

# **Untersuchungen für die Anwendung von aromatischen Endoperoxiden in Liposomen und Polymeren zur Tumorthherapie**



## **Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen Fakultät II-Physik der  
Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Franz-Peter Kalz**  
aus Stadlern

Juli 2006

Promotionsgesuch eingereicht am: 05.07.2006

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Max Maier

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Ingo Morgenstern
1. Gutachter:	Prof. Dr. Max Maier
2. Gutachter:	Prof. Dr. Elmar Lang
weiterer Prüfer:	Prof. Dr. Christoph Strunk

Promotionskolloquium am: 25.09.2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Singulett-Sauerstoff</b> .....	<b>4</b>
2.1 Erzeugung von Singulett-Sauerstoff.....	6
<b>3 Aromatische Endoperoxide</b> .....	<b>10</b>
3.1 Endoperoxidbildung durch Photosensibilisierung mit einem Sensibilisator .....	12
3.2 Endoperoxidbildung durch Autoperoxidation.....	13
3.3 Die Reduktionseffizienz $\eta$ .....	16
3.4 Thermolyse von Endoperoxiden .....	18
3.5 Abgrenzung zur Photodynamischen Therapie (PDT) .....	19
<b>4 Liposomen</b> .....	<b>24</b>
4.1 Liposomenarten.....	24
4.2 Eigenschaften der Liposomen .....	27
4.2.1 Lipiddiffusion.....	27
4.2.2 Phasenübergang von Lipiden .....	27
4.3 Wechselwirkungen der Liposomen mit Zellen.....	31
4.4 Liposomen in der Pharmazie.....	33
4.5 Präparation von Liposomen.....	35
<b>5 Verwendete Substanzen</b> .....	<b>39</b>
5.1 Perylen-Diimid.....	39
5.2 Singulett-Sauerstoff Speichermoleküle: Naphthalin-Derivate .....	39
5.3 Photosensibilisator: Protoporphyrin IX-Dimethylester.....	40
5.4 Liposomenmaterial.....	41
5.5 Polyvinylbutyral (PVB) .....	41
<b>6 Präparation und Durchführung</b> .....	<b>43</b>
6.1 Grundlagen der Fluoreszenzmessungen .....	43
6.1.1 Fluoreszenzmessungen am Monochromator .....	45
6.1.2 Fluoreszenzmessungen am Fluoreszenzspektrometer.....	45
6.2 Liposomenpräparationen .....	46
6.2.1 Liposomenherstellung durch Ultraschallbadbehandlung .....	46
6.2.2 Liposomenherstellung durch Extrusion .....	47
6.3 Präparation der Polymere .....	50
6.4 Messaufbau.....	51
6.5 Durchführung der Messungen.....	53

6.6 Zellversuche .....	55
6.6.1 Aufbau der Zelle.....	55
6.6.2 Durchführung der Zellversuche.....	57
6.6.3 Kristallviolett-Test .....	59
<b>7 Messergebnisse .....</b>	<b>63</b>
7.1 Bildung von Endoperoxiden aus 1,4-Dimethylnaphthalin in Liposomen.....	63
7.2 Bildung von 1,4,5-Trimethylnaphthalin-Endoperoxiden in Liposomen.....	68
7.3 Zytotoxische Wirkung von 1,4,5-Trimethylnaphthalin-Endoperoxiden an Mammakarzinomzellen.....	70
7.4 Fluoreszenzreduktion von Perylen-Diimid in Liposomen.....	72
7.5 Zytostatische bzw. cytocide Wirkung von laserbestrahlten Perylen-diimid dotierten Liposomen an Tumorzellen .....	74
7.5.1 Darstellung der Wachstumskurven an Mammakarzinomzellen.....	74
7.5.2 Darstellung der Wachstumskurven an Kolonkarzinomzellen.....	77
7.6 Kolokalisation der Perylen-diimid dotierten Liposomen an Mammakarzinomzellen mit Hilfe des Konfokalmikroskops.....	79
7.7 Erhöhung der Stabilität von 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxiden durch Einbau in das Polymer Polyvinylbutyral .....	83
7.8 Reduktionseffizienz von 1,4-Dimethylnaphthalin in PVB bei unterschiedlichem Ethanolgehalt .....	86
<b>8 Diskussion und Ausblick.....</b>	<b>88</b>
8.1 Effekt an Tumorzellen von laser-bestrahlten Liposomen dotiert mit aromatischen Molekülen .....	88
8.2 Barrierenerhöhung von 1,4-Dimethylnaphthalin Endoperoxiden in PVB im Vergleich zu Lösung .....	89
8.3 Reduktionseffizienz des Systems 1,4-Dimethyl-naphthalin/PPIX-DME in PVB bzw. Liposomen .....	92
8.4 Reduktionseffizienz des Perylendiimids in Liposomen.....	95
<b>9 Zusammenfassung.....</b>	<b>99</b>
Anhang: Betrachtung zur Erklärung der unterschiedlichen Reduktionseffizienzen durch Diffusion von $^1O_2$ .....	102
Literaturverzeichnis .....	105

# 1 Einleitung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden grundlegende Versuche für ein mögliches neuartiges Verfahren der Tumorthherapie, unter Nutzung von elektronisch angeregtem Sauerstoff (Singulett-Sauerstoff) und dessen Wirkung an Tumorzellen durchgeführt. Die verzögerte Freisetzung des Singulett-Sauerstoffes ( $^1\text{O}_2$ ) erfolgt dabei durch einen thermisch aktivierten Zerfall von aromatischen Endoperoxiden, die in einem pharmazeutischen Träger, (engl.:Carrier) z.B. Liposomen oder Polymere, eingebaut sind. Hierbei sollte auch die Möglichkeit einer Vergrößerung der Stabilität der Endoperoxide durch den Einbau untersucht werden. Die Synthese der aromatischen Endoperoxide kann durch ein Absinken der Fluoreszenzintensität des ursprünglichen Aromaten detektiert werden, da sich über einen Benzolring des Aromaten eine Sauerstoffbrücke ausbildet und sich deshalb die elektronische Anregungsenergie stark verschiebt. Die Bildung der Endoperoxide sollte sowohl mit Hilfe eines Photosensibilisators (Sensitizers) erfolgen als auch durch Autoperoxidation, d.h. dass ein bestimmtes aromatisches Molekül (z.B. ein Farbstoffmolekül) einerseits als Sensitizer wirkt und andererseits mit dem erzeugten Singulett-Sauerstoff selbst unter Bildung eines Endoperoxides reagieren kann (engl.:self sensitized peroxidation).

Diese Autoperoxidation von Farbstoffmolekülen, eingebaut in organischen Matrizen, z.B. Langmuir-Blodgett-Filmen (künstlichen monomolekularen Schichtsystemen, die als Modellsysteme für biologische Membranen dienen) wurde zunächst als Nebeneffekt bei Untersuchungen für die laserspektroskopische Methode des stabilen Lochbrennens [1,2] gefunden. Bei diesen Untersuchungen im Rahmen der Präparation von Farbstoff-Matrix-Systemen, die für die Methode geeignet sind, wurde eine deutliche Verminderung der Fluoreszenzintensität im Laufe der Laserbestrahlung beobachtet, wobei nach Erwärmung wieder eine Zunahme der Fluoreszenzintensität erhalten werden konnte (Fluoreszenzrücksetzung). Diese thermisch induzierte Fluoreszenzzunahme konnte in einem Verfahren der Thermographie mit Gedächtnisfunktion [3] eingesetzt werden, um in einem bildgebenden Verfahren, die während einer thermischen Belastung vorhandene Temperaturverteilung nachträglich zu bestimmen. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität (Fluoreszenzreduktion) konnte durch die laserinduzierte Bildung von aromatischen Endoperoxiden aus dem Farbstoffmolekül Perylen durch Autoperoxidation d.h. eine photoinduzierte Oxidation mit ein und dem selben aromatischen Molekül erklärt werden.

Die zusätzlich zur Autoperoxidation durchgeführten Untersuchungen zur Verwendung eines Photosensibilisators, der durch Laseranregung  $^1\text{O}_2$  generiert, welcher dann von speziellen aromatischer Molekülen eingefangen wird und dadurch ebenfalls ein Endoperoxid entsteht, sind sowohl für die Grundlagen als auch für die mögliche Anwendung des Verfahrens von Bedeutung. Bezüglich der Grundlagen ergab sich die Möglichkeit gezielt bestimmte aromatische Moleküle (insbesondere Naphthalinderivate) auszuwählen, für welche die

Bildung der Endoperoxide und vor allem der Zerfall mit Erzeugung von Singulett-Sauerstoff in der Literatur [4,54,67] genau untersucht ist. Bezüglich des möglichen Einsatzes in der Medizin ist es wichtig, dass damit die Verwendung einer größeren Zahl von verschiedenen aromatischen Molekülen möglich ist, für die entweder bereits eine Zulassung (z.B. für andere Anwendungen) vorliegt, oder die für andere Zwecke z.B. als Lebensmittelzusatz, zugelassen sind.

In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Synthese der Endoperoxide laserinduziert, wobei durch die Fluoreszenzreduktion der zu Grunde liegenden aromatischen Moleküle quantitativ auf die Endoperoxidbildung geschlossen werden kann. Nach Turro [4] zerfallen Endoperoxide aus speziellen Anthracen bzw. Naphthalin-Derivaten durch einen thermisch aktivierten Prozess wieder in  $^1\text{O}_2$  und das zugrunde liegende aromatische Molekül. Deshalb wurden solche Moleküle in der vorliegenden Arbeit ausgewählt. Aufgrund der Tatsache, dass zur Bildung von Endoperoxiden  $^1\text{O}_2$  benötigt wird, dieser aber durch Erwärmung wieder freigesetzt wird, kann man Endoperoxide auch als  $^1\text{O}_2$ -Speicher betrachten [5]. In dieser vorliegenden Arbeit macht man sich das Prinzip der  $^1\text{O}_2$ -Speicherung zu Nutze, indem man Endoperoxide verwendet, deren Zerfallszeit bei Körpertemperatur (37°C) geeignet ist, um mit dem freigesetzten  $^1\text{O}_2$  Tumorzellen zu schädigen.

In der Photodynamischen Therapie (PDT) wird  $^1\text{O}_2$  bereits erfolgreich angewandt, dabei wird der erforderliche  $^1\text{O}_2$  unmittelbar im erkrankten Gewebe – nach vorausgegangener, selektiver Anreicherung spezieller lichtabsorbierender Stoffe (Sensibilisatoren) – durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge erzeugt. Aufgrund dieses Zusammenspiels von Sensibilisator und Bestrahlung durch (Laser-) Licht ist die PDT in ihrem Anwendungsbereich eingeschränkt, wozu vor allem die Wellenlängenabhängigkeit der Eindringtiefe im Gewebe beiträgt.

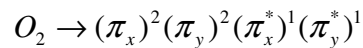
Das hier in dieser Arbeit beschriebene Verfahren beruht ebenfalls auf der Wirkung von  $^1\text{O}_2$ , allerdings durch den thermisch induzierten Zerfall von Endoperoxiden eingebaut in pharmazeutische Träger (engl: carrier). Dazu sollen die aromatischen Ausgangsmoleküle in die Liposomenmembran mit einer bereits etablierten Liposomenpräparation (Extrusionstechnik) eingebaut werden, und durch anschließende Laserbestrahlung in Endoperoxide umgewandelt werden. Ihre toxische Wirkung an Tumorzellen wird dabei überprüft, wobei dabei sowohl der Prozess der Endoperoxidbildung als auch der Zerfall der Endoperoxide über Fluoreszenzuntersuchungen kontrolliert werden soll. Ziel ist es auch mit Hilfe des Konfokalmikroskopes die subzelluläre Lokalisation der Liposomen durchzuführen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Pharmazie ist der Einsatz von Polymeren, wobei spezielle Polymerimplantate [6] bereits für die Behandlung von Hirntumoren eingesetzt werden. In diesem Zusammenhang werden Zytostatika verzögert bis hin zu Monaten freigesetzt. Aus diesem Grund soll für Modellbetrachtungen die Zerfallszeit von

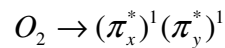
Endoperoxiden aus 1,4-Dimethylnaphthalin im amorphen Polymer Polyvinylbutyral (PVB) untersucht werden, wobei zu bemerken ist, dass PVB als Modellsubstanz ausgewählt wurde, weil es für optische Untersuchungen besonders gut geeignet ist [1], insbesondere wegen seiner amorphen Struktur. Hierbei soll eine Erhöhung der Stabilität der Endoperoxide erzielt werden, die durch eine Erhöhung der Barriere eines asymmetrischen Doppelmuldenpotentials für den Zerfallsprozess der Endoperoxide erklärt werden kann. Variationen der Barrierenhöhe haben direkten Einfluss auf die Zerfallszeit der Endoperoxide und somit die Freisetzungzeit von  $^1\text{O}_2$ . Der Nachweis der Endoperoxidbildung des Naphthalin-Derivates erfolgte durch dessen Fluoreszenzreduktion. Über den zeitlichen Abfall der Fluoreszenzintensität des Naphthalin-Derivates kann somit auf die Effizienz der Endoperoxidbildung geschlossen werden. Am Beispiel von 1,4-Dimethylnaphthalin als Speichermolekül für  $^1\text{O}_2$  soll die Effizienz der Endoperoxidbildung (Reduktionseffizienz) in Polymeren bzw. Liposomen gegenübergestellt werden.

## 2 Singulett-Sauerstoff

Bei Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) handelt es sich um Sauerstoff im ersten elektronisch angeregten Zustand. Dabei muss der „normale“ Sauerstoff im Triplett-Zustand ( $^3\Sigma$ ) auch  $^3\text{O}_2$  geschrieben in den ersten angeregten Singulett-Zustand ( $^1\Delta$ ) angehoben werden. Der Triplett-Sauerstoff liegt in folgender Elektronenkonfiguration vor, wenn man Elektronen aus den unteren Schalen nicht berücksichtigt:



Berücksichtigt man nur die Elektronen mit der höchsten Energie dann kann man wie folgt schreiben [7]



Die schematische Beschreibung der  $\pi_x^*$  und  $\pi_y^*$  Orbitale des Sauerstoff-Moleküls wird in Abbildung 2.1 demonstriert. Da die  $\pi_x^*$  und  $\pi_y^*$  Orbitale entartet sind und der Grundzustand von Sauerstoff zwei Elektronen zur Besetzung dieser Orbitale hat, kann dies nach der Hundschen Regel nur der Grundzustand des molekularen Sauerstoffs sein, d.h. für diese entartete Elektronenkonfiguration liegt der Zustand für die höchste Multiplizität am niedrigsten [7].

Betrachtet man die Besetzung der Orbitale der  $(\pi_x^*)(\pi_y^*)$ -Paare und die entsprechenden Spin-Zustände (parallelem Spin), dann resultieren daraus vier mögliche Orbitalbesetzungen [8], dem Triplett-Zustand (dem Zustand mit der niedrigsten Energie) und drei Singulett-Zustände.



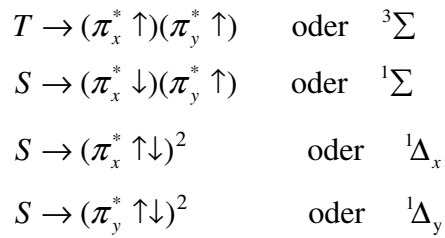


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der möglichen Elektronenverteilung und Zustände für das Sauerstoffmolekül nach [7].

Diesen vier Zuständen werden die spektroskopischen Notationen  ${}^3\Sigma$ ,  ${}^1\Sigma$ ,  ${}^1\Delta_x$ , bzw.  ${}^1\Delta_y$  gegeben. Die Besetzung der Elektronenorbitale dieser vier Zustände wird rechts in der Abbildung 2.2 gezeigt. Die beiden  $\Sigma$ -Zustände besitzen eine Elektronenverteilung, die zylindersymmetrisch zu der Bindungsachse des Sauerstoffes ist. Beim  $\Delta$ -Zustand werden zwei  $\pi^*$ -Elektronen in eine der beiden senkrecht zueinanderstehenden  $p$ -Orbitale verteilt [7].

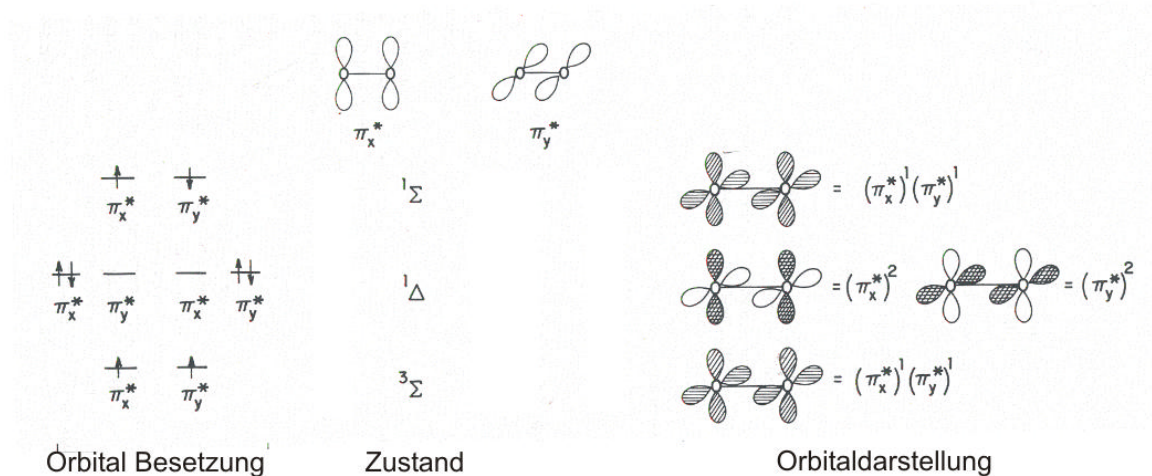


Abbildung 2.2: Qualitative Beschreibung der drei niedrigst liegenden Orbitalkonfigurationen und Zustände von Molekularen Sauerstoff (nach [7]).

Zwischen den entarteten Zuständen  ${}^1\Delta_x$  bzw.  ${}^1\Delta_y$  (mit antiparallelem Spin) wird in der Regel nicht unterschieden und daher wird der erste angeregte Zustand von Sauerstoff kurz mit  ${}^1\Delta$  bezeichnet. Bei diesem niedrigsten, elektronisch angeregten Zustand auch kurz mit  ${}^1\Delta_g$  oder  ${}^1\text{O}_2$  bezeichnet, beträgt die Energiedifferenz zum Grundzustand 94 kJ/mol bzw. 0,977 eV [9]. Bei dem zweiten elektronisch angeregten Singulett-Zustand des Sauerstoffmoleküls auch kurz mit  ${}^1\Sigma_g^+$  bezeichnet, sind die beiden antiparallelen Spins nicht gekoppelt und die Energiedifferenz zum Grundzustand beträgt 156,9 kJ/mol bzw. 1,627 eV. Die Deaktivierung

der beiden elektronisch angeregten Singulett-Zustände  $^1\Delta_g$  bzw.  $^1\Sigma_g^+$  kann durch schwache Emission bei  $\lambda=1269$  nm bzw.  $\lambda=762$  nm beobachtet werden [9]. Abbildung 1.3 soll noch einmal die einzelnen Energieniveaus von molekularem Sauerstoff verdeutlichen.

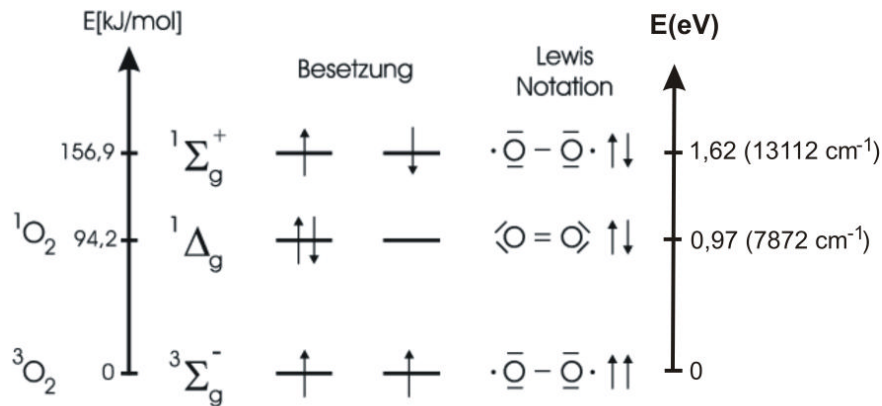


Abbildung 2.3: Vereinfachte Darstellung der Elektronenzustände des Sauerstoffs sowie Angabe der Energieniveaus von molekularem Sauerstoff mit Angabe der Lewis Notation (nach [9]). Zusätzlich sind die Energieniveaus in Elektronenvolt bzw. Wellenzahlen angegeben.

## 2.1 Erzeugung von Singulett-Sauerstoff

Mehrere Methoden zur Erzeugung von  $^1O_2$  wurden bereits entwickelt. Sowohl thermische als auch photochemische Methoden wurden untersucht. Die gängigste Form Singulett-Sauerstoff zu erzeugen erfolgt über die Anregung von Photosensibilisatoren die im Englischen auch Sensitizer genannt werden. Dabei wird ein Photosensibilisator durch Absorption von Licht in den angeregten Zustand überführt, bei dem es sich in der Regel um den  $S_1$ -Zustand handelt. Dieser Zustand ist aufgrund des Frank-Condon-Prinzips zusätzlich schwingungsangeregt und durch die sehr effektiven Relaxationsmechanismen der internen Konversion (Internal Conversion, IC) sehr kurzlebig. Typische Lebensdauern liegen im Piko- und Nanosekundenbereich [10], deshalb ist die Wahrscheinlichkeit, in diesem Zustand mit anderen Molekülen zu interagieren, sehr gering [11]. Durch sogenannte Interkombination (Intersystem Crossing, ISC), ist zunächst die Relaxation in einen Triplett-Zustand möglich (siehe Abbildung 2.4). Dieser  $T_1$ -Zustand besitzt wegen des Frank-Condon-Prinzips wiederum eine Schwingungsanregung mit Lebensdauern von etwa  $10^{-11}$  bis  $10^{-14}$  s [10]. Diese Schwingungsenergie wird wiederum durch den strahlungslosen Prozess der internen Konversion (IC) schnell abgegeben. Der  $T_1$ -Zustand kann dann durch ISC oder durch Abgabe von Phosphoreszenzlicht in den  $S_0$ -Zustand übergehen (siehe Abbildung 2.4).

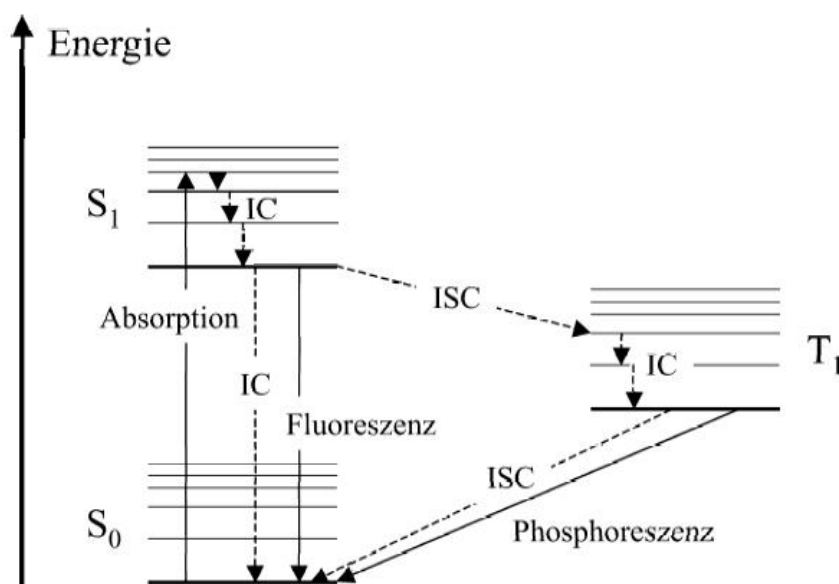
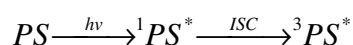


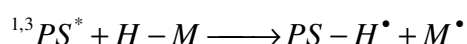
Abbildung 2.4: Jablonski-Diagramm für die Anregung und die möglichen Relaxationswege eines Photosensibilisators [11]. Dabei kennzeichnet der Übergang von  $S_0$  nach  $S_1$  die Absorption des Photosensibilisators. Die Schwingungsniveaus werden durch dünne Linien gekennzeichnet. Die möglichen Übergänge der internen Konversion, sowie der Interkombination werden durch die gestrichelten Pfeile angedeutet. Der direkte Übergang mit Emission eines Photons von  $S_1$  nach  $S_0$  sowie von  $T_1$  nach  $S_0$  ist durch durchgezogene Pfeile gekennzeichnet.

Entscheidend für die Erzeugungswahrscheinlichkeit von  $^1\text{O}_2$  ist die Lebensdauer des Triplett-Zustandes des Photosensibilisators, wobei neben der Möglichkeit  $^1\text{O}_2$  zu erzeugen im allgemeinen folgende Typen von Reaktionen des Photosensibilisators im  $T_1$ -Zustand ablaufen können. Die drei verschiedenen möglichen photosensibilisierenden Oxidationen werden meist in Typ I, Typ II und Typ III-Reaktionen eingeteilt. Zunächst ist die Erzeugung von angeregten Zuständen des Photosensibilisators natürlich der erste Schritt [9]:



#### Typ I-Reaktionen (Radikal- oder Radikationen-Bildung):

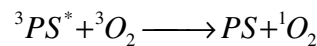
Durch H-Abstraktion (H steht für Wasserstoff) entstehen reaktive Radikale (M steht für Molekülrest), die mit Triplett-Sauerstoff weiter reagieren:



Weiterreaktion erfolgt mit  $^3\text{O}_2$ , führt zu Peroxiden etc. [9]. Wobei  $^{1,3}\text{PS}^*$  bedeutet, dass der Photosensitizer im Triplett  $^3\text{PS}^*$  oder Singulett-Zustand  $^1\text{PS}^*$  vorliegt.

## Typ II-Reaktionen (Energietransfer):

Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), gebildet durch spin-erlaubten Triplett-Triplett-Energietransfer, ist die reaktive Zwischenverbindung bei Typ II-Reaktionen zur Oxidation anderer Verbindungen. Vereinfacht dargestellt ergibt sich der Energietransfer wie folgt:



Bei diesem Prozess handelt es sich um einen nicht strahlenden Transfer von elektronischer Energie entweder durch den kurzreichweitigen Prozess des Austauschs desjenigen Elektrons welches die Anregung trägt, gegen ein solches, welches keine Anregung trägt (Dexter-Prozess [12]), oder durch die langreichweitige Dipol-Dipol Wechselwirkung (Förster-Prozess[13,14]) [10]. Auf die beiden eben erwähnten Prozesse wird hier nicht näher eingegangen. Abbildung 2.5 soll den spinerlaubten Triplett-Triplett-Energietransfer über das Orbitalmodell verdeutlichen. Es wird die mögliche Anregung vom Triplett-Sauerstoff ( $^3\Sigma_g^-$ ) in den  $^1\Delta_g$  bzw.  $^1\Sigma_g^+$ -Zustand anschaulich dargestellt.

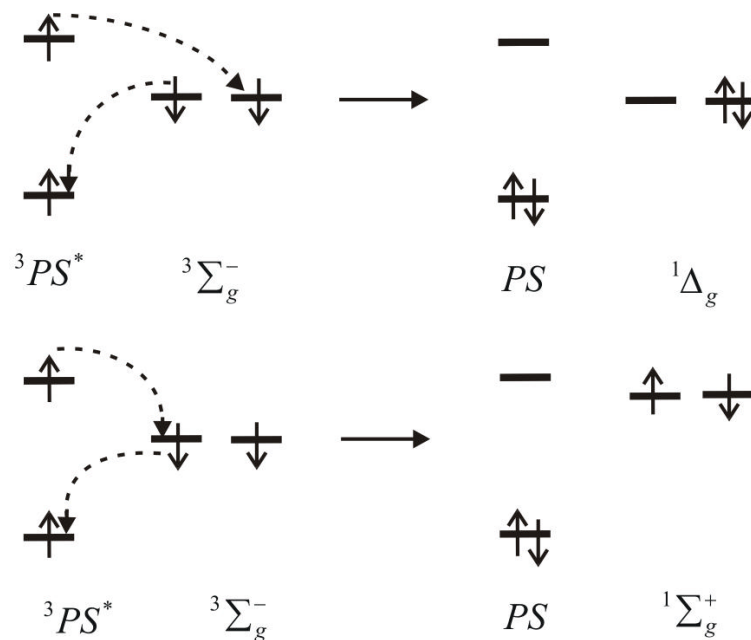
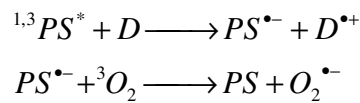


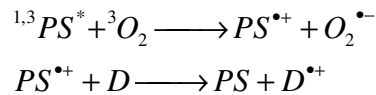
Abbildung 2.5: Molekülorbital-Darstellung zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff mit Hilfe eines Sensitizers im Triplett-Zustand und entsprechendem Elektronentransfer (nach [7]).

### Typ III-Reaktionen (Elektronentransfer):

Weitere Reaktionen des Photosensitizers werden als Typ III-Reaktionen bezeichnet, wobei Typ I und Typ III auch zusammengefasst als Typ I-Reaktionen bezeichnet werden. Die weiteren Reaktionen des Photosensitizers im angeregten  $S_I$ -Zustand oder  $T_I$ -Zustand ( $^{1,3}PS^*$ ) können dann Radikalreaktionen sein. Dabei wird einem beliebig gewählten Donatormolekül (D) ein Elektron entzogen, das dadurch selbst positiv geladen ist, wobei der Photosensitizer dabei ein negativ geladenes Radikal bildet. Das dabei erhaltene  $PS^{\bullet-}$  reagiert mit  $^3O_2$  zu  $O_2^{\bullet-}$  [9].



Auch der photoinduzierte Elektronentransfer vom  $^{1,3}PS^*$  auf  $^3O_2$  unter Bildung eines sogenannten Superoxid-Anions und Regeneration des Photosensibilisators durch einen Donor wird zu den Typ III-Reaktionen gerechnet [9]:



### 3 Aromatische Endoperoxide

Das Wort Endoperoxid scheint von G.O. Schenk in den späten 40 ern des letzten Jahrhunderts geprägt worden zu sein, wobei das Wort „endo“ aus dem Griechischen stammt und bedeutet „innerhalb“. D.h. innerhalb eines Benzolringes von z.B. Anthracen-Derivaten bildet sich eine Peroxidkette aus. Abbildung 3.1 zeigt das Endoperoxid von Dinatrium Anthracen-9,10-diyl-diethyl Disulfat ( $\text{EASO}_2$ ), das durch den Einfang von Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) mit dem ursprünglichen Aromaten (EAS) gebildet wird.

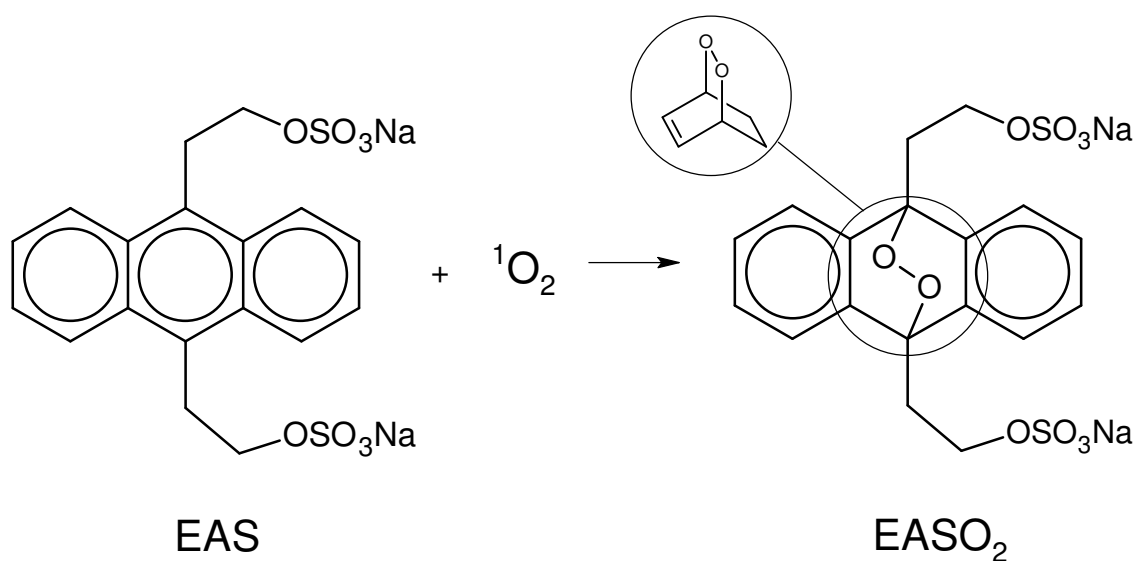


Abbildung 3.1: Bildung von Endoperoxiden aus Dinatrium Anthracen-9,10-diyl-diethyl Disulfat ( $\text{EASO}_2$ ) [15], das durch den Einfang von Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) mit dem zugrunde liegenden Aromaten (EAS) gebildet wird. Die Abbildung zeigt auch die stereometrische Darstellung der Peroxidkette über den Benzolring des Aromaten.

Bei dieser Art der Endoperoxide bildet sich eine Peroxidkette über den Positionen 1 und 4 oberhalb des Benzolringes aus, wobei dadurch ein bicyclischer Ring entsteht wie in Abbildung 3.1. Ebenso können Endoperoxide entstehen, indem konjugierte Alkene mit Sauerstoff zu einem heterocyclischen Ring reagieren (siehe Abbildung 3.2) .

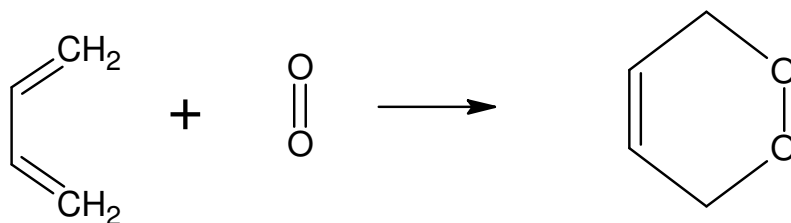


Abbildung 3.2: Reaktion eines Alkadiens mit Sauerstoff zu einem Endoperoxid.

Diesen beiden oben genannten Reaktionen liegt allgemein eine sogenannte Diels Alder-Reaktion zugrunde, bei der ein konjugiertes Dien mit einem Alken zu einem Cyclohexen-Derivat reagiert [16]. Die Diels-Alder Reaktion läuft allgemein in einem Schritt ab. Beide neuen Kohlenstoff-Kohlenstoff  $\sigma$ -Bindungen und die neue  $\pi$ -Bindung werden simultan mit dem Brechen der drei  $\pi$ -Bindungen in den Edukten gebildet (siehe Abbildung 3.3) [17].

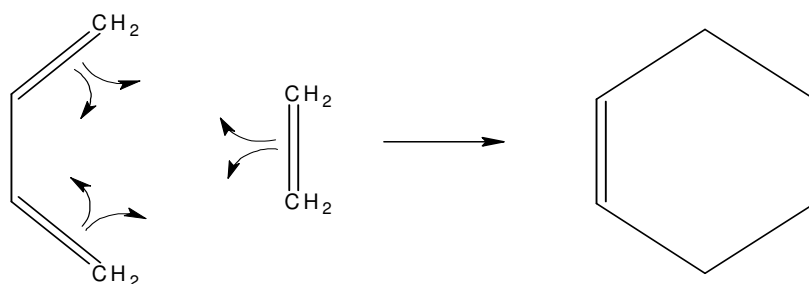


Abbildung 3.3: Diels-Alder Reaktion allgemein nach [17]. Die Abbildung zeigt die Reaktion eines konjugierten Diens mit einem Alken (Ethen).

Ebenso können Endoperoxide durch eine sogenannte [4+2]-Cycloaddition synthetisiert werden, bei der eine Einheit aus vier konjugierten Atomen zu vier  $\pi$ -Elektronen mit einer Doppelbindung zu zwei Elektronen reagieren, also z.B. wie in Abbildung 3.1 oder Abbildung 3.2. Im Rahmen dieser Arbeit werden nur Endoperoxide mit bicyclischen Ringen untersucht, also von der Art, wie sie in Abbildung 3.1 vorliegen. In der Molekülorbital-Darstellung wird die Bindungsbildung klar durch die Überlappung der  $p$ -Orbitale des Dienophils (Alkens) mit den terminalen  $p$ -Orbitalen des Diens hervorgerufen. Auf diese Weise unterliegen alle vier Atome einer Umhybridisierung nach  $sp^3$ . Die beiden internen  $p$ -Orbitale des Diens bleiben übrig und bilden die neue  $\pi$ -Bindung (siehe Abbildung 3.4) [17].

