Standardabweichung liegt die Zellvitalität bei allen Versuchen über 80 %. Die Werte untereinander sind kaum voneinander abweichend.

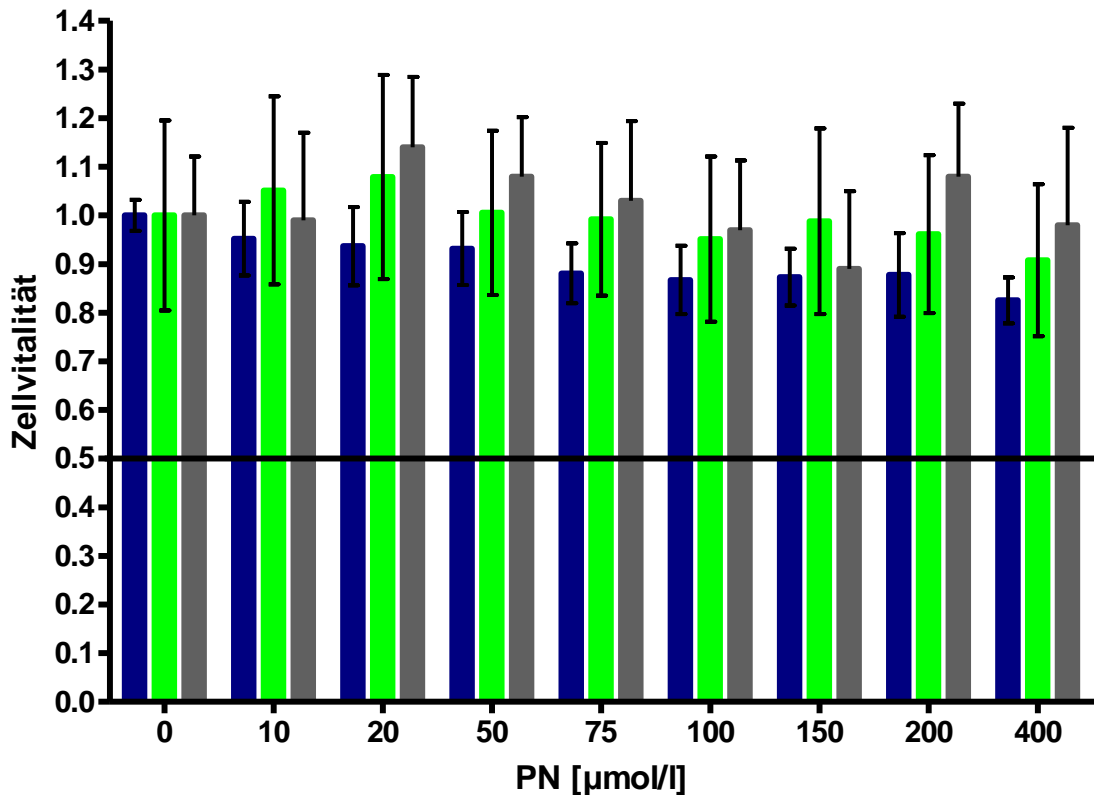


Abbildung 18: Dargestellt ist die Dunkelkontrolle (entsprechend der Bedingungen für die Proben bei 15 min Bestrahlung) in Abhängigkeit von der Konzentration und der Inkubation von 5 (blau), 15 (grün) und 30 (grau) Minuten. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die Zellvitalität 1 gibt eine Überlebensrate der NHDF-Zellen von 100 % an, bei 0,5 überleben demnach nur noch 50 % der Zellen (**EC₅₀-Wert/schwarze Linie**).

5.3.1.1.2 Lichttoxizität

Die **Abbildung 19** zeigt die Zellen nach 5, 15 und 30 minütiger Inkubation mit PN und anschließender jeweils 15 minütiger Bestrahlung ($13,7 \text{ J/cm}^2$). Durch eine Inkubation der Zellen mit dem Photosensibilisator PN für 5 Minuten kommt es zum Absterben der Fibroblasten ab einer Konzentration von 200 μmol von über 50 %. Liegt die Einwirkzeit von PN bei 15 Minuten führt eine Konzentration von 150 μmol zur selben Sterberate und bei 30 minütiger Inkubation ergibt ein 75 μmol konzentrierter Farbstoff eine Zellvitalität von unter

50 %. Ist PN 400 μmol konzentriert, so liegt die Zellvitalität bei allen Inkubationszeiten um die 20 %.

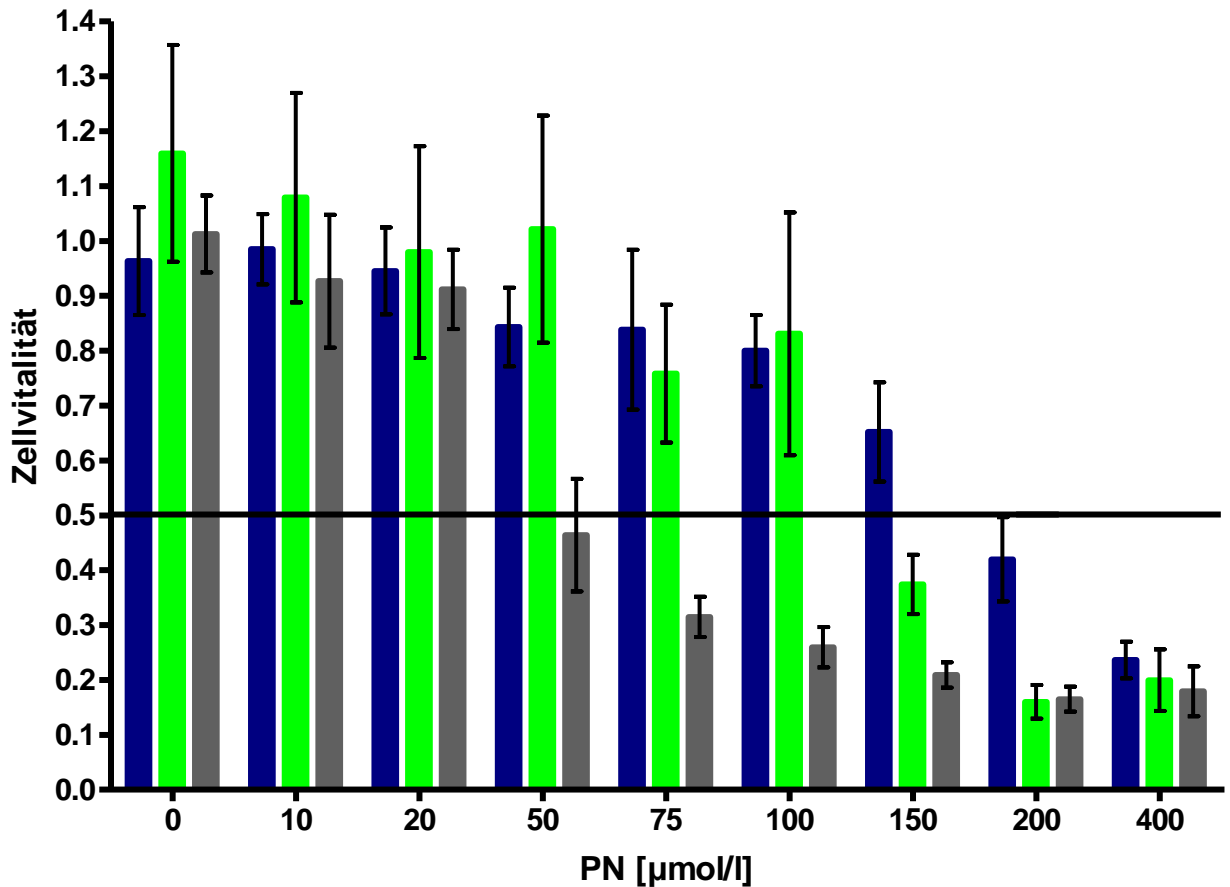


Abbildung 19: Dargestellt ist die Inkubation der NHDF mit PN für 5 (blau), 15 (grün) und 30 (grau) min mit anschließender Bestrahlung von 15 min ($13,7 \text{ J/cm}^2$). Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Es zeigt sich eine Toxizität des Farbstoffes nach Bestrahlung. Der Übersichtlichkeit halber wurden die Dunkelkontrollen einzeln vorher (**Abbildung 18**) dargestellt.

5.3.1.2 Phototoxische Wirkung von PNS auf NHDF mit 15 minütiger Bestrahlung und Überprüfung der Dunkeltoxizität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

5.3.1.2.1 Dunkeltoxizität

In **Abbildung 20** sind die Balkendiagramme der einzelnen Dunkelkontrollen dargestellt. Es zeigt sich eine deutliche Dunkeltoxizität des Farbstoffes PNS bei einer Inkubationszeit von 60 min und einer Konzentration von 400 μmol . Deutlich erkennbar ist, dass mit Zunahme der Inkubationszeit die Anzahl der überlebenden Zellen abnimmt. Vergleicht man die verschiedenen Inkubationszeiten bei einer Konzentration von 1600 μmol miteinander, so ergibt dies bei 5 minütiger Inkubation eine Zellvitalität von 70 %, bei 15 Minuten von 68 % und bei 30 Minuten von 67%. Dagegen bewirkt eine 60 minütige Einwirkdauer des Farbstoffes bei gleicher Konzentration (1600 μmol) auf die Fibroblasten eine Sterblichkeit der Zellen von über 50%.

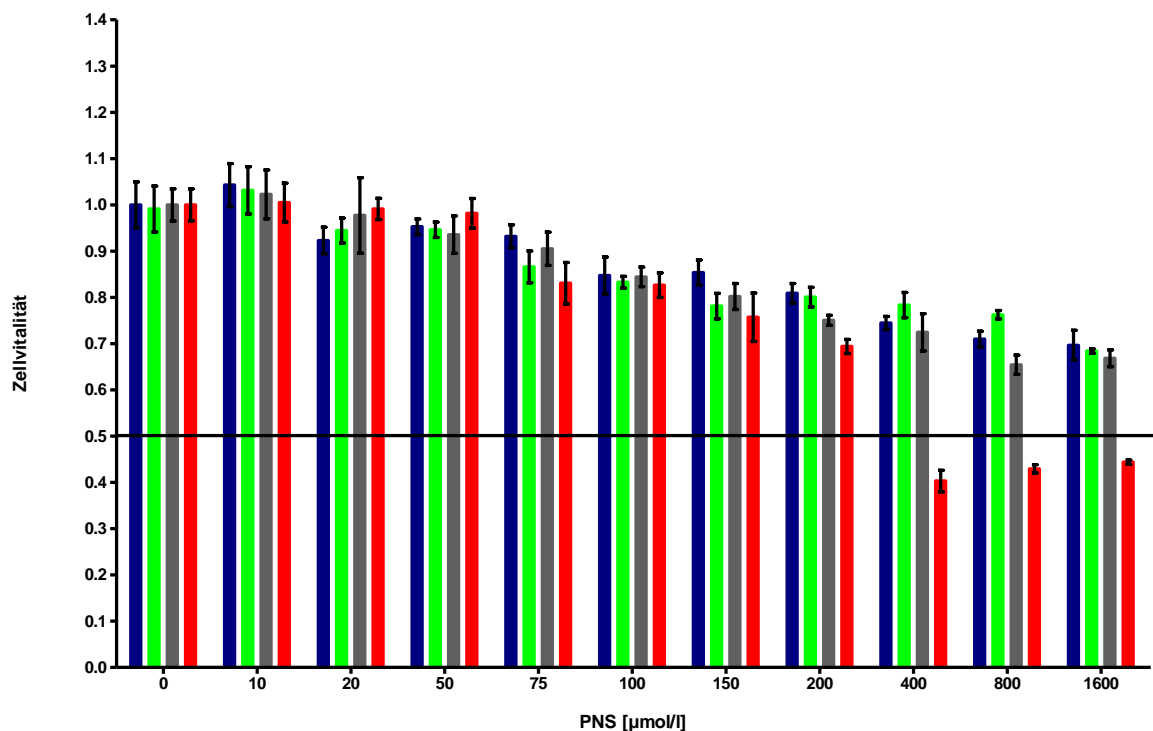


Abbildung 20: Dargestellt sind die Dunkelkontrollen (Inkubation der Zellen mit PNS, ohne anschließende Bestrahlung) für die Inkubation mit PNS für 5 (blau), 15 (grün), 30 (grau) und

60 (rot) min. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Es zeigten sich dunkeltoxische Effekte bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten ab einer Konzentration von 400 μmol . Die Zellvitalität liegt hier unterhalb von 50 %.

5.3.1.2.2 Lichttoxizität

Vergleicht man die Werte der Dunkelkontrolle (ohne Bestrahlung) mit denen nach einer 15 minütigen Bestrahlung (**Abbildung 21**), so zeigt der Farbstoff PNS im Hinblick auf die Fibroblasten eine phototoxische Wirkung. Während die Fibroblasten ohne Lichteinfluß bei den genannten Inkubationszeiten mit 1600 μmol -konzentriertem PNS zu 50 % überleben, sind nach Bestrahlung mit den gleichen Bedingungen nur noch 10 % der Zellen vital.

Bei einer Konzentration von 800 μmol PNS zeigt sich deutlich, dass mit Steigerung der Inkubationsdauer die Toxizität des Farbstoffes auf die Fibroblasten nach Bestrahlung deutlich zunimmt. Hier überleben nach 5 minütiger Inkubation ca. 40 % der Zellen, nach 15 minütiger Inkubation noch 25 %, nach 30 minütiger Inkubation 20 % und nach 60 minütiger Inkubation knapp 5 % der Fibroblasten. Ohne Bestrahlung überleben dahingegen über 50 % der Zellen für die Bedingungen von 5-, 15- und 30 minütiger Inkubation (**Abb.20**).