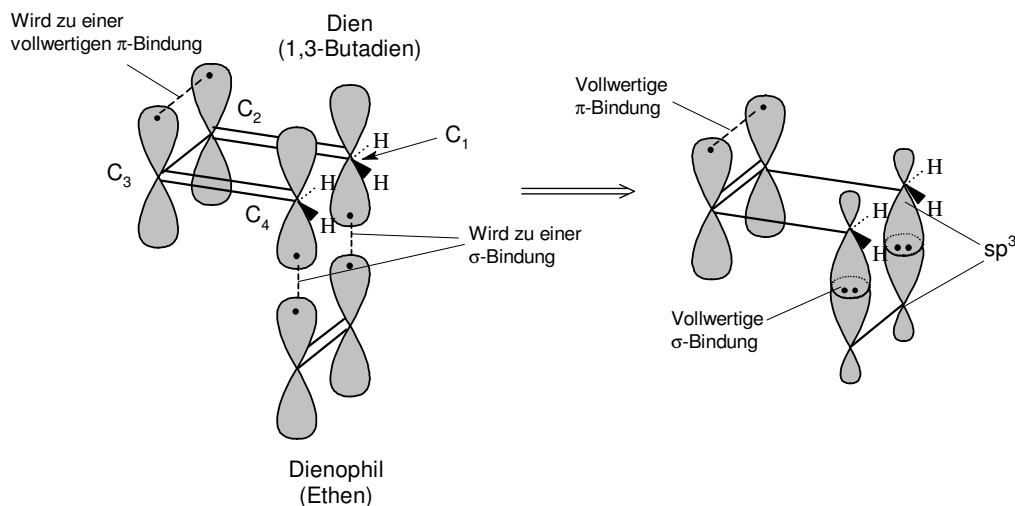


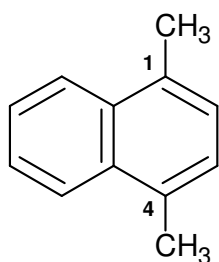
Abbildung 3.4: Diels-Alder-Reaktion von 1,3-Butadien mit Ethen in Orbitaldarstellung. Die beiden  $p$ -Orbitale an den Kohlenstoffatomen C-1 und C-4 des 1,3-Butadiens, und die beiden  $p$ -Orbitale des Ethens gehen eine Wechselwirkung ein. Dabei erfolgt an diesen Kohlenstoffatomen eine Rehybridisierung nach  $sp^3$ , was eine maximale Überlappung der an den gebildeten Einfachbindungen beteiligten Orbitale ermöglicht. Gleichzeitig erfolgt eine Überlappung der  $p$ -Orbitale von C-2 und C-3 des Diens unter Ausbildung einer  $\pi$ -Bindung [17].

### 3.1 Endoperoxidbildung durch Photosensibilisierung mit einem Sensibilisator

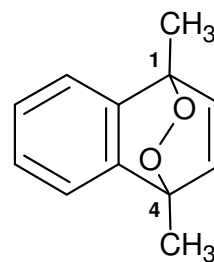
Wird Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) mit einem Photosensibilisator (Sensitizer) erzeugt, so kann er wie oben bereits beschrieben mit aromatischen Verbindungen Endoperoxide bilden. Nach Turro [4] entstehen bei der Reaktion von Naphthalin- oder Anthracenderivaten mit Singulett-Sauerstoff Endoperoxide. Diese Reaktion ist durch einen thermisch aktivierten Prozess wieder reversibel, d.h. dass die Endoperoxide bei Erwärmung wieder in das zu Grunde liegende aromatische Molekül und Singulett-Sauerstoff zerfallen, wobei die Zerfallszeiten von unterschiedlichen Endoperoxiden bei einer bestimmten Temperatur in der Regel unterschiedlich sind.



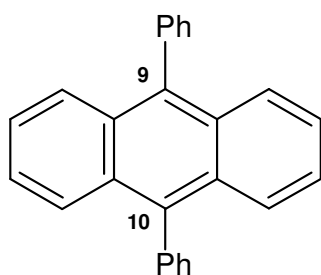
9,10-Diphenyl-Anthracen bildet bei Vorhandensein von  $^1\text{O}_2$  sehr effizient sogenannte 9,10-Diphenyl-Anthracen-Endoperoxide. Dies bedeutet, dass an den Positionen 9 und 10 des Anthracen-Derivats eine Peroxidkette gebildet wird. Ebenso können Naphthalinderivate mit  $^1\text{O}_2$  entsprechende Endoperoxide bilden. Es ist zu beachten, dass sich dabei die Peroxidkette an den Kohlenstoffatomen der jeweils gegenüberliegenden Stellen des Benzolringes ausbildet (siehe Abbildung 3.5), wo in der Regel zusätzliche Substituenten vorhanden sind (z.B. eine Methylgruppe  $\text{CH}_3$ ). Man spricht bei dieser Art des Einfangs von  $^1\text{O}_2$  über benzocyclische Verbindungen auch von einem „Trapping“-Prozess [18] (engl: trap=Einfang), wodurch mit Hilfe der aromatischen Moleküle Singulett-Sauerstoff „gespeichert“ wird.



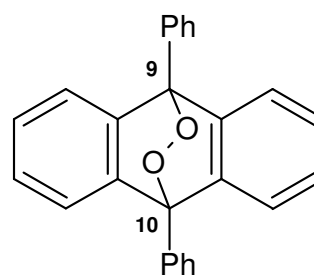
1,4-Dimethylnaphthalin



1,4-Dimethylnaphthalin  
Endoperoxid



9,10-Diphenyl-Anthracen



9,10-Diphenyl-Anthracen  
Endoperoxid

Abbildung 3.5: Naphthalin bzw. Anthracen-Derivate und ihre entsprechenden Endoperoxide mit der Angabe der Kohlenstoffpositionen (Ph steht für Phenyl).

## 3.2 Endoperoxidbildung durch Autoperoxidation

Die Erzeugung von Endoperoxiden kann allerdings nicht nur wie oben beschrieben, durch den Einfang von  $^1\text{O}_2$  durch die Generierung mit Hilfe eines Sensitziers geschehen. Endoperoxide können auch über sogenannte Autoperoxidation, d.h. durch Erzeugung und Einfang von Singulett-Sauerstoff mit ein und dem selben aromatischen Molekül gebildet werden.

Dabei wird das aromatische Molekül mit Licht geeigneter Wellenlänge vom elektronischen Grundzustand  $S_0$  in den elektronisch angeregten  $S_1$ -Zustand bzw. einen darüber liegenden Schwingungszustand gebracht und relaxiert dann durch innere Konversion (IC) und Stöße mit der Umgebung schnell (innerhalb von  $10^{-12}$ s) in den ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustand  $S_1$  [9]. Erfolgt dann der Übergang vom angeregten  $S_1$ -Zustand, in den Grundzustand  $S_0$ , kann Lichtemission in Form von Fluoreszenz auftreten. Intersystem crossing setzt Spinumkehr voraus und führt zu dem energetisch tiefer liegenden Triplett-Zustand ( $T_1$ -Zustand). Dieser energetisch tiefer liegende Triplett-Zustand hat normalerweise eine Lebensdauer, die größer als  $10^{-6}$  s ist [19]. Der Übergang von  $T_1$  nach  $S_0$  ist wiederum ein spinverbotener Prozess, deshalb hat der  $T_1$ -Zustand eine relativ hohe Lebensdauer. Das Ausmaß des Intersystem-Crossing ist unter anderem abhängig von der Energiedifferenz  $\Delta E$  zwischen dem niedrigsten, angeregten  $S_1$ -Zustand und dem niedrigsten, angeregten  $T_1$ -Zustand ( $\Delta E = E_{S_1} - E_{T_1}$ ). Ist die Energiedifferenz klein, dann ist die Intersystem-Crossing-Effektivität groß. Im Gegensatz dazu verliert die Intersystem-Crossing-Effektivität an Bedeutung wenn die Energiedifferenz groß ist.

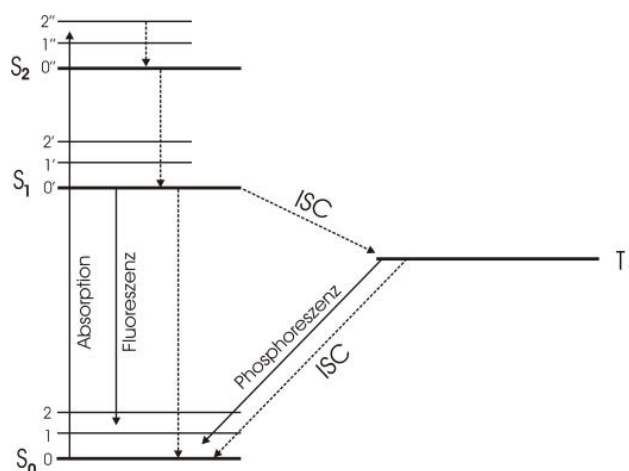


Abbildung 3.6: Jablonski-Diagramm zur Demonstration der Energieniveaus aromatischer Farbstoffe nach [20]. Das Diagramm zeigt ähnlich wie in Abbildung 2.4 die Energieniveaus der elektronischen Grundzustände  $S_0$ , des ersten angeregten Singulett-Zustandes  $S_1$  und des ersten elektronisch angeregten Triplett-Zustandes  $T_1$ . Zusätzlich sind die Schwingungsniveaus der einzelnen Zustände eingezeichnet. Nichtstrahlende Übergänge werden durch gestrichelte Linien angedeutet. Durch Absorption wird der Farbstoff aus dem Grundzustand in den  $S_1$  bzw.  $S_2$ -Zustand oder einen seiner Schwingungsniveaus gehoben ( $v=0,1,\dots,0',1',\dots,0'',1'',\dots$ ), wo er durch innere Konversion (IC) wieder in den angeregten Singulett-Zustand  $S_1$  übergeht. Aus diesem Zustand kann das aromatische Molekül dann in den Grundzustand relaxieren oder durch Intersystem Crossing (ISC) in den Triplettzustand  $T_1$  übergehen.

Wegen der relativ hohen Lebensdauer des  $T_1$ -Zustandes im Vergleich zum  $S_1$ -Zustand des aromatischen Moleküls, ist die Wahrscheinlichkeit des Energieübertrags vom  $T_1$ -Zustand auf

andere Moleküle viel höher. Für die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff ist der Energietransfer vom T<sub>1</sub>-Zustand des aromatischen Moleküls auf den Triplett-Zustand des Sauerstoffs von entscheidender Bedeutung. Dabei muss die Triplett-Lebensdauer der aromatischen Verbindung genügend lang sein (üblicherweise im µs-Bereich [21]), zum anderen muss der Triplett-Zustand des aromatischen Moleküls energetisch höher liegen als der Singulett-Zustand des Sauerstoffs. Der erzeugte Singulett-Sauerstoff kann dann mit dem aromatischen Molekül selbst ein Endoperoxid bilden. Die unten aufgeführten Reaktionen zur Erzeugung von Endoperoxiden durch Autoperoxidation sollen die einzelnen Reaktionsschritte noch einmal verdeutlichen.

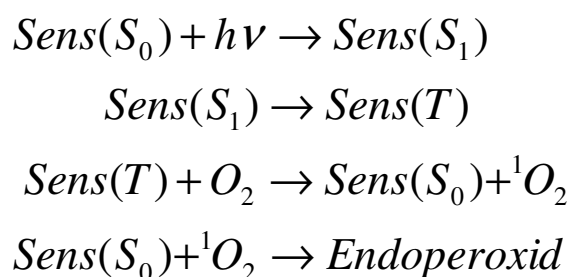


Abbildung 3.7: *Demonstration der einzelnen Reaktionsschritte zur Erzeugung von Endoperoxiden. Die Abkürzung „Sens“ steht für den aromatischen Farbstoff bzw. Sensibilisator.*

Die obigen Reaktionsgleichungen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen. Das aromatische Molekül (*Sens*; *Sens* steht für Sensibilisator) wird aus seinem Grundzustand S<sub>0</sub> mittels Lichtanregung ( $h\nu$ ) in den elektronisch angeregten Singulettzustand S<sub>1</sub> gehoben. Es erfolgt durch Intersystem Crossing der Übergang in den Triplett-Zustand des aromatischen Moleküls (*Sens*(T)). Durch Energietransfer wird die Anregungsenergie des Triplett-Zustands auf den molekularen Sauerstoff übertragen. Dabei entsteht elektronisch angeregter Sauerstoff <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, während das aromatische Molekül wieder in seinen Grundzustand übergeht.

Nach Brauer [22] z.B. können sogenannte *meso*-Diphenylhelianthrene (MDH (Heliantherene=HEL) durch Autoperoxidation (im engl.: self-sensitized photooxidation) entsprechenden Endoperoxide (MDHPO) bilden (siehe Abbildung 3.8).



In unserem Falle wurde zur Endoperoxidbildung über Autoperoxidation ein Perylenderivat mit hoher Photostabilität verwendet, das eine ähnliche chemische Struktur wie meso-Diphenylhelianthren aufweist. Es handelt sich hierbei um (N,N'-Di-(2',6'-dimethyl-phenyl)-perylene-3.4.9.10-tetracarbonsäurediimid (siehe Abschnitt 5.1) mit der internen BASF Nomenklatur KF 241.

Die Endoperoxide können über Photosensibilisierung mit einem Sensitizer (engl.: sensitized), oder durch Autoperoxidation (engl.: self-sensitized) erzeugt werden. Die Detektion der Endoperoxidbildung kann dabei indirekt durch das zeitliche Absinken der Fluoreszenzintensität des entsprechenden aromatischen Moleküls erfolgen. Bei den hier durchgeführten Messungen wurde mit Hilfe von Laseranregung in der Absorptionsbande über das Absinken der Fluoreszenzintensität im Emissionsmaximum die Endoperoxidausbeute quantitativ ermittelt.

16

Wird davon ausgegangen, dass alle angeregten Moleküle die gleiche Reduktionseffizienz, sowie den gleichen Absorptionsquerschnitt  $\sigma(\nu)$  haben, so ergibt sich nach Moerner [23] für die Anzahl der Moleküle  $N$  mit der Laserfrequenz  $\nu$ :

$$N(t, \nu) = N(0, \nu) \cdot e^{-\sigma(\nu) \Phi \eta t} \quad (3.1)$$

Mit  $\Phi = \frac{P}{Ah\nu}$  der mittleren Photonenflussdichte in der Probe,  $P$  der Laserleistung und  $A$  der Fläche des Laserspots auf der Probe. Wobei  $N$  die Anzahl der zu Grunde liegenden aromatischen Moleküle angibt, die sich aufgrund der Endoperoxidbildung zeitlich verringert. Dabei kann die Linienbreite des Lasers als klein gegenüber der homogenen Linienbreite des aromatischen Moleküls angenommen werden. Um daraus die Reduktionseffizienz  $\eta$  zu bestimmen, wird nach Bauer [24] die Zeit  $t_{20\%}$  bestimmt, in der der Quotient  $\frac{N(t, \nu)}{N(0, \nu)}$  um 20% abgefallen ist.

Nach Bauer [24] ergibt sich dann:

$$\eta = -\ln(0,8) \cdot (\sigma(\nu) \Phi t_{20\%})^{-1} \quad (3.2)$$

Nach Kneitschel [25] wurde zum Vergleich der Reduktionskurven, der Reduktionsfaktor  $RF(t)$  eingeführt. Der Faktor gibt dabei den prozentualen Anteil des Fluoreszenzabfalls aufgrund der Endoperoxidbildung in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer an. Somit lassen sich Aussagen über die Ausbeute an Endoperoxiden innerhalb eines gewissen Zeitraumes machen. Wenn man davon ausgeht, dass die Fluoreszenzintensität aufgrund der gebildeten Endoperoxide verringert wird, lässt sich aus dem Absinken der Fluoreszenz die Endoperoxidausbeute ermitteln. Für einige Messungen am Monochromator (vgl. Abschnitt 6.1.1) war die Untergrundfluoreszenz vernachlässigbar klein, somit lässt sich dann die Endoperoxidausbeute durch den Reduktionsfaktor bestimmen mit:

$$RF(t) = \frac{I(0) - I(t)}{I(0)} \cdot 100\% \quad (3.3)$$

mit  $t$  gleich der Bestrahlungsdauer durch den Laser,  $I(0)$  die Fluoreszenzintensität am Beginn der Bestrahlung und  $I(t)$  die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt  $t$  an. Der Wert des Reduktionsfaktors hängt von der Leistungsdichte und der Bestrahlungsdauer ab. Allerdings ist der Reduktionsfaktor nur geeignet, um Reduktionskurven mit gleichen Randbedingungen zu vergleichen. Für Messungen z.B. am Fluoreszenzspektrometer insbesondere bei UV-Anregung musste die Untergrundfluoreszenz der umgebenden Matrix der Endoperoxide mit berücksichtigt werden. Hier wurde die Berechnung der Endoperoxidausbeute neu eingeführt (vgl. Abschnitt 6.2.1).

### 3.4 Thermolyse von Endoperoxiden

Zur Freisetzung des chemisch gebundenen Sauerstoffs aus aromatischen Endoperoxiden, genügt in der Regel das Erwärmen des Endoperoxides (Thermolyse). Nach Turro [4] zerfallen Endoperoxide aus Naphthalin bzw. Anthracen-Derivaten in das ursprüngliche aromatische Molekül und zu einem hohen Prozentsatz in Singulett-Sauerstoff.

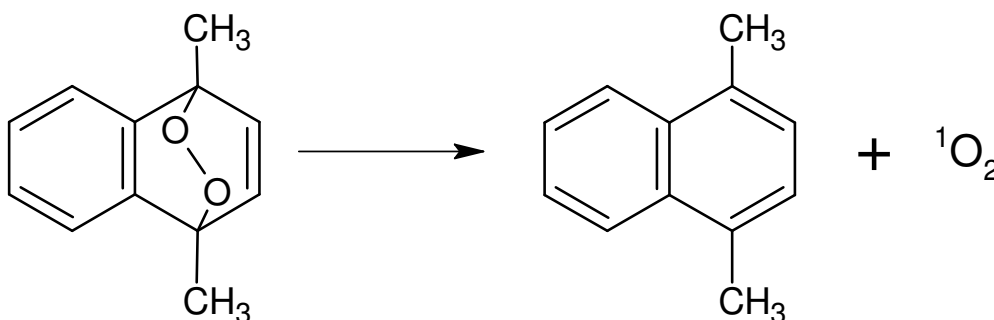


Abbildung 3.9: Thermolyse von 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxid in das ursprüngliche aromatische Molekül und Singulett-Sauerstoff.

Dabei liegt die Zerfallshalbwertszeit von 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxid nach Turro [4] bei 12°C bei rund 36 Stunden in dem Lösungsmittel 1,4-Dioxan, bei einer entsprechenden  $^1\text{O}_2$ -Ausbeute von 76 %. Diese Endoperoxide zerfallen allerdings bei 37°C schon innerhalb von 43 min. Tabelle 1 zeigt die verschiedenen Zerfallshalbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) der Endoperoxide von 1,4,5-Trimethylnaphthalin und 1,4-Dimethylnaphthalin in 1,4-Dioxan bei unterschiedlichen Temperaturen. Diese Zerfallszeiten lassen sich allerdings erhöhen, wenn man das Endoperoxid in eine bestimmte Matrix (z.B. Polymere) einbaut (siehe Abschnitt 7.7). Somit kann man das Einbetten von Endoperoxiden in eine Matrix als Singulett-Sauerstoff-Speicherung ansehen, bei dem der Singulett-Sauerstoff bei einer bestimmten Temperatur nur verzögert freigesetzt wird. Im Zusammenhang mit den Zellversuchen wurden die Endoperoxide in Liposomen eingebaut. Zu bemerken ist, dass es sich bei dieser Art des Zerfalles um eine Reaktion erster Ordnung handelt, da pro Zerfall eines Endoperoxides ein Molekül Singulett-Sauerstoff entsteht. Dieser Zerfall der Endoperoxide kann in Analogie mit dem radioaktiven Zerfall betrachtet werden. Mit  $k$  als Ratenkonstante,  $A_0$  der Anzahl der Endoperoxid-Moleküle,  $A$  der Anzahl der zur Zeit  $t$  bereits zerfallenen Endoperoxide ergibt sich dann die mathematische Beziehung:

$$\frac{A}{A_0} = 1 - e^{-kt} \quad (3.4)$$

mit  $k = \frac{1}{t} \ln \left( \frac{A_0}{A_0 - A} \right)$ . Somit ergibt sich für die Halbwertszeit der Wert  $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$ .

Endoperoxid (von)	Temperatur (°C)	Zerfallshalbwertszeit $t_{1/2}$ (h)
1,4-Dimethylnaphthalin	12	36,3
	35	1,50
1,4,5-Trimethylnaphthalin	24,8	91,7
	57,2	2,54

Tabelle 3.1: Zerfallshalbwertszeiten der Endoperoxide von 1,4-Dimethylnaphthalin und 1,4,5-Trimethylnaphthalin bei unterschiedlichen Temperaturen in 1,4-Dioxan (nach [4]).

### 3.5 Abgrenzung zur Photodynamischen Therapie (PDT)

Die Photodynamische Therapie (PDT) ist eine minimalinvasive Therapieform [26], d.h. es sind keine chirurgischen Eingriffe notwendig die den Organismus stark belasten. Der Organismus wird nur durch die Gabe des Sensibilisators sowie durch die Eingriffe bzw. die Geräte, die für die Bestrahlung notwendig sind, belastet. Hierzu wird vor der Therapie eine photosensibilisierende Substanz verabreicht, die sich in höherer Konzentration im Tumorgewebe als im Normalgewebe anreichert [26]. Durch Lichtbestrahlung wird der Photosensibilisator angeregt und kann bei Vorhandensein von Sauerstoff, Singulett-Sauerstoff erzeugen, der wiederum Moleküle aus der Umgebung oxidiert (Typ II-Reaktionen) [21], oder es werden durch den Photosensibilisator Radikalreaktionen mit dem Gewebe eingeleitet (Typ I-Reaktionen). In Abbildung 3.10 wird das Prinzip der Photodynamischen Therapie schematisch dargestellt.

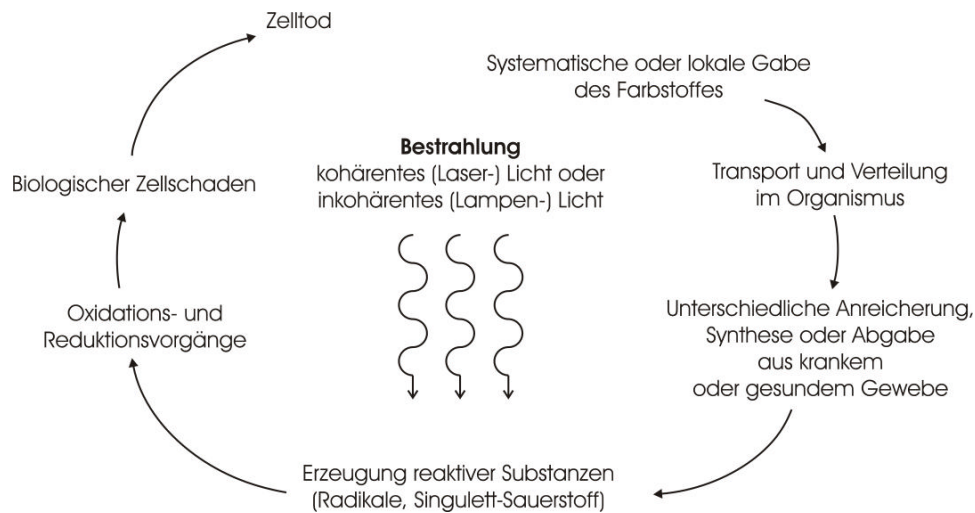


Abbildung 3.10: Schematischer Ablauf der Photodynamischen Therapie (PDT) (nach[27]).

Die Eindringtiefe des Lichtes hängt dabei entscheidend für den Erfolg der PDT ab. Da die Eindringtiefe im Gewebe mit steigender Wellenlänge (bis ca. 1  $\mu\text{m}$ ) zunimmt, werden üblicherweise Photosensibilisatoren, die im roten bis infraroten Spektralbereich absorbieren, verwendet. In Abbildung 3.11a ist die Abhängigkeit des Lichtflusses von der Eindringtiefe ins Gewebe bei verschiedenen Wellenlänge aufgetragen. Man kann erkennen, dass die Eindringtiefe im nahen Infraroten ein vielfaches der Eindringtiefe im Ultravioletten entspricht. Aufgrund der limitierten Eindringtiefe des therapeutischen Lichtes wird derzeit die Photodynamische Therapie bevorzugt zur lokalen Behandlung oberflächlicher Karzinome auf der Haut oder in endoskopisch zugänglichen Hohlorganen eingesetzt [26].

Abbildung 3.11b zeigt das Absorptionsspektrum des Hämatoporphyrin-Derivats (HpD) eines Photosensibilisators, das in der PDT verwendet wird. Man sieht, dass die Absorption von HpD bei ca 625nm relativ schwach ist, wohingegen die Eindringtiefe ins Gewebe bei dieser Wellenlänge relativ hoch ist. Umgekehrt ist die Absorption von HpD bei rund 400nm relativ hoch, wobei allerdings die Eindringtiefe ins Gewebe relativ gering ist. Hier sind auch die Grenzen der PDT hinsichtlich ihrer Effizienz ersichtlich. Als leistungsstarke Lichtquellen im roten Spektralbereich kommen Lampensysteme und Diodenlaser mit nichtthermischen Leistungsdichten von 100 bis 200  $\text{mW}/\text{cm}^2$  zum Einsatz.



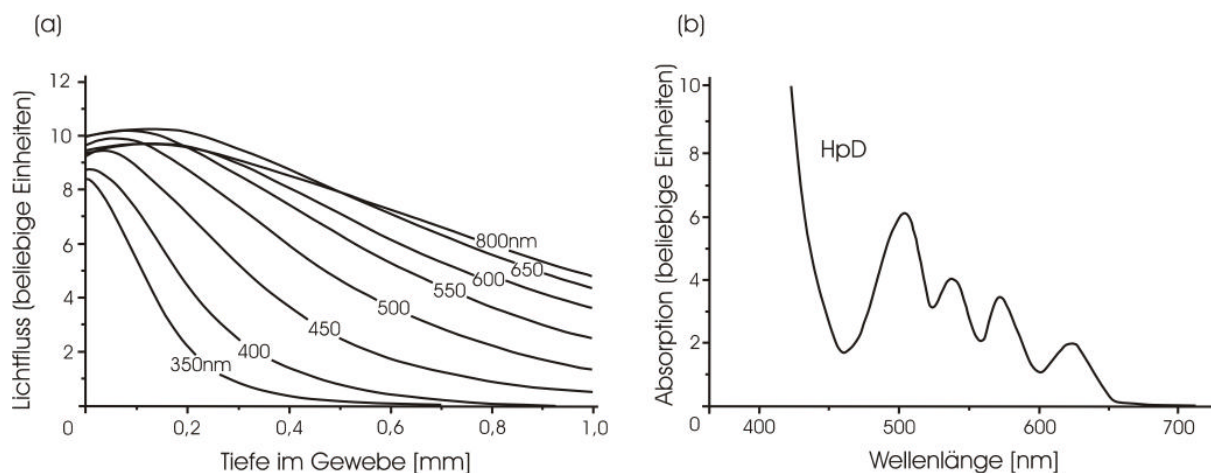


Abbildung 3.11: *Abhängigkeit des Lichtflusses von der Gewebetiefe bei verschiedenen Wellenlängen im Vergleich zur Absorption des Hämatorporphyrin-Derivates, das in der PDT als Sensibilisator eingesetzt wird (nach [28])*

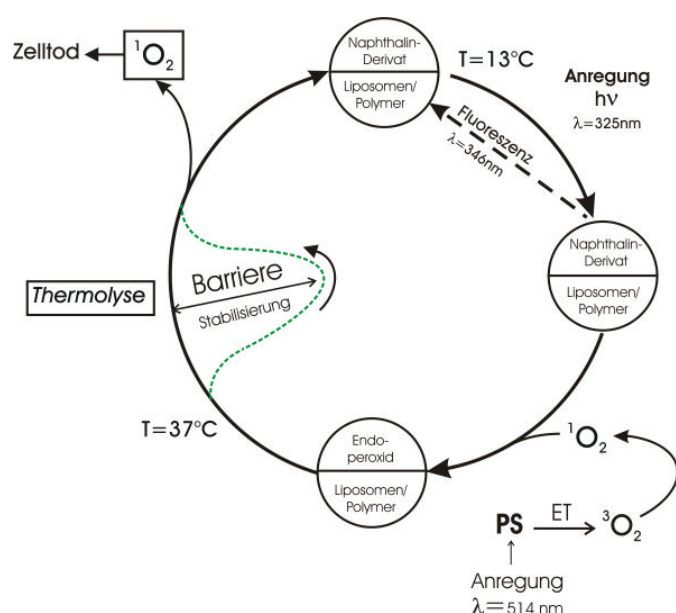
- a) *Abhängigkeit des Lichtflusses von der Eindringtiefe ins Gewebe bei verschiedenen Wellenlängen*
- b) *Absorptionsspektrum des Hämatorporphyrin-Derivats (HpD)*

Der Zusammenhang zwischen dem in dieser Arbeit vorgestellten neuartigen Verfahren und der klassischen PDT liegt in der Art der Schädigung des Gewebes. Hierzu soll kurz auf die in der PDT induzierten Reaktionen auf biologischen Membranen eingegangen werden.

Prinzipiell gibt es zwei verschiedene Wirkungsmechanismen, die in der photodynamischen Therapie Bedeutung finden. Zum einen sind dies Reaktionen, die durch Singulett-Sauerstoff hervorgerufen werden, man spricht hier auch von Typ II – Reaktionen. Wobei hier der Singulett-Sauerstoff für lethale oxidative Schäden verantwortlich ist, z.B. bei der Tumorbehandlung [29]. Dabei werden die Membranlipide durch sogenannte En-Reaktionen oder Cycloadditionen [9] geschädigt. Ein Beispiel hierfür ist die Bildung von Hydroperoxiden aus ungesättigten Fettsäuren und  $^1\text{O}_2$  [30]. Bei Typ I – Reaktionen handelt es sich um Reaktionen, bei denen der Sensibilisator mit Wasserstoff bzw. Elektronendonatoren reagiert, wobei dadurch Radikale des Sensibilisators entstehen, die dann mit Sauerstoff reagieren können [31]. Es entstehen dabei hochreaktive Sauerstoffverbindungen, wie z.B.  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$ , die die meisten biologischen Substanzen oxidieren und somit Zellschäden verursachen können [32].

Da es sich in der vorgestellten Arbeit um die Freisetzung von  $^1\text{O}_2$  aus Endoperoxiden durch Thermolyse handelt, ist die zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen in erster Linie auf Typ II – Reaktionen zurückzuführen. Ein wichtiger Aspekt für die Wirksamkeit ist die Lebensdauer und damit auch der Diffusionsradius von  $^1\text{O}_2$  in Zellen. Geht man davon aus, dass die Lebensdauer in Zellen ca. 6  $\mu\text{s}$  [33] beträgt, dann errechnet sich der Diffusionsradius nach

In Abbildung 3.12 bzw. 3.13 wird die Erzeugung der Endoperoxide sowie deren Zerfall in das zugrunde liegende aromatische Molekül und Singulett-Sauerstoff dargestellt, wie es in der vorliegenden Arbeit angewandt wird. Dabei wird in Abbildung 3.12 das Reaktionsschema der Endoperoxidbildung mit Hilfe eines Sensitizers durch Photosensibilisierung dargestellt, während die Abbildung 3.13 das Reaktionsschema der Endoperoxidbildung durch Autoperoxidation zeigt.



22

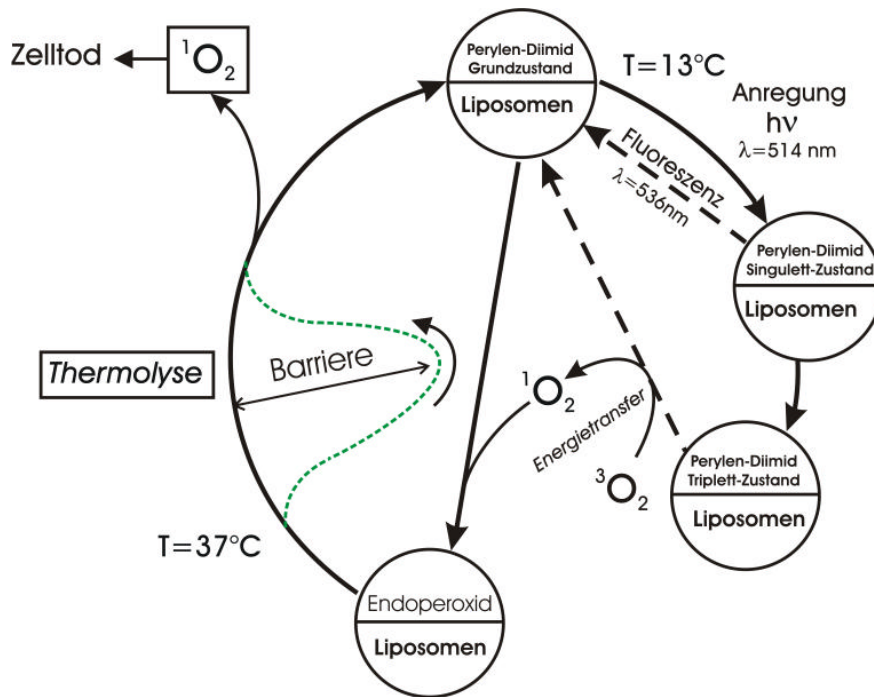


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung des Reaktionsschemas der Endoperoxidbildung durch Autooxidation. Ausgegangen wird von dem Perylen-Diimid im Grundzustand das in Liposomen eingebaut ist, durch Laseranregung in den Singulett-Zustand übergeführt wird und dann durch Intersystem-Crossing in den Triplett-Zustand relaxiert. Es folgt der Energietransfer an den umgebenden Triplett-Sauerstoff in den Singulett-Sauerstoff, der dann mit dem Perylen-Diimid im Grundzustand zu einem Endoperoxid reagiert. Die Barriere bei  $T=13^{\circ}\text{C}$  verhindert den Zerfall der Endoperoxide, während bei  $T=37^{\circ}\text{C}$  der Zerfall der Endoperoxide in das zugrunde liegende aromatische Molekül und Singulett-Sauerstoff erfolgt und dies bei Applikation an Tumorzellen zum Zelltod führen kann.

# 4 Liposomen

## 4.1 Liposomenarten

Liposomen, wie auch größtenteils Zellmembranen, bestehen aus amphiphilen Lipiden [35], d.h. diese Lipide besitzen einen hydrophilen und hydrophoben Teil. Der hydrophile Teil enthält dabei im allgemeinen unter anderem eine Phosphatgruppe und hat somit eine starke Affinität zu Wasser. Dieser hydrophile Anteil des Lipids, auch die polare Kopfregion genannt, liegt somit immer entgegengesetzt zu dem lipophilen (bzw. unpolaren) Anteil des Moleküls, der wiederum aus zwei zueinander parallel verlaufenden gesättigten oder ungesättigten Fettsäureketten besteht. Dabei kann die Länge der Fettsäureketten stark variieren z.B. bestehend aus 12 Kohlenstoffatomen bis hin zu 24 Kohlenstoffatomen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei sogenannte Phospholipide aus ungesättigten Fettsäureketten verwendet bestehend aus 14 bzw. 18 Kohlenstoffatomen mit der entsprechenden Bezeichnung 1,2-Dimyristoyl-L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine (DMPC) bzw. 1,2-Distearoyl-L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine (DSPC) (siehe Abbildung 4.1).

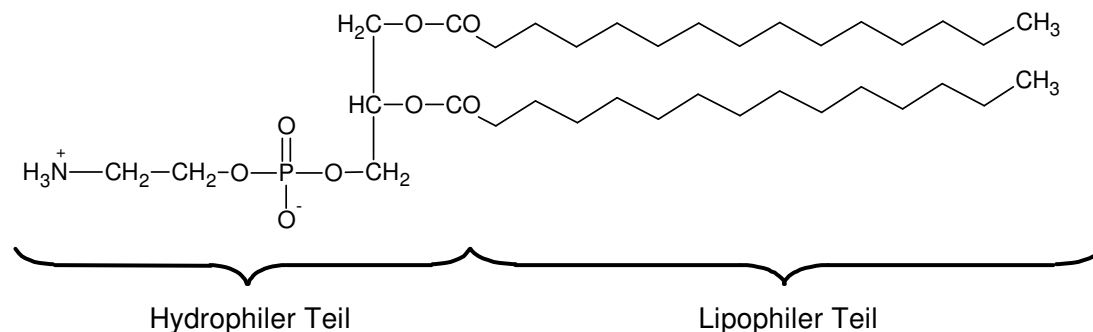


Abbildung 4.1 a: *Chemische Struktur des 1,2-Dimyristoyl-L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine (DMPC) mit ungesättigten Fettsäureketten, bestehend aus 14 Kohlenstoffatomen, die den lipophilen Teil des Moleküls charakterisieren. Der phosphorylierte Alkohol (polare Kopfgruppe) ist hydrophil.*

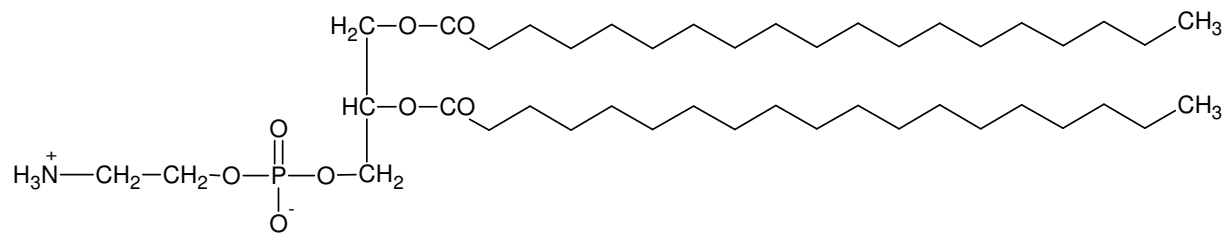


Abbildung 4.1 b: *Chemische Struktur des 1,2-Distearoyl-L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine (DSPC). Das Lipid unterscheidet sich vom obigen nur durch vier weitere Kohlenstoffatome pro Fettsäurekette.*

Diese beiden Lipide unterscheiden sich im wesentlichen durch ihre Phasenübergangstemperatur (siehe Abschnitt 4.2), die im allgemeinen durch die Länge der Fettsäureketten charakterisiert ist.