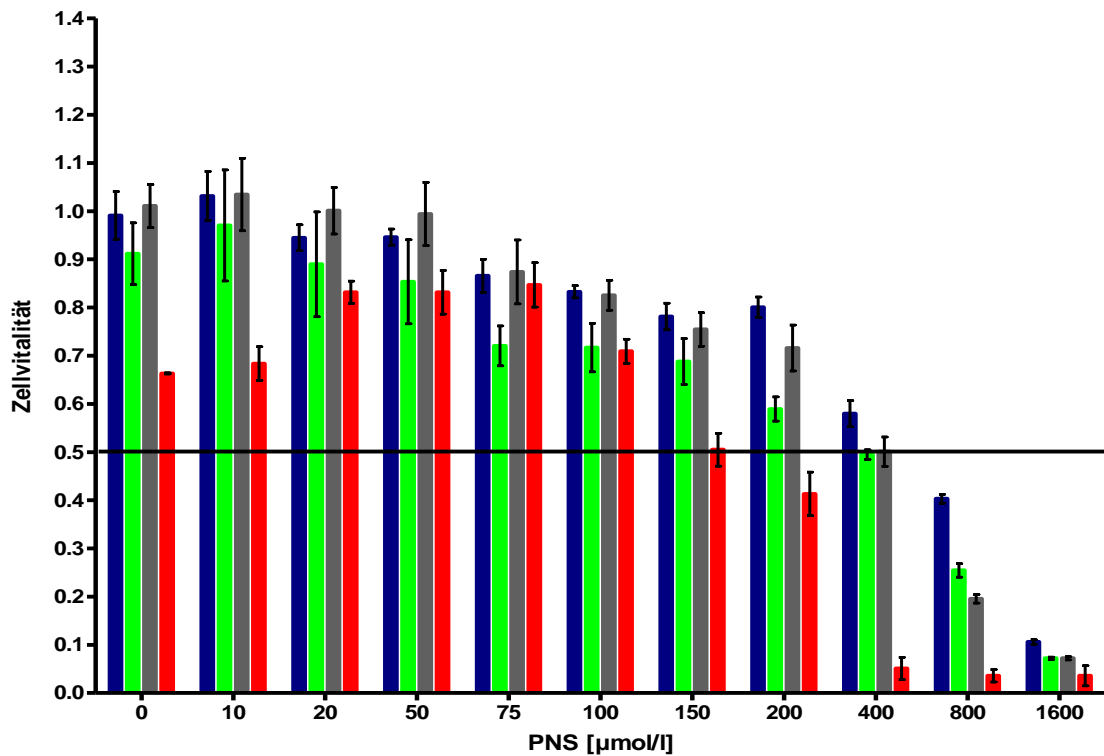


Abbildung 21: Dargestellt ist der Farbstoff PNS bei unterschiedlichen Inkubationszeiten (5 blau), 15 (grün), 30 (grau) und 60 (rot) Minuten Inkubation) und anschließender 15 minütiger Bestrahlungsdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Der Übersichtlichkeit halber wurden die Dunkelkontrollen einzeln vorher (**Abbildung 20**) dargestellt.

5.3.1.3 PN und PNS in direktem Toxizitätsvergleich anhand des EC-50-Wertes

Nachdem festgestellt wurde, dass PN nicht dunkeltoxisch reagiert, PNS allerdings dunkeltoxisch ist und beide Farbstoffe nach Inkubation mit anschließender Bestrahlung einen Rückgang der Zellvitalität zur Folge haben, besteht der nächste Schritt in einer Gegenüberstellung der Werte (**Tabelle 9**).

Für den Farbstoff PN liegt die Zellvitalität bei den durchgeführten Dunkeltoxizitätsversuchen jedes Mal über 50 %. Bei der Inkubation mit PNS führt eine Inkubationszeit von 60 min bei einer Konzentration von 400 µmol/l allerdings zur Fibroblastenmortalität von über 50%.

Für gleiche Inkubationszeiten nach 15 minütiger Bestrahlung zeigt sich folgendes Bild: Für den Farbstoff PN sind zur Erreichung einer Zellmortalität von über 50% deutlich geringere Konzentrationen bei den entsprechenden Inkubationszeiten erforderlich als bei PNS (Tabelle 9).

Reduktion der Zellvitalität durch PN (µmol/l) von mind. 50%				Reduktion der Zellvitalität durch PNS (µmol/l) von mind. 50%			
		<i>Bestrahlung</i> 15min (13,7J/cm²)	<i>Kontrolle</i>			<i>Bestrahlung</i> 15min (13,7 J/cm²)	<i>Kontrolle</i>
<i>Inkubation</i>	5min	200	-	<i>Inkubation</i>	5min	800	-
	15min	150	-		15min	800	-
	30min	70	-		30min	800	-
	60min	F	-		60min	200	400

Tabelle 9: Die Tabelle zeigt den direkten Vergleich von PN und PNS. Es wird dargestellt, welche Konzentration bei den jeweiligen Inkubationszeiten mindestens benötigt wird, um eine Zellvitalität von unter 50 % zu erreichen. Grau hinterlegt sind die verschiedenen Inkubationen der Dunkelkontrolle (15 min im Dunkeln), gelb hinterlegt die verschiedenen Inkubationszeiten mit anschließender 15 minütiger Bestrahlung. - = Es ist keine Konzentrationsreihe gezeigt, bei der über 50 % der Fibroblasten sterben. F = Keine Daten von PN für 60 min Inkubation vorhanden.

5.3.2 Phototoxische Wirkung von PN und PNS auf NHDF bei gleicher Inkubationszeit in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer (15 und 30 min)

5.3.2.1 Phototoxische Wirkung von PN auf NHDF bei 15 minütiger Inkubation in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer (15 und 30 min)

Die **Abbildung 22** zeigt den Farbstoff PN nach Dunkelkontrolle. Die Zellvitalität liegt unter Berücksichtigung der Standardabweichung bei jeder Versuchsreihe über 80 %. Somit kann eine dunkeltoxische Wirkung des Farbstoffes PN auf die Fibroblasten ausgeschlossen werden.

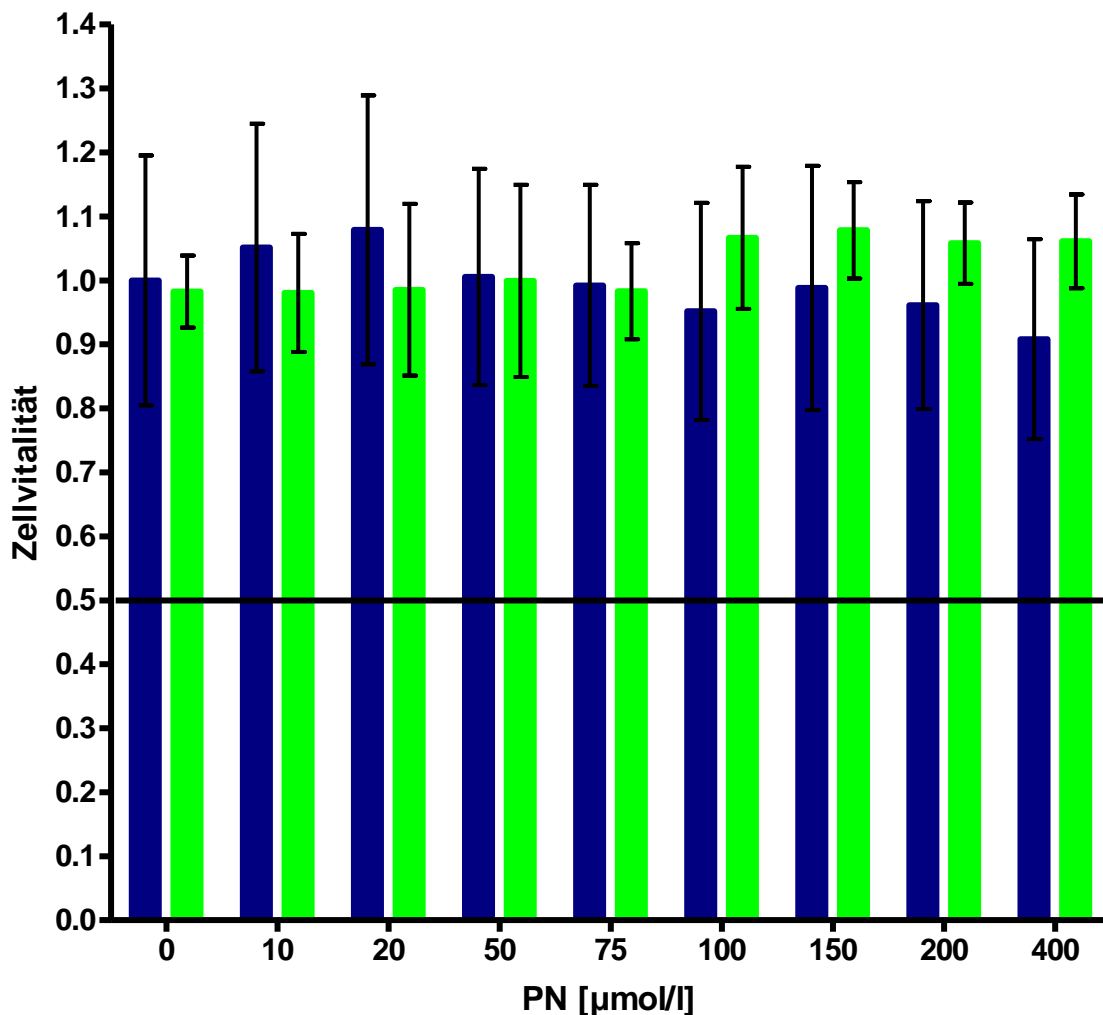


Abbildung 22: Dargestellt ist die Vitalität für die Inkubation der NHDF mit dem Photosensibilisator PN als Dunkelkontrolle entsprechend der Bedingungen für die Proben bei 15 min Bestrahlung (blau) und 30 minütiger Bestrahlungsdauer (grün) nach 15 minütiger

Inkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Es ist keine Dunkeltoxizität des Farbstoffes nachweisbar.

Nach 15 minütiger Inkubation der Zellen mit dem Farbstoff PN und anschließender Bestrahlung der NHDF ergab sich folgendes Bild (**Abbildung 23**):

Bei 15 minütiger Bestrahlung der Zellen kommt es zum Absterben der NHDF von unter 50 % ab einer Konzentration von 150 μmol . Bei einer Konzentration von 200 μmol überleben lediglich noch 15 % der Zellen.

Bei einer Bestrahlung der Fibroblasten für 30 min kommt es ab einer Konzentration von 50 μmol PN zur Unterschreitung des EC_{50} -Wertes. Bei Verdopplung der Konzentration auf 100 μmol überlebten nur noch 25 % der Zellen nach Bestrahlung. Die Zunahme der Konzentration auf 400 μmol bewirkt den Zelltod von etwa 85 % der Fibroblasten.

Somit wird bei einer Bestrahlung der Zellen von 30 min nur 1/3 der Farbstoffmenge benötigt (50 μmol versus 150 μmol), um den EC_{50} -Wert zu unterschreiten.

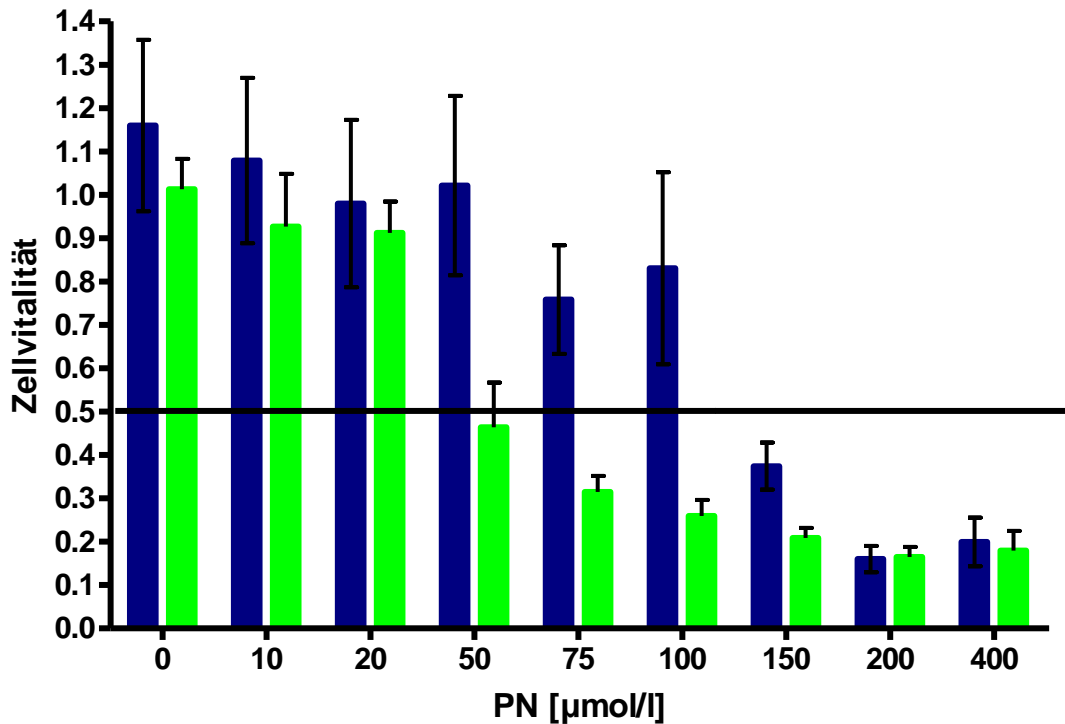


Abbildung 23: Dargestellt ist die 15 minütige Bestrahlung ($13,7 \text{ J/cm}^2$) (blau) und 30 minütige Bestrahlung ($27,54 \text{ J/cm}^2$) (grün) der NHDF nach 15 minütiger Inkubation mit PN. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die Dunkelkontrolle ohne Farbstoff wurde auf 1 (100% Vitalität) normiert.

5.3.2.2 Phototoxische Wirkung von PNS auf NHDF bei 15 minütiger Inkubation in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer (15 und 30 min)

Die Dunkelkontrollen für die Bestrahlungszeiten von 15- und 30 Minuten nach 15 minütiger Inkubation des Farbstoffes zeigen keine markanten Unterschiede. Die Zellvitalität der Dunkelkontrollen liegt für alle Versuche oberhalb des EC_{50} -Wertes. Allerdings ist die Zellanzahl mit Steigerung der Konzentration tendenziell abnehmend. Die relative Zellanzahl unterschreitet jedoch niemals den Vitalitätswert von 65 % (800 µmol / 30 minütige Lagerung im Dunkeln) (**Abb.24**).

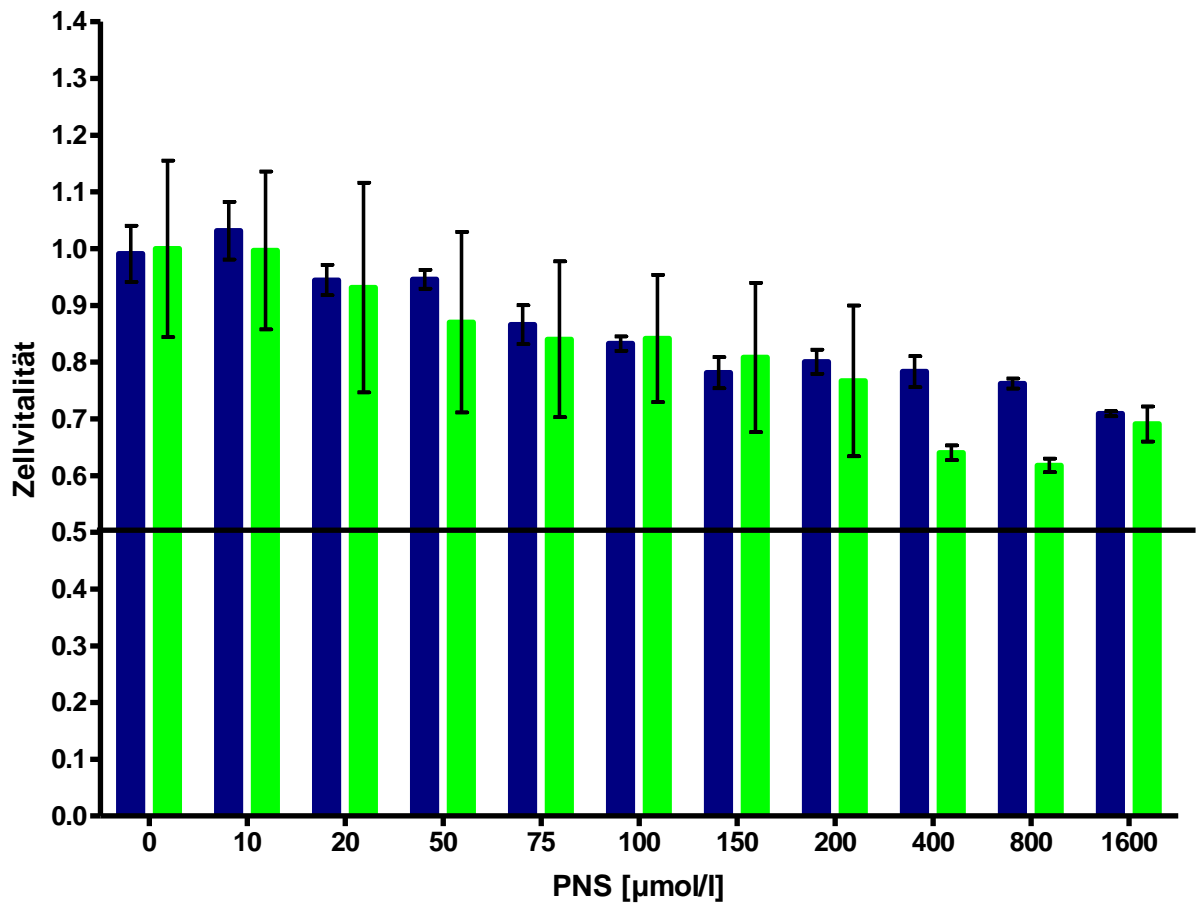


Abbildung 24 Das Diagramm zeigt die Dunkelkontrolle bei Inkubation der NHDF mit PNS für je 15 min. Die Lagerung im Dunkeln betrug 15 (blau) und 30 (grün) Minuten. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Insgesamt bleibt die Zellvitalität über 50 %.

Die **Abbildung 25** zeigt, welchen Einfluss die Bestrahlung nach Verabreichung von PNS auf die Fibroblasten hat. Während ohne Bestrahlung über 60 % der Zellen noch vital sind (**Abbildung 24**), beträgt die Überlebensrate bei 1600 μmol Farbstoff knapp 10 % (**Abbildung 25**). Schon 400 μmol des Photosensibilisators bewirken eine Mortalität der Zellen von 50 % unabhängig von der Bestrahlungsdauer (15 min oder 30 min). Bei 800 μmol PNS liegt die Vitalität bei etwa 20 %.

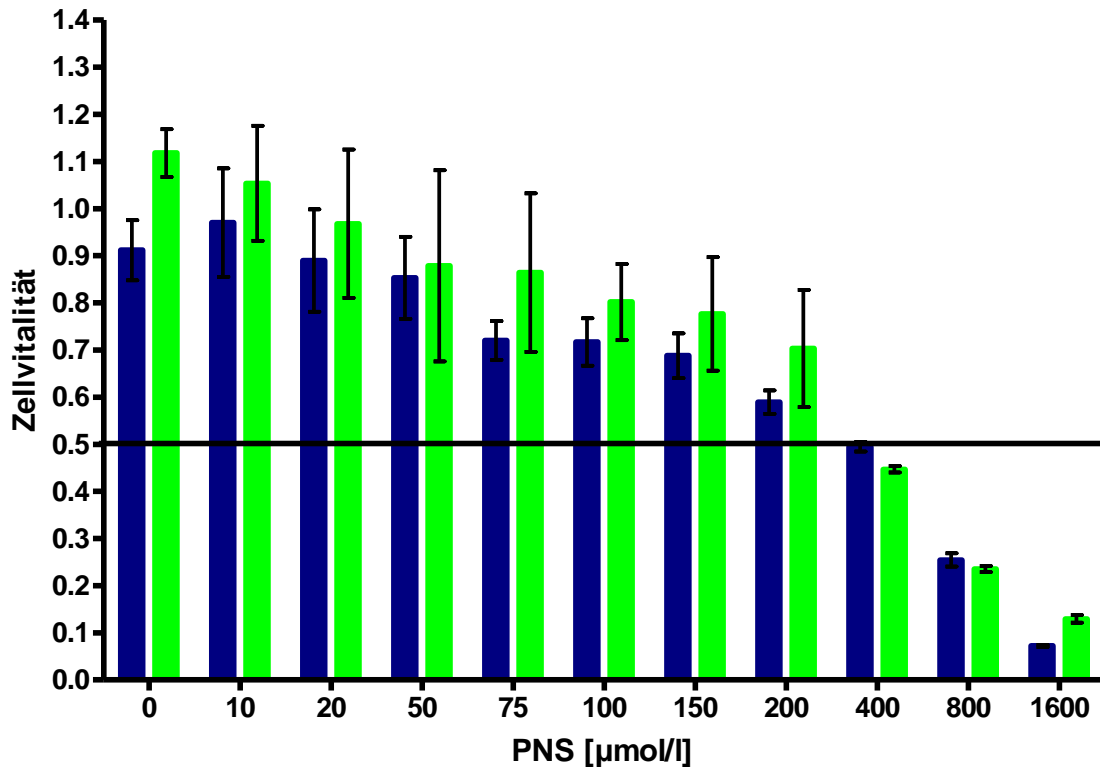


Abbildung 25 Dargestellt ist die Inkubation der NHDF mit PNS für 15 min und den Bestrahlungszeiten von 15 (blau) und 30 (grün) min. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

5.3.2.3 PN und PNS in direktem Toxizitätsvergleich anhand des EC-50-Wertes

Nach 15 minütiger Inkubation der beiden Farbstoffe zeigt sich folgendes Bild: Weder für PN noch für PNS ergibt sich eine Konzentration bei der ohne Bestrahlung eine Zellvitalität von unter 50% vorliegt. Dennoch ergeben sich Unterschiede nach Bestrahlung der Farbstoffe. Während für PN nach 15 minütiger Bestrahlung eine Zellvitalität von unter 50% schon bei einer Konzentration von 150 µmol/l vorliegt, werden 400 µmol/l PNS benötigt. Nach 30 minütiger Bestrahlung reicht für den Farbstoff PN schon eine Konzentration von 75 µmol/l zur Reduzierung der Fibroblasten auf unter 50%, während PNS 400µmol/l konzentriert sein

muss (**Tabelle 10**). Insgesamt lässt sich damit eine geringere Phototoxizität des Farbstoffes PNS zeigen.

Reduktion der Zellvitalität durch PN ($\mu\text{mol/l}$) von mind. 50%			Reduktion der Zellvitalität durch PNS ($\mu\text{mol/l}$) von mind. 50%				
		<i>Inkubation</i> 15min (13,7 J/cm ²)	<i>Kontrolle</i>		<i>Inkubation</i> 15min (13,7 J/cm ²)	<i>Kontrolle</i>	
<i>Bestrahlung</i>	15min	150	-	<i>Bestrahlung</i>	15min	400	-
	30min	75	-		30min	400	-

Tabelle 10: Die Tabelle zeigt den direkten Vergleich von PN und PNS. Gezeigt wird, welche Konzentration bei den jeweiligen Bestrahlungszeiten benötigt wird, um eine Zellvitalität von unter 50 % zu erreichen. Grau hinterlegt sind die verschiedenen Dunkelkontrollen entsprechend der Bedingungen für die Proben bei 15 minütiger und 30 minütiger Bestrahlungsdauer. Gelb hinterlegt die 15 und 30 minütig bestrahlten Zellen. - = Keine der angewandten Konzentrationen führt zum Absterben der Zellen über 50 %.

5.3.2.4 Phototoxische Wirkung von PNS auf normale dermale Fibroblasten bei 30 minütiger Inkubation in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer (15 und 30 min)

In **Abbildung 26** sind vergleichsweise die Dunkelkontrollen zu den Bestrahlungszeiten von 15 und 30 Minuten nach 30 minütiger Inkubation dargestellt. Es zeigt sich eine deutliche Dunkeltoxizität des Farbstoffes PNS. Während die Zellvitalität nach 15 minütiger Inkubation mit einem 1600 μmol konzentriertem Farbstoff PNS auf 70 % abfällt ergibt sich nach 30 minütiger Inkubation eine Reduktion der Zellen auf 10 %. Es zeigten sich toxische Effekte ab

einer Inkubationskonzentration von 400 μmol bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten und 30 minütiger Lagerung im Dunkeln.

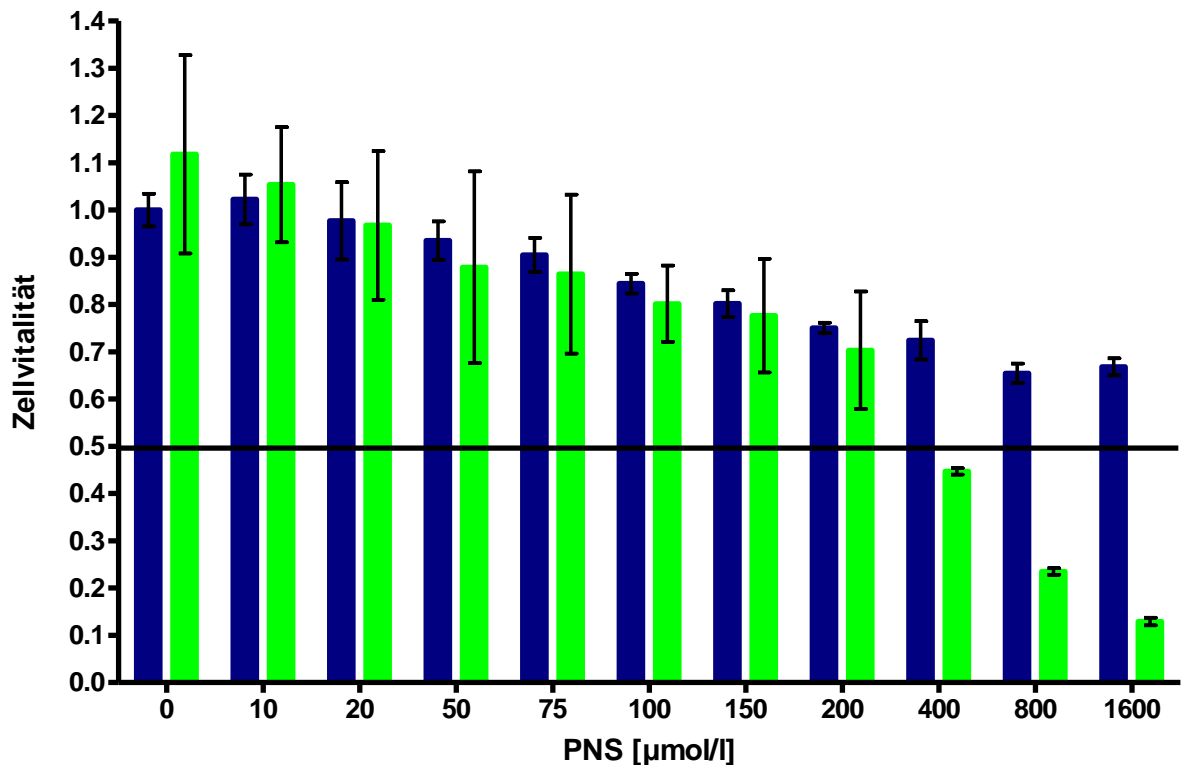


Abbildung 26: Dargestellt ist die Dunkelkontrolle entsprechend der Bedingungen für die Proben bei 15 minütiger Bestrahlung ($13,7 \text{ J/cm}^2$) (blau) und 30 ($27,54 \text{ J/cm}^2$) minütiger Bestrahlungsdauer (grün) nach 30 minütiger Inkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

In **Abbildung 27** ist zu erkennen, dass eine Bestrahlung von 15 Minuten bei einer Konzentration von 400 μmol PNS eine Zellvitalität von 55 % aufweist. Eine Verdopplung der Konzentration auf 800 μmol ergibt ein Überleben der Zellen von unter 20 % und eine weitere Verdopplung der Konzentration des Photosensibilisators zeigt eine Mortalität von über 90 % der Fibroblasten.

Steigert man die Bestrahlungszeit auf 30 Minuten, so resultiert eine Zellmortalität von 52 % bei einer Konzentration von 150 μmol . Bei 400 μmol leben noch 15 % der Fibroblasten und bei 800 μmol knapp 10 %.