Im wässrigen Milieu bilden diese Lipide spontan Lipidaggregate, da ihre hydrophilen Anteile Affinität zum Wasser besitzen, während die Fettsäureketten das Wasser zu meiden versuchen. Lipide mit zwei Fettsäureketten, wie z.B. das verwendete Phosphatidylcholin, neigen zur Bildung von Lipiddoppelschichten [35], d.h. es bilden sich dabei Vesikel. Durch spezielle Präparationsverfahren (siehe Abschnitt 4.5) kann man dabei Liposomen herstellen, also kugelförmige Gebilde, die einen Durchmesser von 20 nm bis hin zu mehreren  $\mu\text{m}$  haben können [36]. Liposomen können auch aus verschiedenen Lipiden zusammengesetzt werden. Das Mischungsverhältnis von einzelnen Lipidarten (z.B. Phospholipide, Cholesterin, Glykolipide...) zueinander bestimmt die Eigenschaften und das Verhalten der Liposomen. Liposomen mit einer Komposition aus DSPC und Cholesterin bei zusätzlicher Arzneimitteldotierung werden unter anderem in der Tumorthherapie angewendet. Diese Liposomen zeichnen sich durch eine lange Halbwertszeit und hohe Blutstabilität aus. Außerdem können sie sich sehr gut im Tumorgewebe anreichern [37]. Liposomen werden in ihrer Größe charakterisiert, oder ob sie aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten bestehen.

### SUV (engl: small unilamellar vesicles)

SUV (engl: Small Unilamellar Vesicles) Liposomen können bis zu 25 nm groß sein. Sie sind durch eine einzige Lipiddoppelschicht charakterisiert. Die Größe dieser Liposomen wird durch die Ionenstärke des wässrigen Mediums sowie durch die Lipidzusammensetzung bestimmt [38]. Bei den kleinsten SUV kann aufgrund der kleinen Krümmung der Membran die Anzahl der Lipidmoleküle in der äußeren Schicht dabei doppelt so hoch wie bei der inneren Schicht sein (vgl. Abbildung 4.2).

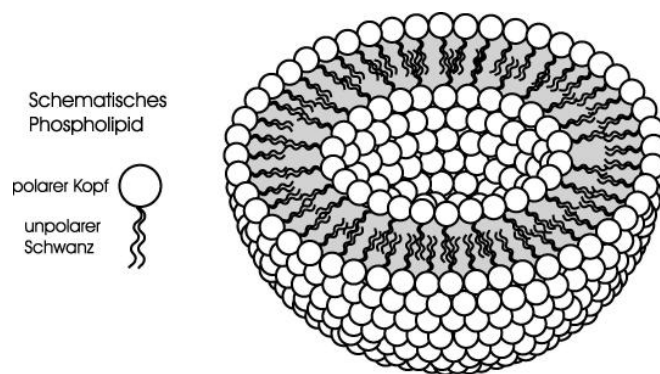


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung eines Liposoms (nach [36]). Die Abbildung zeigt ein SUV (small unilamellar vesicles), das durch eine Doppelmembranschicht charakterisiert ist. Die äußere Schicht der Membran besitzt etwa die doppelte Anzahl an Phospholipiden wie die Innere. Im inneren des Liposoms befindet sich Wasser, das von den polaren Köpfen des amphiphilen Lipids eingeschlossen wird.

Deformationen bewirken dabei einen metastabilen Membranzustand mit gesteigerter Neigung zu Fusion und Wechselwirkung zu anderen Molekülen, sowie erhöhte Membranpermeabilität für hydrophile Moleküle. Aus dem geringen Innenvolumen der SUV resultiert eine geringe Einschlusseffizienz für hydrophile Moleküle. Die geringe Größe kann jedoch beim Einsatz als Arzneistoffträger für eine bessere Organverteilung vorteilhaft sein [36].

#### LUV (engl.: large unilamellar vesicles)

Größere unilamellare Vesikel sind mit einem Durchmesser von größer als 100 nm in ihren Membranen nahezu spannungsfrei und zeigen daher eine bessere Lagerstabilität. Durch einen hohen Quotienten von wässrigem Innenvolumen zu Lipidvolumen ergibt sich bei der Verwendung als Arzneistoffträger ein günstiges Verhältnis von verkapselter Menge an hydrophiler Substanz zu eingesetztem Lipid [36].

#### MLV (engl.: multilamellar large vesicles)

Große multilamellare Vesikel haben eine Größe von etwa 100 nm bis zu mehreren 1000nm und besitzen im allgemeinen fünf oder mehr konzentrische Bilayerschalen [38]. Bei der Verwendung als Trägerstoff für Wirkstoffe haben sie den Nachteil, dass sie bevorzugt in phagozytierten Zellen aufgenommen werden. Ihr Vorteil liegt in der vergrößerten Wirkstofffreisetzung, aufgrund der erhöhten Anzahl an Lipiddoppelschichten [36].

## 4.2 Eigenschaften der Liposomen

### 4.2.1 Lipiddiffusion

Lipidmoleküle können in den Lipiddoppelschichten der Liposomen sowohl transversal als auch lateral diffundieren (siehe Abbildung 4.3). Dabei geschieht die transversale Diffusion äußerst selten, da hierbei die polare Kopfgruppe des Lipidmoleküls durch den Kohlenwasserstoffkern der Doppelschicht transportiert werden muss. Die Halbwertszeit für die Austauschgeschwindigkeiten der transversalen Diffusion liegen im Bereich von einigen Tagen [35]. Im Gegensatz dazu verläuft die laterale Diffusion sehr schnell. Dieser Prozess erfolgt durch Platzwechselvorgänge der einzelnen Lipidmoleküle in einer Membranschicht mit einer Diffusionsgeschwindigkeit von etwa  $1 \mu\text{m/s}$  [35]. Mit dieser Geschwindigkeit können Lipidmoleküle in wenigen Sekunden jeden Ort auf der Membranoberfläche erreichen.

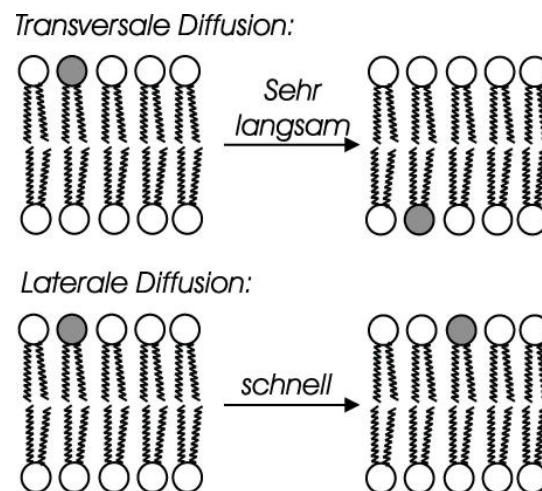


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Lipiddiffusion (nach [35]). Sowohl die transversale Diffusion (sehr langsamer Prozess) als auch die laterale Diffusion (schnell), ist dargestellt.

### 4.2.2 Phasenübergang von Lipiden

Phospholipidmembranen können bei verschiedenen Temperaturen in unterschiedlichen Phasen vorliegen. Wird eine Lipiddoppelschicht über eine charakteristische Temperatur, der sogenannten Phasenübergangstemperatur  $T_m$  oder Schmelztemperatur erwärmt, so erfolgt ein Wechsel der Anordnungsstruktur der Lipidmoleküle. Dabei gehen die Lipide von dem geordneten festen Gelzustand in den flüssig kristallinen Zustand über, wo die einzelnen Lipidmoleküle freier beweglich sind [38]. In der Mikrokalometrie kann die Phasenübergangstemperatur der einzelnen Lipide bestimmt werden. Dabei wird die

aufgenommene Wärme des Lipids in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Das Prinzip funktioniert folgendermaßen: Zwei kleine Aluminiumpfannen eine leer die andere mit einer konzentrierten Probe an Liposomenmembran werden an einen Thermistor angeschlossen der die Temperatur der einzelnen Aluminiumpfannen getrennt anzeigt. Die Wärmezufuhr der „Probenpfanne“ ist so eingestellt, dass sie mit der Wärmezufuhr der Referenzpfanne korreliert. Nahe der Phasenübergangstemperatur wird mehr Wärme benötigt, um die Probenpfanne auf die gleiche Temperatur zu bringen wie die Referenzpfanne. Dieser zeitliche Verlauf der Energieaufnahme einer Liposomenmembran wird in Abbildung 4.4 gezeigt.

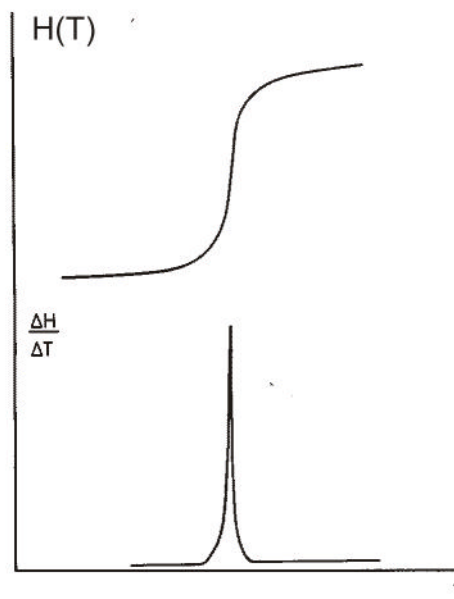


Abbildung 4.4: Energieaufnahme  $H(T)$  der Liposomenmembran in Abhängigkeit von der Temperatur (obere Kurve) nach [38]. Die untere Kurve ergibt sich aus dem Gradienten  $\Delta H/\Delta T$ , während die Fläche unter dem Peak die Enthalpie des Phasenübergangs charakterisiert.

Während unterhalb der Phaseübergangstemperatur des Phospholipids alle Fettsäureketten in der sogenannten *trans*-Konformation vorliegen, befinden sich oberhalb der Phasenübergangstemperatur schon einige in der sogenannten *gauche*-Konformation. Abbildung 4.5 zeigt schematisch Phospholipide in der *trans* und in der *gauche*-Konformation. Durch Rotation der C-C-Einfachbindung in der Fettsäurekette, die durch den Phasenübergang hervorgerufen wird, trägt der Übergang von der *trans* zur *gauche*-Konformation auch zur Volumenvergrößerung bei.



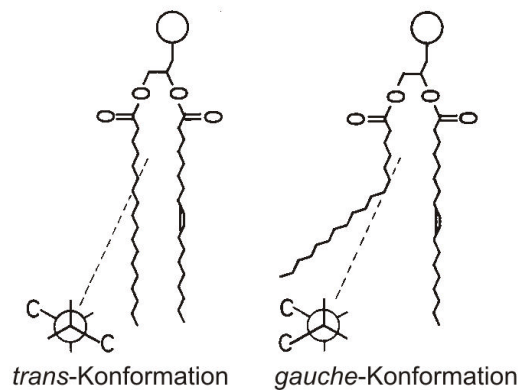


Abbildung 4.5: Anordnung der *trans* und *gauche*-Konformation eines Phospholipides (nach [38]). Die Abbildung zeigt den Unterschied der beiden Anordnungen durch Drehung einer C-C-Einfachbindung um  $180^\circ$  entlang der eingezeichneten, gestrichelten Achse bedingt durch die Phasenübergangstemperatur.

Man erkennt auch, dass bei reinem Auftreten von *trans*-Konformationen eine hohe Ordnung unterhalb der Übergangstemperatur möglich ist, bedingt durch Aneinanderlagerung der Fettsäureketten. Die Membranlipide liegen dann in einem geordneten, starren Zustand vor [35]. Oberhalb der Übergangstemperatur wird die Aneinanderlagerung der Fettsäureketten durch auftretende *gauche*-Konformationen gestört und es tritt eine gewisse Unordnung auf (siehe Abbildung 4.6), die zu einem flüssigen (fluiden) Zustand führt.

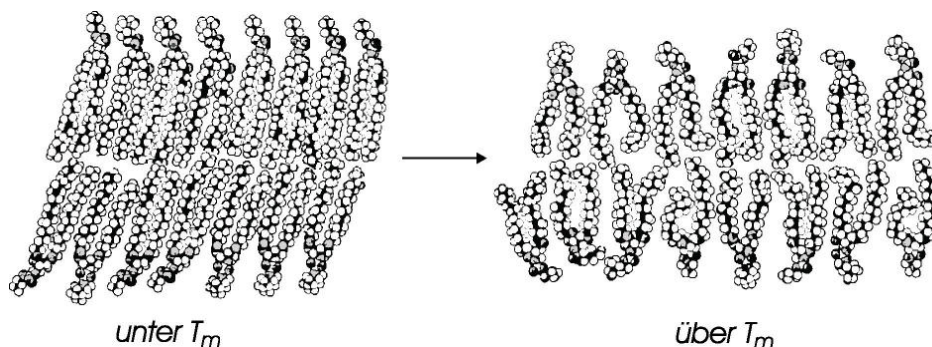


Abbildung 4.6: Anordnung der Membranstruktur oberhalb und unterhalb der Phasenübergangstemperatur (nach [39]). Oberhalb der Phasenübergangstemperatur  $T_m$  verändern sich die Membraneigenschaften der Liposomen, wie z.B. die Fluidität der Membran. Der Vorgang ist reversibel – bei Abkühlung unterhalb der Phasenübergangstemperatur liegen die Lipidmoleküle wieder im „geordneten Zustand“ vor.

Die Phasenübergangstemperatur ist abhängig von der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der Fettsäureketten [35]. Längere Ketten tragen zu einer höheren Phasenübergangstemperatur bei, während bei Kohlenstoffdoppelbindungen die Wechselwirkung zwischen den

Fettsäureketten durch das Auftreten der Knicke in den Kohlenstoffketten (*cis*-Doppelbindungen) gestört wird. In Abbildung 4.7 werden die Phasenübergänge von Phospholipiden mit gesättigten Fettsäureketten dargestellt.

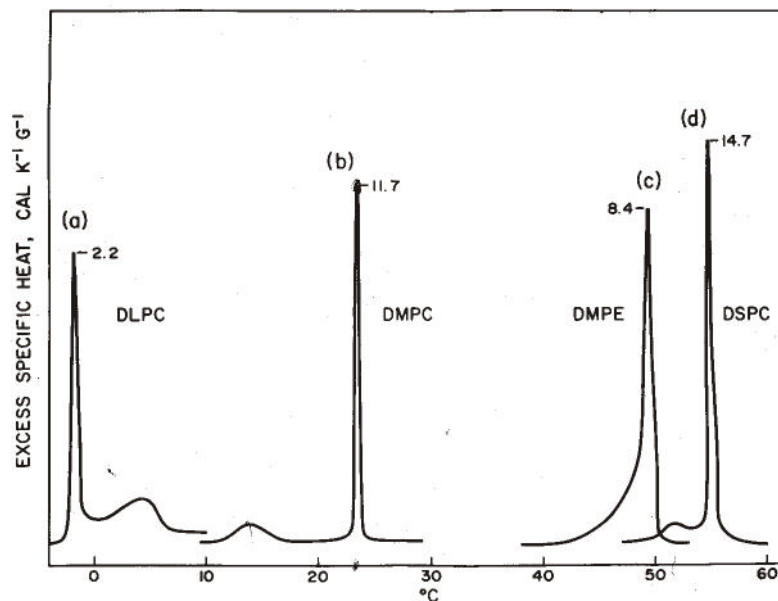


Abbildung 4.7: Aufnahmen aus der Mikrocalorimetrie zur Illustration der Phasenübergangstemperaturen von Phospholipiden [40]: a) Dilauroylphosphatidylcholine (DLPC mit 12 C-Atomen in der Fettsäurekette), b) Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC 14 C-Atome), c) Dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE 16 C-Atome), d) Distearoylphosphatidylcholine (DSPC 18 C-Atome). Die scharfen Peaks demonstrieren die Phasenübergänge von 0 bis 60 °C für die oben erwähnten Lipide. Das Diagramm zeigt, dass sich mit Zunahme der C-Atome in den Fettsäureketten die Phasenübergangstemperatur erhöht. Die breiten kleinen Peaks deuten auf eine Phasenvorumwandlung hin, auf die hier nicht näher eingegangen wird.

Aus der Tabelle 4.1 kann man direkt die Phasenübergangstemperaturen der bereits oben erwähnten Phospholipide entnehmen. Darunter auch das in dieser Arbeit verwendete DMPC sowie DSPC.

Phospholipid	Phasenübergangstemperatur $T_m$ (°C)
DLPC	-1,8
DMPC	23,9
DMPE	49,5
DSPC	54,9

Tabelle 4.1: *Tabelle der Phasenübergangstemperaturen der Phospholipide DLPC, DMPC, DMPE, DSPC (nach [40]). Die Zahlen entsprechen den maximal gemessenen Werten.*

### 4.3 Wechselwirkungen der Liposomen mit Zellen

Nach [41] gibt es vier verschiedene Wechselwirkungen von Liposomen mit Zellen, die sich in erster Linie auf SUV beziehen (siehe Abbildung 4.8)

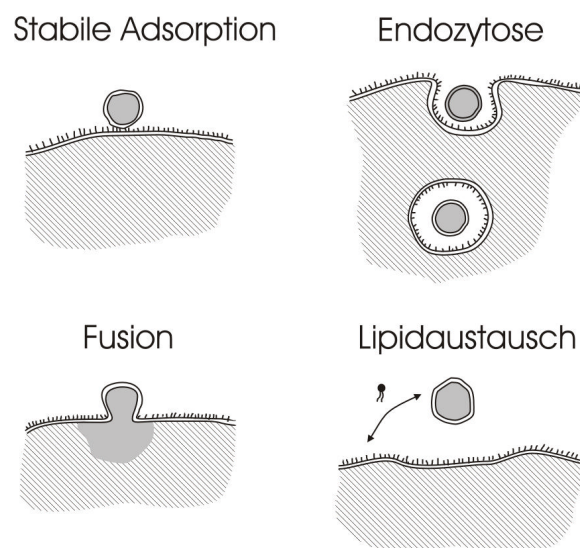


Abbildung 4.8: *Schematische Darstellung der möglichen Wechselwirkungen zwischen kleinen unilamellaren Liposomen und der Zelloberfläche (nach [41])*

#### *Adsorption*

Die stabile Adsorption von Liposomen an Zellmembranen erfolgt über Wechselwirkungen zwischen den Liposomen und der Plasmamembran. Die Wechselwirkung kann durch

physikalische Anziehungskräfte oder durch eine spezifische Rezeptor – Ligand – Bindung zwischen Liposom und Plasmamembran stattfinden. Dabei vermutet man, dass die physikalische Adsorption der Liposomen durch das Andocken an bestimmte Proteine an der Membranoberfläche der Zelle geschieht. Dabei ist der Adsorptionprozess am größten bei Temperaturen kleiner gleich der Phasenübergangstemperatur der Liposomenmembran [41]. Zwischen den adsorbierten Vesikeln und der Zellmembranoberfläche können Lipide ausgetauscht werden [41]. Die adsorbierten Vesikel können durch sogenannte Endozytose von der Zelle aufgenommen werden.

### *Endozytose*

Endozytose nennt man den Vorgang, durch den sich Zellen Makromoleküle, bestimmte Substanzen und in einigen Fällen sogar andere Zellen einverleiben. Dabei wird das aufzunehmende Material immer weiter von einem kleinen Teil der Plasmamembran eingehüllt, der sich zunächst einstülpt und dann abschnürt. Zusätzlich ist die Membranoberfläche der Zelle mit einem spezialisierten Bereich ausgestattet, den sogenannten „coated pits“ [42]. An diesen Stellen hat die Zellwand bereits leichte Einstülpungen, an die Vesikel andocken können. Dann stülpt sich die Zellmembran nach innen und die entstandene „Blase“ schnürt sich von der Zellwand ab. Diese Vesikel verschmelzen mit den Lysosomen, in denen die endozytisch aufgenommenen Objekte verdaut werden. Bei der Endozytose unterscheidet man zwei Hauptarten, die Pinozytose und die Phagozytose [42]. Durch Pinozytose, man spricht hierbei vom „Zell-Trinken“, werden Flüssigkeiten und gelöste Substanzen in kleine Vesikel (Durchmesser höchstens 150 nm) aufgenommen. Durch Phagozytose, auch „Zell-Fressen“ genannt, gelangen umfangreiche Partikel, z.B. Mikroorganismen und Zelltrümmer, über große Vesikel – sogenannte Phagosomen mit einem Durchmesser von gewöhnlich über 250 nm – in die Zelle. Die meisten Eukaryontenzellen nehmen ständig Flüssigkeiten und gelöste Stoffe durch Pinozytose auf; große Partikel dagegen werden hauptsächlich von spezialisierten, phagozytierenden Zellen „gefressen“ [42].

### *Fusion*

Die Fusion beschreibt den Vorgang, bei dem sich Liposomen mit der Zellmembran vereinigen und dabei ihren Inhalt in das Zellplasma freisetzen. Liposomen mit chemisch neutraler Oberfläche können mit Zellmembranen fusionieren, jedoch ist nach Pagano [41] nicht vollständig klar, inwieweit sich Zelltyp, Vesikelgröße und andere Randbedingungen, wie z.B. Temperatur, auf die Fusion von Liposomen mit Zellen auswirken.

## *Lipidaustausch*

Der Lipidaustausch beschreibt den Austausch einzelner Lipidmoleküle von Liposomen und Zellmembran. Es zeigen jedoch nicht alle Phospholipide diese Art der Wechselwirkung mit Zellen. Nach Pagano [41] kann der Lipidaustausch jedoch dazu dienen, Lipidmoleküle und andere lipophile Moleküle (wie z.B. Wirkstoffe) von Liposomen in die Zellmembranen zu transportieren.

## 4.4 Liposomen in der Pharmazie

Liposomen werden seit weit mehr als 20 Jahren hinsichtlich ihrer pharmazeutischen Anwendung untersucht. Ziel jeder pharmazeutischen Anwendung ist dabei, den gewünschten Arzneiträger zum richtigen Zeitpunkt an Ort und Stelle zu bringen. Innerhalb der Medizin wurden Liposomen aufgrund ihrer natürlichen Beschaffenheit und der Möglichkeit, Wirkstoffe einzuschließen, für den Arzneistofftransport weiterentwickelt. Liposomen können einerseits die Verträglichkeit von Wirkstoffen steigern – z.B. Senkung der akuten Toxizität von Amphotericin B [43] oder der Kardiotoxizität von Doxorubicin [44] – sie eröffnen aber auch die Möglichkeit, Arzneistoffe gezielt in erkranktes Gewebe zu transportieren [45]. Je nach Anwendung sind folgende Liposomen Gegenstand der derzeitigen Forschung oder werden auch bereits in der Praxis eingesetzt.

### *Conventional Liposomes*

Conventional Liposomes (engl.: conventional=herkömmlich) unterscheiden sich in ihren physikochemischen Eigenschaften wie Größe, Lipidzusammensetzung, Flächenladung sowie Fluidität und Anzahl der Bilayerschichten. Sie haben eine relativ kurze Verweildauer im Blutkreislauf [46]. Nach intravenöser Applikation werden Liposomen hauptsächlich in Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) der Leber und der Milz aufgenommen [47]. Dort reichern sie sich stark in den phagocytotischen Zellen des (RES) an [46]. Somit sind Conventional Liposomes für den Einsatz zur Freisetzung von Arzneien des RES prädestiniert [46].

### *Long-circulating liposomes*

Hierbei handelt es sich um Liposomen mit einer relativ langen Verweildauer im Blutkreislauf. Um Liposomen als Arzneistoffträger für Zellen außerhalb des RES zu nutzen, werden sie mit Polyethylenglycol (PEG) „gecoatet“, wodurch die Zirkulationszeit der Liposomen im Blut

erhöht wird. Diese Liposomen werden auch Stealth-Liposomen genannt und haben im menschlichen Organismus eine Halbwertszeit von rund 48 Stunden. Vor allem in Tumoren, die häufig sehr gut vaskularisiert sind [48] und deren Gefäße durch geweitete, interendotheliale Verbindungen charakterisiert sind, erhöht sich hierbei die Aufnahmewahrscheinlichkeit der Liposomen deutlich [46]. In klinischer Anwendung befinden sie sich bereits als Doxorubicin-Liposomen (Caelyx<sup>®</sup>).

### *Immuno-Liposomen*

Immuno-Liposomen sind mit speziellen Antikörpern an der Oberfläche der Liposomen ausgestattet. Obwohl Immuno-Liposomen für mehrere therapeutische Zwecke untersucht worden sind, werden sie vorwiegend für die gezielte Freisetzung von Antikrebsmitteln eingesetzt. Auch diese Liposomen werden (bei intravenöser Applikation) zusätzlich mit Polyethylenglycol gecoatet, damit erhöht sich die Chance, dass der Arzneiträger den Zielort erreicht. Diese Liposomen werden auch Targeted-Liposomen (engl. target=Ziel) bezeichnet, da sie zielgerichtet den Arzneistoff freisetzen [46].

### *Kationische-Liposomen*

Diese Liposomen sind mit kationischen Kompartements ausgestattet mit dem Ziel, dass die positiv geladene Lipidkomponente mit der negativ-geladenen DNA interagiert. Dadurch nimmt die DNA eine kompaktere Struktur an. Die entstandenen Lipid-DNA-Komplexe stellen eine Schutzfunktion auf zellulärer Ebene dar.

### *Thermosensitive Liposomen*

Bei thermosensitiven Liposomen erfolgt die Arzneifreisetzung durch spezielle, lokale Erwärmung (Hyperthermie). Durch Hyperthermie kann die Tumoranreicherung von Liposomen gefördert, sowie die Freisetzung des eingeschlossenen Wirkstoffes induziert werden [49]. Thermosensitivität von Liposomen wird durch die Phasenumwandlung der Phospholipide innerhalb der Liposomenmembran erreicht. Wird die Phasenumwandlungstemperatur durchlaufen, so kommt es zu einer kurzzeitigen Membranstabilität und konsekutiver Freisetzung des liposomalen Inhalts [49].

In Abbildung 4.9 sind noch einmal schematisch die Liposomen, die bereits in der Pharmazie Anwendung finden, dargestellt.

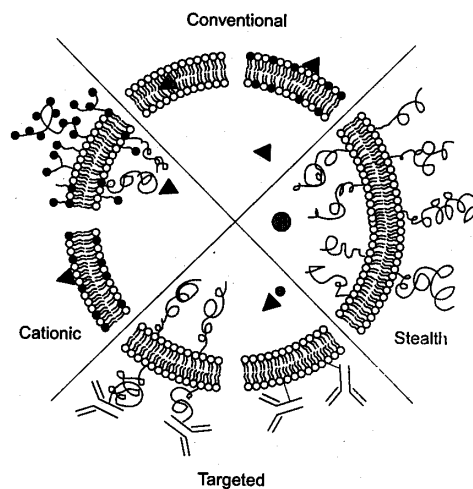


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung der oben genannten Liposomenarten wie sie in der Medizin Anwendung finden (nach [46]). Die Conventional-Liposomes sind entweder negativ geladen oder elektrisch neutral. Die Stealth-Liposomen sind mit dem Polymer Polyethylenglycol (PEG) „gecoatet“. Die Immuno-Liposomen sind mit Antikörper spezifisch präpariert, können zusätzlich aber auch mit PEG-Polymeren gecoatet sein. Bei den kationischen Liposomen interagieren die positiv-geladenen Lipidkomponenten mit der negativ geladenen DNA. Thermosensitive Liposomen sind hier nicht aufgeführt.

## 4.5 Präparation von Liposomen

Im folgenden werden Liposomenpräparationsmethoden vorgestellt, die bereits unter anderem in der Pharmazie Verwendung finden. Da im Rahmen dieser Dissertation nach einer geeigneten Liposomenpräparation gesucht wurde, sollen im folgenden die gängigsten Liposomenpräparationsverfahren mit ihren Vor- und Nachteilen vorgestellt werden.

### *Filmmethode:*

Bei der Filmmethode wird das Lipid (z.B. DMPC) mit einem geeigneten Lösungsmittel (z.B. Chloroform/Methanol 2:1) gelöst. Das Lösungsmittel wird mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei einer Temperatur (20-40 °C) und einem Druck von ca. 30 mbar wieder entfernt. Dabei bildet sich an der Innenseite des Kolbens ein Lipidfilm. Nach der

vollständigen Entfernung des Lösungsmittels gibt man etwas Phosphatpuffer und Glaskugeln dazu und schüttelt das Ganze bei 40°C (Wasserbad) auf. Dadurch bilden sich Liposomen aus.

Vorteile:

Relativ einfaches Verfahren; hohe Farbstoffbeladung möglich

Nachteile:

Sehr inhomogene Größenverteilung von hauptsächlich größeren multilamellar vesicles (MLV) bis zu wenigen small unilamellaren vesicles (SUV) [50]

### *Injection:*

Das Lipid wird in Ethanol oder Ether gelöst. Diese Lipidlösung wird sodann über eine Art Spritze (feine Nadel) in eine wässrige Lösung injiziert, wobei sich dabei spontan hauptsächlich SUV bilden [50]. Die Vesikelgröße hängt ab von der Lipidkonzentration. Eine 3 mM-Lipidlösung erlaubt z.B. eine Liposomengröße von rund 30 nm; Eine 30 mM-Lipidlösung dagegen eine Vesikelgröße von ca. 100nm.

Vorteile:

Relativ einfaches Verfahren;

Bei Etherinjection wird eine Lipidperoxidation stark vermindert; Lipidperoxidationen sind bei der Liposomenherstellung generell zu berücksichtigen.

Nachteile:

Sehr inhomogene Größenverteilung der Liposomen

### *Ultraschallbehandlung:*

Um die Liposomengröße zu reduzieren muss eine hohe Energieabgabe an die Liposomensuspension erfolgen. Dies kann man sehr gut mit Ultraschall bei entsprechend hoher Beschallungsenergie erfolgen.

### *Ultraschallbehandlung mit einem Ultraschall-Stab:*

Das Lipid wird mit einem geeigneten Lösungsmittel (z.B. Chloroform) gelöst. Danach erfolgt der Trocknungsprozess. Nach Zugabe einer wässrigen Lösung, wird durch einen Schüttlungsprozess der Lipidfilm von der Glaswand getrennt. Danach erfolgt die Beschallung mit dem Ultraschall-Stab, wobei die Probe im Eisbad gekühlt wird, da durch die enorm hohe Schwingungsenergie hohe Temperaturen entstehen. Wichtig ist jedoch, dass die Liposomenpräparation oberhalb der Phasenübergangstemperatur erfolgt. Man erhält bei diesem Prozess hauptsächlich SUV bei richtiger Handhabung [51].



Vorteil:

Sehr gute Methode die Größe der Liposomen zu reduzieren (bis zu 25 nm)

Relativ homogene Größenverteilung

Nachteile:

Durch hohe US-Intensität können die Liposomen während des Präparationsprozesses degradieren [51].

In der Regel befinden sich Metallpartikel vom Ultraschallstab in der Lipidsuspension.

### *Ultraschallbehandlung mit einem Ultraschallbad*

Siehe Abschnitt 6.2.1

### *French Press*

French Press ist eine Methode bei der durch eine vorangegangene Liposomenpräparation größere Liposomen (z.B. MLV) unter sehr hohem Druck (1400-2800 atm) durch ein Filter (z.B. Polycarbonat Membran) [50] gepresst werden. Die extrudierten Liposomen weisen dann eine sehr homogene Größenverteilung auf. Es können dabei SUV bis zu einer Größe von 30 nm hergestellt werden. Außerdem kann über die Druckregelung die Größe der Liposomen eingestellt werden.

Vorteile:

Sehr homogene Größenverteilung,

### *Extrusion*

Eine sanftere Methode als die French Press Methode um die Größe der Liposomen zu reduzieren wird durch Extrusion erreicht [50]. Hier wird bei Drücken unterhalb von 6,9 atm. gearbeitet. Dabei wird die Liposomensuspension durch einen Membranfilter mit einer definierten Porengröße gepresst. Je nach Porengröße erhält man Liposomen mit einem entsprechenden Durchmesser oder kleiner. Die Extrusions-Technik wurde schließlich im wesentlichen in dieser vorliegenden Arbeit verwendet (siehe Abschnitt 6.2.2).

Vorteile:

Sehr homogene Größenverteilung, die Liposomen sind nach der Präparation relativ stabil.

Wichtig bei allen Liposomenpräparationsmethoden:

Bei allen Liposomenpräparationen sollten mögliche Oxidationsprozesse auf ein Minimum gehalten werden (z. B. Lipidperoxidationen).

Dem kann entgegengewirkt werden durch:

- i) frische Proben, frisch destilliertes Wasser
- ii) Vermeidung von zu hohen Präparationstemperaturen
- iii) Arbeitsprozesse unter Ausschluß von Sauerstoff
- iv) Einleitung von Stickstoff in die wässrigen Lipidsuspensionen
- v) Lagerung der Liposomensuspensionen unter inerter Atmosphäre
- vi) Zugabe von Antioxidantien in die Lipidmembranen

## 5 Verwendete Substanzen

### 5.1 Perylen-Diimid

Bei dem Perylenderivat (N,N'-Di-(2',6'-dimethyl-phenyl)-perylene-3.4.9.10-tetracarbonsäurediimid, mit der BASF internen Nomenklatur KF 241) siehe Abbildung 1, handelt es sich um ein Farbstoffmolekül mit der molare Masse von 598,65 g/mol [52]. Die polaren Imidgruppen ( $\text{O}=\text{C}-\text{N}-\text{C}=\text{O}$ ) verleihen dem Molekül amphiphilen Charakter. Das Perylenderivat lässt sich daher gut in biologische Membranen wie Liposomen einbauen. Der Farbstoff wurde durch Ultraschallbehandlung in Liposomen eingebaut (siehe Abschnitt 6.2), bei  $\lambda=488\text{nm}$  angeregt und im Fluoreszenzmaximum bei  $\lambda=536\text{nm}$  detektiert, wobei hier von einer Endoperoxidbildung durch Autoperoxidation ausgegangen wird. Das Perylenderivat zeichnet sich durch hohe Photostabilität aus.

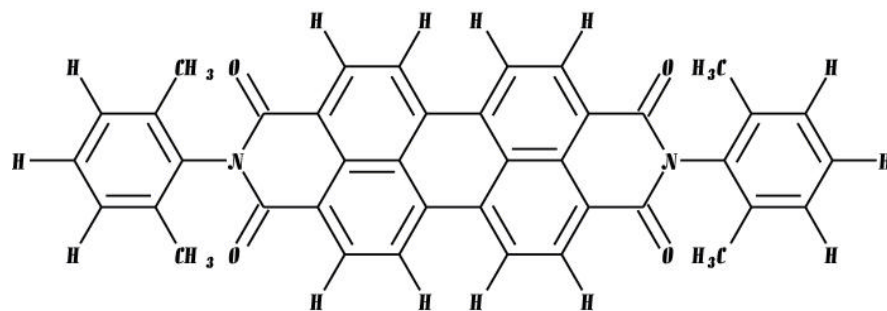


Abbildung 5.1. Strukturformel des Perylenderivates (N,N'-Di-(2',6'-dimethyl-phenyl)-perylene-3.4.9.10-tetracarbonsäurediimid).

### 5.2 Singulett-Sauerstoff Speichermoleküle: Naphthalin-Derivate

Wie in Abschnitt 3.1 erwähnt sind Naphthalin-Derivate geeignet, Singulett-Sauerstoff zu „speichern“. 1,4-Dimethylnaphthalin ist ein Naphthalinderivat, das prädestiniert ist, an den Positionen 1 und 4, wo jeweils eine Methylgruppe hängt, Singulett-Sauerstoff einzufangen. Dabei entsteht ein Endoperoxid (siehe Abbildung 5.2), das durch eine Peroxidkette über dem entsprechenden Benzolring charakterisiert ist [53]. 1,4-Dimethylnaphthalin wurde sowohl in Liposomen als auch in Polymere eingebaut. Zur Endoperoxidbildung wurde das Naphthalinderivat zusätzlich mit einem geeigneten Sensibilisator in Liposomen bzw. Polymere (Polyvinylbutyral) eingebaut, und anschließend mit dem Laser bestrahlt. Diese Endoperoxide

sind bei Raumtemperatur ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ) relativ instabil, d.h. in Lösung haben sie bei dieser Temperatur eine Halbwertszeit von etwa 5h [54] und sind somit zur Demonstration der Erhöhung der Stabilisierung in Polymeren gut geeignet (vgl. Abschnitt 7.7).