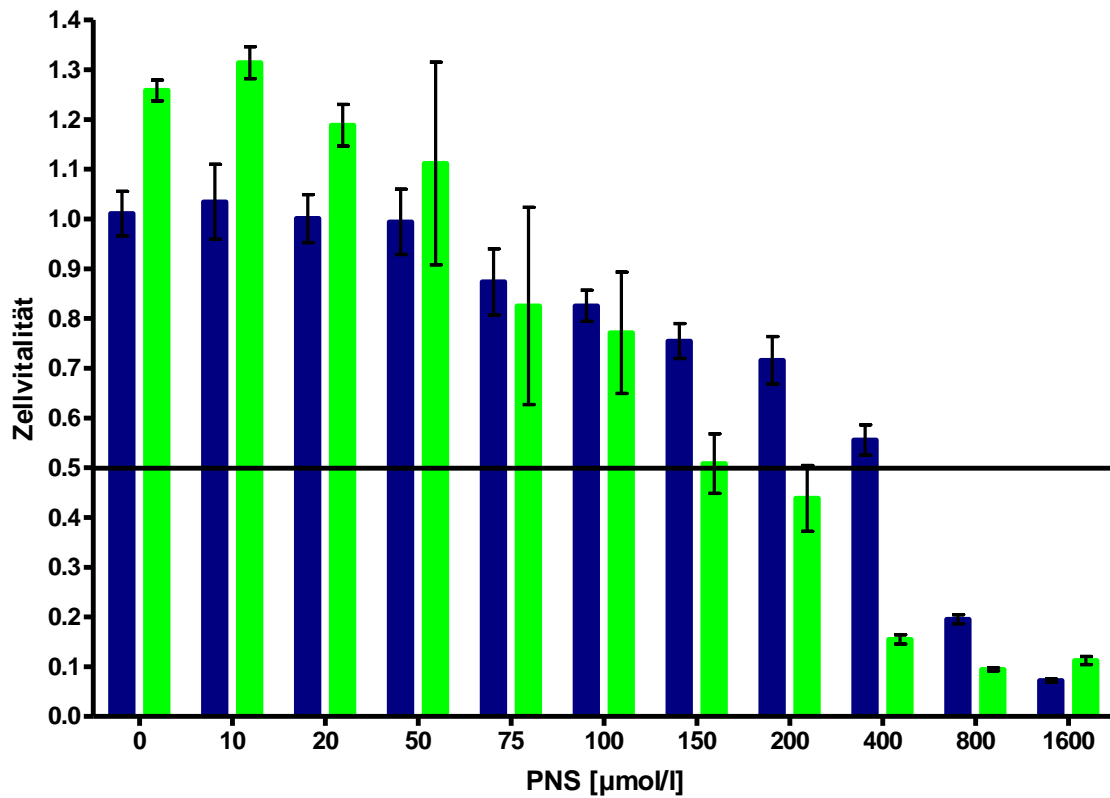


Abbildung 27: Die Inkubationszeit der NHDF betrug jeweils 30 min, die Dauer der Bestrahlung einmal 15 min ($13,7 \text{ J/cm}^2$) (blau) und einmal 30 min ($27,54 \text{ J/cm}^2$) (grün). Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

5.3.2.5 PN und PNS in direktem Toxizitätsvergleich anhand des EC-50-Wertes

Reduktion der Zellvitalität durch PN ($\mu\text{mol/l}$) von mind. 50%				Reduktion der Zellvitalität durch PNS ($\mu\text{mol/l}$) von mind. 50%			
		Inkubation 30min	Kontrolle			Inkubation 30min	Kontrolle
Bestrahlung	15min	F	F	Bestrahlung	15min	800	-
	30min	F	F		30min	200	400

Tabelle 11: Die Tabelle zeigt den direkten Vergleich von PN und PNS. Gezeigt wird, welche Konzentration bei den jeweiligen Bestrahlungszeiten benötigt wird, um eine Zellvitalität von unter 50 % zu erreichen. Grau hinterlegt sind die verschiedenen Dunkelkontrollen entsprechend der Bedingungen für die Proben bei 15 minütiger und 30 minütiger Bestrahlungsdauer ($13,7 \text{ J/cm}^2 / 27,54 \text{ J/cm}^2$). Gelb hinterlegt die 15 und 30 minütig bestrahlten Zellen.

- = Keine der angewandten Konzentrationen führt zum Absterben der Zellen unter 50 %.

f = Keine Daten von PN für 30 min Inkubation vorhanden

5.4 Indirekter Nachweis des Reaktionstyps bei der Photooxidation mittels der

Quenchersubstanz Natriumazid

Bei der photodynamischen Reaktion können zwei verschiedene Reaktionen ablaufen: Zum einen die Typ-I- Reaktion, bei der Radikale entstehen (unter anderem Peroxidradikale, Hydroxylradikale, Superoxidanionen), welche in der Lage sind, mit Sauerstoff zu reagieren und Oxidationsprodukte zu bilden. Bei der Typ-II-Reaktion kommt es zum Energieübertrag vom Triplett-Zustand des angeregten Sensibilisators auf Sauerstoff.

Da aus der Literatur bekannt ist, dass PN und PNS überwiegend Singulett-Sauerstoff nach dem Typ- II- Reaktionsweg generieren, wird dies nun im weiteren Verlauf der Arbeit mittels NaN_3 , einem Typ-II-Quencher, überprüft. Die Quantenausbeute für PN liegt bei 0,98 [Nonell et al.1993].

5.4.1 PN mit Natriumazid bei unterschiedlicher Bestrahlungsdauer (15 und 30 Minuten)

Die **Abbildung 28** zeigt zusätzlich neben der Bestrahlung der Zellen nach 15 minütiger Inkubation mit dem Farbstoff PN, eine Inkubation mit Natriumazid. Wie erwartet kommt es nach Inkubation der Zellen mit dem Farbstoff und anschließender Bestrahlung (15 min) zum Absterben der Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration. Bei einer Konzentration von $100 \mu\text{mol}$ kommt es zur Sterberate von 50 % der Zellen. Ohne Bestrahlung allerdings überleben alle Zellen. Bestrahlt man die Zellen nach Inkubation mit dem Farbstoff und NaN_3 , bewirkt keine der eingesetzten Photosensibilisatorkonzentrationen ein Absterben der NHDF von unter 50%. Beispielsweise überleben bei einer Konzentration von $100\mu\text{mol}$ alle Zellen. Damit ist NaN_3 als Quencher wirksam (Typ II).

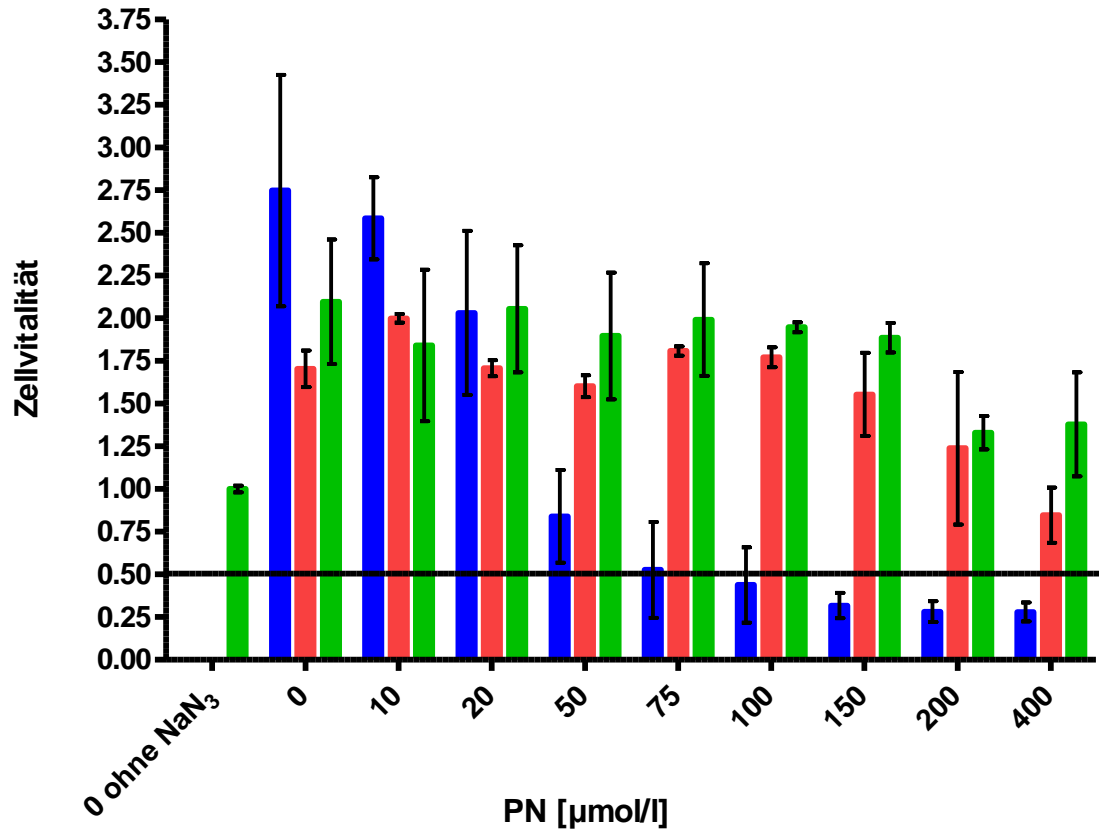


Abbildung 28: Die Abbildung zeigt die Inkubation der NHDF mit dem Farbstoff PN für 15 Minuten nachfolgender 15 minütiger Bestrahlung (blau). Zusätzlich wurde eine Versuchsreihe mit dem Quencher NaN₃ versetzt (rot) und eine Versuchsreihe zeigt die Dunkelkontrolle (grün). Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

In **Abbildung 29** erkennt man, dass die Zellen der Dunkelkontrolle alle überlebt haben. Es zeigt sich damit keine Dunkeltoxizität von PN. Nach 30 min Bestrahlung kam es zum Absterben der Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration. Hier zeigt sich auch, dass eine längere Bestrahlung eine höhere Sterberate ab einer Konzentration von 200 µmol zur Folge hat. Während nach 30 minütiger Bestrahlung nur 10 % der Zellen überleben sind dies nach 15 minütiger Bestrahlung noch 30 %. Mit dem Quencher NaN₃ liegen nur die Konzentrationen von 200µmol und 400µmol knapp über dem EC₅₀ –Wert.

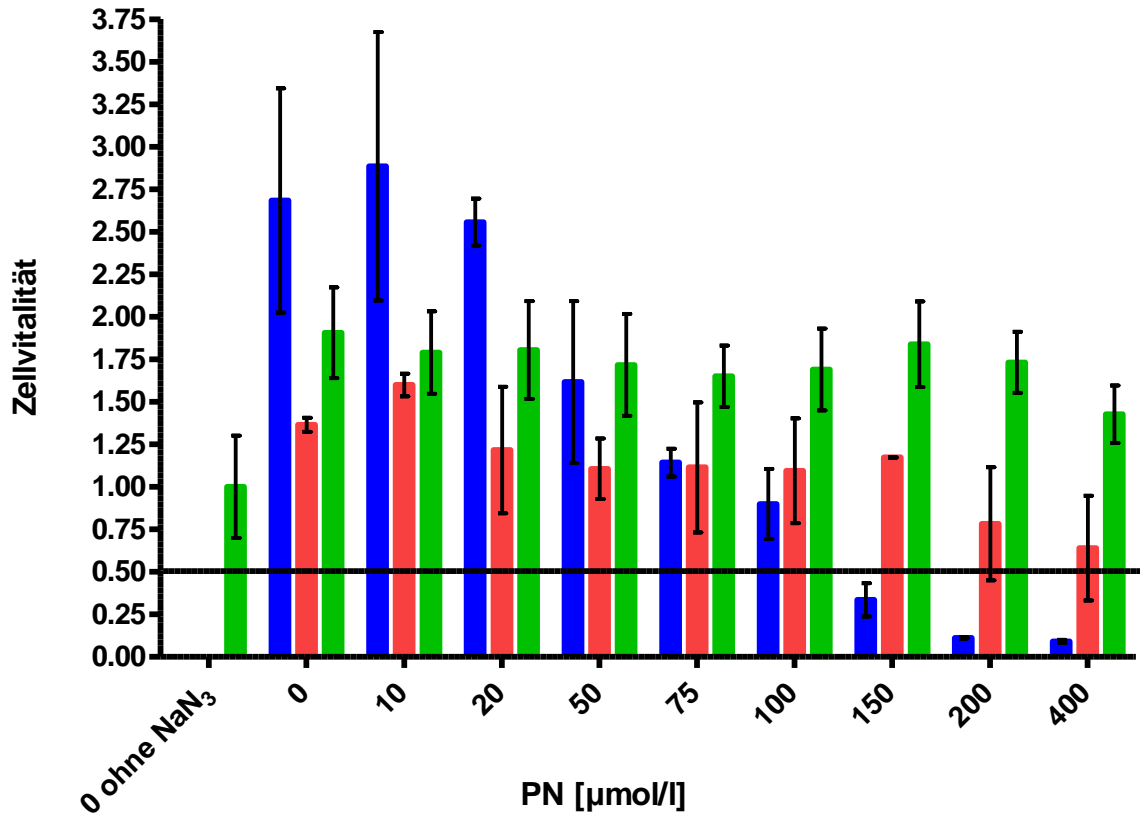


Abbildung 29: Dargestellt ist eine 15 minütige Inkubation mit PN und 30 minütiger Bestrahlung (blau). Zusätzlich wurde eine Versuchsreihe mit dem Quencher NaN₃ versetzt (rot), eine Versuchsreihe zeigt die Dunkelkontrolle (grün). Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

5.4.2 PNS mit Natriumazid bei unterschiedlicher Bestrahlungsdauer (15 und 30 Minuten)

Nach Inkubation der NHDF mit dem Farbstoff PNS für 15 min zeigte sich folgendes Bild (**Abb.30**):

Die Zellen der Dunkelkontrolle überlebten bei jeder verwendeten Konzentration zu über 100 %. Dahingegen zeigte sich wie erwartet eine Phototoxizität des Farbstoffes für die bestrahlten Zellen (15 min). Bei einer Konzentration von 400 µmol überlebten 75 % der Fibroblasten. Bei 800 µmol überlebten knapp 10 % der Zellen.

Der Quencher Natriumazid bewirkte sogar bei den höchsten Konzentrationen des Farbstoffes PNS ein Überleben der Zellen von knapp 100 %.

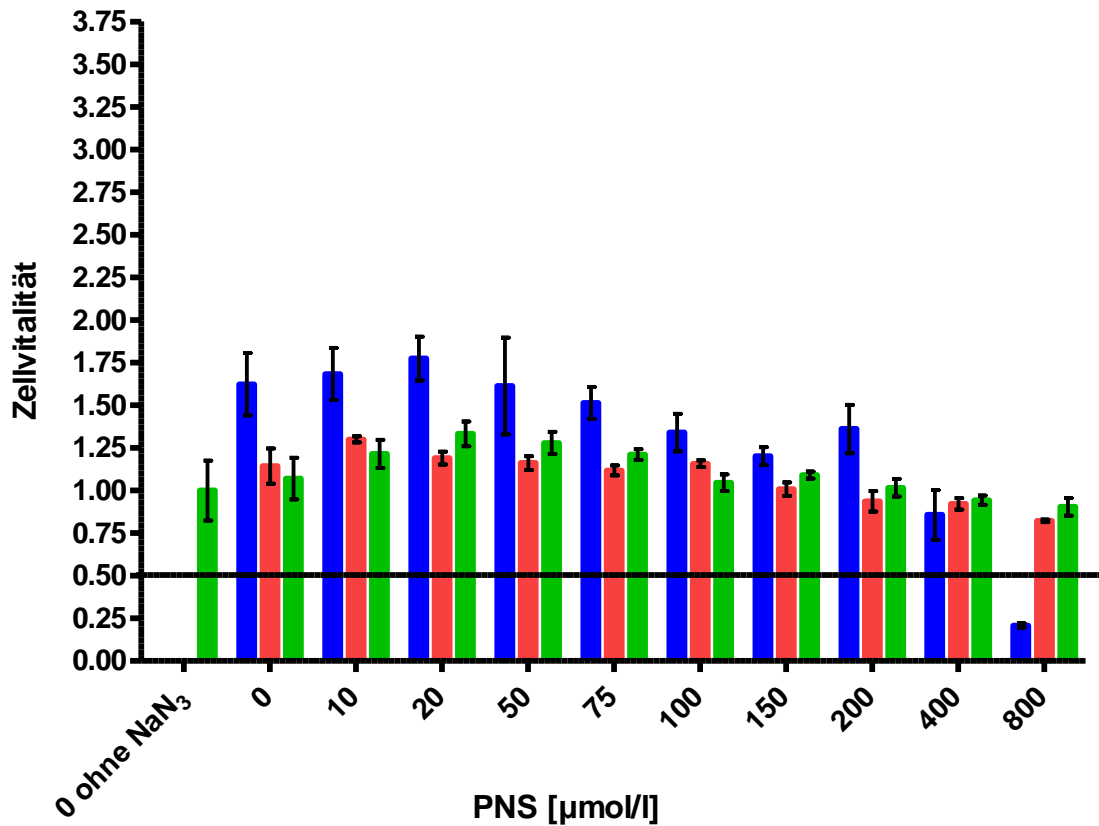


Abbildung 30: Dargestellt ist die Inkubation der Zellen mit PNS für 15 min als Dunkelkontrolle (grün), mit (rot) und ohne (blau) NaN₃ nach 15 minütiger Bestrahlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung

Nach 30 minütiger Bestrahlung der Zellen zeigt sich folgendes Bild (**Abb.31**): Mit Anstieg der PNS-Konzentration ergibt sich eine höhere Mortalität für die bestrahlten Zellen. Bei 400 µmol PNS überleben knapp 40 % der Zellen und bei 800 µmol überleben nur noch 25 % der NHDF. Damit zeigt der Farbstoff seine phototoxische Wirkung auf die NHDF.

Im Vergleich dazu zeigte sich bei der Zugabe des Quenchers Natriumazid folgendes:

Bei einer Konzentration des Farbstoffes PNS von 800 µmol und NaN₃ überleben knapp 70 % der NHDF.

Die Dunkelkontrolle zeigt keine toxische Wirkung auf die Zellen.

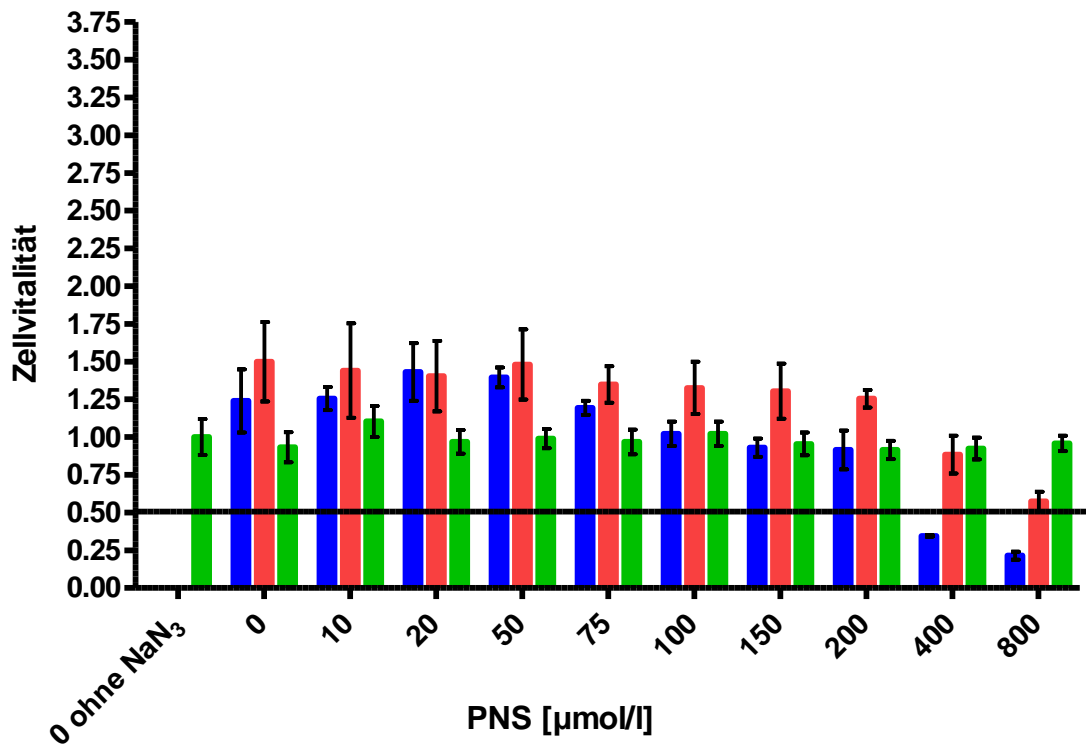


Abbildung 31: Dargestellt ist die Inkubation der Zellen mit PNS für 15 min als Dunkelkontrolle (grün), mit (rot) und ohne (blau) NaN₃ nach 30 minütiger Bestrahlung. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

5.5 Toxizitätsvergleich von PN und PNS anhand der gemessenen Zellvitalität

Ein Vergleich der beiden Farbstoffe PN und PNS anhand der überlebenden Fibroblasten (**Tabelle 12**) zeigt, dass zur Erreichung annähernd gleicher Zellanzahlen (in %) höhere Konzentrationen von PNS nötig sind. Damit zeigt PN ein höheres toxisches Potential in Bezug auf die NHDF-Zellen als PNS. Bei kurzer Inkubation (z.B. 5 min) und kurzer Bestrahlung (z.B. 15 min) ist der EC₅₀-Wert bei PN ab einer Konzentration von 200 µmol erreicht. Die 6 fache Inkubationszeit (30 min versus 5 min) führt zur Mortalität der Fibroblasten unter 50 % ab 50 µmol PN. Für PNS ergaben gleiche Inkubations- und

Bestrahlungszeiten bei 5 minütiger Inkubation eine Konzentration von 800 µmol (das 4-fache) und bei 30 minütiger Inkubation eine Konzentration von 400 µmol (das 8-fache).

Insgesamt kann man für beide Farbstoffe erkennen, dass mit Anstieg der Inkubationsdauer oder Bestrahlungsdauer eine höhere Toxizität des jeweiligen Farbstoffes gegeben ist.

Konzentration in µmol	Zellvitalität in %	Zellvitalität in %
	<i>PN: 5 min inkubiert/15 min bestrahlt/ 13,7 J/cm²</i>	<i>PNS :5 min inkubiert/15 min bestrahlt/ 13,7 J/cm²</i>
50	85	95
75	85	85
100	80	83
150	65	80
200	39	80
400	20	55
800	-	35
1600	-	13
	<i>PN:15 min inkubiert/15 min bestrahlt (13,7 J/cm²)</i>	<i>PNS: 15 min inkubiert/15 min bestrahlt (13,7 J/cm²)</i>
50	100	85
75	75	75
100	85	75
150	35	70
200	10	60
400	18	50
800	-	25
1600	-	10
	<i>PN: 30 min inkubiert/15 min bestrahlt (13,7 J/cm²)</i>	<i>PNS: 30 min inkubiert/15 min bestrahlt (13,7 J/cm²)</i>
50	45	95
75	30	86
100	22	83

150	20	75
200	10	70
400	15	50
Konzentration in μmol	Zellvitalität in %	Zellvitalität in %
	<i>PN: 30 min inkubiert/15 min bestrahlt (13,7 J/cm²)</i>	<i>PNS: 30 min inkubiert/15 min bestrahlt (13,7 J/cm²)</i>
800		20
1600	-	10
		<i>PNS:60 min inkubiert/15min bestrahlt (13,7 J/cm²)</i>
50	-	83
75	-	83
100	-	75
150	-	50
200	-	40
400	-	5
800	-	5
1600	-	5

Tabelle 12: Die Tabelle stellt die Zellvitalität der Fibroblasten in % nach Inkubation mit den Farbstoffen PN und PNS und anschließender Bestrahlung dar. Die jeweiligen Inkubations- und Bestrahlungszeiten sind in der Tabelle angegeben. Hervorgehoben wurden die Werte, die unterhalb des **EC₅₀-Wertes** liegen. - = keine Versuche zu den jeweiligen Werten vorhanden.

5.6 Gegenüberstellung der Parameter Inkubation und Bestrahlung für beide Farbstoffe

Beim Vergleich der Parameter verlängerte Inkubation oder verlängerte Bestrahlungsdauer im Hinblick auf die Fibroblastenmortalität zeigt sich für beide Farbstoffe eine geringere Überlebenstendenz der Zellen für beide Farbstoffe bei längerer Inkubation (**Tabelle 13**).

Insgesamt gesehen ist der prozentuale Unterschied allerdings gering und macht (PN: 100 μmol) 8 % aus.

Konzentration in μmol	Zellvitalität in %	Zellvitalität in %	
	<i>PN: 30 min inkubiert/15 min bestrahlt (13,7 J/cm²)</i>	<i>PN: 15 min inkubiert/30 min bestrahlt (27,54 J/cm²)</i>	
50	45	48	<
75	30	33	<
100	22	30	<
150	20	25	<
200	10	16	<
400	15	18	<
800	-	-	
1600	-	-	
	<i>PNS: 30 min inkubiert/15 min bestrahlt (13,7 J/cm²)</i>	<i>PNS: 15 min inkubiert/ 30 min bestrahlt (27,54 J/cm²)</i>	
50	95	89	>
75	86	88	<
100	83	80	>
150	75	79	<
200	70	73	<
400	50	48	>
800	20	22	<
1600	10	15	<

Tabelle 13: Dargestellt sind die Parameter Inkubation und Bestrahlung im Direktvergleich. Für den Farbstoff PN ergibt eine längere Inkubation eine höhere Zellmortalität als bei verlängerter Bestrahlung (Inkubation 30 min, Bestrahlung 15 min versus Inkubation 15 min, Bestrahlung 30 min). > = größer als, < = kleiner als (Vergleich von linker und rechter Spalte). Hervorgehoben wurden die Werte, die unterhalb des EC₅₀-Wertes liegen. - = Es existieren zu dieser Konzentration keine Versuche.

6. Diskussion

Die Photodynamische Therapie ist eine mögliche Alternative um onkologische oder nicht-onkologische Erkrankungen zu bekämpfen. Im Hinblick auf die mögliche Anwendung der photosensibilisierenden Substanzen Perinaphtenon in wasserlöslicher und wasserunlöslicher Form im Bereich der Photodynamischen Therapie wurden beide Wirkstoffe erstmals an normalen humanen dermalen Fibroblasten zur Ermittlung ihrer toxischen Eigenschaften getestet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels spektroskopischem Nachweisverfahren gezeigt, dass sowohl PN als auch PNS in die Zellen aufgenommen werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass PN eine gesteigerte Aufnahme in die Zellen zeigte. Die Lokalisation konnte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops dargestellt werden. PN reichert sich diffus im Plasma an. Die Inkubation der Fibroblasten mit Perinaphtenon in wasserlöslicher Form konnte noch nicht veranschaulicht werden.

6.1 Spektroskopischer Nachweis zur zellulären Aufnahme von PN und PNS

Spektroskopisch konnte die zelluläre Aufnahme von PN und PNS bestätigt werden. Nach Inkubation von NHDF mit PN und PNS kam es zu einer Abnahme der Absorption im Überstand (ohne Fibroblasten) und einer Zunahme im Pellet (resuspendierte Zellen) im Vergleich zur Absorption reiner PN-Lösung. Die zelluläre Aufnahme stellt eine Grundvoraussetzung dar, damit ein Farbstoff als Photosensibilisator fungieren kann. Sie ist deshalb sehr wichtig, damit die reaktiven Sauerstoffspezies, wie z.B. Singulett-Sauerstoff, gezielt wirken können. Singulett-Sauerstoff hat eine Überlebenszeit von 3,5 µs in Wasser, im biologischen Medium ist sie noch geringer, was auf die Quencher, wie beispielsweise Aminosäuren und ungesättigte Fettsäuren zurückzuführen ist [Nonell S., 1993].

6.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Im Fluoreszenzmikroskop konnte ein Fluoreszenzsignal für beide Farbstoffe nachgewiesen werden. Allerdings war das Signal unter den verwendeten Bedingungen von PN stärker als das von PNS. Ein Grund dafür könnte sein, dass PNS eine geringere Quantenausbeute bezüglich des Singulett-Sauerstoffs aufweist. Dagegen sprechen allerdings die Versuche von Nonell, der für PN und PNS gleiche Quantenausbeuten herausgefunden hat [Nonell et al. 1993]. Möglich wäre auch, dass PNS eventuell nicht photostabil ist und schneller zerfällt als PN. Diese Untersuchungen sind gerade Gegenstand der aktuellen Forschung der Arbeitsgemeinschaft PD. Dr. T. Maisch (Dermatologie, Regensburg). Von Ala beispielsweise wird über die Instabilität in bestimmten pH-Bereichen in der Literatur ausführlich berichtet. Wässrige Ala-Lösungen, die vor ihrer Anwendung auf einen neutralen pH-Wert gepuffert werden, zeigen eine chemische Instabilität, die visuell durch eine Gelbfärbung erkennbar ist [Novo et al., 1995]. Die kürzere Fluoreszenzdauer könnte allerdings auch durch die kurze Belichtungsdauer von 1 Min. bedingt sein. Eventuell hätte man diese erhöhen müssen, um ein stärkeres Fluoreszenzsignal zu erhalten. Da aber auch durch die spektroskopischen Untersuchungen eine geringere Aufnahme von PNS nachgewiesen werden konnte, deutet alles darauf hin, dass die absolute Aufnahme in die Fibroblasten geringer ist.

6.3 Phototoxizität von PN und PNS anhand der Ergebnisse

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten erwiesen sich PN und PNS für die NHDF als effektive photoaktive Substanzen.

Anhand der Phototoxizitätstests konnten die Konzentrationen und Inkubationszeiten ermittelt werden, bei denen PN und PNS phototoxisch auf die Fibroblasten wirkten und welche Bestrahlungszeiten einen nur geringen oder keinen phototoxischen Effekt auf die Zellen aufwiesen. Für eine 15 minütige Bestrahlung bei einer Inkubationsdauer von 5-, 15-, 30-, und

60 Minuten zeigte sich für den Farbstoff PN insgesamt eine stärkere Toxizität als für den Farbstoff PNS. Erkennbar war dies daran, dass geringere Konzentrationen für PN nötig waren, um eine Zelltoxizität von unter 50 % zu erreichen (EC_{50}). Bei 5 minütiger Inkubation war für PNS die vierfache Konzentration (800 μmol versus 200 μmol) nötig, um den EC_{50} -Wert zu erreichen. Nach 15 minütiger Inkubation war die fünffache Menge (800 μmol versus 150) von dem Farbstoff PNS nötig und nach 30 minütiger Inkubation die dreifache (75 μmol versus 200). Die NHDF wurden nur mit dem Farbstoff PNS 60 min inkubiert, um einen EC_{50} -Wert zu ermitteln, da der Farbstoff PN schon nach 30 minütiger Inkubation eine Toxizität von >55% aufwies (50 μmol führten zu Zelltoxizität von über 55 %). Damit wurden Versuche mit 60 minütiger Inkubation hinfällig. Vermutlich liegt das höhere toxische Verhalten des Farbstoffes PN in der höheren absoluten Aufnahme von PN in die Zelle begründet. Die Singulett-Quantenausbeute, die zudem die Toxizität eines Farbstoffes bestimmt, ist für beide Photosensibilisatoren annähernd gleich und damit für den toxischen Unterschied zwischen PN und PNS nicht relevant [Nonell S. 1993]. Auch die anderen Versuchsreihen zeigten deutliche höhere toxische Werte für PN im Vergleich zu PNS. Eine 15 minütige Inkubation des Farbstoffes PN bei anschließender 30 minütiger Bestrahlung bewirkt bei einer Konzentration von 50 μmol eine Zellmortalität von über 50 %, während bei gleichen Bedingungen für den Farbstoff PNS noch 89 % der Zellen vital sind und eine Mortalität von über 50 % der Zellen erst bei einer Inkubationskonzentration von 400 μmol PNS zustande kommt.