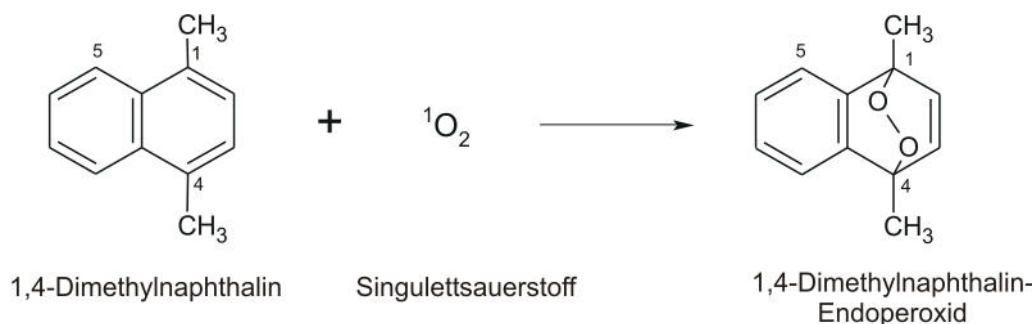


Abbildung 5.2: Bildung von 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxid durch Einfang von Singulett-Sauerstoff. Zusätzlich sind die Positionen 1,4 bzw. 5 der entsprechenden Kohlenstoffatome eingetragen.

1,4- Dimethylnaphthalin wurde von Sigma-Aldrich bezogen.

Im Zusammenhang mit Zellversuchen kam 1,4,5-Trimethylnaphthalin zum Einsatz. 1,4,5-Trimethylnaphthalin bildet ebenfalls unter gleicher Voraussetzung wie oben Endoperoxide. Dabei unterscheidet sich das 1,4,5-Trimethylnaphthalin von 1,4-Dimethylnaphthalin nur durch eine zusätzliche Methylgruppe an der 5. Position des Aromaten (vgl. Abbildung 5.2). Die Zerfallshalbwertszeit des Endoperoxides von 1,4,5-Trimethylnaphthalins in Lösung ist deutlich höher als bei 1,4-Trimethylnaphthalin. Sie beträgt nach Turro [4] bei  $25^{\circ}\text{C}$  ca. 91 Stunden und bei  $37^{\circ}\text{C}$  ca. 19 Stunden. Diese Zeiten sind im Zusammenhang mit Zellexperimenten vorteilhaft, um Effekte an Tumorzellen durch die Freisetzung von Singulett-Sauerstoff nachzuweisen. 1,4,5-Trimethylnaphthalin (von Sigma-Aldrich) wurde nur in Liposomen eingebaut.

### 5.3 Photosensibilisator: Protoporphyrin IX-Dimethylester

Bei Protoporphyrin IX – Dimethylester (PPIX-DME) handelt es sich um einen Photosensibilisator, der aus Protoporphyrin IX (siehe Abbildung 5.3) besteht, welches unter anderem in den Mitochondrien von lebenden Zellen aus 5-Aminolävulinsäure metabolisiert wird. Durch einen Veresterungsprozess mit Methanol entsteht PPIX-DME. PPIX-DME wurde in unserem Falle bei 514 nm mit dem Argon-Ionen-Laser angeregt wird. Der dabei entstehende  $^1\text{O}_2$  wird über Naphthalin-Derivate (siehe obiges Beispiel) chemisch gebunden. PPIX-DME (von Sigma-Aldrich) wurde zusammen mit einem der oben genannten Naphthalin-Derivate sowohl in Liposomen, als auch in das amorphe Polymer Polyvinylbutyral (PVB) zur Endoperoxidbildung eingebaut.

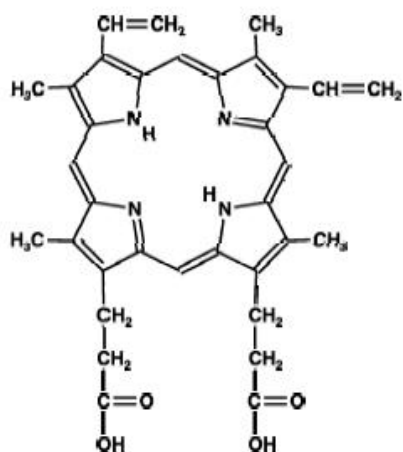


Abbildung 5.3: Strukturformel des Photosensibilisators Protoporphyrin IX (PP IX), das unter anderem in der Photodynamischen Therapie zum Einsatz kommt.

## 5.4 Liposomenmaterial

Im Rahmen dieser Dissertation wurden ausschließlich Lipide mit gesättigten Fettsäureketten verwendet. Es handelt sich hierbei um *1,2-Dimyristoyl-L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine (DMPC)* bzw. *1,2-Distearoyl-L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine (DSPC)* (von Sigma-Aldrich) mit 14 bzw. 18 Kohlenstoffatomen in den Fettsäureketten (siehe Abschnitt 4.4). Das Material eignet sich gut, um die oben genannten lipophilen bzw. amphiphilen Moleküle einzubauen. Mit diesen Liposomenmaterialien wurden mit Hilfe des Liposofast (siehe Abschnitt 6.2) unilamellare Liposomen mit einer homogenen Größenverteilung von 100nm hergestellt. Ebenfalls kamen Liposomen mit einer inhomogenen Größenverteilung von 100 bis etwa 1000nm zum Einsatz, hergestellt mit dem Ultraschallbad.

## 5.5 Polyvinylbutyral (PVB)

Für einen Teil der Messungen zur Demonstration der Stabilisierung von Endoperoxiden wurde das Polymer Polyvinylbutyral (PVB) verwendet. Diese Matrix ist in verschiedenen Arbeiten bereits untersucht worden [25,55]. PVB ist ein Kopolymer mit verschiedenen Anteilen an Azetal-, Ester- und Hydroxylgruppen. Diese sind statistisch in der Polymerkette verteilt und behindern sich gegenseitig durch ihre unterschiedliche räumliche Struktur, so dass PVB-Schichten immer amorph vorliegen. Die einzelnen Gruppen sind polar und besitzen permanente Dipolmomente.

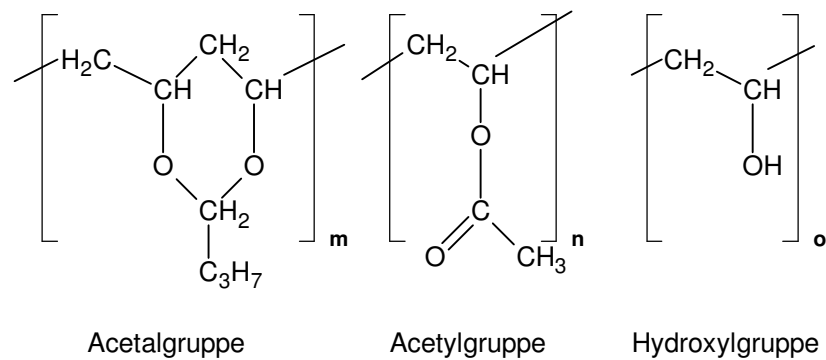


Abbildung 5.4: Struktur der Monomereinheiten von Polyvinylbutyral (PVB).

Als Ausgangsmaterial zur Herstellung von PVB-Polymerfilmen liegt PVB als feines, weißes Pulver vor (Mowital B 60 T Fa. Höchst, Dichte=1,1mg/ml). Das Polymer wurde in Ethanol aufgelöst mit einem Massenanteil von PVB zu Ethanol von 25%. Dabei entsteht eine glasklare hochviskose Flüssigkeit, aus der man nach Verdunsten des Alkohols einen glasklaren, amorphen Film aus PVB erhält. Durch die statistische Anordnung der Monomereinheiten und die unterschiedlichen Seitenketten wird eine Kristallisation verhindert. Tabelle 5.1 gibt die jeweiligen Konzentrationen der in Abbildung 5.4 dargestellten Gruppen an.

Bezeichnung	Acetalgruppe	Acetylgruppe	Hydroxylgruppe
Relative Häufigkeit	62,2%	3,7%	34,1%
Konzentration [mol/l]	6,39	0,38	3,5

Tabelle 5.1: Molare Konzentrationen der verschiedenen Seitengruppen des Kopolymers PVB (nach [56]).

Der Einbau des Perylen-Derivates sowie der Naphthalin-Derivate mit einem geeigneten Sensibilisator in PVB erfolgte durch Auflösung der beiden Komponenten in Chloroform und der darauffolgenden Zugabe zum Polymer. Dabei wurde die Konzentration der Dotierung so gewählt, dass sie als Monomere vorlagen. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Chloroformanteil beim Trocknungsprozess des Polymers vernachlässigbar gering ist.

# 6 Präparation und Durchführung

## 6.1 Grundlagen der Fluoreszenzmessungen

Die laserinduzierte Synthese der aromatischen Endoperoxide wird sowohl bei dem Prozess der Autoperoxidation, als auch bei dem Prozess des  $^1\text{O}_2$ -Einfangs über Naphthalinderivate durch eine vorangegangene Photosensibilisierung mit Hilfe eines Photosensibilisators (Trapping-Prozess) indirekt über die Fluoreszenzreduktion der aromatischen Ausgangsprodukte nachgewiesen. Um mit dieser Methode Aussagen über die Bildung von Endoperoxiden zu ermöglichen, muss gewährleistet sein, dass die Fluoreszenz bei der Detektionswellenlänge auf die freien aromatischen Molekülen eingeschränkt werden kann, das heißt die aromatischen Moleküle, die ein Singulett-Sauerstoffmolekül in Form eines Endoperoxides gebunden haben, dürfen bei der Detektionswellenlänge nicht mehr fluoreszieren. Umgekehrt kann natürlich durch Thermolyse der Zerfall der Endoperoxide in das zugrundeliegende aromatische Molekül und Singulett-Sauerstoff ebenfalls quantitativ ermittelt werden. Während das Absorptionsmaximum von 1,4-Dimethylnaphthalin bzw. 1,4,5-Trimethylnaphthalin bei etwa 270 nm liegt, absorbieren deren Endoperoxide aufgrund der Sauerstoffbrücke über einem Benzolring und dem dadurch fehlenden durchkonjugiertem  $\pi$ -Elektronsystem bei etwa 240 nm. Bei der Anregung von 240 nm sind jedoch Absorptions- bzw. Emissionsmessungen wegen zusätzlicher Absorptionen der umgebenden Matrix des aromatischen Moleküls schwer zugänglich. Im Falle des Perylen-Diimids bestehend aus einem aromatischen Molekül mit mehreren Benzolringen können leider keine Aussagen über die Lokalisation der Sauerstoffbrücke (Peroxidkette), sowie deren Anzahl solcher Peroxidketten innerhalb des Moleküls gemacht werden, sodass auch hier keine Aussagen über Absorption- bzw. Emission der Endoperoxide gemacht werden können.

Abbildung 6.1 zeigt das Absorptionsspektrum bzw. Emissionsspektrum des verwendeten Perylen-Diimids (KF 241 von der Firma BASF), bei der durch Einbettung in Liposomen und anschließender Autoperoxidation durch Laserbestrahlung mit einem Argon-Ionen-Laser ( $\lambda=488\text{nm}$ ) ein Absinken des gesamten Emissionsspektrums beobachtet werden konnte, was auf eine Bildung von Endoperoxiden hinweist.

Abbildung 6.2 zeigt das Absorptionsspektrum bzw. Emissionsspektrum von 1,4-Dimethylnaphthalin und 1,4,5-Trimethylnaphthalin das über den Einfang von  $^1\text{O}_2$  1,4-Dimethylnaphthalin bzw. 1,4,5-Trimethylnaphthalin-Endoperoxide bildet, wobei der  $^1\text{O}_2$  durch Laseranregung eines geeigneten Sensitizers erzeugt wird. Zur Erzeugung des  $^1\text{O}_2$  wurde der Photosensibilisator Protoporphyrin IX-Dimethylester (PPXI-DME) verwendet.

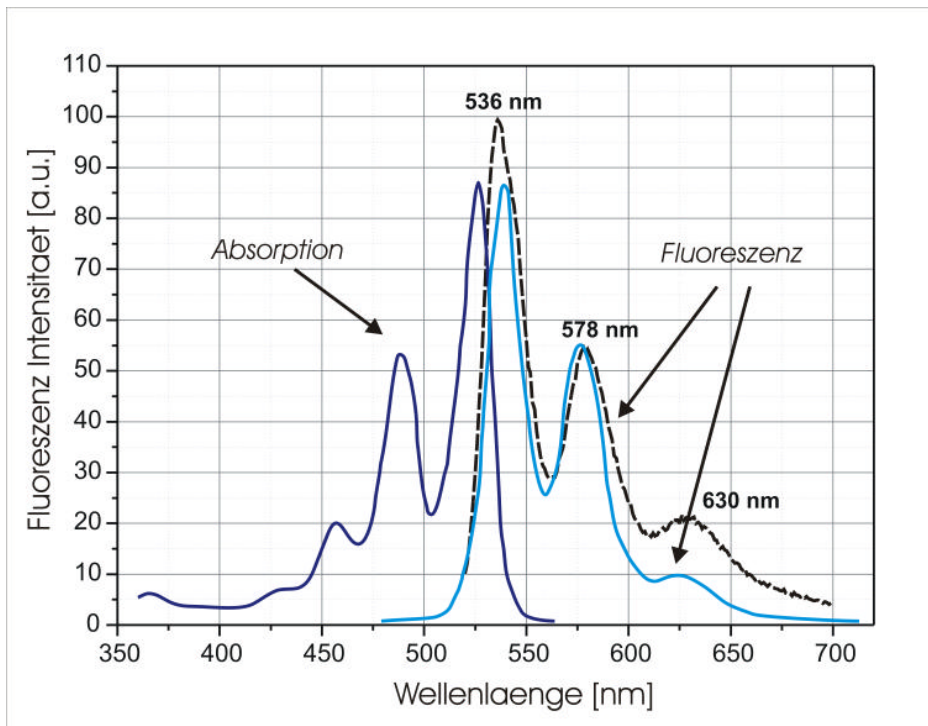


Abbildung 6.1: Emissionsspektrum des oben genannten Perylenderivates in Liposomen gestrichelt (nach [57]). Zum Vergleich das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum nach [58] in Lösung.

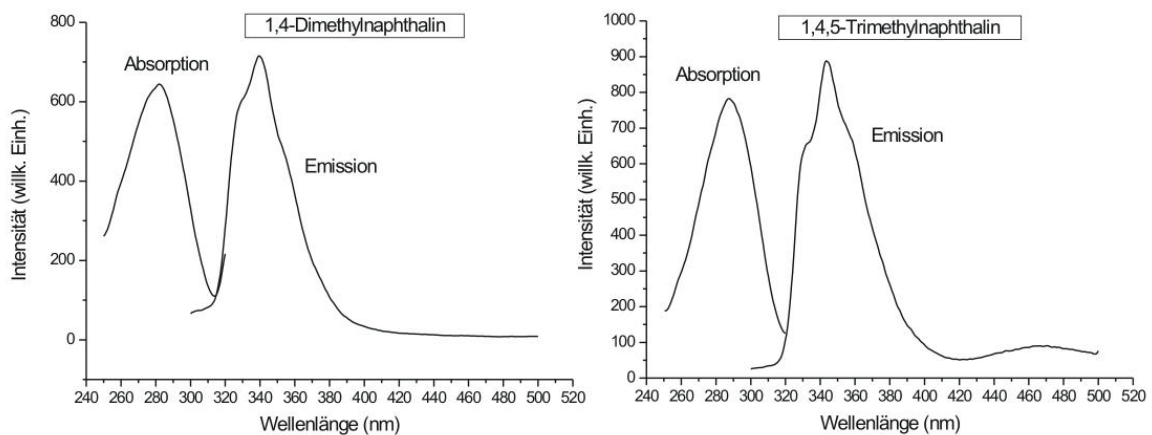


Abbildung 6.2: Absorptions- bzw. Emissionsspektrum von 1,4-Dimethylnaphthalin und 1,4,5-Trimethylnaphthalin. Die Naphthalin-Derivate wurden in Liposomen eingebaut (Liposomenpräparation nach Abschnitt 6.2.2), danach wurde die Liposomensuspension in Methanol 1:10 verdünnt. Die beiden Spektren wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer aufgenommen (Perkin Elmer, LS 50 B).



### 6.1.1 Fluoreszenzmessungen am Monochromator

Der zeitliche Abfall der Fluoreszenzintensität aufgrund der Endoperoxidbildung sowie die Fluoreszenzmessungen mit Polymerproben wurden am Doppelmonochromator (Spex 1402) mit Photomultiplier (RCA 31043/A02) durchgeführt. Bei Fluoreszenzuntersuchungen des Perylen-Diimids in Liposomen wurde mit einem Argon-Ionen-Laser bei  $\lambda_{ex}=514\text{nm}$  angeregt und am Doppelmonochromator bei  $\lambda_{det}=536\text{ nm}$  die Fluoreszenz des Farbstoffes detektiert. Die Fluoreszenzintensität der Naphthalin-Derivate wurde ebenfalls am Doppelmonochromator detektiert. Beide Komponenten, sowohl eines der Naphthalin-Derivate als auch der Photosensitizer, wurden in Liposomen, bzw. in das Polymer Polyvinylbutyral eingebaut. Die Fluoreszenzanregung der Naphthalin-Derivate erfolgte mit einem Helium-Cadmium-Laser ( $\lambda_{anreg} = 325\text{nm}$ ), wobei die Fluoreszenz über einen Doppelmonochromator bei  $\lambda_{det} = 346\text{nm}$  detektiert wurde. Durch den zeitlichen Abfall der Fluoreszenzintensität bei 346 nm aufgrund der zusätzlichen Sensitizeranregung bei 514 nm kann indirekt auf die Endoperoxid-Ausbeute des Naphthalin-Derivats geschlossen werden, da diese Endoperoxide bei  $\lambda_{det} = 346\text{nm}$  nicht mehr fluoreszieren, sondern wie in Abschnitt 6.1 erwähnt, bei etwa 240 nm.

### 6.1.2 Fluoreszenzmessungen am Fluoreszenzspektrometer

Bei dotierten Liposomensuspensionen (siehe Abschnitt 6.2.1) tritt im allgemeinen eine zeitlich veränderliche Fluoreszenzintensität auf, deren Ursache auf die Liposomenfusion zurückgeführt werden kann. Des weiteren ist der Phasenübergang der Liposomen zu beachten. Dabei kann die Fluoreszenzintensität der dotierten Liposomen beim Erwärmen über der Phasenübergangstemperatur um ein vielfaches Ansteigen [57]. Wird die Temperatur wieder unter die Phasenübergangstemperatur gesenkt, so sinkt die Fluoreszenz wieder stark ab, erreicht jedoch nicht mehr den Ausgangswert [57]. Reproduzierbare Messverfahren bezüglich der Fluoreszenzintensität sind allerdings in diesem Zusammenhang vor allem bei der Thermolyse der Endoperoxide von Bedeutung, da hierfür unter anderem Temperaturen oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Liposomen nötig sind. Des weiteren ist natürlich die Fluoreszenzintensität temperaturabhängig.

Aufgrund der oben genannten Probleme wurden die mit Farbstoff bzw. Naphthalin-Derivat und PPIX-DME dotierten Liposomen vor bzw. nach der Bestrahlung mit dem Argon-Ionen-Laser in Methanol mit einem wohldefinierten Mischungsverhältnis verdünnt, in eine Quarzküvette gefüllt und an einem Fluoreszenzspektrometer bei einer bestimmten Temperatur die relative Fluoreszenzintensität ermittelt. Aus den Fluoreszenzwerten vor bzw. nach der Laserbestrahlung kann dann auf die Endoperoxidkonzentration geschlossen werden, wenn

man die Untergrundfluoreszenz der Liposomen berücksichtigt. Der prozentuale Anteil  $\Delta_{Fl}$  der Endoperoxid-Ausbeute ergibt sich dann zu:

$$\Delta_{Fl} = \frac{I_n - I_u}{I_g - I_u} \cdot 100\% \quad (6.1)$$

Mit  $I_g$  der Gesamtfluoreszenz also der Fluoreszenzintensität vor Laserbestrahlung,  $I_n$  der Fluoreszenzintensität nach der Laserbestrahlung und  $I_u$  der Untergrundfluoreszenzintensität.

$RF = \frac{\Delta_{Fl}}{100\%}$  wird als der Reduktionsfaktor bezeichnet, d.h. der Faktor um wie viel die Fluoreszenzintensität reduziert wurde.

Ebenso kann die bei der Thermolyse der Endoperoxide die wieder auftretende prozentuale Fluoreszenz  $\Delta_{Fl}$  (rück) der zugrunde liegenden Aromaten ermittelt werden zu:

$$\Delta_{Fl}(\text{rück}) = \frac{I_{nth} - I_u}{I_g - I_u} \cdot 100\%$$

mit  $I_{nth}$  der Fluoreszenz nach der Thermolyse. Geht man davon aus, dass alle Endoperoxide durch Thermolyse in die zugrunde liegenden Aromaten umgewandelt werden, und durch Laserbestrahlung keine photochemischen Nebenprodukte entstehen, so kann man von einer 100%igen Fluoreszenzrücksetzung ausgehen. Somit ist dann:

$$\Delta_{Fl}(\text{rück}) = \frac{I_{nth} - I_{vth}}{I_g - I_{vth}} \cdot 100\% = 100\% .$$

## 6.2 Liposomenpräparationen

### 6.2.1 Liposomenherstellung durch Ultraschallbadbehandlung

Bei der Ultraschallbadbehandlung wird dem Lipid (z.B. DMPC) Wasser (Millipore Qualität) hinzugefügt und 30 min lang im Ultraschallbad oberhalb der Phasenübergangstemperatur beschallt, wobei man hier sowohl SUV (small unilamellar vesicles) sowie multilamellare Liposomen [51] mit einer sehr inhomogenen Größenverteilung von 100nm bis 1000nm erhält.

Dabei wurde die Lipidkonzentration so gewählt, dass der Lipidanteil zu Wasser 1mg/ml betrug.

Um die Liposomen mit dem Perylen-Derivat zu dotieren wurde der Farbstoff zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst und dabei eine  $10^{-3}$  molare Stammlösung hergestellt. Zur Präparation von Liposomen mit Farbstoffdotierung wird 40  $\mu$ l der oben genannten Perylen-Derivat-Stammlösung dem Lipid-Wasser-Gemisch hinzugefügt und ebenso mit dem Ultraschallbad (Fa. Bandelin, Sonorex) 30 min lang beschallt. Während der Behandlung mit dem Ultraschallbad erfolgt auch die Einlagerung des Perylen-Derivates in die Liposomenmembran. Zur Liposomenherstellung wurde dabei DMPC bzw. DSPC verwendet, da diese Lipide vollständig gesättigte Fettsäureketten besitzen und dadurch stabil gegenüber Oxidationen durch Singulett-Sauerstoff  $^1\text{O}_2$  sind, der durch die laserninduzierte Synthese von Endoperoxiden in den Liposomen auftritt

## 6.2.2 Liposomenherstellung durch Extrusion

Neben der Herstellung der Liposomen durch Ultraschallbadbehandlung, wodurch man Liposomen mit einer sehr inhomogenen Größenverteilung erhält, kam vor allem die sogenannte Extrusionstechnik mit dem Liposofast (Fa. Avestin) zum Einsatz, bei der man Liposomen mit einer sehr homogenen Größenverteilung erhält. Das Prinzip der Liposomenherstellung mit dem Liposofast ist in Abbildung 6.3 dargestellt. Als erstes wird das Lipid in Chloroform gelöst. Bei Dotierung der Liposomen mit Naphthalin-Derivaten bzw. dem zusätzlichen Einbau des Sensibilisators werden sowohl das Naphthalin-Derivat als auch der Sensitizer in Chloroform gelöst und der Lipid-Chloroform-Lösung hinzugegeben. Im weiteren Schritt wird das Chloroform oberhalb der Phasentemperatur des Lipides unter Einfluss von gasförmigen Stickstoff verdunstet siehe Abbildung 6.3 (1), sodass sich nach kurzer Zeit ein Lipidfilm am Rande der Gefäßwand eines Reagenzglases ausbildet (2). Wenn das Lipid trocken ist, wird dem bereits entstandenen Lipidfilm Wasser (Millipore Qualität) hinzugefügt (3) und so stark aufgerührt, sodass sich der Lipidfilm von der Gefäßwand löst. Dabei entsteht eine Liposomensuspension aus multilamillaren Liposomen mit einer extrem unterschiedlichen Größenverteilung (4). Diese Liposomensuspension wird dann wiederum oberhalb der Phasenübergangstemperatur des Lipides durch ein Polycarbonatmembranfilter mit einer wohl definierten Porengröße z. B. 100 nm mehrmals durchgedrückt, bei der man nach dem Prozess unilamellare Liposomen mit dem entsprechenden Durchmesser und einer sehr homogenen Größenverteilung erhält (5).

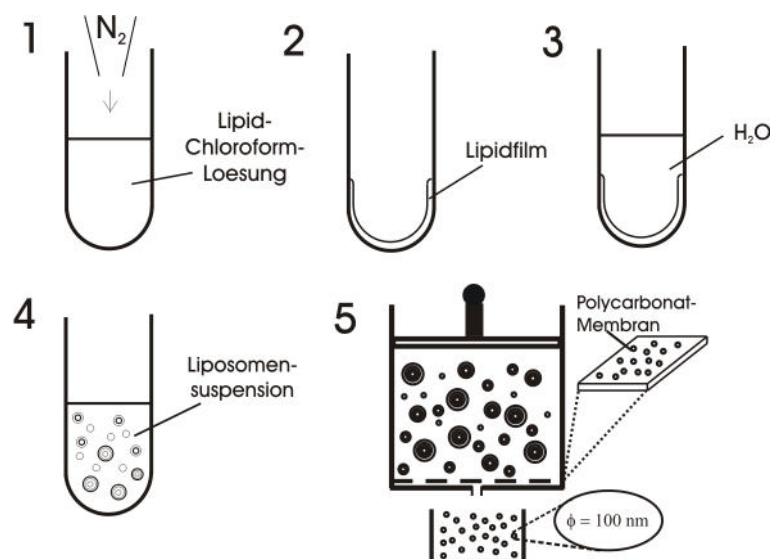


Abbildung 6.3: Prinzip der Liposomenherstellung mit dem Liposofast (Erklärung siehe Text).

Die oben genannte Liposomenpräparation wurde angewendet bei Dotierung mit 1,4-Dimethylnaphthalin bzw. 1,4,5-Trimethylnaphthalin und entsprechender Sensitizer-Dotierung bei Bedarf. Im allgemeinen wurden dabei Liposomen mit einem Durchmesser von 100 nm hergestellt, sodass bei der Darstellung der folgenden Messergebnisse ohne weiterer Erwähnung von dieser Liposomengröße ausgegangen werden kann.

Für die Dotierung der Liposomen mit dem Perylen-Derivat (KF241), bei dem durch Autoperoxidation Endperoxide gebildet wurden, wurde den undotierten Liposomen (hergestellt mit dem Liposofast) 40  $\mu\text{l}$  der  $10^{-3}$  molaren Stammlösung (KF241 in DMSO) hinzugegeben und danach 30 min im Ultraschallbad beschallt. Dabei wurde bei der Zugabe der Stammlösung geachtet, dass die Stammlösung maximal 10% DMSO enthalten darf. Diese Forderung ist im Hinblick auf die Versuchsreihen an Tumorzellen zu sehen, da ein erhöhter Gehalt an DMSO eine hemmende Wirkung auf das Wachstum der Zellpopulation besitzen kann. Überschüssiger Farbstoff wurde dabei nach der Ultraschallbadbehandlung mit einer Zentrifuge bei 20000 g (5min) abzentrifugiert und als Bodensatz verworfen. Der Überstand und somit die Liposomensuspension wurde danach ein weiteres mal mit Hilfe des Liposofastes durch ein Polycarbonatmembranfilter gedrückt.

Bei allen wässrigen Liposomensuspensionen betrug dabei die Lipidkonzentration in der Endform 1 mg/ml. Da durch die Behandlung der Liposomen mit dem Liposofast von einem Masseverlust des Lipides von etwa 20 % auszugehen ist, wurde entsprechend mehr Lipid als Ausgangsmaterial abgewogen. Die Dotierung der Aromaten (der Naphthalin-Derivate bzw. des Perylen-Diimides) wurde dabei so gewählt, dass keine Dimere im Lipid der Liposomen

vorlagen. Dazu wird das Verhältnis  $\alpha$  aus Anzahl  $N(\text{DMPC})$  der DMPC-Lipid-Moleküle und Anzahl  $N(\text{arom})$  der aromatischen Moleküle mittels folgender Gleichung bestimmt.

$$\alpha = \frac{N(\text{DMPC})}{N(\text{arom})}$$

Geht man davon aus, dass bei der Dotierung der Liposomen alle aromatischen Moleküle in die Liposomenmembran einbauen, so lässt sich die Konzentration des Aromaten sowohl im Lipid als auch in der Liposomensuspension ermitteln. Da die Massenkonzentration der Lipide in der Liposomen-Suspension 1 mg/ml beträgt und man z.B. die Dotierung der Aromaten so wählt, dass jedes 20 DMPC-Molekül ( $\alpha=20$ ) ein aromatisches Molekül trägt, so lässt sich die Konzentration in der Liposomensuspension folgendermaßen ermitteln:

Die Stoffmenge  $n$  von DMPC ergibt sich zu:

$$n(\text{DMPC}) = \frac{m(\text{DMPC})}{M(\text{DMPC})} \quad (6.2)$$

Wobei mit  $m$  die Masse des Lipids und  $M$  die Molare Masse des Lipids bezeichnet wird. Daraus ergibt sich für 1 mg und der molaren Masse von DMPC mit 677,9 g/mol eine Stoffmenge DMPC von  $1,47 \times 10^{-6}$  mol. Da dies jedoch zugleich die Stoffmenge an DMPC in einem Milliliter Suspension ist, kann daraus leicht die Konzentration  $c$  in der wässrigen Liposomensuspension (1 mg/ml) ermittelt werden mit  $V(\text{H}_2\text{O})$  dem Volumen des Wassers (im vorliegenden Fall 1 ml):

$$c(\text{DMPC}) = \frac{n(\text{DMPC})}{V(\text{H}_2\text{O})} \quad (6.3)$$

Somit ergibt sich die Konzentration  $c(\text{DMPC})$  zu  $1,47 \times 10^{-3}$  mol/l bezogen auf die Liposomensuspension. Eine entsprechend 20-fach geringere Konzentration muss dann die des aromatischen Moleküls betragen mit  $c(\text{arom}) = 7,37 \times 10^{-5}$  mol/l.

Um die Endoperoxidkonzentration der aromatischen Moleküle zu ermitteln, muss man dann noch den Reduktionsfaktor mit einbeziehen. Geht man davon aus, dass durch die Endoperoxidbildung der Moleküle die Fluoreszenzintensität verschwindet und die Untergrundfluoreszenz der umgebenden Matrix vernachlässigbar klein ist, so kann man nach Gl. (6.4) leicht die Endoperoxidkonzentration  $c$  (Endo) in Liposomen ermitteln.

$$c(\text{Endo}) = \frac{\Delta_{FI}}{100\%} c(\text{arom}) \quad (6.4)$$

Die Reduktionsfaktoren bei der Endoperoxidbildung der verwendeten Aromaten schwankten dabei zwischen etwa 50-80%. Es ist dabei zu berücksichtigen, dass der Reduktionsfaktor eine zeitabhängige Größe ist.

Im Zusammenhang der Liposomen soll noch eine Sprachkonvention eingeführt werden:

- **Leerliposomen**  
Leerliposomen sollen Liposomen bezeichnen, die nicht dotiert sind d.h. Liposomen, in denen kein aromatisches Molekül oder Sensibilisator eingebaut ist
- **Dotierte Liposomen**  
Dotierte Liposomen bezeichnet Liposomen, die entweder mit einem der oben genannten Aromaten dotiert sind oder zusätzlich zu den aromatischen Molekülen im Falle der Naphthalin-Derivate einen Sensibilisator tragen.
- **Endoperoxid-dotierte Liposomen**  
Endoperoxid-dotierte Liposomen sind bereits dotierte Liposomen die zusätzlich aufgrund der Laserbestrahlung Endoperoxide in sich tragen. Dabei ist zu bemerken, dass Endoperoxid-dotierte Liposomen im Zusammenhang mit Naphthalin-Derivaten immer zusätzlich mit einem Sensibilisator beladen sind. Für die Zellversuche sowie die Untersuchungen von Zellen am Konfokalmikroskop können sie auch als „Liposomen mit Wirksubstanz“ betrachtet werden

## 6.3 Präparation der Polymere

Zum Einbau der aromatischen Moleküle in Polymere wurde Polyvinylbutyral (PVB) verwendet. Dabei wurde PVB in Pulverform vorliegend in Ethanol (uvasol) aufgelöst, so dass der Massenanteil PVB zu Ethanol 0,25 betrug. Als PVB-Dotierung wurde 1,4-Dimethylnaphthalin mit dem Sensitizer PPIX-DME verwendet. Der Einbau in PVB erfolgte durch Auflösung der jeweiligen Komponenten mit Chloroform und der darauffolgenden Zugabe zum Polymer. Dabei wurde die Konzentration des Perylen-Derivates bzw. der Naphthalinderivate so gewählt, dass keine Dimere im Polymer vorlagen. Das Polymer wurde dann mit einem Pinsel im noch feuchten Zustand auf ein Substrat (in der Regel Objektträgerglas) aufgetragen und 1-2 Tage unter Ethanol-Atmosphäre gelagert. Dabei betrug die Schichtdicke des Polymerfleckes um die 40µm. Durch Laserbestrahlung der dotierten Polymere konnte dann mit Hilfe des Doppelmonochromators bei entsprechender Detektionswellenlänge des zu detektierenden Aromaten eine Abnahme der Fluoreszenzintensität durch Endoperoxidbildung beobachtet werden. Dabei wurde die Fläche des Laserstrahls mit Hilfe einer Linse auf die Größe des Polymerfleckes eingeengt. Nach der

Endoperoxidbildung wurden die Polymere mindestens eine Stunde bei  $10^{-3}$  Torr evakuiert um den restlichen Ethanolbestandteil aus dem Polymer zu entfernen. Die Evakuierung wurde vollzogen um für die Termolyse der Endoperoxide bei den zu vermessenden Proben gleiche Randbedingungen zu haben.

## 6.4 Messaufbau

Für die Versuche zur Fluoreszenzmessung am Doppelmonochromator wurde ein küvettenbasierter Aufbau verwendet, in den Küvetten verschiedener Größe eingesetzt werden konnten. Abbildung 6.4 zeigt den schematischen Aufbau zur Fluoreszenzmessung am Doppelmonochromator. Bei der Erzeugung der Endoperoxide durch Autoperoxidation wurde der in Liposomen eingebaute Farbstoff mit dem Argon-Ionen-Laser angeregt ( $\lambda_{ex}=514$  nm) und dessen Fluoreszenzintensität am Monochromator bei  $\lambda_{det}=536$  nm ermittelt. Dabei wird der Laserstrahl über Umlenkspiegel (S1-S4) auf die Küvette gelenkt. Ein Teil des Strahls wird mit Hilfe eines Quarzplättchens auf die Streuscheibe vor einer Photodiode gelenkt, die für die externe Normierung der Fluoreszenzintensität benötigt wird. Die Küvette befand sich in einer speziellen Halterung im Abstand  $d=50$  cm vor dem Eintrittsspalt des Doppelmonochromators und wurde über eine Sammellinse (Brennweite  $f=125$  mm) auf den Spalt abgebildet. Die Fluoreszenzintensität wird über den Doppelmonochromator, der an einem Photomultiplier angeschlossen ist, gemessen und an einem Messrechner ausgegeben. Der Messrechner ermittelt über das Ausgangssignal der Photodiode über einen vor Beginn der Messung bestimmten Normwert die jeweils normierte Fluoreszenzintensität.

Die Fluoreszenz der Naphthalinderivate wurde durch Anregung mit einem HeCd-Laser ( $\lambda_{ex}=325$ nm) und gleichzeitiger Fluoreszenzdetektion am Doppelmonochromator bei  $\lambda_{det}=346$ nm beobachtet. Die in diesem Falle zur Endoperoxidbildung nötige Sensibilisatoranregung wurde wiederum mit dem Argon-Ionen-Laser vollzogen. Dabei wurde der Laserstrahl mit Hilfe einer Sammellinse so eingengt, dass er die gesamte Breite der Küvette umfasste.

Um während der Synthese der Endoperoxide deren Zerfall in Liposomen zu verhindern, wurde die Probenküvette gekühlt, während im Falle der Thermolyse die Probe aufgeheizt werden musste. Die Küvette wurde daher durch zwei Durchflusskörper gehalten, die sowohl an einen Kühlkreislauf als auch an einen Heizkreislauf angeschlossen werden konnten. Der kombinierte Heiz-Kühl-Kreislauf ist mit einer Peltier-Kühlung und einen Badthermostaten verbunden (siehe Abbildung 6.5). Um in der Probenküvette das Absinken der Liposomen zu verhindern, wurden sie mit einem Magnetrührer gerührt. Die Messung der Temperatur erfolgte über ein Thermoelement.

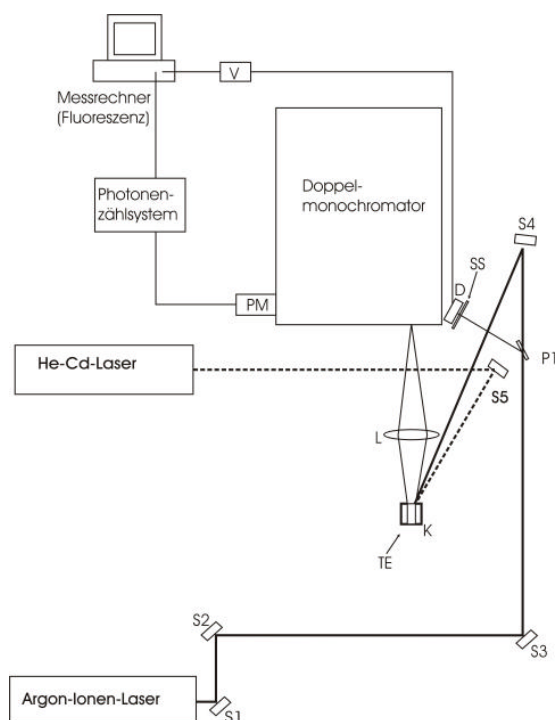


Abbildung 6.4: *Experimenteller Aufbau für Fluoreszenzuntersuchungen am Doppelmonochromator. Die Umlenkspiegel (S1-S4) lenken den Laserstrahl des Argon-Ionen-Lasers (durchgezogene Linie) auf die Küvette (K). Dabei wird ein Teil des Laserstrahls mittels eines Quarzplättchens (P1) ausgekoppelt und auf die Photodiode (D) gelenkt. Vor der Photodiode befindet sich eine Streuscheibe (SS). Die Küvette (K) wird über eine Sammellinse (L) auf den Eintrittsspalt des Monochromators abgebildet. Die Photodiode ist über einen Vorverstärker (V) mit dem Messrechner verbunden. Die Fluoreszenzintensität wird über den Doppelmonochromator, der an einem Photomultiplier (PM) angeschlossen ist, gemessen und an einem Messrechner ausgegeben. Die Temperaturkontrolle erfolgt durch ein Thermoelement (TE), das über ein Multimeter ausgelesen werden kann. Die gestrichelte Linie zeigt den Strahlengang des Helium-Cadmium-Lasers. Für die Fluoreszenzmessungen mit Polymeren wurde die Küvette durch einen Probenhalter ersetzt, in der das Glas bzw. Kupferplättchen mit dem Polymer eingeklemmt wurde.*

Für die Fluoreszenzmessungen mit Polymeren wurde die Küvettenhalterung durch einen Probenhalter für Glas bzw. Kupferplättchen von rund 1mm Dicke ersetzt. In diesen Probenhalter wurde das Glas bzw. Kupferplättchen mit dem Polymerfilm eingeklemmt, mit dem Laser bestrahlt, und dabei die Fluoreszenz des dotierten Polymerfleckes wiederum über eine Sammellinse (Brennweite  $f=125\text{mm}$ ) auf den Doppelmonochromator abgebildet. Die Endoperoxidbildung in den dotierten Polymeren erfolgte wiederum durch Laseranregung mit dem Argon-Ionen-Laser. Dabei wurde das Polymer mit 1,4-Dimethylnaphthalin (DMN) und PPIX-DME dotiert, wobei die Fluoreszenzreduktion ( $\lambda_{\text{det}}=346\text{nm}$ ) mit Hilfe des Helium-



Cadmium-Lasern ( $\lambda_{\text{ex}}=325\text{nm}$ ) beobachtet wurde. Zur Thermolyse der Endoperoxide in Polymeren wurde ein selbst präparierter Ofen, bestehend aus Heizplatte mit Aluminiumblock verwendet (siehe Abbildung 6.6).

## 6.5 Durchführung der Messungen

Zur Endoperoxidherstellung wurden die Liposomen-Suspensionen wie oben beschrieben in einer Glasküvette mit dem Argon-Ionen-Laser bestrahlt. Dabei wurde der Laserstrahl mit Hilfe einer Sammellinse so eingengt, dass er die gesamte Breite der Küvette umfasste (siehe Abbildung 6.7). Bei den Fluoreszenzmessungen mit dem He-Cd-Laser hatte der Laserfleck einen Durchmesser von etwa 5 mm und eine Leistungsdichte von etwa  $2\text{mW}/\text{cm}^2$ . Der Laserstrahl des He-Cd-Lasers wurde dabei mit einer Quarzsammellinse ( $f=100\text{ mm}$ ) auf den Probenort ( $\varnothing=5\text{mm}$ ) fokussiert. Analog wurde bei den Fluoreszenzmessungen mit dotierten Polymeren vorgegangen. Die Fluoreszenzintensität der Proben wurde wie oben beschrieben über eine Sammellinse auf den Eintrittsspalt des Doppelmonochromators abgebildet und mit Hilfe des Photomultipliers detektiert. Die Endoperoxidbildung in Liposomen erfolgte bei  $13^\circ\text{C}$  (unterhalb der Phasenübergangstemperatur der Liposomen) unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührfisch. Dabei wurde die Probe in der Küvette über einen Wasserkreislauf und Peltierkühlung abgekühlt und die Temperatur über ein Thermoelement, das an ein Multimeter angeschlossen war, überprüft. Mit Hilfe des Heizkreislaufes (siehe Abbildung 6.5) konnte die Thermolyse der Endoperoxide durchgeführt werden, wobei hier mit Hilfe eines Thermostaten das Wasser auf konstante Temperatur gehalten wurde

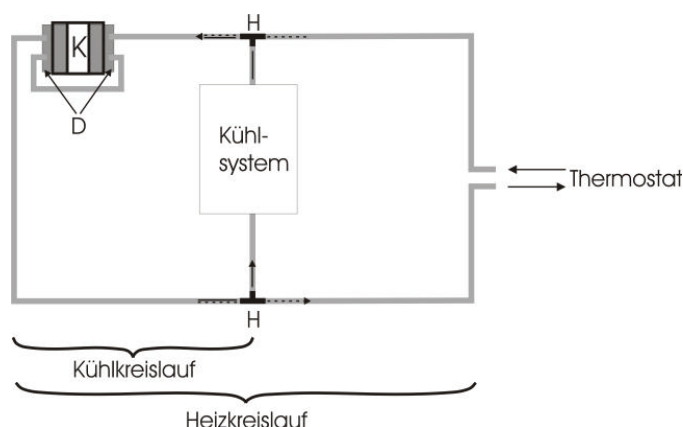


Abbildung 6.5: Schematischer Aufbau des Wasserkreislaufs für Kühlung und Heizung. Die Küvette (K) ist von einem Wasserdurchflusskörper (D) umgeben, der an einen Wasserkreislauf angeschlossen ist. Der kleinere Kühlkreislauf angedeutet durch die beiden durchgezogenen Pfeile wurde mit Peltier-Kühlung und Umlaufpumpe betrieben, während der größere Heizkreis (gestrichelte Pfeile) durch einen Thermostaten geregelt wurde. Durch die beiden Dreiwege-Hähne (H) konnte zwischen den zwei Wasserkreisläufen gewählt werden.

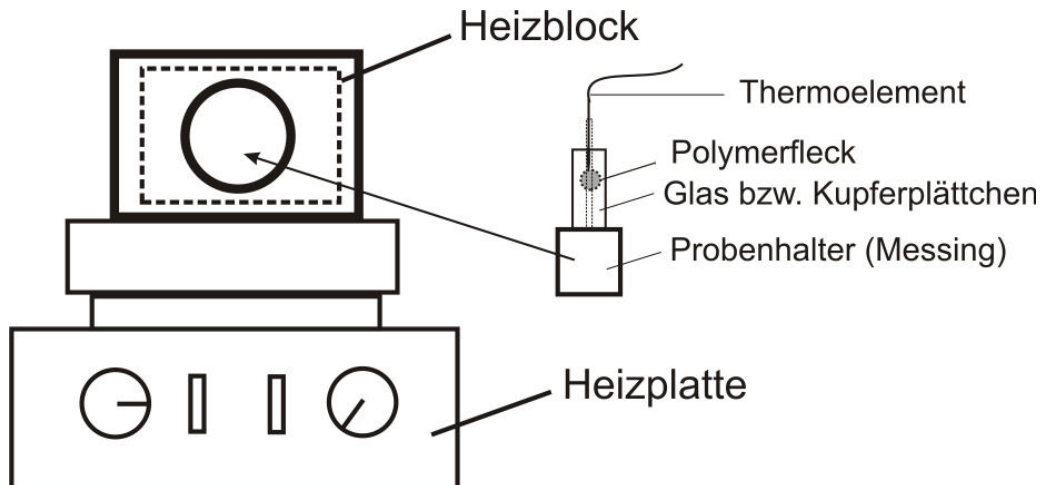


Abbildung 6.6: *Probenaufbau für die Thermolyse von Endoperoxiden in Polymeren. Die Abbildung zeigt die Heizplatte, auf der sich ein Aluminiumblock mit Hohlraum befindet. Dahinter wird die Öffnung des Aluminiumblockes mit einem weiteren Aluminiumblock abgedeckt. Die eigentliche Probe ist in einem Probenhalter eingebaut, der passgenau an einen Telleraufsatz montiert werden kann. Somit wird der Polymerfleck immer exakt genau auf den selben Ort des Eintrittsspalt des Doppelmonochromators abgebildet. An dem Probenhalter ist ein Thermoelement befestigt, mit dem über ein Multimeter die Temperatur an der Probe gemessen werden kann.*



Abbildung 6.7: *Die Abbildung zeigt die Probenküvette mit Liposomen dotiert mit Perylen-Derivat (KF241) bei Bestrahlung mit dem Argon-Ionen-Laser ( $\sim 200 \text{ mW/cm}^2$ ). Man sieht am Boden der Küvette den Rührfisch, mit dem die Probe mit Hilfe eines Magnetrührers (in Abbildung nicht sichtbar) verrührt wurde.*

Die Endoperoxidbildung in Polymeren erfolgte durch Bestrahlung mit dem Argon-Ionen-Laser bei Raumtemperatur. Nach der Bestrahlung wurde das Polymer 1 Stunde lang bei  $10^{-3}$  Torr evakuiert. Für die Thermolyse der Endoperoxide im Polymer wurde das Glas bzw. Kupferplättchen mit dem Polymerfleck in einen Aluminiumblock bei konstanter Temperatur gelagert und nach bestimmten Zeitabständen aus dem Ofen entnommen. Dabei wurde darauf

geachtet, dass die Temperatur für die Fluoreszenzmessungen vor bzw. nach dem Tempern 25 °C betrug.

## 6.6 Zellversuche

### 6.6.1 Aufbau der Zelle

Für die Zellversuche wurden sowohl Mammakarzinomzellen als auch Kolonkarzinomzellen verwendet. Anhand einer schematischen Skizze soll der Aufbau einer menschlichen Zelle und die Bedeutung einiger Zellorganellen erläutert werden. Biologische Membranen umhüllen dabei die Zellen und grenzen den Zellkern und die Zellorganellen gegenüber dem restlichen Zytoplasma ab. Dadurch entstehen Kompartimente, d.h. Räume, in denen unterschiedliche Stoffwechselvorgänge stattfinden können [59]. Die Zellgröße beim Menschen schwankt zwischen 5  $\mu\text{m}$  (z.B. einige Bindegewebszellen) bis 150  $\mu\text{m}$  (weibliche Eizellen). Nachfolgend werden einige Zellbestandteile näher erläutert.

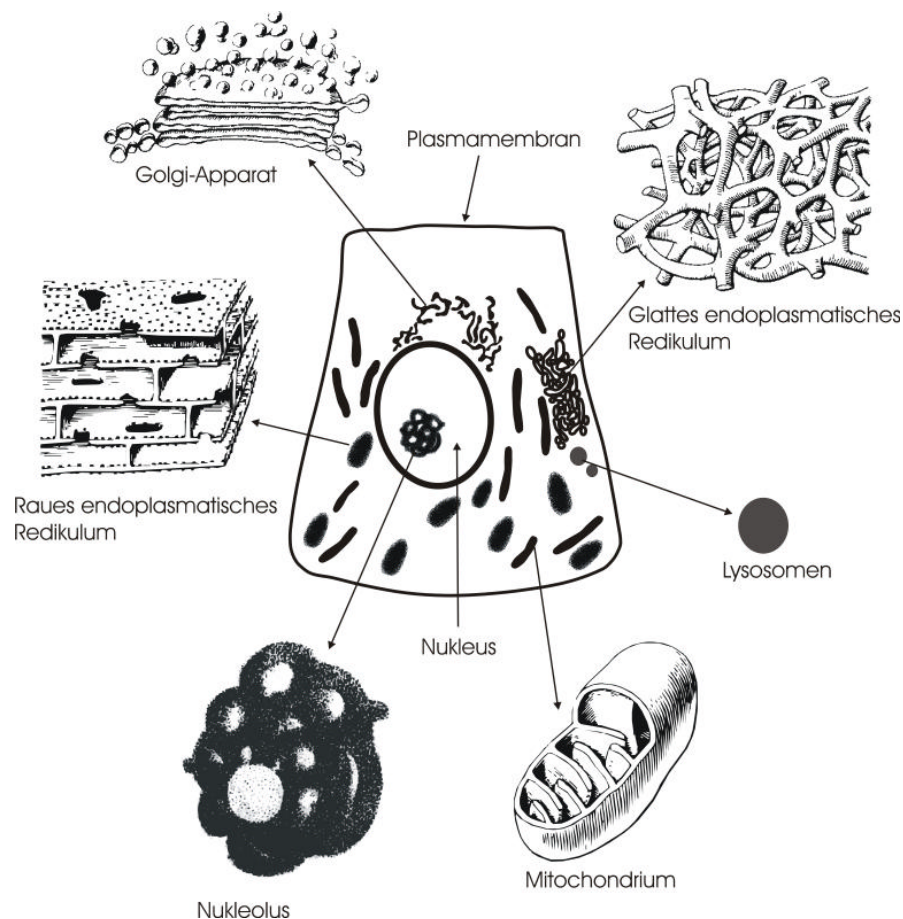


Abbildung 6.8: Schematische Darstellung einer Zelle und der wichtigsten Zellorganellen (nach [59]).

## *Plasmamembran*

Die umgebende Plasmamembran (auch Zellmembran genannt) hält den flüssigen Zelleib zusammen. Sie besteht aus einer Lipiddoppelschicht, wobei 2 Lagen von Lipidmolekülen (Phospholipide, Cholesterin) derart angeordnet sind, dass ihre fettlöslichen Anteile (Fettsäuren) einander zugekehrt sind, während die wasserlöslichen Anteile an die Innen- bzw. Außenseite der Zellmembran grenzen. Die Lipiddoppelschicht wird von Proteinen mehr oder weniger mosaikartig durchsetzt [60]. Die Plasmamembran ist bei 37 °C flüssig, lässt daher Bewegungen der Moleküle zu, besitzt jedoch als Ganzes noch eine große Stabilität.

## *Mitochondrien*

Mitochondrien sind kleine, 2-6µm lange, fadenförmige Gebilde. Ihre Wände bestehen aus einer inneren und einer äußeren Einheitsmembran, wobei die innere stark aufgefaltet ist und somit eine große Oberfläche besitzt. Mitochondrien sind die „Kraftwerke“ der Zelle, da sie die für alle Stoffwechselprozesse notwendige Energie in Form eines universellen biologischen Brennstoffs, Adenosintriphosphat (ATP), liefern [60].

## *Lysosomen*

Lysosomen sind kugelförmige Gebilde und stellen die Verdauungsorgane der Zelle dar [59]. Sie enthalten größere Mengen an Enzymen, mit deren Hilfe sie aufgenommene Fremdkörper oder zelleigene Organellen abbauen und dem zellulären Stoffwechsel in Form von Ausgangsstoffen wieder zur Verfügung stellen können [60]. Die hydrolytischen Enzyme werden nach der Biosynthese am endoplasmatischen Retikulum im Golgi-Apparat modifiziert und erscheinen danach in den Vorstufen der Lysosomen, den Endosomen.

## *Golgi-Apparat*

Der Golgi-Apparat setzt sich aus mehreren Golgi-Feldern zusammen und stellt ebenfalls ein inneres Hohlraumssystem dar, das an der Aufnahme und an der Ausschleusung von Stoffen in Form von begrenzten Sekretvesikeln beteiligt ist. Auch die Lysosomen werden auf diese Weise gebildet. Die Golgi-Felder besitzen eine Aufnahme- und eine Abgabeseite. Vorstufen von Eiweißsekreten wandern aus dem rauen endoplasmatischen Retikulum zur Aufnahmeseite des Golgi-Feldes, wo sie in Transportvesikel verpackt und über die Abgabeseite aus der Zelle ausgeschleust werden. Dabei verschmilzt die Vesikelmembran mit der Zellmembran. Die Erneuerung der Zellmembran ist daher eine wichtige Aufgabe des Golgi-Apparates [60].

## *Nukleus*

Der Nukleus (Zellkern) wird durch eine Membran vom umgebenden Zytoplasma abgegrenzt, steht aber über sogenannte Kernporen in Verbindung mit dem endoplasmatischen Retikulum. Innerhalb des Zellkerns befindet sich das Kernkörperchen (Nukleolus), wobei im Zellkern auch mehrere Nukleoli auftreten können. Der Nukleolus ist Ausgangspunkt der Ribosomensynthese [59].

## *Endoplasmatisches Retikulum (ER)*

Das Endoplasmatische Retikulum durchzieht das Zytoplasma in Form von röhren- und bläschenförmigen Strukturen, die von Einheitsmembranen umgeben sind. Es ermöglicht entlang seiner Hohlräume den intrazellulären Stofftransport. Durch seine große Oberfläche ermöglicht es einen schnellen Ablauf von unterschiedlichen Stoffwechselreaktionen (z.B. Protein- und Lipidsynthese). An vielen Stellen ist das endoplasmatische Retikulum mit Ribosomen (siehe unten) ausgestattet, die vor allem der Eiweißsynthese dienen – dann spricht man vom rauen endoplasmatischen Retikulum. Fehlen die Ribosomen spricht man vom glatten endoplasmatischen Retikulum [60].

## *Ribosomen*

Ribosomen sind für die Eiweißsynthese zuständig. Hierbei handelt es sich um Multienzymkomplexe, die aus Eiweiß- und RNA-Molekülen bestehen, die bei der Proteinsynthese die Aminosäuren verketteten. Während sie am rauen ER für die Produktion von Exportproteinen (z.B. Drüsensekrete) zuständig sind, produzieren sie als freie Ribosomen zelleigene Proteine (z.B. Enzyme, Strukturproteine) [60] .

## 6.6.2 Durchführung der Zellversuche

### *Mammakarzinomzellen (MDA-MB 231)*

Der Nachweis einer zytotoxischen bzw. einer zytostatischen Wirkung von Endoperoxid-dotierten Liposomen wurde neben Kolonkarzinomzellen in erster Linie an Mammakarzinomzellen vollzogen. Dabei wurden die Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB 231 2 Tage vor der Wirkstoffzugabe in sterile 96-well Mikrotiterplatten (12 Reihen a 8 well) ausgesät. Den Zellen wurde das sterile, zellspezifische Kulturmedium McCoy, dem zusätzlich 5% fetales Kälberserum beigemischt ist, zugegeben. Dabei wurden

die Zellsuspensionen zwei Tage unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt. In diesem Zeitraum wuchsen die Zellen am Boden der Mikrotiterplatten an und vermehrten sich soweit, dass aussagekräftige Wachstumskurven möglich waren. Dabei wurde in bestimmten Zeitabständen das Zellwachstum ermittelt. Es wurde für jeden Messpunkt in der Wachstumskurve eine Mikrotiterplatte benötigt, somit richtete sich die Anzahl der vorbereiteten Platten nach der Anzahl der vorgesehenen Inkubationsräume. Abbildung 6.9 zeigt das Phasenkontrastbild der verwendeten Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB 231.

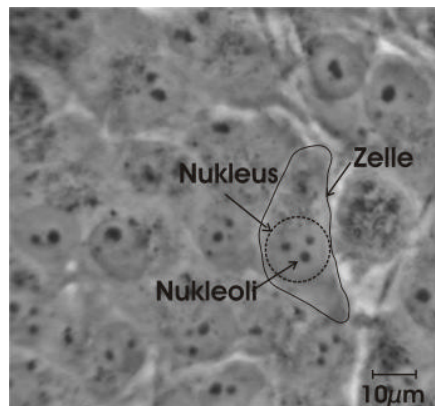


Abbildung 6.9: Phasenkontrastbild einer lebenden Zellpopulation der verwendeten Mammakarzinomzellen (MDA-MB 231) nach [57]. Die schwarze Umrandung (durchgezogen) kennzeichnet dabei eine Zelle. Der Zellkern (Nucleus, gestrichelt) ist hier kreisförmig und liegt mittig in der Zelle. Die dunklen Punkte im Zellkern zeigen die Nukleoli (Kernkörperchen).

Zur Applikation der Liposomen-Suspensionen an die Tumorzellen wurde nach folgender Beschreibung vorgegangen. Die laserinduzierte Bildung von Endoperoxiden erfolgte unmittelbar vor dem Zellversuch. Dabei wurden die Proben unmittelbar nach der Laserbestrahlung auf ca. 4 °C gekühlt und innerhalb von max. 30 min an den Tumorzellen appliziert. Die Kühlung bzw. die schnelle Applikation nach der Laserbestrahlung war nötig, um den Zerfallsprozess der Endoperoxide in den Liposomen so gering wie möglich zu halten. Aufgrund der langen Einwirkzeit von 8 Tagen an den Tumorzellen, mussten die Präparate keimfrei sein. Dabei wurden die Kontrollproben unmittelbar vor der Applikation an den Tumorzellen 20 Minuten lang mit einer UV-C-Lampe ( $\lambda=254\text{nm}$ ) bestrahlt. Bei dem Sterilisationsprozess wurde darauf geachtet, dass die Leistung der UV-Lampe nicht zu hoch war um bei den Kontrollproben, d.h. bei farbstoff-dotierten Liposomen bzw. die mit Naphthalinderivat und PPIX-DME beladenen Liposomen die nicht mit dem Argon-Ionen-Laser bestrahlt wurden, keine Endoperoxide zu bilden. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei den Endoperoxid-dotierten Liposomen allein durch den Herstellungsprozess, bei dem bereits Singulett-Sauerstoff eine aktive Rolle spielt, die Keime und Bakterien zerstört werden [84]. Zusätzlich wurden vor der Herstellung und Bearbeitung sämtlicher Liposomen alle Geräte und Gefäße mindestens 1 Stunde in 70%iger Ethanollösung gebadet.

Bei den Mikrotiterplatten sind jeweils 8 wells in einer Reihe zusammengefasst, so dass jede Reihe mit verschiedenen Substanzzugaben belegt wurde. Dabei wurden in den Zellversuchen folgende Substanzen getestet.

Versuchsreihen:

- Leerliposomen
- Farbstoff (Perylen-Diimid)-dotierte , bzw. Naphthalinderivat mit PPIX-DME dotierte Liposomen
- Endoperoxid-dotierte Liposomen (d.h. Endoperoxide mit den entsprechenden Aromaten)

Kontrollreihen:

- Phosphate Buffered Saline (PBS) [61]
- Cisplatin in Dimethylformamid (DMF)

Die Wirkung der Endoperoxid-dotierten Liposomen wurde mit Cisplatin, einem starken Zytostatikum verglichen. Cisplatin ist ein Platinkomplex, der sich an die DNA im Zellkern anlagert und sie dabei schädigt, wodurch die Zelle teilungsunfähig wird. Des weiteren wurden die Zellen mit Phosphat Buffered Saline inkubiert, ein Phosphat-Puffer (ohne Wirksubstanz) der das Wachstum der Zellen fördert, und somit als Kontrolle zu den Wirksubstanzen angesehen werden kann.

Vor Applikation an den Tumorzellen wurden die Liposomensuspensionen mit dem sterilen, zellspezifischen Kulturmedium McCoy 1:10 bzw. 1:30 verdünnt. Vor der Zugabe der einzelnen Substanzen wurde das alte Kulturmedium aus jeweils einer Reihe auf allen vorbereiteten Mikrotiterplatten entfernt. In eine der Reihe der Mikrotiterplatten wurden jeweils 200 µl einer Inkubationslösung eingefüllt. Die Inkubationslösung bezeichnet dabei die der Zellpopulation zugegebene Substanz, unabhängig ob bzw. welcher Wirkstoff sich darin befindet. Nach der Zugabe der jeweiligen Inkubationslösungen wurden die Zellen bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert.

### 6.6.3 Kristallviolett-Test

Die Bestimmung des zeitlichen Verlaufes des Zellwachstums erfolgte über den sogenannten Kristallviolett-Test [62,63]. Dieser Test erlaubt eine Quantifizierung der Zellzahl durch Absorptionsmessungen mit dem Farbstoff Kristallviolett. Dabei wird nach einem festgelegten

Zeitpunkt die Inkubation der Zellkulturen auf einer Mikrotiterplatte beendet und das Kulturmedium abgesaugt. Die abgestorbenen Zellen die nicht mehr im Gegensatz zu den lebenden am Untergrund der Mikrotiterplatte haften, werden mit dem Kulturmedium entfernt.

Dabei werden die am Untergrund verbleibenden Zellen mit 1 %-igem Glutardialdehyd in PBS (Phosphate Buffered Saline) 15 Minuten fixiert. Bei der Fixierung werden die Zellen abgetötet, wodurch die folgenden Nachbehandlungen zeitunabhängig durchgeführt werden können. Durch die Fixierung bleibt auch die Gewebestruktur der Zellen erhalten und es entsteht somit auch eine Momentaufnahme der Zellpopulation. Die Fixierung der Zellen erfolgt durch Polymerisierung von 2 bis 4 Molekülen Glutardialdehyd zu Ketten. Dabei reagiert Glutardialdehyd mit den  $\epsilon$ -Aminosäureresten der Membranproteine. Die Membranproteine werden dadurch vernetzt und somit ein Stützkorsett um die Zellen gelegt,

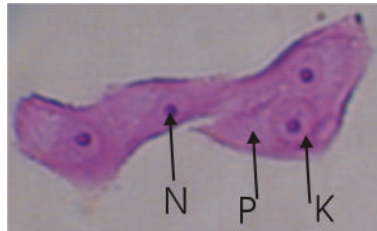


Abbildung 6.10: Mit Kristallviolett eingefärbte Zellen nach [57]. *P* zeigt das Zytoplasma, *K* den Zellkern und *N* die Nukleoli (Kernkörperchen).

wobei gleichzeitig die Zellen am Untergrund fixiert werden. Durch diese Fixierung erhalten die Zellen eine gewisse mechanische Stabilität [64]. Anschließend wird die Fixierlösung durch PBS ersetzt und die Mikrotiterplatten bei 4°C im Kühlschrank bis zur endgültigen Auswertung aufbewahrt. Die Inkubationszeit bei den Zellversuchen dauerte etwa 180 Stunden und erst nach Beendigung des Experimentes erfolgte die Färbung der Zellen, um eventuelle Unterschiede bei den Färbungsbedingungen zu verhindern bzw. möglichst gering zu halten. Zur Färbung der Zellen wurde Kristallviolett (N-Hexamethylpararosanilin) in einer 0,02%-igen wässrigen Lösung verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Farbstoff der vor allem Nucleoproteine anfärbt [62]. Dabei lässt man den Farbstoff über 30 min auf die bereits fixierten Zellen einwirken, wodurch sich der Nukleus (Zellkern) tief blau einfärbt, während das Zytoplasma eine schwach bläuliche Färbung annimmt und die Nukleoli (Kernkörperchen) dunkelviolettschwarz eingefärbt werden (siehe Abbildung 6.10). Überschüssiger Farbstoff wird durch anschließendes 15-minütiges Wässern der Zellen entfernt, so dass nur der an der DNA gebundene Farbstoff zurückbleibt. Dieser Farbstoff wird mit 70%-igem Ethanol aus den Zellen herausgelöst und die Transmission der Lösung für jede Zellpopulation einzeln bei der Wellenlänge  $\lambda=578\text{nm}$  bestimmt. Aus dem Verhältnis der gemessenen Transmission  $I$  und der eingestrahlten Intensität  $I_0$  liefert der Kristallviolett-Test für jede Zellpopulation einen Wert für den Absorptionsindex:



$$A_{578} = \ln \frac{I_0}{I}$$

Aufgrund der Korrelation des Absorptionsindex der Kristallviolettlösung mit der Zellzahl (vgl. Abbildung 6.11) ist eine quantitative Aussage über das Wachstumsverhalten der Zellpopulation möglich.

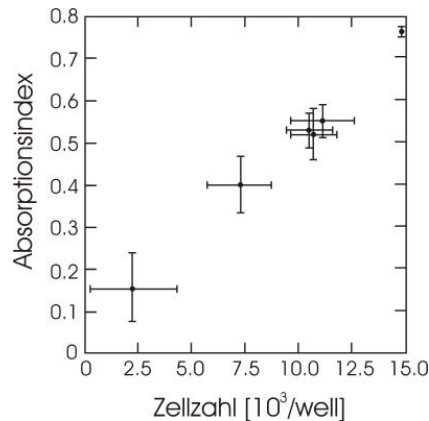


Abbildung 6.11: Abhängigkeit zwischen Absorptionsindex und Zellzahl (nach [65]). In dem Diagramm ist der Absorptionsindex bei  $\lambda=590\text{nm}$  gegen die Zellzahl pro well aufgetragen. Der Kristallviolett-Tests erlaubt quantitative Aussagen über die Größe der Zellpopulation.

Abbildung 6.11 zeigt die Korrelation des Absorptionsindex bei  $\lambda=590\text{ nm}$  mit der Zellzahl. Die Bestimmung des Absorptionsindex bei den Zellversuchen erfolgte jedoch bei  $\lambda=578\text{nm}$ . Da die Absorption bei  $\lambda=578\text{nm}$  geringer ist als bei  $\lambda=590\text{nm}$ , besitzt die wahre Korrelationsfunktion unter Voraussetzung linearer Interpolation – eine geringere Steigung. Da jedoch die Angaben über das Wachstumsverhalten der Zellen für diese Arbeit Relativangaben sind, hat die Abweichung der Steigungen praktisch keine Bedeutung.

Zur Auswertung der Zellpopulation über die Absorption mussten die Zellen zunächst aus den Mikrotiterplatten (12 Reihen a 8 wells) entfernt werden. Da die für die pro Inkubationszeit erfasste Zellpopulation aus einer Reihe zu je 8 wells besteht, wurde über jede Zellpopulation pro well ein Messwert ermittelt und schließlich über alle wells der Mittelwert errechnet. Für die Bestimmung des endgültigen Messpunkts werden – wie bei diesem Verfahren üblich – eventuell auftretende Messwerte mit einer großen Abweichung vom Mittelwert ausgeschlossen. Dafür wird ein Konfidenzintervall  $|x_i - X| \leq 2 \cdot \sigma(X)$ , wobei  $x_i$  einen einzelnen Messwert und  $X$  den Mittelwert bezeichnet, herangezogen. Anschließend werden Mittelwert und Standardabweichung  $\sigma(X)$  erneut berechnet. Bei der letztendlichen Auswertung wird der erhaltene Absorptionsindex gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Aus diesen Messwerten kann dann eine Zellpopulations-Wachstumskurve ermittelt werden.

Abbildung 6.12 zeigt schematisch mögliche Zellpopulations-Wachstumskurven und ihre jeweilige Bedeutung. Dabei liefern unterschiedliche Inkubationslösungen natürlich auch unterschiedliche Verlaufsformen der Wachstumskurven. C beschreibt die Wachstumskurve einer unbehandelten Zellpopulation und damit das maximal mögliche Wachstum. Diese Kurve ist z.B. zu erwarten, wenn die Zellen mit PBS inkubiert werden, also einem Phosphatpuffer (ohne Wirksubstanz), der das Wachsen der Zellen fördert. Erholt sich die Zellpopulation nach anfänglichem Schaden fast vollständig, spricht man von einer zytotoxischen Wirkung. Eine zytostatische Wirkung liegt vor, wenn zu Beginn als auch am Ende des Zellversuches die gleiche Zellpopulation vorliegt. Bei einer Verringerung der Zellpopulation im Verlauf der Behandlung spricht man von einer zytociden Wirkung.

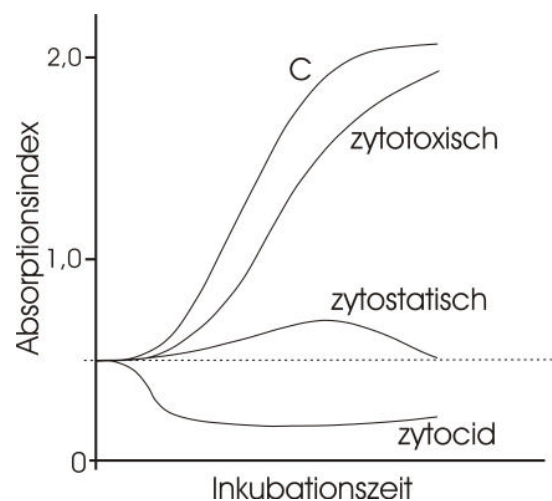


Abbildung 6.12: Schematische Darstellung der Wachstumskurven (nach [66]). C beschreibt das Wachstum der unbehandelten Kontrolle. Zytotoxisch bedeutet, dass sich die Zellpopulation nach anfänglichem Schaden fast vollständig erholt. Von einer zytostatischen Wirkung spricht man, wenn die Zellpopulation so stark behindert wird, dass die Ausgangspopulation wieder erreicht wird. Ist die Zellpopulation am Ende geringer als zu Beginn spricht man von einer zytociden Wirkung.

## 7 Messergebnisse

### 7.1 Bildung von Endoperoxiden aus 1,4-Dimethylnaphthalin in Liposomen

Wie bereits in Abschnitt 3.1 erwähnt, können durch Lichteinfluss Endoperoxide aus 1,4-Dimethylnaphthalin- bzw. 1,4,5-Trimethylnaphthalin bei Vorhandensein eines geeigneten Sensitizers erzeugt werden. Diese Endoperoxide zerfallen unter Freisetzung von  $^1\text{O}_2$  nach Müller [67] in phosphatgepuffertem Wasser bei  $37^\circ\text{C}$  mit einer Halbwertszeit  $t_{1/2}$  von 43 min. Des weiteren kann von Käsermann [68] eine antivirale Wirkung durch die Freisetzung von  $^1\text{O}_2$  aus polymerisierten Naphthalin-Derivaten belegt werden. Aus diesem Grund wurde im Zusammenhang mit den Zellversuchen der Entschluss gefasst, Endoperoxide aus Naphthalin-Derivaten mit einer geeigneten Freisetzungszeit von  $^1\text{O}_2$  bei  $37^\circ\text{C}$  zur Applikation an Tumorzellen heranzuziehen. Für den Einbau der Naphthalin-Derivate wurde als Matrix das im Abschnitt 5.5 erwähnte Liposomenmaterial 1,2-Dimyristoyl-L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (DMPC) verwendet. Die entsprechende Liposomenpräparation (Extrusionstechnik mit dem Liposofast) kann aus dem Abschnitt 6.2 entnommen werden.

Abbildung 7.1 zeigt die laserinduzierte zeitabhängige Abnahme der Fluoreszenzintensität von 1,4-Dimethylnaphthalin in DMPC-Liposomen. Die Stoffmengenkonzentration von 1,4-Dimethylnaphthalin zu DMPC betrug 1:50, die Stoffmengenkonzentration des Sensitizers PPIX-DME zu DMPC betrug dabei 1:500, unter der Annahme, dass sowohl 1,4-Dimethylnaphthalin als auch PPIX-DME komplett in die Lipidmembran einbaut. Die Lipidkonzentration in der wässrigen Liposomensuspension wurde auf 1mg/ml festgelegt. Dabei wurde 1,4-Dimethylnaphthalin bei 325nm mit dem HeCd-Laser bei einer Laserleistungsdichte von etwa  $1\text{ mW/cm}^2$  angeregt, wobei die Fluoreszenzintensität des Naphthalin-Derivates bei 346 nm gemessen wurde. Die Erzeugung von  $^1\text{O}_2$  erfolgte durch die Anregung des Sensitizers PPIX-DME mit dem Argon-Ionen-Lasers bei  $\lambda_{ex}=514\text{nm}$  bei einer Laserleistungsdichte von etwa  $320\text{ mW/cm}^2$ . Die Liposomensuspension (4 ml) befand sich während des Messprozesses in einer Küvette mit Rührer bei einer Temperatur von  $13^\circ\text{C}$ .

Um zu zeigen, dass es sich bei dem genannten Prozess um die Bildung von Endoperoxiden handelt, wurde die Liposomensuspension mit dem dotierten 1,4-Dimethylnaphthalin bzw. dem PPIX-DME anschließend in Methanol aufgelöst und auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt. Die Auflösung der Liposomensuspension wurde aufgrund der in Abschnitt 6.2.1 beschriebenen Ursachen vollzogen. Methanol wurde zur Auflösung der dotierten Liposomensuspension verwendet, da Methanol alle Komponenten der Suspension löst. D.h. Methanol löst PPIX-DME, 1,4-Dimethylnaphthalin und das DMPC-Lipid, zusätzlich ist Methanol in Wasser löslich.