Um als Photosensibilisator in therapeutischen bzw. diagnostischen Bereichen der Medizin Anwendung zu finden darf keine Toxizität für gesunde Zellen bei therapeutische Dosen vorliegen [Dougherty et al., 1975] und eine Dunkeltoxizität des Wirkstoffes muß für die angewendete Konzentrationen ausgeschlossen werden können. Für PN konnte nachgewiesen werden, dass keine Dunkeltoxizität des Farbstoffes für die durchgeführten Versuche vorliegt. Die Zellvitalität lag bei über 80 %. PNS dagegen zeigte dunkeltoxische Tendenzen bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten ab einer Konzentration von 400 μmol . Die Zellvitalität lag

hier unterhalb von 50 %. Auch zeigten sich toxische Effekte ab einer Inkubationskonzentration von 400 μmol bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten und 30 minütiger Lagerung im Dunkeln. Hier reduzierte sich die Vitalität auf 48 % ab.

Der Nachweis zum vorherrschenden Reaktionstyp wurde mittels NaN_3 (Quencher der Typ II Reaktion). Sowohl PN als auch PNS reagieren hervorragend mit Sauerstoff zu Singulett-Sauerstoff, reagieren also vorwiegend in Form der TypII-Reaktion. Belegt werden kann dies durch die Versuchsdaten aus 3.4. Die Fibroblasten, welche mit NaN_3 und den jeweiligen Sensibilisatoren versetzt wurden, zeigten eine höhere Überlebensrate bei den einzelnen Konzentrationen als die bestrahlten Proben mit den Photosensibilisatoren ohne NaN_3 .

6.4 Phototoxizität von PN und PNS anhand physiko-chemischer Eigenschaften

6.4.1 Molekulargewicht von PN und PNS

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Farbstoffe PN und seine wasserlösliche Form PNS anhand ihrer Eigenschaften als Photosensibilisatoren, vor allem bezüglich ihrer Toxizität, an normalen humanen dermalen Fibroblasten miteinander verglichen. Die Weiterentwicklung des Farbstoffes PN zu PNS spielt dabei eine ganz entscheidende Rolle, da die chemischen und physikalischen Eigenschaften beibehalten werden konnten.

Beide Farbstoffe zeichnen sich durch ein geringes Molekulargewicht von 180 g/mol (PN) und 260,27 (PNS) aus. Zum Vergleich ihrer chemischen Eigenschaften eignen sich ähnlich große Photosensibilisatoren.

Das hydrophobe Phenoxazin „Nile blue“ mit einem Molekulargewicht von 353,845 g/mol stellt ein solches Molekül dar [Lin 1991a]. Allerdings zeigt sich „Nile blue“ im Gegensatz zu PN und PNS in den Lysosomen lokalisiert. Der Grund hierfür könnte sein, dass Nile Blue anders als die Phenalene PN und PNS eine positive Ladung aufweist. Der

Aufnahmemechanismus von Nile blue kann so erklärt werden, dass das Phenoxazin sein Kation abgibt und mittels Endozytose lysosomal aufgenommen wird [Lin 1991b]. Anschließend kommt es zur Protonierung des Farbstoffes in dem Lysosom, so dass er keine Möglichkeit mehr hat aus der Zellorganelle zu entweichen, ähnlich dem Lysosomen-spezifischen Farbstoff LysoTracker green.

6.4.2 Intrazelluläre Lokalisation

Die Toxizität eines Moleküls wird unter anderem durch die Lokalisation bestimmt. Der bevorzugte Ort der Anreicherung eines Photosensibilisators ist abhängig von seiner chemischen Struktur. Lipophile Photosensibilisatoren lagern sich überwiegend in Membranen an. Nach ihrer Aktivierung kommt es zu einer Depolarisation durch Oxidation der Phospholipide und schließlich zur Veränderung der Permeabilität bis zur Ruptur der Membranen. Ein ähnlicher Mechanismus könnte für PN als lipophiler Sensibilisator postuliert werden. Hydrophile Photosensibilisatoren zerstören nach Aktivierung hauptsächlich die Lysosomenmembranen. Es kommt zur Ausströmung von lysosomalen Enzymen ins Zytoplasma und zur Zytolyse [Kübler, 1999]. Zum genaueren Verständnis intrazellulärer Prozesse im Rahmen der PDT wurde es für notwendig erachtet, fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von PN und PNS durchzuführen.

Nach Anfärbung und Inkubation der NHDF-Zellen mit den Markern Höchst, Rhodamin, LysoTracker Green einerseits und PN oder PNS andererseits wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie das Färbeverhalten der Zellen bei genannten Farbstoffen miteinander verglichen.

Beim Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften von PN und PNS mit jenen drei Markern für Zellorganellen, Höchst, Rhodamin und LysoTracker Green, stellte sich hierbei heraus, dass weder der Zellkern, die Mitochondrien noch die Lysosomen die primäre Lokalisation von PN und PNS darstellten. Eine Fluoreszenz von PN zeigte sich mikroskopisch diffus im Plasma

lokalisiert. Die Inkubation der Fibroblasten mit Perinaphtenon in wasserlöslicher Form zeigte keinen Unterschied hinsichtlich der Lokalisation.

Der lipophile Farbstoff ATMPn beispielsweise zeigt sich im Gegensatz zu PN in den Lysosomen lokalisiert [Fickweiler S., 1998]. Dahingegen befindet sich der lipophile Farbstoff Hypericin vorwiegend in der Plasmamembran von Glioblastomzellen angereichert [Wein 2009].

Die lipophilen Porphyrinderivate TPYR-PP und C16-TTP reichern sich in Me45 Zellen (menschliche maligne Melanomzellen) nach 4 stündiger Inkubation an der Plasmamembran an und im Cytoplasma. Nach 12 stündiger Inkubation waren beide Farbstoffe in Organellen um den Zellkern herum zu finden. Für Photofrin II (5µg/ML) ergab sich nach 12 h eine Anreicherung diffus im Cytoplasma [Kramer-Marek G., 2006].

6.4.3 Zellulärer Transportmechanismus

Der Aufnahmemechanismus für beide Farbstoffe (PN und PNS) in die Fibroblasten ist allerdings noch ungeklärt. Den meisten Zellen stehen Transportsysteme für die Aufnahme von kationischen, zwitterionischen oder anionischen Aminosäuren zur Verfügung. Laut Stevens und Mitarbeiter können diese Systeme klassifiziert werden in die Gruppe der Na⁺ - abhängigen, wie beispielsweise GABA-Transporter und Na⁺ - unabhängigen Transporter [Stevens BR, 1984].

Für Ala als hydrophiles Molekül wurde beispielsweise mit Rezeptorinhibitionsversuchen eine Aufnahme über Na⁺ - abhängige Transporter ermittelt. Vor allem aber die System-Beta-Transporter scheinen in dem Aufnahmemechanismus von Ala wichtig zu sein. Ihre Inhibition reduziert die intrazelluläre Anreicherung von PP IX um bis zu 85 % [Rud 2000]. Die hydrophobe veresterte Form des Ala wird nicht über diese Transporter aufgenommen [Rud 2000]. Hier scheint die passive Diffusion von großer Bedeutung zu sein.

Die Aufnahme von Nile blue, einem Benzophenoxazin ist effizient und direkt proportional zum Farbstoffgehalt extrazellulär. Durch Ausschaltung der ATP-Aktivität bei 2 ° C wurde nachgewiesen, dass Nile blue mittels Endozytose in die Zelle, vorwiegend in die Lysosomen aufgenommen wurde. Beweisend für einen aktiven Transport in die Zelle ist eine Farbstoffanreicherung bei 37°C, die bei unter 4°C nicht gegeben ist.

Ähnliche Versuche zur Ausschaltung der aktiven Transporter erfolgten mit dem lipophilen Farbstoff Hypericin. Der Zellmetabolismus zeigte sich ebenfalls bei niedrigen Temperaturen (4°C) stark beeinträchtigt, so dass dem Aufnahmemechanismus von Hypericin in die Zelle ebenfalls ein aktiver Transport zugrunde liegt, wie zB. der endozytose-vermittelten Aufnahme [Wein 2009]. Dies konnte zuvor schon von Dougherty et al. für Photosensibilisatoren aus der Porphyringruppe gezeigt werden [Dougherty et al. 1998].

In Zukunft könnten ähnliche Versuche zur Klärung des Aufnahmemechanismus von PN und PNS durchgeführt werden.

6.4.4 Singulett-Sauerstoff

Ein weiterer Punkt der die Toxizität eines aktivierten Farbstoffes ausmacht ist die Reaktion mit Sauerstoff zu Singulett-Sauerstoff. Sowohl PN als auch PNS besitzen eine hohe Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute. Die Quantenausbeute für PN in Benzen beträgt 0,94 entsprechend 94 % und in Methanol 0,97 entsprechen 97 %.

6.4.5 Absorptionsspektrum von PN und PNS

Das Absorptionsspektrum von PNS liegt wie bei PN vornehmlich im Bereich des UVA-Lichtes bei 367 nm. Wünschenswert wäre aber eine maximale Absorption im Bereich des sichtbaren Lichtes, da mit Zunahme der Wellenlänge eine höhere Penetrationstiefe des

Lichtes ins Gewebe gewährleistet ist. Somit lassen sich tiefer gelegene Tumorzellen mit rotem Licht effektiver behandeln als mit blauem Licht. In dieser Studie wurde eine Lichtquelle verwendet, die bei 420 nm ihre maximale Lichtleistung besitzt. Dieser Bereich ist sowohl für PN als auch für PNS zur Absorption noch ausreichend, was durch die Experimente zur Toxizität belegt werden kann. Es wurde der sichtbare Wellenlängenbereich gewählt, da eine Bestrahlung der Zellen in vivo im Bereich von 320-380 nm (UVA-Strahlung) zu Schäden an der Haut führen würde.

Für PN liegt die maximale Absorption etwas besser im langwelligeren Bereich bei 360-420 nm. Vergleicht man diesen Wellenlängenbereich mit den durch Dougherty postulierten Kriterien für einen für die PDT geeigneten Photosensibilisator, so liegt die Aktivierung von PN und PNS weit unter dem geforderten Wellenlängenbereich von 600 nm. Die Porphyrine haben im Vergleich zu den Phenalenen auch ein maximales Absorptionsspektrum im Übergangsbereich vom UVA-Licht zum sichtbaren Licht. Allerdings weisen die Porphyrine weitere Absorptionspeaks bei 580 und 630 nm auf [[Fritsch 2005](#)], die für die PDT tiefer gelegener Tumore genutzt werden können. Bestenfalls liegen die Absorptionsbereiche im langwelligen, roten sichtbaren Lichtbereich, wie beispielsweise das Porphycene ATMPn, welches bei 640 nm absorbiert [[Fickweiler et al. 1998](#)].

6.5 PN und PNS im Vergleich in Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz

Entscheidender Unterschied zwischen PN und PNS ist die Wasserlöslichkeit von PNS.

Diese Eigenschaft hat den Vorteil, dass PNS nicht erst in Lösung gebracht werden (Formulierung z.B. als Creme) muss, um hautgängig zu sein, sondern er kann direkt zur Anwendung kommen. Bei anderen Substanzen wie beispielsweise dem hydrophilen Ala stellt gerade die verringerte Diffusionstiefe und damit die verringerte Penetrationstiefe das Problem dar. Daher sind sehr hohe Ala-Konzentrationen in loco erforderlich, um ein ausreichend hohes

Protoporphyrine IX-Level für die PDT zu erreichen. Zur Verbesserung der Eindringtiefe in die Haut besteht die Möglichkeit, einen Tesafilmabriss durchzuführen oder einen Penetrationsvermittler wie DMSO (Dimethylsulfoxid 10-20 %) beizufügen. DMSO wirkt als Penetrationsvermittler ab einer Konzentration von 40% und eine optimale Penetration kann ab einer Konzentration von 60 % erreicht werden. DMSO weist allerdings dann den Nachteil auf, dass es zu toxischen, irritativen Schäden an der Haut und zu Erythemen kommt [Al-Saidan et al., 1987]. Daher sollte laut Wester und Maibach eine klinische Anwendung vermieden werden [Wester 1989]. Auch andere Lösungsmittel wie z.B. Ethanol sind physiologisch nicht geeignet, um als Lösungsmittel in vivo zu fungieren. Die gute Wasserlöslichkeit des PNS ist zudem im Hinblick auf die Tumorthherapie vorteilhaft, da der interstitielle Raum maligner Tumore im Mittel dreimal größer ist als derjenige des Normalgewebes [Müller W. Gammastrahlung versus Laserlichtbestrahlung, Promotionsarbeit, Rheinisch Westfälische Technische Hochschule Aachen].

Ein weiterer Punkt der die Penetrationseigenschaften beeinflusst ist das Molekulargewicht. Um das Stratum corneum der Haut zu penetrieren darf ein Molekül eine Größe von 500 Da nicht überschreiten [Magnusson Beatrice M. et al., 2004]. Da sowohl PN als auch PNS mit der Molekülgröße von 180 g/mol (PN) und 260,27 g/mol (PNS) damit weit unter 500 DA liegen, wird hier vermutlich die Möglichkeit für beide Farbstoffe geschaffen, das Stratum corneum der Haut direkt zu passieren.

Im Vergleich dazu hat beispielsweise das noch nicht als Medikament zugelassene Porphycene ATMPn die Problematik mit einer molaren Masse von 601 g/mol (bestimmt vom Institut für anorganische Chemie, Universität Köln) zu groß zu sein, um das Stratum corneum direkt zu passieren. Das Absorptionsspektrum von PN und PNS liegt wie schon erwähnt nicht in dem von Dougerthy geforderten Wellenlängenbereich von 600 nm. Es könnte allerdings zur Behandlung pathogener Keime genutzt werden, zum Beispiel im Sinne der Oberflächendesinfektion. Hier würde das kurzwellige Blaulicht vollkommen ausreichen,

um die oberste Hautschicht zu durchdringen. Die toxischen Konzentrationen der Farbstoffe PN und PNS auf die Fibroblasten wurden wie folgt ermittelt: PN weist z.B. einen EC_{50} -Wert nach 5 minütiger Konzentration und 15 minütiger Bestrahlung bei einer Konzentration von $200\mu\text{mol}$ auf. Das bedeutet, dass ab einer Konzentration von $200\mu\text{mol}$ und den genannten Bedingungen 50 % der Fibroblasten sterben. Zukunftsorientiert wären somit Versuche mit den Photosensibilisatoren PN und PNS im Hinblick auf die Ausschaltung pathogener Keime, wie beispielsweise dem Bakterium *Staphylokokkus aureus* interessant. Voraussetzung für den klinischen Einsatz wäre die Ermittlung eines „therapeutischen Fensters“. Nach genau definierten Bedingungen für die antibakterielle Therapie (Inkubationskonzentration, Inkubationsdauer, Bestrahlungsdauer...) sollten prokaryonte pathogene Keime abgetötet werden, während eukaryonte Hautzellen jedoch überleben. Da antibiotikaresistente Keime heutzutage ein Problem sind, könnte die PDT eventuell Erfolge in der Abtötung dieser Prokaryonten darstellen.

7. Zusammenfassung

Das Verfahren der PDT hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einer denkbaren Alternative für palliative aber auch kurative Behandlungsansätze innerhalb der Tumorthherapie entwickelt. Die Bedeutung neuer Photosensibilisatoren gilt es unter dem Aspekt ihrer chemischen, physikalischen und pharmakologischen Eigenschaften jedoch noch unter Beweis zu stellen, bevor diagnostische oder therapeutische Ansätze für jeweilige diskutiert werden können.

So wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl die Toxizität von Perinaphtenon in wasserlöslicher und wasserunlöslicher Form auf NHDF-Zellen untersucht, als auch Versuche zur Lokalisation und zellulären Aufnahme von PN und PNS durchgeführt. Des Weiteren wurde der vorherrschende photooxidative Mechanismus (Typ-II) indirekt durch Verwendung von NaN_3 bestimmt.

Mit Hilfe eines spektroskopischen Nachweisverfahrens konnte gezeigt werden, dass PN und PNS von NHDF-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit aufgenommen werden. Fluoreszenzmikroskopisch konnten beide Farbstoffe diffus im Zytoplasma verteilt nachgewiesen werden.

Unterschiedliche Konzentrationen (PN 0-400 $\mu\text{mol/l}$ und PNS 0-1600 $\mu\text{mol/l}$), verschiedene Inkubationszeiten (5 min, 15 min, 30 min, 60 min) und unterschiedliche Lichtintensitäten (13,77 J/cm^2 , 27,54 J/cm^2) wurden verwendet, um die Phototoxizität gegenüber NHDF-Zellen mit dem MTT-Test zu bestimmen. Bei den Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Phototoxizität von PN und PNS abhängig von der Inkubationszeit, applizierten Lichtintensität und Konzentration der Farbstoffe ist. Bei niedriger Inkubationsdauer von 5 min und einer Bestrahlungszeit von 15 min (13,77 J/cm^2) liegt die Konzentration von PN bei der 50% der Zellen sterben noch bei 200 $\mu\text{mol/l}$, bei 15 minütiger Inkubation bei 150 $\mu\text{mol/l}$, und bei 30 minütiger Inkubation bei 70 μmol . Wählt man eine höhere Bestrahlungsdauer von

30 min ($27,54 \text{ J/ cm}^2$) bei 15 minütiger Inkubation, so sinkt die Überlebensrate der NHDF-Zellen bereits bei $75 \text{ } \mu\text{mol/l}$ auf weniger als 50%.

Für den wasserlöslichen Farbstoff PNS ergibt sich selbiger Sachverhalt: Je höher konzentriert der Farbstoff und je höher die Inkubations-, sowie Bestrahlungsintensität war, umso geringer war die Überlebensrate der NHDF-Zellen. Bei 30 minütiger Inkubation und 15 minütiger Bestrahlung ($13,77 \text{ J/ cm}^2$) liegt der EC_{50} -Wert bei $800 \text{ } \mu\text{mol/l}$. Eine Erhöhung der Inkubationsdauer auf 60 min führt zu einer Überlebensrate der NHDF-Zellen unter 50 % bei einer Konzentration von $200 \mu\text{mol/l}$. Insgesamt konnte gezeigt werden, daß PN eine höhere Lichttoxizität aufweist als PNS, während PNS in hohen Konzentrationen bei langer Inkubationsdauer dunkeltoxisch reagiert.

Zukunftsorientiert wären somit Versuche mit den Photosensibilisatoren PN und PNS im Hinblick auf die Ausschaltung pathogener Keime, wie beispielsweise dem Bakterium *Staphylokokkus aureus* interessant. Voraussetzung für den klinischen Einsatz wäre die Ermittlung eines „therapeutischen Fensters“. Nach genau definierten Bedingungen für die antibakterielle Therapie (Inkubationskonzentration, Inkubationsdauer, Bestrahlungsdauer...) sollten prokaryonte pathogene Keime abgetötet werden, während eukaryonte Hautzellen jedoch überleben. Wie in den Phototoxizitätsversuchen gezeigt werden konnte, müssen die Bedingungen deshalb sowohl im Bereich kurzer Inkubationszeiten als auch im Bereich geringer Bestrahlungsintensitäten liegen. Da antibiotikaresistente Keime wie die meticillinresistenten *Staphylococcus aureus*-Stämme heutzutage ein klinisches Problem darstellen, da sie Kreuzresistenzen gegen alle β -Lactam-Antibiotika aufweisen [Kloos und Lambe,1991], könnte die PDT mit diesen Photosensibilisatoren eventuell Erfolge in der Abtötung dieser Prokaryonten darstellen.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
5-Ala	5-Aminolaevulin-Säure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FBM	Fibroblast Basal Medium
FBS	Fetal Bovin Serum
FGM	Fibroblast Growth Medium
G	Gramm
H	Stunde
HpD	Hämatoporphyrinderivat
J	Joule
M	Mol
Min	Minute
MKG-Chirurgie	Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NaN ₃	Natriumazid
NHDF	Normale humane dermale Fibroblasten
PDT	Photodynamische Therapie
PN	Perinaphton in wasserunlöslicher Form
PNS	Perinaphton in wasserlöslicher Form
PS	Photosensibilisator
SDS	Sodiumdodecylsulfat
μ	Mikro

9. Literatur

Abels C (2003) Wirkmechanismus der photodynamischen Therapie. Biologische Effekte. In: Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M (Hrsg) Klinische Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie. Blackwell, Berlin, Wien, S 63-66

Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M (2001) The history of photodetection and photodynamic therapy. Photochem Photobiol 74: 656-669

Al-Saidan S M, Selkirk A B, Winfield A J (1987), Effect of dimethylsulfoxide concentration on the permeability of neonatal rat stratum corneum to alkanols. J Invest. Dermatol 89: 426-429

Anderson RR, Parrish Ja (1981), The optics of human skin.
J. Invest Dermatol 1981; 77: 13-19

Auler H, Banzer G (1942) Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. Z Krebsforsch 53: 65-68

Babilas P, Landthaler M, Szeimies RM (2006) Photodynamic therapy in dermatology. Eur J Dermatol 16: 340-348

Bäumler W (2003) Lichtquellen.Grundlagen. Eindringtiefe von Licht in Gewebe . In: Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M (Hrsg) Klinische Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie. Blackwell, Berlin, Wien, S 44-46

Bäumler W., Ackermann G., Abels C., Szeimis R.-M. (2003) Fluoreszenzdiagnostik in der Dermatologie. Blackwell Verlag, Band 1

Baletic N, Petrovic Z, Pendjer I, Malicevic H (2004) Autofluorescent diagnostics in laryngeal pathology. Eur Arch Otorhinolaryngol 261: 233-237

Berenbaum MC, Akande SL, Bonnett R, Kaur H, Ioannou S, White RD, Winfield UJ (1986) Meso-Tetra(hydroxyphenyl)porphyrins, a new class of potent tumour photosensitisers with favourable selectivity. Br J Cancer 54: 717-725

Berlanda J, Kiesslich T, Oberdanner CB, Obermair FJ, Krammer B, Plaetzer K (2006) Characterization of apoptosis induced by photodynamic treatment with hypericin in A431 human epidermoid carcinoma cells. J Environ Pathol Toxicol Oncol 25: 173-188

Betz V, Schneckenburger H, Alleroder HP, Sybrecht GW, Meyer JU (1994) Evaluation of changes in the NADH level between carcinogenic and normal tissue samples by use of fluorescence spectroscopy. Pro SPIE 2324: 284-291

Betz CS, Stepp H, Janda P, Arbogast S, Grevers G, Baumgartner R, Leunig A (2002) A comparative study of normal inspection, autofluorescence and 5-ALA-induced PPIX fluorescence for oral cancer diagnosis. Int J Cancer 97: 245-252

Biel MA (1996) Photodynamic therapy and the treatment of head and neck cancers. J Clin Laser Med Surg 14: 239-244

Biel MA (2007) Photodynamic therapy treatment of early oral and laryngeal cancers. Photochem Photobiol 83: 1063-1068

Bisonette R, Tremblay J., Juzenas P, Boushira M, Lui H (2002). Systemic photodynamic therapy with aminolaevulinic acid induces apoptosis in lesional T-Lymphocytes of psoriatic plaques. J. Invest. Dermatol. 119: 77-83.

Blant SA, Glanzmann TM, Ballini JP, Wagnieres G, van den Bergh H, Monnier P (2002) Uptake and localisation of mTHPC (Foscan) and its ¹⁴C-labelled form in normal and tumour tissues of the hamster squamous cell carcinoma model: a comparative study. Br J Cancer 87: 1470-1478

Bonnett R, White RD, Winfield UJ, Berenbaum M (1989) Hydroporphyrines of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumor photosensitizers. Biochem J 261: 277-280

Braathen LR, Szeimies RM, Basset-Seguin N, Bissonnette R, Foley P, Pariser D, Roelandts R, Wennberg AM, Morton CA (2007) International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology, 2005. J Am Acad Dermatol 56: 125-143

Brown SB, Brown JE, Vernon DI (1999) Photosensitizing drugs - their potential in oncology. Expert Opin Investig Drugs 8: 1967-1979

Bunting JR (1992) A test of the singlet oxygen mechanism of cationic dye photosensitization of mitochondrial damage. Photochem Photobiol 55: 81-88

Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R (2007) Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 21: 293-302

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942

Chang CJ, Wilder-Smith P (2005) Topical application of photofrin for photodynamic diagnosis of oral neoplasms. *Plast Reconstr Surg* 115: 1877-1886

Chekulayeva LV, Shevchuk IN, Chekulayev VA, Ilmarinen K (2006) Hydrogen peroxide, superoxide, and hydroxyl radicals are involved in the phototoxic action of hematoporphyrin derivative against tumor cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 25: 51-77

Cole SP (1986) Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother Pharmacol* 17: 259-263

Cramers P, Ruevekamp M, Oppelaar H, Dalesio O, Baas P, Stewart FA (2003) Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy. *Br J Cancer* 88: 283-290

DaCosta RS, Andersson H, Cirocco M, Marcon NE, Wilson BC (2005) Autofluorescence characterisation of isolated whole crypts and primary cultured human epithelial cells from normal, hyperplastic, and adenomatous colonic mucosa. *J Clin Pathol* 58: 766-774

Dissemond J, Grabbe S (2006) Nichtoperative Therapie von Basalzellkarzinomen der Kopf-Hals-Region. *Laryngorhinootologie* 85: 133-141

Doss M, Philipp-Dormoston W. (1973) Regulatory link between lactate dehydrogenase and biosynthesis of porphyrin and heme in microorganisms. *Enzyme* 16: 28-41,

Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R, Weishaupt KR, Boyle DG (1975) Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J Natl Cancer Inst* 55: 115-121

Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A (1978) Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* 38: 2628-2635

Dougherty TJ (1986): Photosensitization of malignant tumors. *Semin Surg Oncol* 2: 24-37

Dougherty TJ (1987) Yearly review: Photosensitizers: Therapy and detection of malignant tumors. *Photochem Photobiol* 45: 879-889

Dougherty TJ (1993) Photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 58: 895-900

Dougerthy TJ., Gomer C, Henderson B, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J and Peng Q (1998)., Photodynamic Therapy. *J Natl Cancer Inst* 90: 889-905

Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, von Eggeling F, Müller-Richter U, Kosmehl H, Reichert TE (2007) Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *J Dtsch Dermatol Ges* 5: 1095-1100

Driemel O, Kunkel M, Reichert TE, Burkhardt A, Hemprich A, Howaldt HP, Kosmehl H, Mohr C, Reichart PA, Remmerbach T, Wolff KD (2008) Erkennung oraler Risikoläsionen in der zahnärztlichen Praxis. Deutsche Krebshilfe, S 1-57

Fickweiler S, Abels C, Karrer S, Bäumler W, Landthaler M, Hofstädter F, Szeimis R-M (1999) Photosensitization of human skin cell lines by ATMPn (9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -methoxyethyl)-porphycene) in vitro: mechanism of action. J. Photochem, Photobiol. B: Biol 48 27-35

Figge FHJ, Weiland GS, Manganiello LOJ (1948) Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. Proc Biol

Fijan S, Hönigsmann H, Ortel B (1995): Photodynamic Therapy of epithelial skin tumours using delta-aminolevulinic acid and desferrioxamine. Br J Dermatol 133: 282-288

Fingar VH (1996) Vascular effects of photodynamic therapy. J Clin Laser Med Surg 14: 323-328

Fink-Puches R, Hofer A, Smolle J, Kerl H, Wolf P (1997) Primary clinical response and long-term follow-up of solar keratoses treated with topically applied 5-aminolevulinic acid and irradiation by different wave bands of light. J Photochem Photobiol B 41: 145-151

Fink-Puches R, Soyer HP, Hofer A, Kerl H, Wolf P (1998) Long term follow up and histological changes of superficial nonmelanoma skin canaers treated with topical d-aminolevuinic acid photodynamic therapy. Arch Dermatol 134: 821-826

- Foote CS (1984) Mechanisms of photooxygenation. *Prog Clin Biol Res* 170: 3-18
- Franck B, Schneider U, Schröder D, Gulliya KS, Matthews JL (1994) In: Jung EG, Holick MF (eds) *Biologic Effects of Light*, de Gruyter, Berlin, New York, pp 289-302
- Franck B, Nonn A (1995) Neuartige Porphyrinoide für Chemie und Medizin durch biomimetische Synthesen. *Angew Chem* 107: 1941-1957
- Fritsch C, Goerz G, Ruzicka T (1998) Photodynamic therapy in dermatology. *Arch Dermatol* 134: 207-214
- Fritsch C. (2005) Biochemische Grundlagen , Photosensibilisatoren und Lichtquellen. *Akt Dermatol* 31: 198-201
- Gold MH (2007) Efficacy of Lasers and PDT for the Treatment of Acne Vulgaris. *Skin Therapy Lett* 12: 1-6
- Gollnick SO, Evans SS, Baumann H, Owczarczak B, Maier P, Vaughan L, Wang WC, Unger E, Henderson BW (2003) Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br J Cancer* 88: 1772-1779
- Gross SA, Wolfsen HC (2008) The use of photodynamic therapy for diseases of the esophagus. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 27: 5-21

Hausmann W (1911) Die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins. Biochem Z 30: 276-316

Henderson BW, Dougherty TJ (1992) How does photodynamic therapy work? Photochem Photobiol 55: 145-157

Hesse U (1996) Photodynamische Therapie mit Tetrapyrrolderivaten: Untersuchungen an HPD und Modellsensibilisatoren, Dissertation, Universität Paderborn

Hullmann M, Kunkel M, Reichert TE. Diagnostik und Therapie präkanzeröser Läsionen. MKG-Chir 2010; 1: 7- 15

Itoh Y, Ninomiya Y, Tajima S, Ishibashi A (2001). Photodynamic therapy of acne vulgaris with topical delta-aminolaevulinic acid and incoherent light in Japanese patients. Br. J. Dermatol. 144: 575-579.