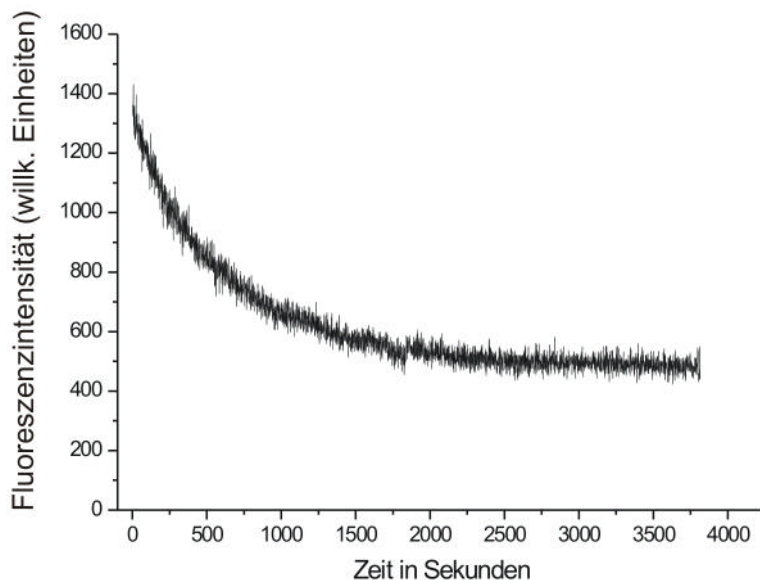


Abbildung 7.1: Zeitabhängige Abnahme der Fluoreszenzintensität von 1,4-Dimethylnaphthalin in Liposomen aufgrund der Bildung von Endoperoxiden bei  $T=13^{\circ}\text{C}$ . Dabei liegt die Anregungswellenlänge des Sensitizermoleküls PPIX-DME zur Generierung von  $^1\text{O}_2$  bei 514nm während die Anregungswellenlänge von 1,4-Dimethylnaphthalin in diesem Falle bei 325 nm liegt. Die Detektion der Fluoreszenz des Naphthalinderivates erfolgt bei 346nm. Aufgrund der Endoperoxidbildung führt dies zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität des Naphthalinderivates.

Die Abbildung 7.2 zeigt das Fluoreszenzspektrum der oben genannten dotierten Liposomen vor der Bestrahlung (1) und nach 30 min. Bestrahlung (2) mit dem Argon-Ionen-Laser, sowie die Zunahme der Fluoreszenzintensität nach bestimmten Zeitpunkten bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Die Messungen wurden an einem geeigneten Spektrometer durchgeführt. Vor der Messung der Thermolyse wurde die Probe, wie bereits erwähnt, in Methanol aufgelöst. Das Mischungsverhältnis von Liposomensuspension und Methanol betrug dabei 1:2. Die Anregung der Probe erfolgte bei 270nm, im Absorptionsmaximum des 1,4-Dimethylnaphthalins. Man kann aus den Spektren ein Wiederauftauchen der Fluoreszenzintensität des Naphthalin-Derivates entnehmen, was auf den Zerfall der Endoperoxide zurückzuführen ist. Nach 76 min ist bereits 75 % der ursprünglichen Fluoreszenzintensität wieder vorhanden.

Nach Gl 3.4 lässt sich aus dem Verhältnis des Anteils der zerfallenen (thermolysierten) Endoperoxide  $A$  (Fluoreszenzrücksetzung), zu dem Anteil der ursprünglich gebildeten Endoperoxide  $A_0$  (Fluoreszenzreduktion), die entsprechende Ratenkonstante  $k$  für den Zerfallsprozess ermitteln.

$$\frac{A}{A_0} = 1 - e^{-kt} \quad (3.4)$$

Die Gleichung GL. (3.4) kann man dann noch Umformulieren zu:

$$\ln A_0 - kt = \ln(A_0 - A) \quad (7.1)$$

Die halblogarithmische Auftragung der Fluoreszenzreduktion  $A_0$ , abzüglich des veränderlichen Parameters der Fluoreszenzrücksetzung  $A$ , in Abhängigkeit von der Zeit  $t$ , liefert dann die Abbildung 7.3.

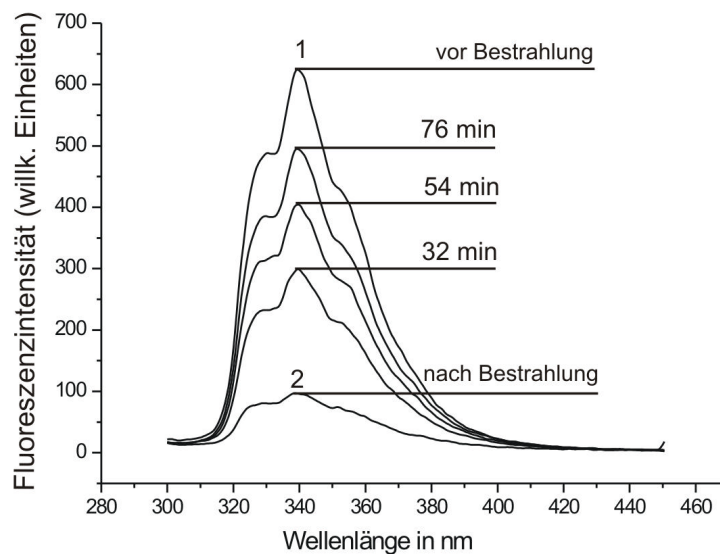


Abbildung 7.2: Thermolyse von 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxiden. Die Abbildung zeigt das Wiederauftauchen der Fluoreszenzintensität von 1,4-Dimethylnaphthalin aufgrund des Endoperoxid-Zerfalles durch den thermolytischen Prozess bei 37 °C. Die Anregung des Naphthalin-Derivates erfolgte bei 270 nm. Spektrum 1 zeigt das Fluoreszenzspektrum der wässrigen Liposomensuspension bei 37°C vor der Bestrahlung mit dem Argon-Ionen-Laser bei einer 1:2 Verdünnung in Methanol. Die wässrige Liposomensuspension (1mg/ml Lipidgehalt) dotiert mit 1,4-Dimethylnaphthalin (1,4-Dimethylnaphthalin:DMPC=1:30) und PPIX-DME (PPIX-DME:DMPC=1:500) wurde 30 min lang mit dem Argon-Ionen-Laser bestrahlt ( $P/A=320\text{mW/cm}^2$ ;  $\lambda_{\text{ex}}=514\text{nm}$ ), danach ebenfalls 1:2 in Methanol aufgelöst und bei 37°C vermessen (siehe Spektrum 2). Weitere Spektren zeigen die Zunahme der Fluoreszenzintensität nach den Zeitpunkten 32 min, 54 min bzw. 76 min. Die Messung wurde am Fluoreszenzspektrometer (Perkin Elmer, LS 50B) durchgeführt.

Der in der Abbildung 7.3 benötigte Wert der Fluoreszenzreduktion  $A_0$  wird durch Subtraktion der Fluoreszenzintensitäten von 1 und 2 bei der Wellenlänge 339nm aus der Abbildung 7.2 ermittelt, d.h. also der Wert der Fluoreszenzreduktion durch Laserbestrahlung. Ebenso kann

der zeitabhängige Wert  $A$  der Fluoreszenzrücksetzung durch Subtraktion der Fluoreszenzintensitäten nach 32min, 54 min bzw. 76 min von der Fluoreszenzintensität 2 bei 339 nm aus Abbildung 7.2 ermittelt werden.

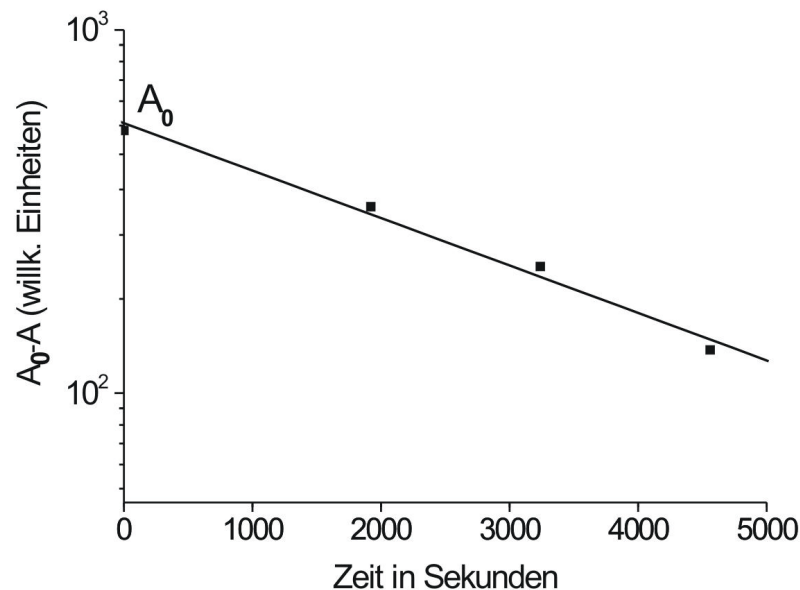


Abbildung 7.3: Halblogarithmische Darstellung nach Gleichung 7.1 zur Ermittlung der Ratenkonstanten  $k$  aufgrund der zeitabhängigen Fluoreszenzrücksetzung bei 37°C durch den Zerfall der 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxide in Methanollösung. Man kann erkennen dass die Fluoreszenzrücksetzung einer Kinetik erster Ordnung unterliegt. Aus der Steigung der Geraden kann man unmittelbar die Ratenkonstante  $k$  zu  $3,0 \cdot 10^{-4} s^{-1}$  bei einer entsprechenden Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 64$  min ermitteln, wenn davon ausgegangen wird, dass keine Photochemie aufgrund der Laserbestrahlung überlagert ist.

Aus der halblogarithmischen Darstellung kann man erkennen, dass der Zerfall der Endoperoxide einer Kinetik erster Ordnung unterliegt. Aus der Geradensteigung lässt sich dann die Ratenkonstante für den Zerfall der Endoperoxide (bei 37°C) in der Methanol-Lipid-Lösung zu  $k = 3,0 \cdot 10^{-4} s^{-1}$  und einer entsprechenden Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 64$  min ermitteln. Dieser Wert der Ratenkonstante stimmt sehr gut mit dem Wert der Ratenkonstante für den Zerfall der 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxide in phosphatgepuffertem Wasser überein, der von Müller [67] zu  $k = 2,67 \cdot 10^{-4} s^{-1}$  mit einer entsprechenden Halbwertszeit  $t_{1/2}$  von 43 min ermittelt wurde.

Der Zerfall der 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxide wurde ebenfalls in Liposomen untersucht. Dabei wurde 1,4-Dimethylnaphthalin sowie PPIX-DME in 1,2-Distearoyl-L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine (DSPC)-Liposomen eingebaut und analog zu oben mit dem Argon-Ionen-Laser 30 min lang bei 514 nm und einer Leistungsdichte von  $320 \text{ mW/cm}^2$  bestrahlt. DSPC wurde als Liposomenmaterial gewählt, da DSPC eine relativ hohe

Phasenübergangstemperatur ( $T_m=54,9^\circ\text{C}$ ) besitzt, und somit Effekte im Zusammenhang mit der Phasenübergangstemperatur (vgl. Abschnitt 4.2.2 und Abschnitt 6.1.2) auszuschließen sind. In diesem Fall wurde die dotierte Liposomensuspension vor der Untersuchung am Fluoreszenzspektrometer nicht in Methanol aufgelöst. Abbildung 7.4 zeigt die Fluoreszenzspektren vor bzw. nach Laserbestrahlung, sowie die Zunahme der Fluoreszenzintensität durch Thermolyse zu bestimmten Zeitpunkten bei  $25^\circ\text{C}$ . Aus Abbildung 7.4 lässt sich aus der Zunahme der Fluoreszenzintensitäten innerhalb der ersten 50 min nach Gl. (7.1) eine Zerfallshalbwertszeit von etwa 5 Stunden extrapolieren, was der Zerfallszeit von 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxiden in Lösung entspricht [54]. Zu beachten ist hier bei den Fluoreszenzuntersuchungen eine mögliche zeitabhängige Liposomenfusion, was eine zeitliche Veränderung der Fluoreszenzintensität zur Folge hat, so dass keine präzise Auswertung bezüglich der Zerfallszeit gemacht werden kann. Die optische Beeinflussung der Messergebnisse durch Liposomenfusion in Abhängigkeit von der Zeit konnte durch ein Vergleichsexperiment nachgewiesen werden. Hierbei konnte bei den Liposomen dotiert mit 1,4-Dimethylnaphthalin (ohne Endoperoxidbildung) innerhalb von 50 min ein Absinken der Gesamtfluoreszenz von etwa 5% beobachtet werden, sodass man davon ausgehen kann, dass der Anstieg der Fluoreszenzintensität in Abbildung 7.4 für das Spektrum (bei 50 min Thermolyse) entsprechend geringfügig erhöht ist.

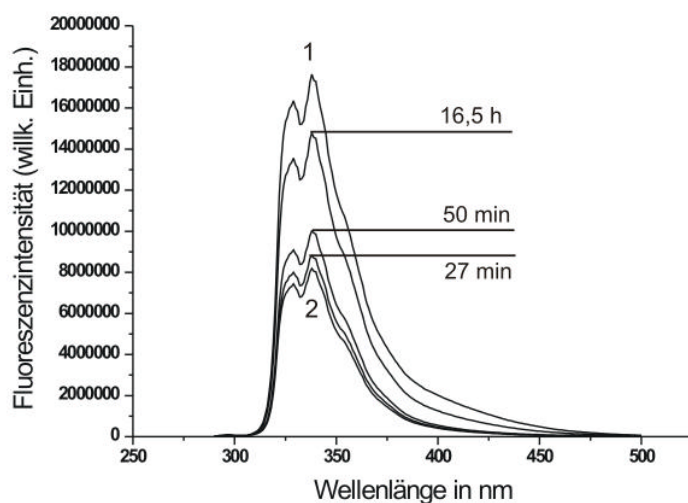


Abbildung 7.4: Demonstration des Zerfalles von 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxiden in DSPC-Liposomen bei  $25^\circ\text{C}$ . 1 und 2 zeigen jeweils das Fluoreszenzspektrum der Liposomensuspension dotiert mit 1,4-Dimethylnaphthalin und PPIX-DME vor bzw. nach Laserbestrahlung (Liposomengröße:  $\varnothing=200\text{nm}$ ). Ebenfalls sind die Spektren nach 27min, 50 min bzw. 16,5 Stunden Thermolyse eingetragen. Die Anregung erfolgte bei  $270\text{ nm}$  im Absorptionsmaximum von 1,4-Dimethylnaphthalin; Fluoreszenzspektrometer: Fluorolog, Jobin Yvon.

## 7.2 Bildung von 1,4,5-Trimethylnaphthalin-Endoperoxiden in Liposomen

Zur Untersuchung einer zytotoxischen Wirkung des durch Thermolyse freigesetzten Singulett-Sauerstoffs an Mammakarzinomzellen (siehe Abschnitt 7.3) sollten Liposomen appliziert werden, die mit 1,4,5-Trimethylnaphthalin-Endoperoxiden dotiert waren. Da nach [4] 1,4,5-Trimethylnaphthalin-Endoperoxide in 1,4-Dioxan bei 37°C mit einer Halbwertszeit von 21 Stunden zerfallen, scheinen sie aufgrund der relativ hohen Stabilität prädestiniert für Langzeituntersuchungen zu sein. Zu diesem Zweck wurde 1,4,5-Trimethylnaphthalin und der Sensitizer (PPXI-DME) in DMPC-Liposomen eingebaut (Präparation wie in Abschnitt 6.2.2), mit den Stoffmengenverhältnissen 1,4,5-Trimethylnaphthalin/DMPC=1:20 und PPXI-DME/DMPC=1:5000 und hinsichtlich der Endoperoxidbildung und deren Thermolyse untersucht. Die Erzeugung der Endoperoxide erfolgte wiederum mit dem Argon-Ionen-Laser ( $\lambda_{ex}=514\text{ nm}$ ;  $150\text{ mW/cm}^2$ ) bei 60 min. Bestrahlungsdauer.

In Abbildung 7.5 sieht man die Fluoreszenzspektren von 1,4,5-Trimethylnaphthalin in Liposomen vor (1) und nach (2) der Laserbestrahlung. Nach anschließendem Verdünnen mit Methanol 1:10 wurde die Fluoreszenzrücksetzung nach bestimmten Zeiten bei  $T=52^\circ\text{C}$  gemessen. Diese relativ hohe Temperatur wurde aufgrund der relativ hohen Stabilität der Endoperoxide gewählt. Aus dem Graphen kann man entnehmen, dass bereits nach 350 min die Endoperoxide zu 84 % in der Methanol-Lösung zerfallen sind.

In Abbildung 7.6 ist die halblogarithmische Auftragung der Fluoreszenzreduktion  $A_0$  abzüglich des veränderlichen Parameters der Fluoreszenzrücksetzung  $A$ , in Abhängigkeit von der Zeit  $t$ , analog zu Abschnitt 7.1, für den Zerfall der 1,4,5-Trimethylnaphthalin-Endoperoxide aufgetragen. Der lineare Zusammenhang im Rahmen der Messgenauigkeit zeigt wiederum, dass es sich um eine Kinetik erster Ordnung handelt. Dabei wurde aufgrund von messtechnischen Gründen der Startpunkt für die Thermolyse für die Auftragung aus Abbildung 7.5 bei 35 Minuten gewählt.



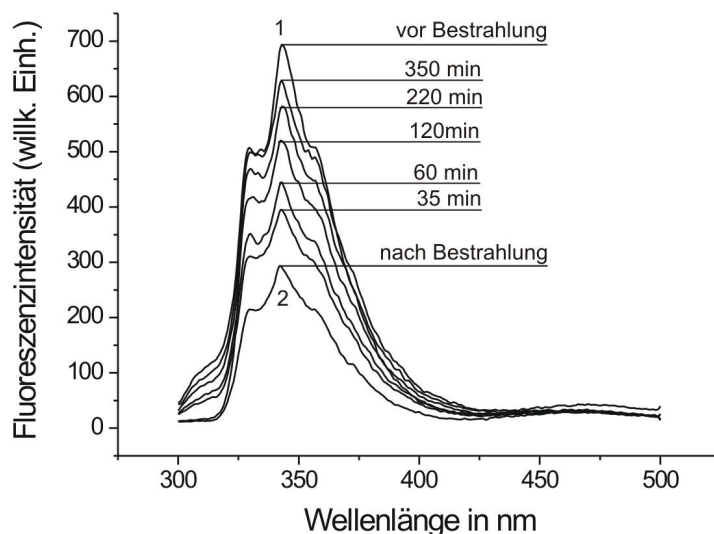


Abbildung 7.5: Thermolyse von 1,4,5-Trimethylnaphthalin-Endoperoxid in Liposomen nach Auflösung in Methanol (1:10) bei  $T=52^{\circ}\text{C}$ . Spektrum 1 bzw. 2 charakterisiert das Fluoreszenzspektrum vor bzw. nach 60 min. Laserbestrahlung der 1,4,5-Trimethylnaphthalin-dotierten Liposomen mit dem Argon-Ionen-Laser ( $P/A=150\text{mW}/\text{cm}^2$ ;  $\lambda_{\text{ex}}=514\text{nm}$ ). Nach anschließendem Auflösen in Methanol wurde ebenfalls zu den angegebenen Zeiten ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen (35min....350min). Die wässrige Liposomensuspension ( $1\text{mg}/\text{ml}$ ) wurde mit 1,4,5-Trimethylnaphthalin (1,4,5-Trimethylnaphthalin:DMPC=1:20) und PPIX-DME (PPIX-DME:DMPC=1:5000) dotiert. Man kann erkennen, dass nach 350 min bei  $T=52^{\circ}\text{C}$ , 84 % der ursprünglichen Fluoreszenzintensität wieder vorhanden ist. Die Messung wurde am Fluoreszenzspektrometer (Perkin Elmer, LS 50B) bei jeweils konstanter Messtemperatur und einer Anregung von 270 nm durchgeführt.

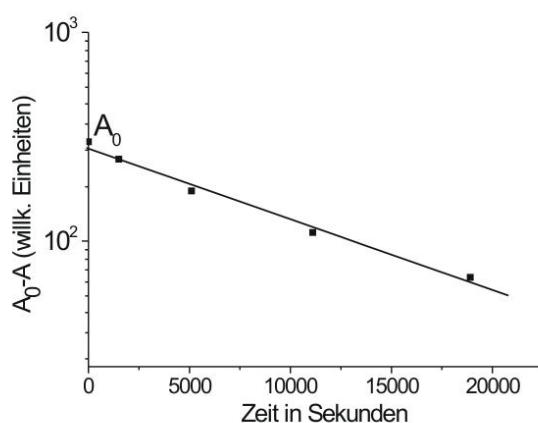


Abbildung 7.6: Demonstration einer Kinetik erster Ordnung aufgrund des Zerfalles von 1,4,5-Trimethylnaphthalin-Endoperoxiden. Der Graph zeigt den Anteil der wiederauftretenden Fluoreszenzintensität von 1,4,5-Trimethylnaphthalin (halblogarithmische Darstellung) in Abhängigkeit von der Zeit. Die Messwerte wurden aus dem Graphen in Abbildung 7.5 entnommen.

### 7.3 Zytotoxische Wirkung von 1,4,5-Trimethylnaphthalin-Endoperoxiden an Mammakarzinomzellen

Aufgrund der im Abschnitt 7.2 ermittelten Messwerte wurde der zytotoxische Effekt von Singulett-Sauerstoff, der durch Thermolyse aus 1,4,5-Trimethylnaphthalin-Endoperoxiden entsteht, an Tumorzellen untersucht. In Abschnitt 6.6.3 wurde der zytotoxische Effekt an Tumorzellen anhand der Wachstumskurve erklärt. Dieser Effekt ist in der vorliegenden Arbeit durch einen signifikanten Zelltot bei Applikation von Endoperoxid-dotierten Liposomen charakterisiert. Dazu wurden die Liposomen (hergestellt mit dem Extrusionsverfahren) mit PPXI-DME (PPIX-DME/DMPC=1/500) und 1,4,5 Trimethylnaphthalin (1,4,5-TMN) (1,4,5-TMN/DMPC=1/20) dotiert ca. 30 min bei  $320 \text{ mW/cm}^2$  mit dem Argon-Ionen-Laser bei  $\lambda_{\text{ex}}=514\text{nm}$  bestrahlt. Dabei betrug das Volumen der Liposomensuspension in der Küvette 4 ml. Nach der Laserbestrahlung wurde die wässrige Liposomensuspension (1mg/ml Lipidanteil) vor Applikation bei ca.  $4^\circ\text{C}$  gelagert, um die vorzeitige Thermolyse zu minimieren. Die Liposomensuspension wurde 1:30 mit einem Kulturmedium verdünnt und danach an den Tumorzellen appliziert. Nach der Applikation wurden die Tumorzellen im Brutschrank ( $T=37^\circ\text{C}$ ) für 34,5 Stunden gelagert. Diese Inkubationszeit wurde gewählt, da die Zerfallshalbwertszeit von 1,4,5-Trimethylnaphthalin-Endoperoxiden nach [4] in 1,4-Dioxan bei  $37^\circ\text{C}$  bei etwa 20 Stunden liegt.

Nach der Inkubationszeit von 34,5 Stunden wurden die Tumorzellen mit dem Farbstoff TOPRO-3 ( $1\mu\text{M}$ ) bzw. mit Calcein ( $1\mu\text{M}$ ) eingefärbt. TOPRO-3 ist ein Farbstoff, der dafür prädestiniert ist, tote Zellen zu markieren. Dabei wird der Farbstoff bei  $633\text{nm}$  angeregt und fluoresziert erst dann, wenn die Zellen auch tatsächlich tot sind. Calcein dagegen ist ein Farbstoff, der geeignet ist, um noch lebende Zellen zu markieren. Calcein wird bei  $488 \text{ nm}$  angeregt und fluoresziert im langwelligeren grünen Spektralbereich nur bei noch lebenden Tumorzellen. Abbildungen 7.7.1 bzw. 7.7.2 zeigen die Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop 34,5 Stunden nach Applikation der 1:30 verdünnten Liposomensuspension an den Tumorzellen in Graustufendarstellung. Abbildung 7.7.1 bzw. 7.7.2 zeigen die Tumorzellen appliziert mit nicht bestrahlten bzw. laserbestrahlten Liposomen. a) zeigt die toten Zellen eingefärbt mit Topro-3, b) zeigt die noch lebenden Zellen eingefärbt mit Calcein, in c) ist die Summe der toten und lebenden Zellen dargestellt, d.h. eine Überlagerung von a) und b). In Abbildung 7.7.2 kann man einen signifikanten Unterschied zwischen lebenden und toten Zellen im Vergleich zur Abbildung 7.7.1 feststellen. Betrachtet man den Quotienten aus lebenden Zellen zu toten Zellen, so ergibt sich im Falle der applizierten unbestrahlten dotierten Liposomensuspension ein Wert von  $\frac{403}{747} = 0,54$ , während

sich im Falle der laserbestrahlten dotierten Liposomensuspension ein Wert von  $\frac{112}{642} = 0,17$  ergibt. Somit ist der Anteil an toten Zellen im Falle der Applikation von laserbestrahlten, dotierten Liposomensuspensionen deutlich erhöht.

Abb. 7.7.1 nicht bestrahlt

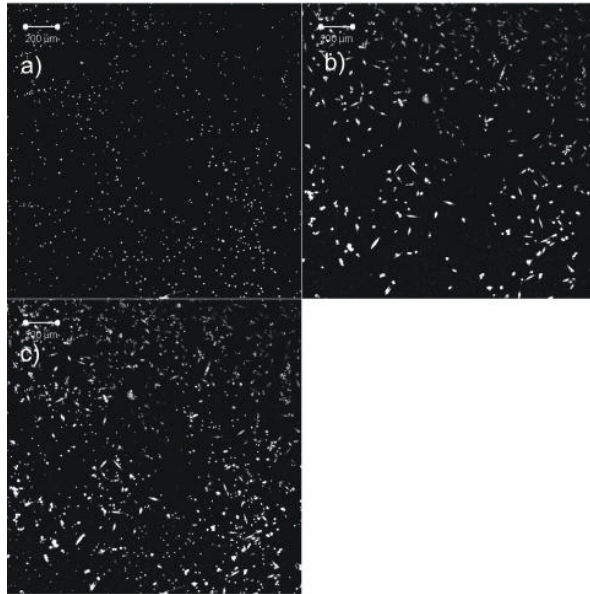


Abb. 7.7.2 laser-bestrahlt

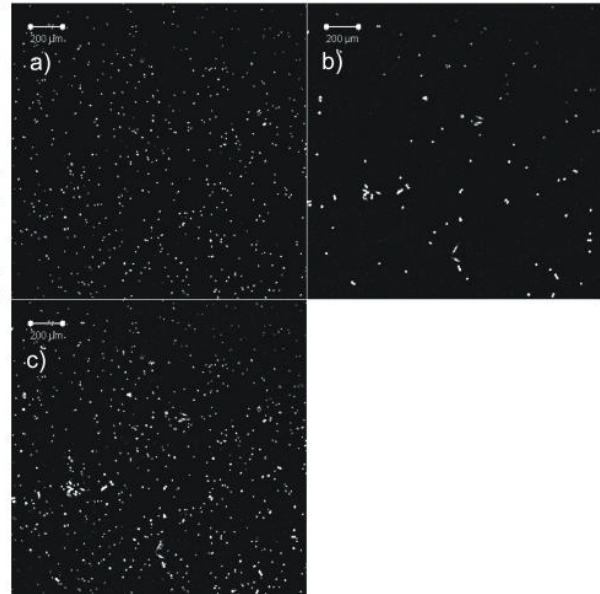


Abbildung 7.7: Demonstration der zytotoxischen Wirkung von 1,4,5-Trimethylnaphthalin-Endoperoxiden eingebaut in Liposomen an Mammakarzinomzellen mit Hilfe des Konfokalmikroskopes. a) charakterisiert die toten Zellen eingefärbt mit TOPRO-3, b) zeigt die noch lebenden Zellen eingefärbt mit Calcein. c) zeigt die Überlagerung von a) und b). Die Abbildungen zeigen die Aufnahme von Mammakarzinomzellen 34,5 Stunden nach der Applikation der Liposomensuspension; Abb.7.7.1 dotiert mit 1,4,5-Trimethylnaphthalin und PPIX-DME (nicht bestrahlt). Abb.7.7.2 dotiert mit 1,4,5-Trimethylnaphthalin-Endoperoxiden und PPIX-DME (laser-bestrahlt).

Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop (Axiovert 200 M/LSM 510 von Zeiss), Objektiv: Plan-Neofluar 10x/0,3 Öl Anregung von TOPRO-3 bei 633 nm, 13% Lasertransmission; Anregung von Calcein bei 488nm, 2% Lasertransmission, Filter: Ch1-1 LP650, Ch1-2 LP530

## 7.4 Fluoreszenzreduktion von Perylen-Diimid in Liposomen

Experimentelle Ergebnisse von Kneitschel [25] zeigen den Effekt der Abnahme der Fluoreszenzintensität (Fluoreszenzreduktion) von perylendotiertem Polyvinylbutyral (PVB) bei Bestrahlung mit Laser bei einer Wellenlänge im Bereich der Absorptionsbande und Vorhandensein von Sauerstoff. Bei Perylen handelt es sich um eine Substanz bestehend aus zwei Naphthalinmolekülen, die durch zwei Atombindungen an den Kohlenstoffatomen 4 und 5 miteinander verbunden sind. Es konnte von Kneitschel weiter belegt werden, dass nach erfolgter Fluoreszenzreduktion von Perylen auf Eloxal ( $T=25\text{ °C}$ ) bei Erwärmung auf  $80\text{ °C}$  und erneutem Abkühlen auf  $25\text{ °C}$ , ein deutlicher Zuwachs der Fluoreszenzintensität zu beobachten ist. Diese Messergebnisse führten zu dem Schluss, dass es sich hierbei um die Bildung und Thermolyse von Perylenendoperoxiden handeln könne. Da jedoch Perylen selbst toxisch ist, wurde im Hinblick auf weitere Untersuchungen vor allem im Zusammenhang mit Zellversuchen, das bereits im Abschnitt 5.1 erwähnte Perylen-Diimid verwendet. Das Perylenderivat wurde, wie in Abschnitt 6.2 beschrieben, in Liposomen eingebaut. Als Liposomenausgangsmaterial wurde wie auch im Abschnitt 7.3 1,2-Dimyristoyl-L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine (DMPC) verwendet. Die Liposomensuspension wurde mit der Extrusionstechnik (Abschnitt 6.2.2) hergestellt.

Zur Fluoreszenzreduktion des Perylen-Diimids in Liposomen wurde ein Argon-Ionen-Laser bei 488 nm und 514 nm verwendet. Die Leistungsdichte an der Probe betrug dabei  $140\text{ mW/cm}^2$ . Während dieser Fluoreszenzreduktion betrug die Temperatur  $13\text{ °C}$  und lag somit unterhalb der Phasenübergangstemperatur des DMPC. Die Detektionswellenlänge am Doppelmonochromator betrug dabei  $\lambda_{\text{det}}=536\text{ nm}$ . Abbildung 7.8 zeigt den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzreduktion innerhalb der Bestrahlungszeit von  $t=83\text{ min}$  (5000s). Nach der Bestrahlung wurde die Fluoreszenzreduktion ermittelt mit (siehe Abschnitt 3.3):

$$RF(t) = \frac{I(0) - I(t)}{I(0)} \cdot 100\% \quad (3.3)$$

Bei einer  $9,0 \cdot 10^{-7}$ -molaren Farbstoffkonzentration der Liposomensuspension konnte bei einer Leistungsdichte von  $140\text{ mW/cm}^2$  ein Wert von  $RF(83\text{min})=64\%$  erreicht werden Gl. (3.3). Dabei betrug die Lipidkonzentration in der Liposomensuspension  $1\text{ mg/ml}$ , der Farbstoff zu Lipidanteil (DMPC) wurde zu rund 1 : 2000 bestimmt. Der  $t_{20\%}$ -Wert wurde zu 580 Sekunden (vgl. Abbildung 7.8) ermittelt.

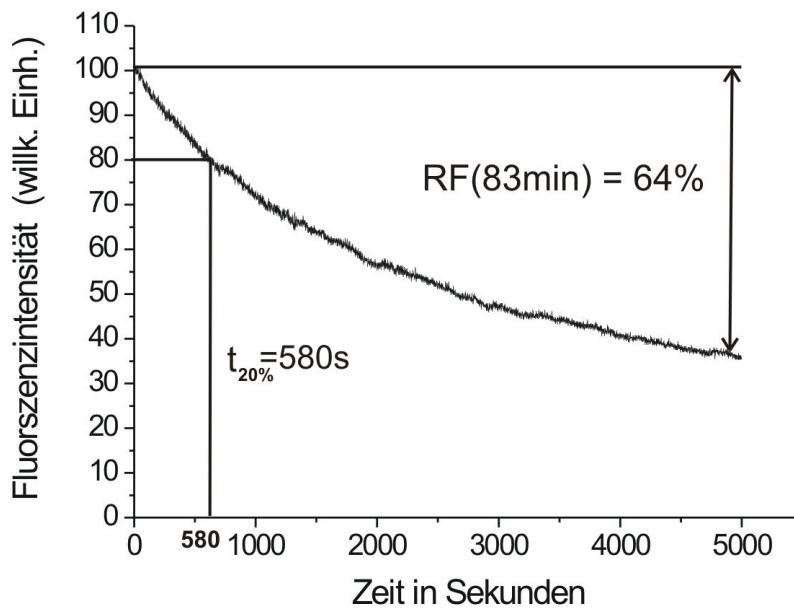


Abbildung 7.8: Abnahme der Fluoreszenzintensität während der Laserbestrahlung des Perylen-Diimids im Zusammenhang mit Autoperoxidation.

$\lambda_{ex}=488\text{nm}$ ,  $\lambda_{det}=536\text{nm}$ ,  $T=13^\circ\text{C}$ ,  $P/A=140\text{ mW/cm}^2$ , Farbstoffkonzentration der wässrigen Liposomensuspension betrug  $9 \cdot 10^{-7}\text{ mol/l}$  bei einem Farbstoff zu Lipidanteil von rund 1:2000. Das Volumen in der Küvette betrug 4 ml. Der Reduktionsfaktor RF des Perylenderivates in Liposomen beträgt bei diesen Randbedingungen zu 64 %. Der  $t_{20\%}$ -Wert betrug dabei 580 s.

Geht man davon aus, dass bei der Laserbestrahlung durch Autoperoxidation Endoperoxide gebildet werden, so kann man unter der Voraussetzung, dass alle Moleküle aufgrund des Rührvorgangs angeregt werden und keine photochemischen Reaktionsprodukte während der Laserbestrahlung entstehen, die Endoperoxidkonzentration aus der Fluoreszenzreduktion ermitteln. Dabei errechnet sich die Endoperoxidkonzentration folgendermaßen:

$$n_{endo} = n_{farb} \cdot \frac{RF(83\text{min})}{100\%} \quad (7.2)$$

Dabei bezeichnet  $n_{endo}$  die molare Stoffmenge der Endoperoxiden,  $n_{farb}$  die molare Stoffmenge des Farbstoff und  $RF(83\text{min})$  ist der Reduktionsfaktor am Ende der Bestrahlungsdauer.

Aus Gl. (7.2) lässt sich die Endoperoxidkonzentration, die einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hat, ermitteln. Somit ergibt sich aus den oben ermittelten Werten die Endoperoxidkonzentration in der Liposomensuspension nach der Laserbestrahlung zu  $n_{endo} = 5,7 \cdot 10^{-7}\text{ mol/l}$ .

## 7.5 Zytostatische bzw. cytocide Wirkung von laserbestrahlten Perylen-diimid dotierten Liposomen an Tumorzellen

### 7.5.1 Darstellung der Wachstumskurven an Mammakarzinomzellen

Im Zusammenhang mit Autoperoxidation durch Laserbestrahlung von Perylen-diimid-dotierten Liposomen wurde ebenfalls, analog zu Abschnitt 7.3 der wachstumshemmende Effekt an kultivierten Mammakarzinomzellen (MDA-MB 231) untersucht. Dazu wurden die Stammlösungen der Liposomen sowohl mit der Ultraschallbad-Methode als auch durch Extrusion hergestellt (vgl. Abschnitt 6.2.1 und 6.2.2). Die Farbstoffkonzentration der Liposomen hergestellt mit der Ultraschallbadmethode betrug dabei  $4 \cdot 10^{-5}$  mol/l, die Farbstoffkonzentration der Liposomen hergestellt mit der Extrusionstechnik wurde durch das zusätzliche Abzentrifugieren des überschüssigen Farbstoffes um das etwa 44-fache reduziert, sodass man von einer  $9 \cdot 10^{-7}$  molaren Stammlösung ausgehen kann. Die Bestrahlung der Farbstoff-dotierten Liposomen erfolgte bei 13°C bei einer Laserleistungsdichte von etwa 140 mW/cm<sup>2</sup> und ergab einen Reduktionsfaktor von  $RF(38min)=64\%$  bei einem Volumen der Probe von 4 ml. Um die Stärke des Effekts bestimmen zu können, wurde die Liposomensuspension (Stammlösung) vor Applikation an den Tumorzellen mit 1:10 bzw. 1:30 in Kulturmedium verdünnt. Somit betragen die Farbstoffkonzentration der Liposomensuspensionen (hergestellt durch Extrusionstechnik), die an den Tumorzellen appliziert wurden,  $9 \cdot 10^{-8}$  mol/l bzw.  $3 \cdot 10^{-8}$  mol/l. Prinzipiell wird jedoch davon ausgegangen, dass durch die beiden Liposomenpräparationen (Extrusionstechnik und Ultraschallbadmethode) anteilmäßig gleich viel gelöster Farbstoff in die Lipidmembran der Liposomen eingebaut wird, da durch den Beschallungsvorgang im Ultraschallbad (vgl. Abschnitt 6.2) bei beiden Präparationstechniken gleich viel Lipidanteil in den Liposomensuspensionen vorliegt und somit von einer äquivalenten Aufnahmewahrscheinlichkeit des Farbstoffes in die Lipidmembran ausgegangen werden kann. Ebenso wird dann nach der laserinduzierten Synthese der Endoperoxide in Liposomen bei beiden Liposomenpräparationsmethoden im Falle eines gleichen Reduktionsfaktors von einer gleichen Wirksubstanz in der Stammlösung ausgegangen.

In Abbildung 7.9 werden die Wachstumskurven der Mammakarzinomzellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (180 h) dargestellt. Der in den Wachstumskurven gegen die Inkubationszeit aufgetragene Absorptionsindex ist proportional mit der Zahl der noch lebenden Tumorzellen (vgl. Abschnitt 6.6.3). Zur Kontrolle wurden die Tumorzellen mit PBS, einem Phosphatpuffer für ungehemmtes Zellwachstum (vgl. Abschnitt 6.6.2), inkubiert.

a) zeigt die zytostatische Wirkung der laserbestrahlten Farbstoff-dotierten Liposomen (Herstellung: Extrusions-Technik) bei den Verdünnungen 1:10 bzw. 1:30 in Kulturmedium verglichen mit der Kontrolle PBS. Man kann bei der Verdünnung 1:10 erkennen, dass die zytostatische Wirkung nach bereits 120 Stunden eintritt, während sie bei der Verdünnung 1:30 nach etwa 160 Stunden eintritt. Vergleicht man die Wachstumskurven mit b), so kann man bei den laserbestrahlten Farbstoff-dotierten Liposomen, die im Ultraschallbad hergestellt wurden, bei der 1:30 Verdünnung nahezu keinen zytotoxischen Effekt feststellen, obwohl die Ausgangszelldichte um einen Faktor zwei (siehe Absorptionsindex zu Beginn der Inkubation) erniedrigt ist. c) bzw. d) zeigt das Zellwachstum bei Applikation der Farbstoff-dotierten bzw. undotierten Liposomen (Herstellung: Extrusions-Technik) in den Verdünnungen 1:10 und 1:30. Man kann erkennen, dass sowohl die undotierten als auch die Farbstoff-dotierten Liposomen bei der Verdünnung 1:30 keinen Effekt an Tumorzellen zeigen (nahezu identischer Wachstumsverlauf mit der Kontrolle), während sie bei der Verdünnung 1:10 bereits leicht zytotoxisch sind. Untersuchungen mit dem Konfokalmikroskop haben gezeigt, dass die Liposomen bei den Verdünnungen 1:10 bereits Aggregate bilden, die an sich selbst schon zytotoxisch sind. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchungen an Tumorzellen die auch pharmazeutisch übliche Verdünnung von 1:30 gewählt (vgl. Abschnitt 7.3).

Abbildung 7.10 beschreibt die Kontrolle an Tumorzellen mit dem Zytostatikum Cisplatin mit einer Konzentration von  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l bzw.  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Cisplatin ist in diesem Zellversuch somit über eine Größenordnung höher konzentriert als die applizierten Liposomensuspensionen hergestellt durch Extrusion-Technik. Aus den Abbildungen kann man entnehmen, dass die laserbestrahlten, Farbstoff-dotierten Liposomensuspensionen hergestellt durch Extrusion-Technik bei einer Endkonzentration von  $3 \cdot 10^{-8}$  mol/l den gleichen Effekt an Tumorzellen zeigen, als das Zytostatikum Cisplatin in der Konzentration von  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l.

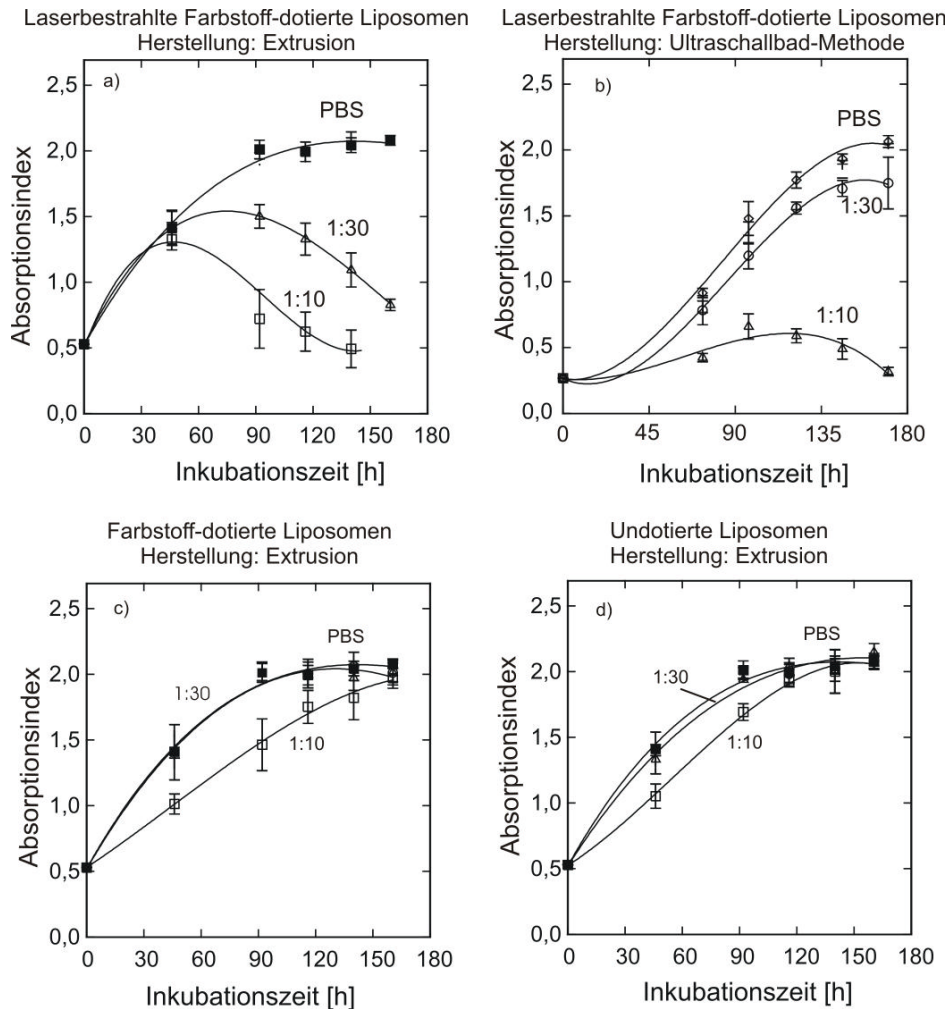


Abbildung 7.9: Wachstumskurven von Mammakarzinomzellen nach Applikation von laserbestrahlten Perylen-Diimid dotierten Liposomen bei  $T=37^{\circ}\text{C}$ . a) zeigt die zytostatische Wirkung der laserbestrahlten Farbstoff-dotierten Liposomen (Herstellung: Extrusions-Technik) bei den Verdünnungen 1:10 bzw. 1:30 in Kulturmedium verglichen mit der Kontrolle PBS. Man kann bei der Verdünnung 1:10 erkennen, dass die zytostatische Wirkung nach bereits 120 Stunden eintritt, während sie bei der Verdünnung 1:30 nach etwa 160 Stunden eintritt. Vergleicht man die Wachstumskurven mit b), so kann man bei den laserbestrahlten Farbstoff-dotierten Liposomen im Ultraschallbad hergestellt, bei der 1:30 Verdünnung nahezu keinen zytotoxischen Effekt feststellen, obwohl die Ausgangszelldichte um einen Faktor zwei (siehe Absorptionsindex zu Beginn der Inkubation) erniedrigt ist. c) bzw. d) zeigt das Zellwachstum bei Applikation der Farbstoff-dotierten bzw. undotierten Liposomen (Herstellung: Extrusions-Technik) in den Verdünnungen 1:10 und 1:30. Man kann erkennen, dass sowohl die undotierten, als auch die Farbstoff-dotierten Liposomen, bei der Verdünnung 1:30 keinen Effekt an Tumorzellen zeigen (nahezu identischer Wachstumsverlauf mit der Kontrolle), während sie bei der Verdünnung 1:10 bereits leicht zytotoxisch sind.



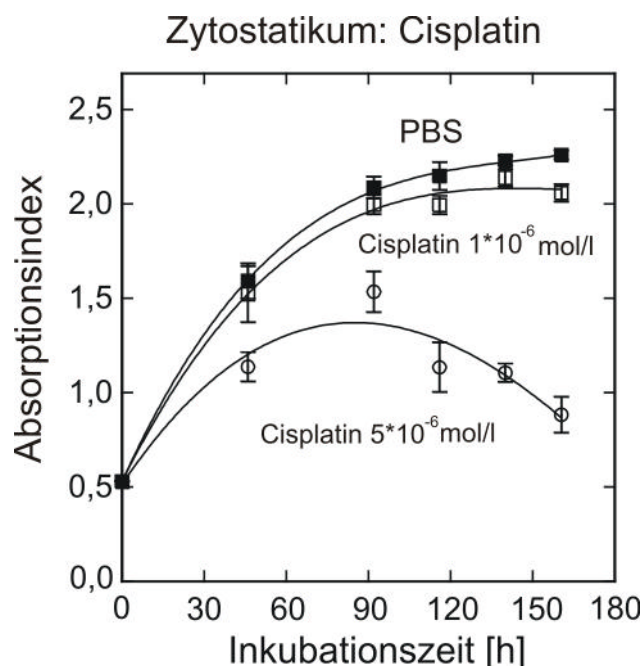


Abbildung 7.10: Wachstumskurven von Mammakarzinomzellen nach Applikation des Zytostatikums Cisplatin. Der Graph zeigt analog zur Abbildung 7.9 die zeitliche Entwicklung der Zellpopulation bei Applikation von Cisplatin mit den Konzentrationen  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l bzw.  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Zu bemerken ist, dass bei einer Konzentration von  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l ein nur sehr geringer zytotoxischer Effekt beobachtet werden kann. Im Gegensatz dazu kann bei den Liposomensuspensionen hergestellt durch Extrusion-Technik in der Verdünnung 1:30 und schließlich einer Endkonzentration von  $3 \cdot 10^{-8}$  mol/l nach etwa 160 Stunden eine zytostatische Wirkung beobachtet werden wie bei Cisplatin in der Konzentration  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l (siehe Abbildung 7.9 a).

### 7.5.2 Darstellung der Wachstumskurven an Kolonkarzinomzellen

Neben Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB 231 wurden auch Kolonkarzinomzellen der Zelllinie HT29 auf die zytostatische Wirkung der laserbestrahlten Perylendiimid-dotierten Liposomen überprüft. Dabei wurden wiederum Liposomen, hergestellt durch Extrusion-Technik, an den Tumorzellen appliziert. Die Farbstoffdotierung der Stammlösung betrug wiederum  $9 \cdot 10^{-7}$  mol/l und wurde vor Applikation 1:30 verdünnt. Der Reduktionsfaktor konnte nach der Laserbestrahlung zu 60% ermittelt werden. Abbildung 7.11 zeigt das Wachstumsverhalten der Kolonkarzinomzellen nach Applikation der Liposomensuspensionen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Hervorzuheben ist dabei, dass die laserbestrahlten Farbstoff-dotierten Liposomen nach der Inkubationszeit von etwa 200 Stunden einen zytociden Effekt zeigen da die Zelldichte zum Ende geringer ist als zu Beginn des Zellversuches (vgl. Abschnitt 6.3.3).

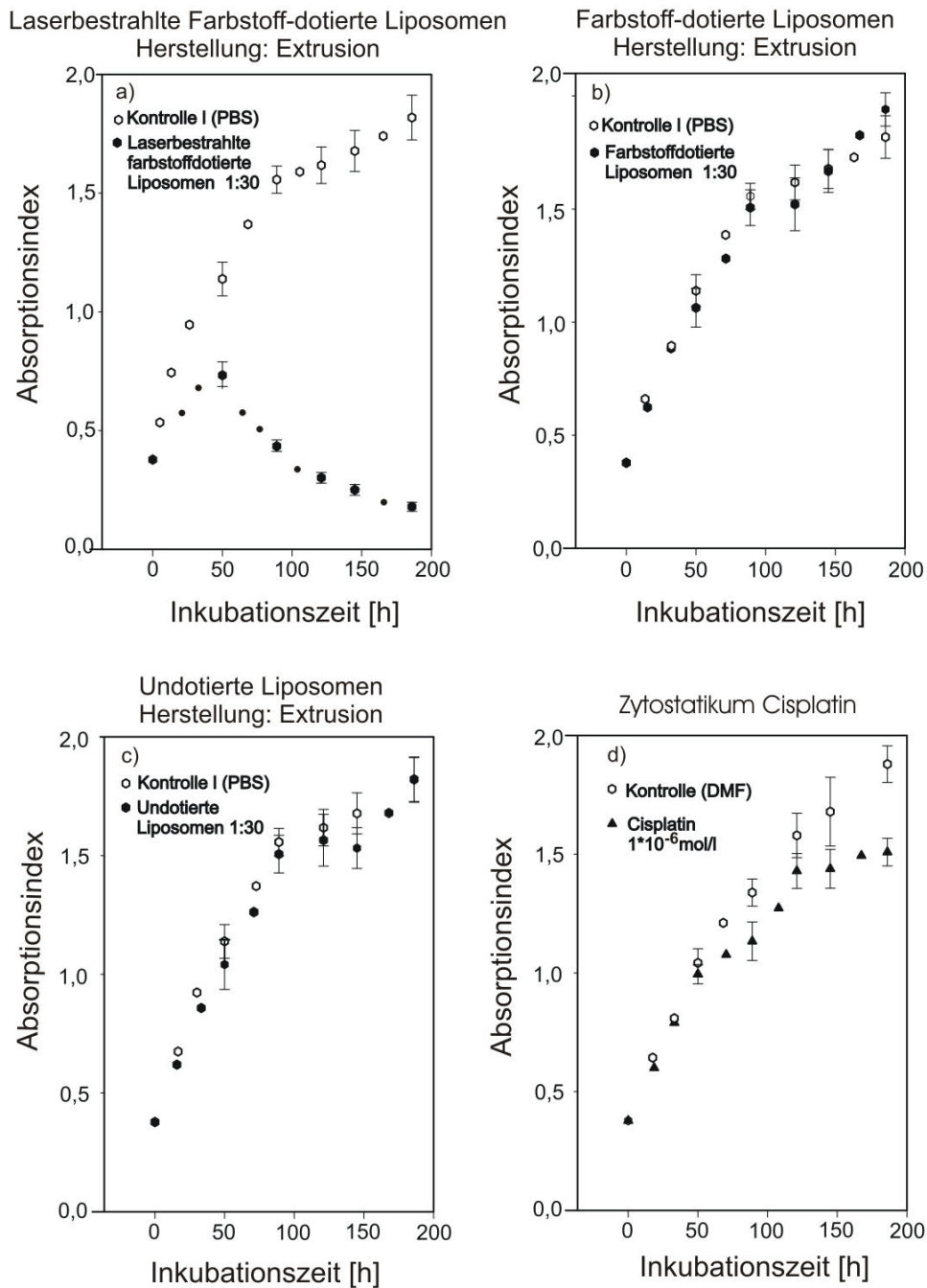


Abbildung 7.11: Demonstration des zytociden Effektes an Kolonkarzinomzellen der Zelllinie HT-29 von laserbestrahlten Farbstoff-dotierten Liposomen in der Verdünnung 1:30 innerhalb der Inkubationszeit von 200 Stunden a). Zur Kontrolle wurde an den Tumorzellen zeitgleich PBS dazugegeben. b) bzw. c) zeigen den Wachstumsverlauf der Tumorzellen bei Applikation von Farbstoff-dotierten bzw. undotierten Liposomen. In d) kann man erkennen, dass das Zytostatikum Cisplatin in der Konzentration von  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$  kaum eine toxische Wirkung auf den Wachstumsverlauf der Zellen hat. Hier wurde zur Kontrolle Dimethylformamid (DMF) als Wachstumsmedium verwendet. Der Zellversuch wurde bei  $T=37^\circ\text{C}$  durchgeführt.

## 7.6 Kolokalisation der Perylen-diimid dotierten Liposomen an Mammakarzinomzellen mit Hilfe des Konfokalmikroskops

Durch Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop ist es möglich einzelne optische Schnitte innerhalb der Zelle aufzuzeichnen, um somit Aussagen über die Lokalisation von Partikeln im Zellinneren zu treffen. Damit sollte der Entstehungsort des Zellschadens nach Applikation der laserbestrahlten Farbstoff-dotierten Liposomen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Perylendiimid-dotierten Liposomen an Mammakarzinomzellen appliziert und nach bestimmten Inkubationszeiten mit dem Konfokalmikroskop beobachtet. Um die Farbstoff-dotierten Liposomen zu lokalisieren, machte man sich die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes zu Nutze. Um die Kolokalisation zu erleichtern, wurden die Zellkerne zur Kontrolle mit dem Kernfarbstoff DRAQ5 (von Invitrogen) markiert. Dadurch konnte die Lokalisation der Zellkerne eingegrenzt werden. Abbildung 7.12.1 zeigt eine Übersichtsaufnahme mit Hilfe des Konfokalmikroskops über eine Stapelfolge von Konfokalebenen über eine Gesamthöhe von über 10,2  $\mu\text{m}$ . Die Abbildung 7.12.2 zeigt eine vergrößerte Aufnahme aus der Stapelfolge, dabei kann man die Lokalisation der Liposomen eindeutig im Zytoplasma der Zellen feststellen. Abbildung 7.12.3 zeigt ebenfalls eine Übersichtsaufnahme der Farbstoff-dotierten Liposomen im Zytoplasma der Mammakarzinomzellen [76]. Die Bildaufnahme erfolgte 24 Stunden nach der Inkubation der Tumorzellen mit den farbstoff-dotierten Liposomen. Dabei wurde der Kernfarbstoff DRAQ5 bei 633 nm angeregt und ab 650 nm dessen Fluoreszenz detektiert, während die farbstoff-dotierten Liposomen bei 514 nm angeregt wurden und deren Fluoreszenz ab 530 nm detektiert wurde. Im Zytoplasma also innerhalb der Zellumrandung kann man die Liposomen als kleine Punkte identifizieren[76]. Diese Beobachtung konnte durch eine Gegen-Kontrolle, bei der die Tumorzellen nicht mit der Liposomensuspension appliziert wurden, bestätigt werden.

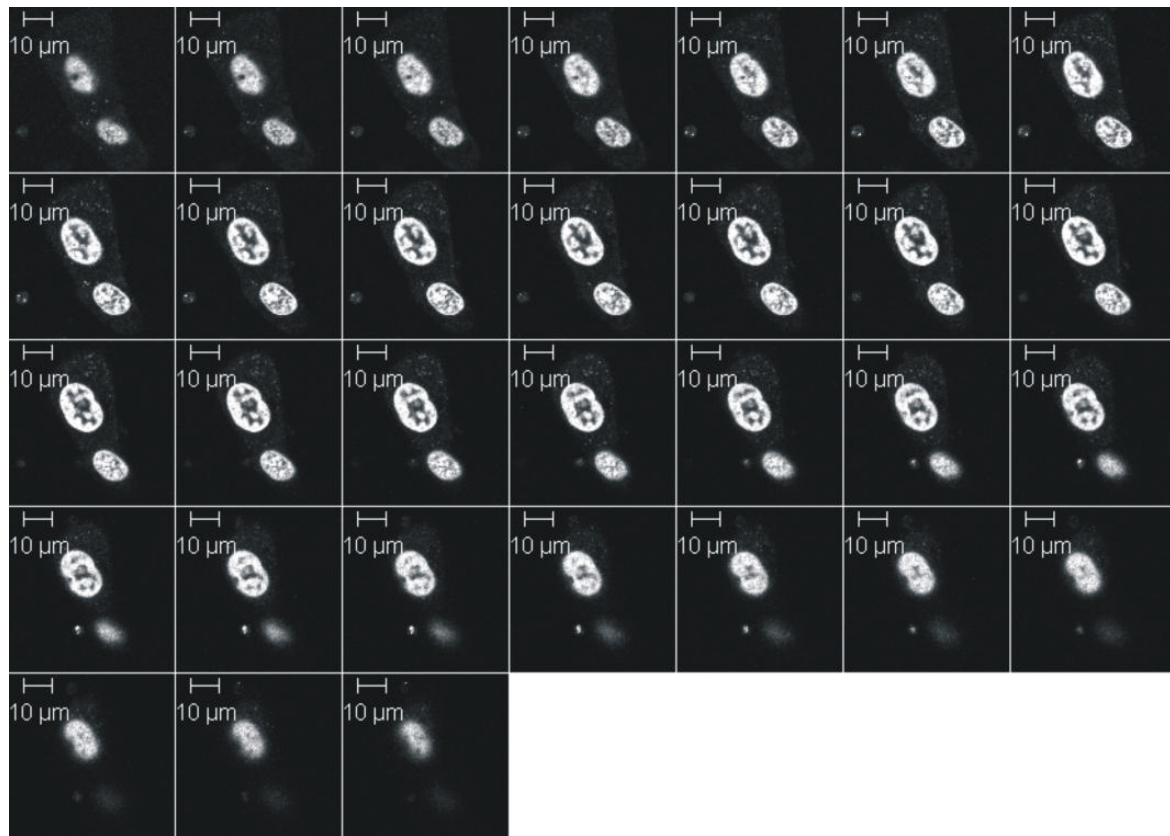


Abbildung 7.12.1: Nachweis zur Lokalisation der Farbstoff-dotierten Liposomensuspension (Verdünnung 1:30) im Zytoplasma von zwei Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB 231. Aufnahme einer Stapelfolge von Konfokalebene über eine Gesamthöhe von 10,2 µm (von links nach rechts). Die Bildaufnahme erfolgte 24h nach Applikation. Objektiv: Plan Apochromat 63x/1,4 Öl; Wellenlänge: 633 nm, 11 % Transmission des Lasers ; 514 nm, 8% Transmission des Lasers

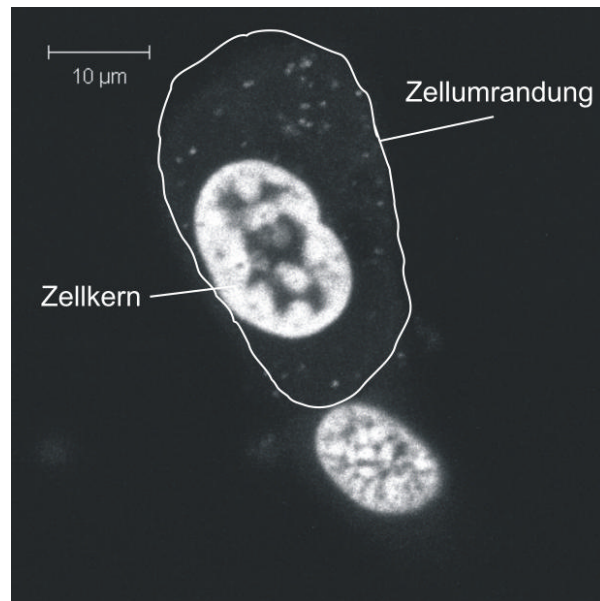


Abbildung 7.12.2: Aufnahme aus der Stapelfolge aus Abbildung 7.12.1 vergrößert. Die Abbildung zeigt die Umrandung einer Zelle sowie deren ovalen Zellkern. Die Liposomen als kleine punktförmige Gebilde sind eindeutig im Zytoplasma vorzufinden [76].

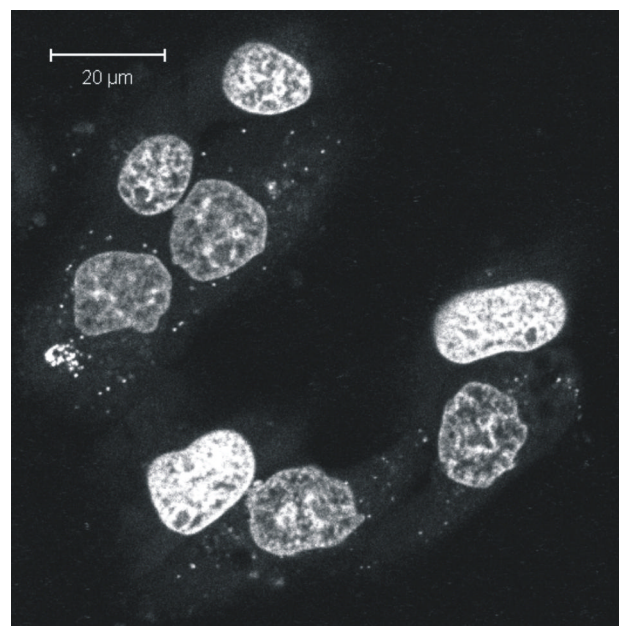


Abbildung 7.12.3: Übersichtsaufnahme der Farbstoff-dotierten Liposomen im Zytoplasma von Mammkarzinomzellen. Aufnahme 24 h nach Applikation. Objektiv: Plan Apochromat 63x/1,4 Öl; Wellenlänge: 633 nm, 20 % Transmission des Lasers; 514 nm, 11% Transmission des Lasers (Farbstoff-dotierte Liposomen).



Zur weiteren Untersuchung der Lokalisation der Liposomen in den Zellen wurden die Zellen mit Lysotraker Red DND 99 (von Invitrogen) versetzt. Red DND 99 ist ein Farbstoff, der die Lysosomen in den Zellen markiert und ebenfalls zur Fluoreszenzdetektion bei 633 nm angeregt werden kann. Bereits nach 5 min. Applikation des Lysotrakers an den Tumorzellen ist er in den Lysosomen vorzufinden. In Abbildung 7.13 sieht man anhand der konfokalen Bildaufnahmen der Tumorzellen, dass die Fluoreszenz der Farbstoff-dotierten Liposomen (grün) b) an den selben Stellen wie Fluoreszenz des Lysotrakers a) (in Falschfarbendarstellung: weiss) lokalisiert ist („Kokalisation“). Die Überlagerung beider Bilder c) liefert eine nahezu identische Bildstruktur wie in a) und b).

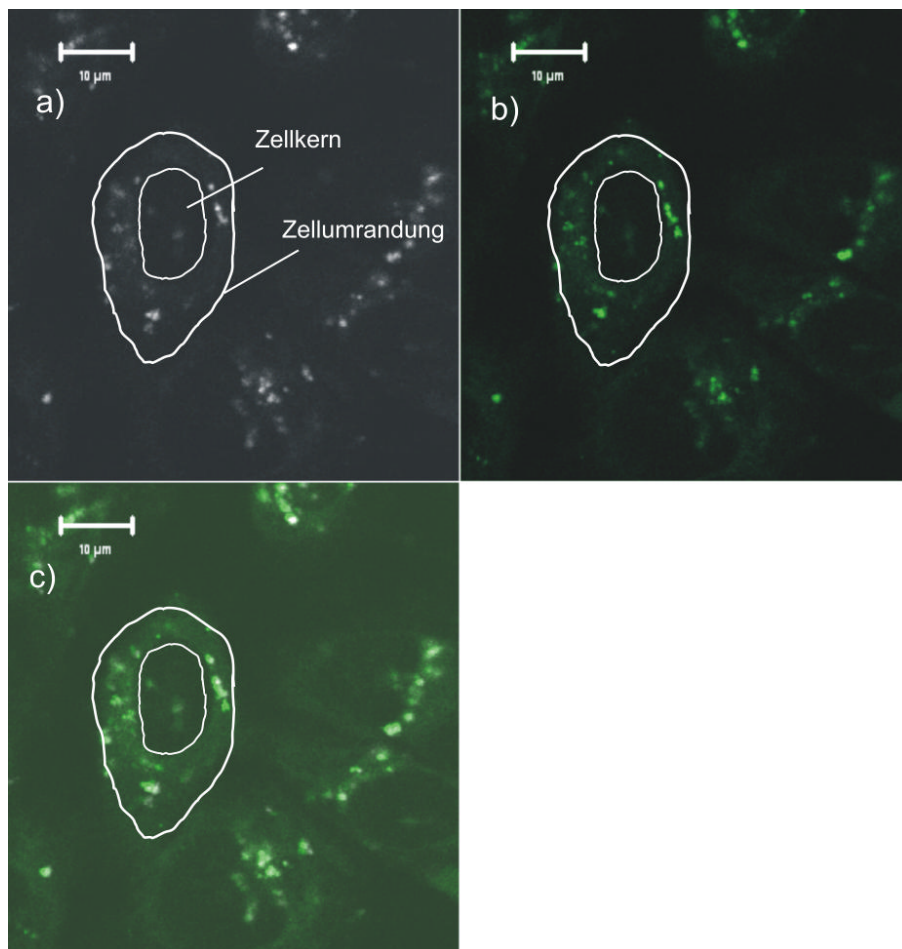


Abbildung 7.13: Nachweis der Lokalisation der Perylendiimid-dotierten Liposomen in den Lysosomen der Mammakarzinomzellen durch Gegenfärbung mit Lysotraker Red DND 99. a) zeigt die Fluoreszenzaufnahmen des Lysotrakers zur Markierung der Lysosomen (in Falschfarbendarstellung: weiss). b) zeigt die Fluoreszenz der Liposomen in den Tumorzellen. In c) kann man als Überlagerung von a) und b) ein nahezu identisches Bild zu a) und b) erkennen, bei der auch die Lysotrakerfluoreszenz mit der Fluoreszenz der Perylendiimid-dotierten Liposomen kokalisiert ist. Aufnahme nach 40 Stunden. Objektiv Plan-Neofluar 40x/1,3 Emulsionsöl; Wellenlänge: 633nm, 13% Transmission des Lasers; 458 nm, 68% Transmission des Lasers.

Die Kolokalisationsaufnahmen in diesem Kapitel zeigen, dass die Liposomen durch Endozytose ins Zellplasma aufgenommen werden und schließlich in den Lysosomen landen.

## 7.7 Erhöhung der Stabilität von 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxiden durch Einbau in das Polymer Polyvinylbutyral

Neben den Liposomen als Matrix für die Erzeugung von Endoperoxiden galt ein weiteres Interesse den Polymermaterialien [6], wobei spezielle Polymerimplantate bereits für die Behandlung von z.B. Hirntumoren durch Freisetzung von klassischen Zytostatika eingesetzt werden. Hierbei ist eine ausreichende Stabilität der eingebauten Endoperoxide und somit die verzögerte Freisetzung von Singulett-Sauerstoff von entscheidender Bedeutung, da hier eine Freisetzungszeit von Wochen bis hin zu Monaten erforderlich ist. Aus diesem Grund wurde für Modellbetrachtungen in unserem Falle das Polymer Polyvinylbutyral (PVB) herangezogen, welches sich wegen seiner vollständigen amorphen Struktur hervorragend für optische Untersuchungen eignet [1].

Zur Demonstration der Möglichkeit einer Erhöhung der Zerfallshalbwertszeit, wurde der Zerfall der 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxide in PVB untersucht. Dabei wurden der Sensitizer PPIX-DME sowie 1,4-Dimethylnaphthalin wie in Abschnitt 6.3 beschrieben in PVB eingebaut und anschließend ein kleiner Polymerfleck auf ein Glassubstrat aufgebracht. Dieser Polymerfleck wurde dann über 24 Stunden in Ethanolatmosphäre gelagert. Die Dimethylnaphthalinkonzentration im flüssigen Polymer lag bei  $1,3 \cdot 10^{-2}$  mol/l, die Sensitizerkonzentration betrug  $6,0 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Die Schichtdicke des Polymers wurde zu  $(40 \pm 5)$   $\mu\text{m}$  bestimmt. Der Durchmesser des Polymerfleckes betrug etwa 3,5 mm. Anschließend wurde der Polymerfleck mit dem Substrat vor dem Monochromator gehalten und während der Sensitizer-Anregung mit dem Argon-Ionen-Laser ( $\lambda_{\text{ex}}=514\text{nm}$ ;  $P/A=320\text{mW/cm}^2$ ) die Abnahme der Fluoreszenzintensität des 1,4,-Dimethylnaphthalins ( $\lambda_{\text{ex}}=325\text{nm}$ ;  $P/A=1\text{mW/cm}^2$ ) bei  $\lambda_{\text{det}}=346\text{ nm}$  ermittelt.

Abbildung 7.15 zeigt die zeitabhängige Abnahme der Fluoreszenzintensität von 1,4-Dimethymethylnaphthalin in PVB aufgrund der Endoperoxidbildung. Der Reduktionsfaktor (vgl. Abschnitt 3.3) wurde dabei zu  $\text{RF}=85\%$  ermittelt, wobei er im allgemeinen zwischen 65 und 75 % lag. Nach der Bestrahlung wurden die Proben über 1 Stunde im Exsikkator bei  $10^{-3}$  Torr evakuiert.

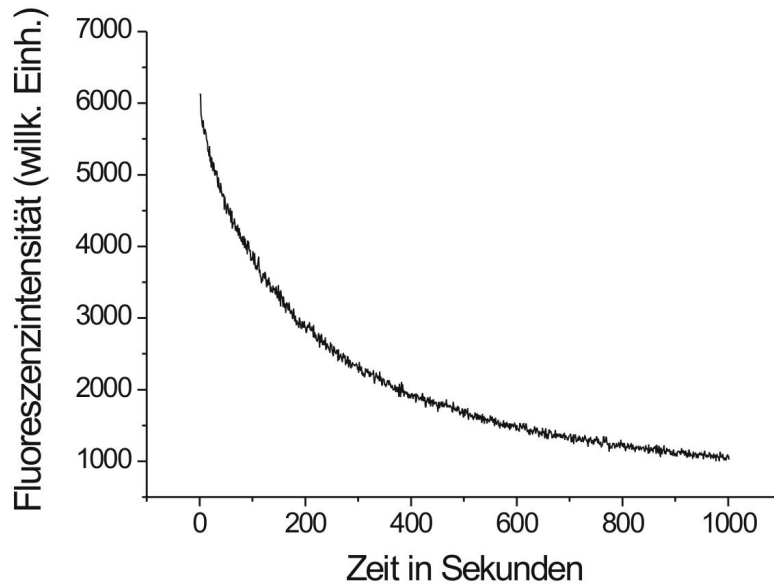


Abbildung 7.15: Demonstration der Endoperoxidbildung von 1,4-Dimethylnaphthalin in PVB. Der Graph zeigt die zeitliche Abnahme der Fluoreszenzintensität von 1,4-Dimethylnaphthalin ( $\lambda_{ex}=325\text{ nm}$ ,  $\lambda_{det}=346\text{ nm}$ ); Anregung Sensitizer ( $\lambda_{ex}=514\text{ nm}$ ,  $P/A=320\text{ mW/cm}^2$ ).

Nach der Evakuierung der Proben wurde die Fluoreszenzrücksetzung einer Polymerprobe bei 25 °C und einer weiteren Polymerprobe bei 38 °C untersucht. Dabei wurde nach gewissen Zeitintervallen jeweils die Zunahme der Fluoreszenzintensität gemessen, wobei die Temperatur während der Fluoreszenzmessungen immer 25 °C betrug. Für die Bestimmung der Fluoreszenzrücksetzung bei  $T_2=38^\circ\text{C}$  wurde die Probe mit Thermoelement bei der entsprechenden Temperatur im Heizblock getempert (vgl. Abbildung 6.7). Dabei wurde darauf geachtet, die Aufwärmzeit sowie die Abkühlzeit (auf 25°C) der Probe gegenüber der Heizzeit bei 38°C so gering wie möglich zu halten. In Abbildung 7.16 ist die Fluoreszenzrücksetzung von 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxiden in PVB in Abhängigkeit von der Zeit für die Temperaturen  $T_1=25^\circ\text{C}$  und  $T_2=38^\circ\text{C}$  aufgetragen. Dabei wurde der relative Anteil aus Fluoreszenzrücksetzung  $A$  (aufgrund der Thermolyse) zu Gesamtfluoreszenzreduktion  $A_0$  (aufgrund der Endoperoxidbildung) ermittelt, auf  $A_0$  normiert und gegen die Zeit halblogarithmisch nach Gleichung 7.1 aufgetragen.



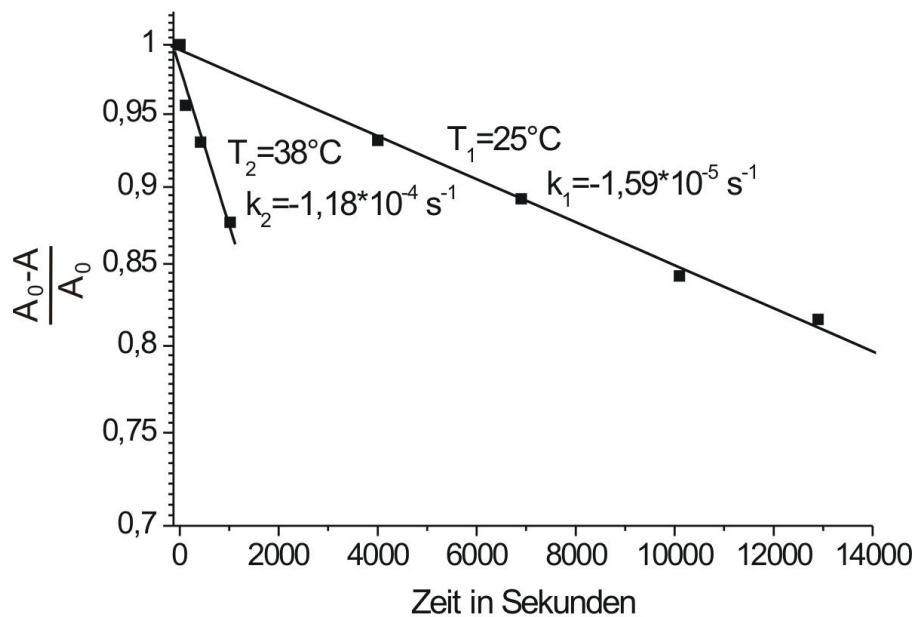


Abbildung 7.16: Demonstration der Fluoreszenzrücksetzung von 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxiden in PVB bei den Temperaturen  $T=25^\circ\text{C}$  und  $T=38^\circ\text{C}$ . Der Graph zeigt die halblogarithmische Darstellung der Fluoreszenzrücksetzung aufgrund des Zerfalles der Endoperoxide in Abhängigkeit von der Zeit. Die Anregung von 1,4-Dimethylnaphthalin erfolgte bei  $\lambda_{\text{ex}}=325\text{nm}$ , die Detektion der Fluoreszenzintensität über den Monochromator wurde bei  $\lambda_{\text{det}}=346\text{nm}$  gemessen. Aus dem Graphen kann man die Ratenkonstante bei  $25^\circ\text{C}$  zu  $k_1=1,59 \cdot 10^{-5} \text{ 1/s}$  entnehmen, während sie bei  $38^\circ\text{C}$  zu  $1,18 \cdot 10^{-4} \text{ 1/s}$  bestimmt wurde.