Jacobs R, Ackerman NB, Bloom ND, Kim DD (1990) The acute effects of hematoporphyrin derivate photoradiation on tumor and liver capillary blood flow. Microcirc Endothelium Lymphatics 6: 343-354

Kennedy JC, Pottier RH (1992) Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B 14: 275-292

Kick G, Messer G, Plewig G (1996) Historische Entwicklung der Photodynamischen Therapie. Hautarzt 47: 644-649

Klein A, Babilas P, Karrer S, Landthaler M, Szeimies RM (2008) Photodynamic therapy in dermatology - an update 2008. J Dtsch Dermatol Ges 6: 839-846

Kloos WE, Lambe DW (1991) Staphylococcus. In: Balows A., Hausler WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds), Manual of clinical microbiology. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington DC, 1991, 28:222-237.

Kramer-Marek G, Serpa Carlos, Szurko Agniesszka, Widel Maria, Sochanik Aleksander, Snietura Mirosław, Kus Piotr, Nunes Rui M D, Arnaut Luis G, Ratuszna Alicja (2005) Spectroscopic properties and photodynamic effects of a new lipophilic porphyrin derivatives: Efficacy, localisation and cell death pathways. J. of Photochem and Photobiol 84: 1-14

Kübler AC (1999) Die Photodynamische Therapie in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Untersuchungen zur klinischen Einführung eines neuen, organerhaltenden Tumortherapieverfahrens. Med. Habilitationsschrift, Universität Heidelberg

Kvaal SI, Warloe T (2007) Photodynamic treatment of oral lesions. J Environ Pathol Toxicol Oncol 26: 127-133

Laetsch B, Beyeler M, Dummer R (2004) Epitheliale Neoplasien der Haut: Epidemiologie, Klinik, Therapie. Onkologie 3: 7-11

Landthaler M, Rück A, Szeimies RM (1993) Photodynamische Therapie von Tumoren der Haut. Hautarzt 44: 69-74

Leunig A, Rick K, Stepp H, Goetz A, Baumgartner R, Feyh J (1996) Photodynamische Diagnostik von Neoplasien der Mundhöhle nach lokaler Applikation von 5-Aminolävulinsäure. *Laryngorhinootologie* 75: 459-464

Leunig A, Betz SC, Mehlmann M, Stepp H, Arbogast S, Grevers G, Baumgartner R (2000) Detection of squamous cell carcinoma of the oral cavity by imaging 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence. *Laryngoscope* 110: 78-83

Leonhard J, Beck W (1971) Hematoporphyrin fluorescences: an aid in diagnosis of malignant neoplasms *Laryngoscope* 81: 365-372

Lin C-W, Shulok Janine R, Wong Yau-Kai, Schanbacher Carl F, Cincotta Louis, Foley James W (1991), Photosensitization, Uptake and Retention of Phenoxazine Nile Blue Derivates in Human Bladder Carcinoma Cells. *Cancer Research* 51: 1109-1116

Lin C-W, Shulok Janine R, Kirley Sandra D, Cincotta Louis, Foley James W (1991), Lysosomal Localization and Mechanism of uptake of Nile blue Photosensitizers in Tumor cells. *Cancer Research* 51: 2710-2719

Lui H, Anderson RR (1992) Photodynamic therapy in Dermatology. Shedding a different light on skin disease. *Arch Dermatol* 128: 1631-1636

Ma L, Moan J, Berg K (1994) Evaluation of a new Photosensitizer, meso-tetrahydroxyphenyl-chlorin, for use in photodynamic therapy: A comparison of its photobiological properties with those of two other photosensitizers. *Int J Cancer* 57: 883-888

MacDonald IJ, Dougherty TJ (2001) Basic principles of photodynamic therapy. *J Porphyrins Phthalocyanines* 5: 105-129

Magnusson B M, Anissimov Y G, Cross S E, Roberts M S (2004).Molecular Size as the main determinant of solute maximum flux across the skin. *J invest Dermatol* 122: 993-999

Maisch Tim (2007). “Singulett-Sauerstoff: Photodynamische Inaktivierung von Bakterien”. *BIOspektrum*; 13: S.2-4

Mashberg A, Samit A.(1995).Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous carcens. *CA Cancer J Clin* ; 45: 328-351

Meyer-Betz F (1913) Untersuchungen über die biologische Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffes. *Dtsch Arch Klin Med* 112: 476-503

Moan J (1990) On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *J Photochem Photobiol B* 6: 343-347

Moan J, Berg K (1991) The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *J Photochem Photobiol B* 53: 549-553

Maisch T, Bosl C, R-M Szeimis, Love B and Abels C (2007), Determination of the antibacterial efficacy of a new porphyrin-based photosensitizer against MRSA ex vivo *Photochem Photobiol* 6: 545-551

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63

Mroz P, Pawlak A, Satti M, Lee H, Wharton T, Gali H, Sarna T, Hamblin MR (2007) Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism. *Free Radic Biol Med* 43: 711-719

Nauta, JM, van Leengoed HL, Star WM, Roodenburg JL, Witjes MJ, Vermey A (1996) Photodynamic therapy of oral cancer. A Review of basic mechanisms and clinical applications. *Eur J Oral Sci* 104: 69-81

Nonell S, Gonzalez M, Trull FR (1993) 1H-Phenalen-1-one-2-sulfonic acid: an extremely efficient singlet molecular oxygen sensitizer for aqueous media. *AFINIDAD L* 448: 445-450

Ochsner M (1997) Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B* 39: 1-18

Ohkawa A, Miwa H, Namihisa A, Kobayashi O, Nakaniwa N, Ohkusa T, Ogihara T, Sato N (2004) Diagnostic performance of light-induced fluorescence endoscopy for gastric neoplasms. *Endoscopy* 36: 515-521

Okutsu T, Noda S, Tanaka S, Kawai A, Kinichi O, Hiratsuka H (2000) Nature of excited singlet and non-phosphorescent triplet states of perinaphthenone. *J Photochem Photobiol A Chem* 132: 37-41

Palumbo G (2007) Photodynamic therapy and cancer: a brief sightseeing tour. *Expert Opin Drug Deliv* 4: 131-148

Pass HI (1993) Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Nat Cancer Inst* 85: 443-456

Pauleikhoff D, Spital G (2005) Photodynamische Therapie bei der altersabhängigen Makuladegeneration. *Dtsch Arztebl* 102: 3186-3190

Pauleikhoff D, Bornfeld N, Gabel VP, Holz F, Roider H (2005) Konsenspapier der Retinologischen Gesellschaft, der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte - Stellungnahme zur aktuellen Therapie der neovaskulären AMD. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 222: 381-388

Photodermatology Group (2008) Guidelines for topical photodynamic therapy: update. *Br J Dermatol* 13 (Epub ahead of print)

Pinthus JH, Bogaards A, Weersink R, Wilson BC, Trachtenberg J (2006) Photodynamic therapy for urological malignancies: past to current approaches. *J Urol* 175: 1201-1207

Poh CF, Zhang L, Anderson DW, Durham JS, Williams PM, Priddy RW, Berean KW, Ng S, Tseng OL, MacAulay C, Rosin MP (2006) Fluorescence visualization detection of fields alterations in tumor margins of oral cancer patients. *Clin Cancer Res* 12: 6716-6722

Poh CF, Ng SP, Williams PM, Zhang L, Laronde DM, Lane P, MacAulay, Rosin MP (2007) Direct fluorescence visualization of clinically occult high-risk oral premalignant disease using a simple hand-held device. *Head Neck* 29: 71-76

Policard A (1924) Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la luminere de wood. *CR Soc Biol* 91: 1423-1424

Raab O (1900) Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Z Biol* 39: 524-546

Reed MW, Wieman TJ, Schuschke DA, Tseng MT, Miller FN (1989) A comparison of the effects of photodynamic therapy on normal and tumor blood vessels in the rat microcirculation. *Radiat Res* 119: 542-552

Rud E., Gederaas O., Hogset A., Berg K. (2000) 5-aminolevulinic-acid, but not 5-aminolevulinic acid esters, is transported into adenocarcinoma cells by system Beta transporters. *Photochem Photobiol* 71 (5):640-647

Schleier P, Zenk W, Dietel W.(2002) Fluoreszenz beim Mundhöhlenkarzinom. *HNO-Nachrichten* 5: 22-24

Schleier P, Zenk W, Dietel W (2002) Mundhöhlentumoren. Nicht alles was fluoresziert ist bösartig. *MMW Fortschr Med* 144: 26-28

Schleier P, Berndt A, Voth M, Herzau M, Koloß S, Zenk W, Dietel W, Gawellek M, Kosmehl H (2004) Möglichkeiten und Grenzen der Fluoreszenzdiagnostik und photodynamischen Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. *Dsch Zahnarztl Z* 59: 276-282

Schneckenburger H., Physikalische Grundlagen der Fluoreszenzdiagnostik und photodynamischen Therapie, Blackwell Verlag, Kapitel 1.1: S. 21- S.24,

Schwartz S, Absolon K, Vermund H (1955) Some relationships of porphyrins, x-rays and tumors. Med Bull 27: 7-13

Sharwani A, Jerjes W, Salih V, MacRobert AJ, El-Maaytah M, Khalil HS, Hopper C (2006) Fluorescence spectroscopy combined with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in detecting oral premalignancy. J Photochem Photobiol B 83: 27-33

Spikes JD (1985) The historical development of ideas on applications of photosensitised reactions in health sciences. In: Bergasson RV, Jori G, Land EJ, Truscott TG (eds) Primary Photoprocesses in Biology and Medicine. Plenum, New York, pp 209-227

Spikes DJ (1988) Photochemotherapy: Molecular and cellular processes involved. Advances in Photochemotherapy. Proc SPIE 997: 92-100

Stevens BR, Kaunitz JD, Wright EM (1984). Intestinal transport of aminoacid and sugars: advances using membrane vesicles. Annu Rev Physiol 46: 417- 433.

Steinbauer Julia Maria, Schreml Stephan, Babilas Philipp, Zeman Florian, Karrer Sigrid, Landthaler Michael, Szeimis Rolf-Markus (2009): Topical photodynamic therapy with porphyrin precursors –assessment of treatment-associated pain in a retrospective study. Photochemical and Photobiological Sciences 8: 1111-1116

Tappeiner von H, Jesionek A (1903) Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. Munch Med Wochenschr 47: 2042-2044

Thomas C. and Pardini RS (1992) Oxygen dependence of hypericininduced phototoxicity to EMT6 mouse mammary carcinoma cells, Photochem Photobiol, 55(6): 831-7

Tschen EH, Wong DS, Pariser DM, Dunlap FE, Houlihan A, Ferdon MB; Phase IV ALA-PDT Actinic Keratosis Study Group (2006) Photodynamic therapy using aminolaevulinic acid for patients with nonhyperkeratotic actinic keratoses of the face and scalp: phase IV multicentre clinical trial with 12-month follow up. Br J Dermatol 155: 1262-1269

Wester RC, Maibach HI (1989) In vivo animal models for percutaneous absorption. In: Bronaugh RL, Maibach HI (Hrsg). Percutaneous absorption. New York: Marcel Dekker Verlag, 221-228

Wilson BC (2002) Photodynamic therapy for cancer: principles. Can J Gastroenterol 16: 393-396

Wolf P, Rieger F, Kerl H (1993) Topical photodynamic therapy with endogenous porphyrins after application of 5-aminolevulinic acid: an alternative treatment modality for solar keratoses, superficial squamous cell carcinomas, and basal cell carcinomas? J Am Acad Dermatol 28: 17-21

Wolf P, Kerl H (1995) Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid: a promising concept for the treatment of cutaneous tumors. Dermatol 190: 183-185

Xiang W, Weingandt H, Liessmann F, Klein S, Stepp H, Baumgartner R, Hillemanns P (2001) Photodynamic effects induced by aminolevulinic acid esters on human cervical carcinoma cells in culture. *Photochem Photobiol* 74: 617-623

Zenk W, Dietel W, Schleier P, Günzel S (1999) Visualisierung von Karzinomen der Mundhöhle durch Stimulierung der Synthese von fluoreszierendem Protoporphyrin IX. *Mund Kiefer Gesichtschir* 3: 205-209

Zhong W, Urayama P Mycek MA (2003) Imaging fluorescence lifetime modulation of a ruthenium-based dye in living cells: the potential for oxygen sensing. *J Phys D Appl Phys* 36: 1689-1695

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Klinikums der Universität Regensburg erstellt. An dieser Stelle danke ich all jenen, die durch ihre Hilfe und Unterstützung das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht haben, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Michael Landthaler danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, sowohl die Experimente im Labor seiner Klinik und Poliklinik für Dermatologie durchführen zu lassen, als auch die Arbeit an der genannten Einrichtung einreichen zu können.

Herrn PD. Dr. rer. nat. Tim Maisch, Biologe der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Klinikums der Universität Regensburg, danke ich für die erfolgreiche, kompetente und motivierende Zusammenarbeit, seine vielfältige Unterstützung und die fruchtbaren Diskussionen. Seine Anregungen und Erfahrungen waren wesentlich für die Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Peter Prof., Direktor der Poliklinik für Kieferorthopädie des Klinikums der Universität Regensburg, danke ich für die Durchsicht der Arbeit, die konstruktiven Korrekturvorschläge und Anregungen sowie die Übernahme des Koreferates.

Frau Petra Unger, Chemielaborantin der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Klinikums der Universität Regensburg, danke ich für die technische Assistenz und Hilfe bei der Erstellung der Diagramme. Sie stand mir mit ihrer langjährigen Erfahrung immer zur Seite.

Meinem Mann Oliver und meinem Sohn Julius danke ich für ihr großes Verständnis und ihre beständige, motivierende Unterstützung.

Nicht zuletzt gilt mein ausdrücklicher Dank auch meinen lieben Eltern, die mich während meines Studiums und dem Verfassen dieser Arbeit stets mit liebevoller Aufmerksamkeit begleitet und unterstützt haben und in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.