Aus der Abbildung 7.16 kann entnommen werden, dass die 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxide in PVB bei  $T=25^\circ\text{C}$  mit einer Ratenkonstante von  $k_{25^\circ\text{C}}=1,59 \cdot 10^{-5} \text{ 1/s}$  ( $t_{1/2}=12,1 \text{ h}$ ) und bei  $T=38^\circ\text{C}$  mit einer Ratenkonstante von  $k_{38^\circ\text{C}}=1,18 \cdot 10^{-4} \text{ 1/s}$  ( $t_{1/2}=1,6 \text{ h}$ ) zerfallen. Nach Turro zerfallen 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxide in 1,4-Dioxan bei  $25^\circ\text{C}$  mit einer Halbwertszeit von  $t_{1/2}=5,8\text{h}$  ( $k_{25^\circ\text{C}}=3,33 \cdot 10^{-5} \text{ 1/s}$ ), während sie im selben Lösungsmittel bei  $38^\circ\text{C}$  eine Zerfallshalbwertszeit von  $1 \text{ h}$  ( $k_{38^\circ\text{C}}=1,94 \cdot 10^{-4} \text{ 1/s}$ ) haben. Somit ist die Zerfallshalbwertszeit der Endoperoxide in PVB im Vergleich zu 1,4-Dioxan bei  $T=25^\circ\text{C}$  um den Faktor 2, und bei  $T=38^\circ\text{C}$  um den Faktor 1,6 erhöht.

## 7.8 Reduktionseffizienz von 1,4-Dimethylnaphthalin in PVB bei unterschiedlichem Ethanolgehalt

Zur Demonstration der Endoperoxidbildung von 1,4-Dimethylnaphthalin in PVB mit unterschiedlichem Ethanolgehalt sowie der Fluoreszenzrücksetzung durch den thermisch induzierten Zerfall der Endoperoxide wurden die Polymere wiederum wie in Abschnitt 6.3 präpariert. Das Polymer wurde mit einer Dimethylnaphthalinkonzentration von  $1,3 \cdot 10^{-2}$  mol/l und einer Sensitizerkonzentration (PPIX-DME) von  $6,0 \cdot 10^{-4}$  mol/l analog zu Abschnitt 7.7 dotiert, wobei das Polymer in diesem Falle auf ein Kupferblech (10 x 30 x 0,1 mm) aufgetragen wurde. Die Polymerprobe wurde bei 325 nm angeregt, die Fluoreszenzdetektion erfolgte bei 346 nm. Zur Anregung des Sensitizers kam wiederum ein Argon-Ionen-Laser ( $\lambda_{ex}=514$  nm) zum Einsatz mit einer Leistungsdichte vor dem Polymerfleck von  $320 \text{ mW/cm}^2$ .

Abbildung 7.17 zeigt die Fluoreszenzreduktion von 1,4-Dimethylnaphthalin aufgrund der Endoperoxidbildung bei Raumtemperatur (A) ( $T=25^\circ\text{C}$ ). Man beobachtet eine nahezu vollständige Fluoreszenzrücksetzung nach 5 min. Erhitzen bei  $T=80^\circ\text{C}$  und erneutem Abkühlen auf Raumtemperatur (B). Es wird davon ausgegangen, dass sich der Restgehalt an Ethanol im Polymer durch den Heizprozess verringert. Dabei erfolgte die Wärmeübertragung hier über einen Heizwiderstand, der hinter dem Kupferblech mit dem Polymer angebracht wurde. Zur Temperaturkontrolle wurde ein Thermoelement verwendet, das an dem Kupferblech angebracht war. Es wird darauf hingewiesen, dass während des Heizvorgangs und der Dunkelpause der Argon-Ionen-Laser abgeblockt wurde. Nach dem Heizvorgang konnte erneut bei Raumtemperatur durch das Dazuschalten des Argon-Ionen-Lasers bei identischer Leistungsdichte eine Fluoreszenzreduktion mit allerdings deutlich geringerer Reduktionseffizienz verifiziert werden. Bei gleichen Einstrahlbedingungen beträgt die Zeit  $t_{20\%}$  bei der ursprünglichen Probe 66 sec während sich nach der Erwärmung auf 233 sec, also um mehr als das dreifache, steigt.

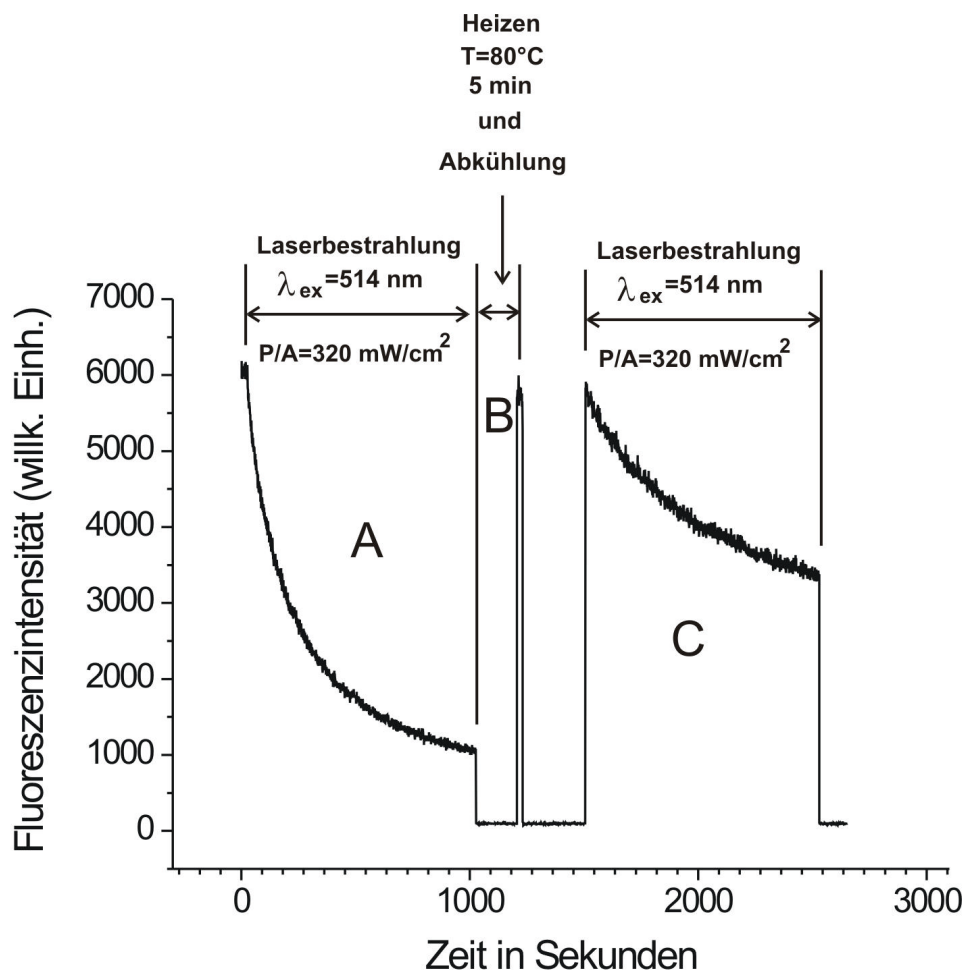


Abbildung 7.17: Nachweis unterschiedlicher Effizienz der Endoperoxidbildung in PVB mit unterschiedlichem Ethanolgehalt. A demonstriert die Fluoreszenzreduktion von 1,4-Dimethylnaphthalin aufgrund der Endoperoxidbildung ( $t_{20\%}=66\text{s}$ ). B zeigt die Fluoreszenzintensität nach 5 min. Aufheizen auf 80°C und erneutem Abkühlen auf Raumtemperatur ( $T=25^\circ\text{C}$ ) bei reduziertem Ethanolgehalt des Polymers. C bestätigt eine erneute Fluoreszenzreduktion bei Raumtemperatur mit einer allerdings erheblich geringeren Reduktionseffizienz ( $t_{20\%}=233\text{s}$ ). Anregung des Naphthalinderivates bei  $\lambda_{\text{ex}}=325\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{det}}=346\text{nm}$ ; Anregung des Sensitizers PPIX-DME  $\lambda_{\text{ex}}=514 \text{ nm}$  P/A=320 mW/cm<sup>2</sup>.

Betrachtet man die beiden Fluoreszenzreduktionen vor und nach dem Aufheizvorgang, so lassen sich daraus Aussagen über die Reduktionseffizienz machen. Im Anhang werden mögliche Gründe für diese Beobachtung, insbesondere unterschiedliche Diffusionseigenschaften von Singulett-Sauerstoff, diskutiert.

## 8 Diskussion und Ausblick

### 8.1 Effekt an Tumorzellen von laser-bestrahlten Liposomen dotiert mit aromatischen Molekülen

Im Abschnitt 7.5 wurde die zytostatische Wirkung an Mammakarzinomzellen sowie die zytocide Wirkung an Kolonkarzinomzellen der laserbestrahlten perylen-diimid dotierten Liposomen demonstriert. Zusätzlich wird in Abbildung 7.8 das Absinken der Fluoreszenzintensität des Perylen-Diimids in Liposomen gezeigt, das durch eine Endoperoxidbildung des aromatischen Moleküls über Autoperoxidation erklärt werden kann. An Mammakarzinomzellen konnte bei Applikation von extrudierten Liposomen ( $\varnothing \leq 100\text{nm}$ ) mit der Verdünnung 1:30 (siehe Abbildung 7.9) ein nahezu zytostatischer Effekt nachgewiesen werden, während man mit Liposomen in der gleichen Verdünnung hergestellt mit dem Ultraschallbad (inhomogene Größenverteilung) nur einen zytotoxischen Effekt nachweisen konnte. Zugleich konnte bei den farbstoff-dotierten bzw. undotierten Liposomen ohne Laserbestrahlung kein nennenswerter Effekt an den Tumorzellen beobachtet werden. Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop zeigen, dass die Liposomen im Zytoplasma durch Endozytose aufgenommen werden und schließlich in den Lysosomen der Zelle landen [76].

In diesem Zusammenhang wird die Wirkung an Tumorzellen durch eine Freisetzung von Singulett-Sauerstoff aus den aromatischen Molekülen durch Thermolyse bei  $37^\circ\text{C}$  erklärt. Wenn Singulett-Sauerstoff in der Plasmamembran der Zelle vorhanden ist, dann kann er die dort befindlichen Proteine und Enzyme zerstören und damit letztendlich die Zelle zerstören [76]. Eine mögliche Erklärung für die signifikant höhere Zytotoxizität der extrudierten Liposomen könnte sein, dass die kleineren Liposomen mit der homogenen Größen-Verteilung leichter durch Endozytose aufgenommen werden können, als die Liposomen mit der inhomogenen Verteilung, bei denen auch verhältnismäßig große Liposomen mit einem Durchmesser von bis zu  $1000\text{nm}$  vorhanden sind.

Untersuchungen an Melanomzellen der Zelllinie B16-F10 zeigen, dass spezielle fluoreszente Polymernanopartikel, sogenannte „fluoreszente Microspheres“ nur bis zu einer bestimmten Partikelgröße von den Tumorzellen aufgenommen werden können. Rejman J. et. al. [77] konnte mit Hilfe eines Konfokalmikroskopes zeigen, daß diese Polymernanopartikel bei einer Größe von  $50\text{-}200\text{ nm}$  innerhalb von drei Stunden Inkubation sehr gut von den Tumorzellen aufgenommen werden. Diese Nanopartikel wurden jedoch bei einer Größe von  $500\text{ nm}$  nur noch vereinzelt und bei einer Größe von  $1000\text{ nm}$  nicht mehr im Zytoplasma vorgefunden.

Die zytotoxische Wirkung an Mammakarzinomzellen von laserbestrahlten Liposomen dotiert mit 1,4,5-Trimethylnaphthalin und PPIX-DME im Vergleich zu den nichtbestrahlten dotierten Liposomen ist signifikant (siehe Abbildung 7.7). In diesem Zusammenhang kann ebenso der Zelltod durch die Freisetzung von Singulett-Sauerstoff aus 1,4,5-Trimethylnaphthalin-Endoperoxiden erklärt werden, da die laserbestrahlten Liposomen dotiert mit 1,4,5-Trimethylnaphthalin die Thermolyse der Endoperoxide bestätigen (vgl. Abschnitt 7.2).

Bei der Anwendung von laserbestrahlten, Perylen-diimid dotierten Liposomen an Kolonkarzinomzellen (HT-29) wurde sogar eine cytocide Wirkung beobachtet, d.h. die Zellzahl nimmt im Verlauf des Inkubationszeitraums ab. Diese Wirkung kann ebenfalls durch die Freisetzung von Singulett-Sauerstoff aus den Endoperoxiden erklärt werden.

## 8.2 Barrierenerhöhung von 1,4-Dimethylnaphthalin Endoperoxiden in PVB im Vergleich zu Lösung

Im folgenden wird die Erhöhung der Zerfallszeit von 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxiden in PVB gegenüber Lösung diskutiert. Dabei kann aus den Messungen in Abschnitt 7.1 entnommen werden, dass die Zerfallszeit dieser Endoperoxide in Lösung mit der in Liposomen nahezu korreliert. In Abschnitt 7.7 wird eine Erhöhung der Zerfallshalbwertszeit bzw. Stabilität von 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxiden in PVB demonstriert. Die erhöhte Stabilität der Endoperoxide in PVB soll ermittelt und durch eine Barrierenerhöhung erklärt werden.

Diese Barrierenerhöhung lässt sich folgendermaßen erklären: Für den Zerfall der Endoperoxide in das zugrunde liegende aromatische Molekül (1,4-Dimethylnaphthalin) und Singulett-Sauerstoff wird freies Volumen, sogenanntes positives Aktivierungsvolumen, benötigt. Dabei bedeutet positives Aktivierungsvolumen, dass für den Zerfall der Endoperoxide ein zusätzliches Volumen benötigt wird, da beide Moleküle separiert voneinander mehr Volumen beanspruchen als in der Verbindung des Endoperoxides. Für den Zerfall der Endoperoxide in Lösung steht aufgrund der weitgehend freien Bewegung der Lösungsmittelmoleküle ein zeitlich schnell fluktuierend ausreichend großes, freies Volumen zur Verfügung und somit wird auch der Zerfall in erster Linie nur durch die chemische Bindung der Peroxidkette am aromatischen Molekül behindert. Im Falle des Polymers PVB ist aufgrund von „Verschlaufungen“ ein vermindertes freies Volumen vorhanden, wodurch der Zerfall der Endoperoxide behindert wird. Dies hat eine Barrierenerhöhung für die Thermolyse zur Folge. In Abbildung 8.1 wird eine schematische Darstellung für die Barrierenerhöhung vorgestellt. Das Diagramm (Doppelmuldenpotential) ist durch die Energie  $E$ , sowie eine verallgemeinerte Reaktionskoordinate  $\zeta$ , die das gesamte System beschreibt, definiert. Das Endoperoxid, eingebaut in eine bestimmte Matrix, ist durch das System II

charakterisiert. Energetisch tiefer liegend befindet sich das System I, mit dem zugrundeliegenden Aromaten und Singulett-Sauerstoff in der gleichen Matrix. Die gewählte Matrix hat direkten Einfluss auf die Höhe der Barriere und somit auf die Zerfallshalbwertszeit der Endoperoxide.

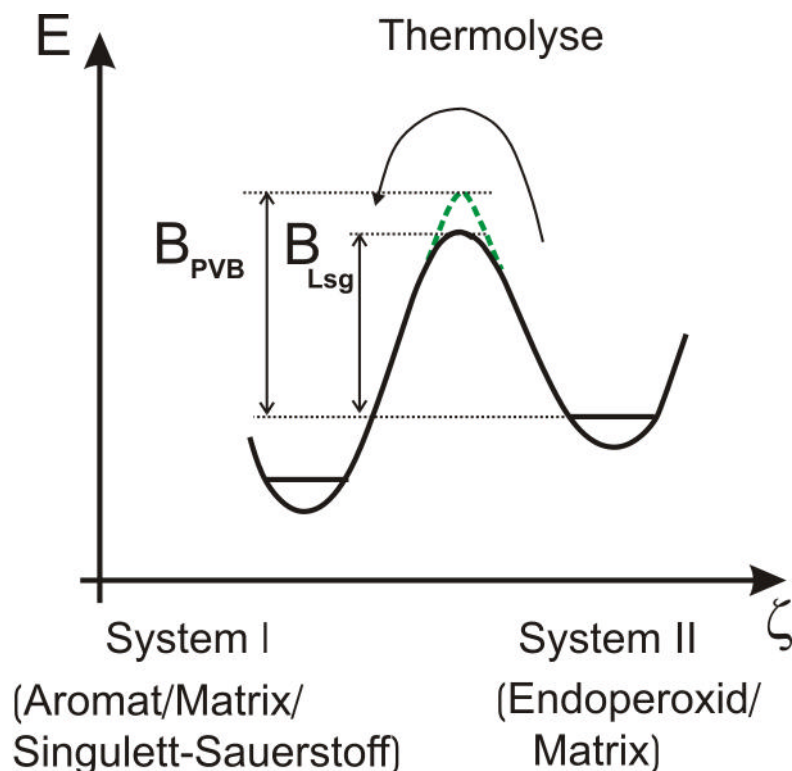


Abbildung 8.1: Schematische Darstellung für die Barrierenerhöhung für den Zerfall der Endoperoxide in PVB gegenüber Lösung (nicht maßstabsgetreu). Das Diagramm ist durch die Energie  $E$ , sowie eine verallgemeinerte Reaktionskoordinate  $\zeta$  die das gesamte System beschreibt, definiert. Das Endoperoxid, eingebaut in eine bestimmte Matrix, ist durch das System II charakterisiert. Energetisch tiefer liegend befindet sich das System I, mit dem zugrundeliegenden Aromaten und Singulett-Sauerstoff in der gleichen Matrix. Die gewählte Matrix hat direkten Einfluss auf die Höhe der Barriere und somit auf die Zerfallszeit der Endoperoxide.

In Abschnitt 7.7 wurde eine doppelt so hohe Zerfallshalbwertszeit von 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxiden in PVB in Vergleich zu Lösung ermittelt. Aus den gemessenen Ratenkonstanten  $k$  des Zerfallsprozesses in PVB für die beiden Temperaturen  $T_1=25^\circ\text{C}$  und  $T_2=38^\circ\text{C}$  kann man dann anhand der beiden Ratenkonstanten in 1,4-Dioxan (Lösungsmittel) nun die Erhöhung der Stabilität der Endoperoxide in PVB berechnen. Im folgenden wird statt der Erhöhung der Stabilität von der Erhöhung der Barriere  $\Delta B$  gesprochen. Dabei sind folgende Werte gegeben (vgl. Abschnitt 7.7):

Temperaturen  $T$  und Ratenkonstanten  $k$  in PVB:

$$T_{1(PVB)}=298 \text{ K} \rightarrow k_{1(PVB)}=1,59 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1} ; T_{2(PVB)}=311 \text{ K} \rightarrow k_{2(PVB)}=1,18 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

Temperaturen  $T$  und Ratenkonstanten  $k$  in dem Lösungsmittel 1,4-Dioxan (Abk.: Lsg für Lösung) nach Turro [4]:

$$T_{1(Lsg)}=298 \text{ K} \rightarrow k_{1(Lsg)}=3,33 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1} ; T_{2(Lsg)}=311 \text{ K} \rightarrow k_{2(Lsg)}=1,94 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

Nach Arrhenius gilt allgemein [69]:

$$k = A \cdot \exp(-E / RT) \quad (8.1)$$

mit  $k$  der Ratenkonstanten,  $A$  einem konstantem Vorfaktor,  $E$  der eigentlichen Aktivierungsenergie für die Thermolyse die im folgenden mit  $B$  ( $B$  steht für Barriere) bezeichnet wird,  $R$  der allgemeinen Gaskonstanten und  $T$  der Temperatur. Gl. (8.1) lässt sich umformen zu:

$$\ln k = \ln A - \frac{B}{RT} \quad (8.2)$$

Sind die Ratenkonstanten für zwei verschiedene Temperaturen bekannt, so lässt sich in Gl. (8.2) die Konstante  $A$  bzw.  $\ln A$  eliminieren. Im Falle der ermittelten Werte in 1,4-Dioxan kann man dann folgendermaßen schreiben:

$$\ln k_{1(Lsg)} + \frac{B_{(Lsg)}}{RT_{1(Lsg)}} = \ln k_{2(Lsg)} + \frac{B_{(Lsg)}}{RT_{2(Lsg)}} \quad (8.3)$$

es folgt dann:

$$B_{(Lsg)} = \frac{\ln k_{2(Lsg)} - \ln k_{1(Lsg)}}{\frac{1}{R} \left( \frac{1}{T_{1(Lsg)}} - \frac{1}{T_{2(Lsg)}} \right)} = 104,4 \text{ kJ/mol} = 8722 \text{ cm}^{-1} \quad (8.4)$$

Ebenso folgt für die ermittelten Werte in PVB für die Barriere  $B$ :

$$B_{(PVB)} = \frac{\ln k_{2(PVB)} - \ln k_{1(PVB)}}{\frac{1}{R} \left( \frac{1}{T_{1(PVB)}} - \frac{1}{T_{2(PVB)}} \right)} = 118,7 \text{ kJ/mol} = 9920 \text{ cm}^{-1} \quad (8.5)$$

Um die Barrierenerhöhung  $\Delta B$  für den Zerfall der Endoperoxide zwischen Lösungsmittel (1,4-Dioxan) und PVB zu ermitteln muss man dann Gl. (8.4) von Gl. (8.5) abziehen:

$$\Delta B = B_{(PVB)} - B_{(Lsg)} = 14,3 \text{ kJ/mol} = 1198 \text{ cm}^{-1} \sim 1200 \text{ cm}^{-1} \quad (8.6)$$

### 8.3 Reduktionseffizienz des Systems 1,4-Dimethylnaphthalin/PPIX-DME in PVB bzw. Liposomen

In diesem Abschnitt soll die Reduktionseffizienz von 1,4-Dimethylnaphthalin aufgrund der Laseranregung des Photosensibilisators PPIX-DME, sowohl in Liposomen, als auch in PVB ermittelt werden. Während bei der Autoperoxidation, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird, diejenigen Moleküle, die den Singulett-Sauerstoff nach Lichtabsorption erzeugen, dieselben sind wie diejenigen, die das Endoperoxid bilden, betreffen beim System 1,4-Dimethylnaphthalin/PPIX-DME (DMN/PPIX-DME) beide Vorgänge unterschiedliche Moleküle, sodass ein wesentlich komplizierterer Fall für die Abschätzung von  $\eta$  aus den experimentellen Daten vorliegt. Da die Zahl der absorbierenden Sensitizer-Moleküle konstant bleibt, ist die Analogie zur Brenneffizienz beim stabilen spektralen Lochbrennen, die im Abschnitt 3.3 verwendet wurde und die zum Beispiel für den Fall der Autoperoxidation anwendbar ist, nicht vollständig gegeben. Daher wird ausgehend von der Definition der Reduktionseffizienz (photochemischen Quanteneffizienz) als Verhältnis produzierter Endoperoxidmoleküle zur Zahl absorbierter Photonen (siehe Abschnitt 3.3) folgende Überlegung angestellt:



Betrachtet man ein Erzeugungsexperiment, bei dem nach einer Zeit  $t_{20\%}$  ein Anteil von 20% der als Singulett-Sauerstoff-Speicher wirkenden 1,4-Dimethylnaphthalin-Moleküle ein Endoperoxid gebildet haben, so ist zu diesem Zeitpunkt die Zahl der Endoperoxide  $0,2 \cdot N(\text{DMN})$ , wobei  $N(\text{DMN})$  die Gesamtzahl der im Probenvolumen befindlichen Speicher-Moleküle (1,4-Dimethylnaphthalin) darstellt. Die Zeitdauer  $t_{20\%}$  wurde hierbei aufgrund der bei allen Experimenten beobachteten, guten Erreichbarkeit und in Analogie zu Abschnitt 3.3 gewählt.

Die Zahl der bis zu diesem Zeitpunkt von den Sensitizer-Molekülen absorbierten Photonen lässt sich folgendermaßen bestimmen: Das Produkt aus der Photonenflussdichte  $\Phi$  und dem Absorptionswirkungsquerschnitt  $\sigma(\nu)$  gibt die Anzahl der Absorptionsprozesse eines Sensitizer-Moleküls (hier: PPIX-DME) pro Zeiteinheit an. Um die Gesamtzahl der absorbierten Photonen zu errechnen, ist dieser Wert mit der Experimentierzeit  $t_{20\%}$  und der Zahl der im Probenvolumen vorhandenen Sensitizer-Moleküle  $N(\text{PPIX-DME})$  zu multiplizieren.

Damit ergibt sich für die Reduktionseffizienz (photochemische Quanteneffizienz):

$$\eta = \frac{0,2 \cdot N(\text{DMN})}{\Phi \cdot \sigma(\nu) \cdot t_{20} \cdot N(\text{PPIX-DME})}$$

Das Verhältnis der Anzahl der Moleküle entspricht dem Verhältnis der Konzentrationen der Moleküle  $c(\text{DMN})$  und  $c(\text{PPIX-DME})$ . Daher ergibt sich:

$$\eta = \frac{0,2 \cdot c(\text{DMN})}{\Phi \cdot \sigma(\nu) \cdot t_{20} \cdot c(\text{PPIX-DME})} \quad (8.7)$$

Die im Nenner stehende Sensitizerkonzentration beinhaltet, dass bei Beobachtung des gleichen  $t_{20\%}$ -Wertes z.B. mit einer 10-fach niedrigeren Sensitizer-Konzentration eine um den Faktor 10 höhere Effizienz vorliegt. Im zeitlichen Verlauf der Endoperoxidbildung nimmt  $\eta$  im Gegensatz zur Autoperoxidation ab. Diese Abnahme ist darauf zurückzuführen, dass die Sensitizerkonzentration und damit die Rate der absorbierten Photonen konstant bleibt, während die Konzentration der Speichermoleküle (DMN) und damit die Rate der möglichen Endoperoxidbildungen abnimmt. Diese Formel zur Abschätzung von  $\eta$  aus  $t_{20\%}$  beinhaltet deshalb die Angabe eines Mittelwerts (für den Zeitraum bis  $t_{20\%}$ ) bei den gegebenen experimentellen Randbedingungen insbesondere den Konzentrationen von Sensitizer- und Speicher-Molekül. Auf den Unterschied zwischen  $\eta$  bei Verwendung eines Sensitizermoleküls und bei Autoperoxidation wird im folgenden Abschnitt nochmals eingegangen.

Bei der Berechnung von  $\eta$  wird davon ausgegangen, dass der Absorptionswirkungsquerschnitt des Sensitizers PPIX-DME bei 514 nm für Liposomen ( $\sigma(\nu)_{(Lipos)}$ ) und PVB ( $\sigma(\nu)_{(PVB)}$ ) in guter Näherung durch den Wert von  $2,3 \times 10^{-17} \text{ cm}^2$  beschrieben wird, der in deuteriertem Ethanol gemessen wurde [70]. In beiden Systemen wird nur ein geringer Anteil des Laserlichts absorbiert, sodass in guter Näherung von einer homogenen Leistungsdichte in den Proben ausgegangen werden kann.

Aufgrund des Mischprozesses der Liposomensuspension während der Anregung des Sensitizers mit dem Argon-Ionen-Laser bei 514 nm, erniedrigt sich die effektive mittlere Rate der Absorptionen pro Sensitizer-Molekül im Verhältnis von mit dem Laserstrahl ausgeleuchtetem Volumen in der Küvette zum gesamten Küvettenvolumen. Mit einer Laserleistung von 250 mW und einer Fläche des Laserstrahls von  $0,8 \text{ cm}^2$ , ergibt sich für die mittlere Zahl der Absorptionen je Sensitizer-Molekül pro Sekunde

$$(\Phi \cdot \sigma(\nu))_{Lipos} = \frac{250 \text{ mW} \cdot 2,3 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2}{0,8 \text{ cm}^2 \cdot 6,62 \cdot 10^{-34} \text{ Js} \cdot 5,8 \cdot 10^{14} \text{ s}^{-1}} \cdot \frac{0,8 \text{ cm}^2 \cdot 1 \text{ cm}}{4 \text{ cm}^3} = 3,7 \text{ s}^{-1}$$

Dabei wird von einer Küvette mit  $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$  Grundfläche und einer Füllhöhe von  $4 \text{ cm}$  ausgegangen, wobei der Laser die Küvette längs einer der  $1 \text{ cm}$  – Kanten durchstrahlt.

Mit  $t_{20\%} = 111 \text{ s}$  (Abbildung 7.1) und den Konzentrationen von DMN und PPIX-DME bezogen auf das Lipidvolumen  $c(\text{DMN})_{\text{Lipid}} = 2,95 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$  und  $c(\text{PPIX-DME})_{\text{Lipid}} = 2,95 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$  ergibt sich für die Reduktionseffizienz

$$\begin{aligned} \eta_{(Lipos)}(c(\text{DMN}); c(\text{PPIX - DME})) &= \eta_{(Lipos)}(2,95 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}; 2,95 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}) = \\ &= \frac{0,2 \cdot 2,95 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}}{3,7 \text{ s}^{-1} \cdot 111 \text{ s} \cdot 2,95 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}} = 5 \cdot 10^{-3} \end{aligned}$$

Im Fall der Matrix PVB kann die mittlere Rate der Absorptionen pro Sensitizer-Molekül direkt aus der Leistungsdichte des Lasers von  $2 \text{ W/cm}^2$  ermittelt werden:

$$(\Phi \cdot \sigma(\nu))_{PVB} = \frac{2 \text{ W/cm}^2 \cdot 2,3 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2}{6,62 \cdot 10^{-34} \text{ Js} \cdot 5,8 \cdot 10^{14} \text{ s}^{-1}} = 120 \text{ s}^{-1}$$

Mit  $t_{20\%} = 52 \text{ s}$  aus Abbildung 7.15 und den Konzentrationen  $c(\text{DMN})_{\text{PVB}} = 5,2 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$  und  $c(\text{PPIX-DME})_{\text{PVB}} = 2,4 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$  errechnet sich

$$\begin{aligned} \eta_{(PVB)}(c(\text{DMN}); c(\text{PPIX - DME})) &= \eta_{(PVB)}(5,2 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}; 2,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}) = \\ &= \frac{0,2 \cdot 5,2 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}}{120 \text{ s}^{-1} \cdot 52 \text{ s} \cdot 2,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}} = 7 \cdot 10^{-4} \end{aligned}$$

Für das Verhältnis der beiden Reduktionseffizienzen in PVB bzw. Liposomen ergibt sich dann:

$$\frac{\eta_{(Lipos)}}{\eta_{(PVB)}} = \frac{5 \cdot 10^{-3}}{7 \cdot 10^{-4}} = 7$$

Die Reduktionseffizienz in PVB ist damit etwa um einen Faktor 7 geringer als in Liposomen, wobei in etwa vergleichbare, absolute Konzentrationen von DMN und PPIX-DME zugrunde liegen. Mögliche Gründe für den Unterschied zwischen den beiden Reduktionseffizienzen in PVB bzw. Liposomen könnten unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen in den beiden Matrizen sein. Ebenso müssen eventuell unterschiedliche Diffusionskoeffizienten des Sensitizers, des Sauerstoffs und des 1,4-Dimethylnaphthalins, sowie eine möglicherweise unterschiedliche Lebensdauer des Singulett-Sauerstoffs in den beiden Systemen mit berücksichtigt werden.

In Abbildung 7.17 wird deutlich, dass die Reduktionseffizienz der 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxide nach einem Trocknungsprozess erheblich vermindert ist. Dies bedeutet auch im Zusammenhang mit der Präparation der Polymere (vgl. Abschnitt 6.3) und der anschließenden Endoperoxidbildung, dass es hinsichtlich der Reduktionseffizienz vorteilhaft ist, wenn das Polymer noch einen gewissen Ethanolgehalt aufweist und nicht vollständig getrocknet ist. Nach der Endoperoxidbildung ist es jedoch von Vorteil, die Polymere zu evakuieren ( $10^{-3}$  Torr; 1 Std.), um so durch den Trocknungsprozess die gewünschte Zerfallszeit der Endoperoxide zu erhöhen (vgl. Abschnitt 8.2).

## 8.4 Reduktionseffizienz des Perylendiimids in Liposomen

Zur Bestimmung der Reduktionseffizienz des Perylen-Diimids in Liposomen durch Autoperoxidation, muss zunächst der Absorptionsquerschnitt des Perylen-Diimids (KF241) ermittelt werden. Aus Absorptionsmessungen des Perylen-Diimids in Methanol konnte der molare Extinktionskoeffizient zu  $\varepsilon = 1,46 \cdot 10^5 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  bei 525 nm ermittelt werden. Es wird davon ausgegangen, dass sich der Extinktionskoeffizient auf Liposomen übertragen lässt. Nach Abbildung 6.1 (Absorptionsspektrum des Perylen-Diimids) ergibt sich dann bei der Anregungswellenlänge des Argon-Ionen-Lasers ( $\lambda_{ex} = 514 \text{ nm}$ ) für den molaren Extinktionskoeffizienten ein Wert von  $7,3 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Dann gilt für den Absorptionsquerschnitt für das Perylen-Derivat mit der Avogadrokonstanten  $N_L$ :

$$\sigma(\nu) = \varepsilon \cdot 1000 \cdot \frac{\text{cm}^3}{1} \cdot \ln(10) / N_L = 7,3 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 1000 \frac{\text{cm}^3}{1} \cdot \frac{\ln(10)}{6,022 \cdot 10^{23}} \cdot \text{mol}$$

$$\Rightarrow \sigma(\nu) = 2,79 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$$

Aufgrund des Mischprozesses der Liposomensuspension während der Anregung des Sensitizers mit dem Argon-Ionen-Laser bei 514 nm erniedrigt sich – wie auch im Abschnitt 8.3 berücksichtigt - die mittlere Rate der Absorptionen pro Molekül im Verhältnis von dem mit dem Laserstrahl ausgeleuchtetem Volumen in der Küvette zum gesamten Küvettenvolumen. Mit einer Laserleistung von 110 mW und einer Fläche des Laserstrahls von 0,8 cm<sup>2</sup> ergibt sich für die mittlere Zahl der Absorptionen je Sensitizer-Molekül pro Sekunde

$$(\Phi \cdot \sigma(\nu))_{Lipos} = \frac{110mW \cdot 2,8 \cdot 10^{-16} cm^2}{0,8cm^2 \cdot 6,62 \cdot 10^{-34} Js \cdot 5,8 \cdot 10^{14} s^{-1}} \cdot \frac{0,8cm^2 \cdot 1cm}{4cm^3} = 20s^{-1}$$

Dabei wird wieder von einer Küvette mit 1 cm x 1 cm Grundfläche und einer Füllhöhe von 4 cm ausgegangen, wobei der Laser die Küvette längs einer der 1 cm langen Kanten durchstrahlt.

Zur Ermittlung der Reduktionseffizienz des Perylen-Diimids in Liposomen kann die Gl. (3.2) direkt angewendet werden, da es sich um Autoperoxidation handelt. Der  $t_{20\%}$ -Wert kann aus der Abbildung 7.8 zu 580 s entnommen werden. Somit gilt dann für die Reduktionseffizienz des Perylen-Diimids in Liposomen:

$$\eta = -\ln(0,8)(\sigma(\nu) \cdot \Phi \cdot t_{20\%})^{-1} = -\ln(0,8)(2,79 \cdot 10^{-16} cm^2 \cdot 7,16 \cdot 10^{16} cm^{-2}s^{-1} \cdot 580s)^{-1} = 2 \cdot 10^{-5}$$

Im Vergleich der Reduktionseffizienz von 1,4-Dimethylnaphthalin durch Sensibilisatoranregung des PPIX-DME, ist die Effizienz der Endoperoxidbildung im Zusammenhang mit Autoperoxidation des Perylen-Diimids um mehr als zwei Größenordnungen geringer. Die Triplett-T<sub>1</sub>-Quantenausbeute von PPIX-DME in Methanol beträgt nach [71] 0,8, wodurch sehr effizient Singulett-Sauerstoff generiert werden kann und somit sehr effizient 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxide in Liposomen gebildet werden können. Des weiteren ist 1,4-Dimethylnaphthalin geradezu prädestiniert über den Singulett-Sauerstoff-Einfang Endoperoxide zu bilden [4]. Im Gegensatz dazu besitzt das Perylen-Diimid bei 536 nm eine Fluoreszenzquantenausbeute deutlich über 95% [58], was eine sehr geringe Übergangswahrscheinlichkeit in den Triplett-Zustand des Farbstoffes zur Folge hat. Dies bedeutet auch eine geringe Singulett-Sauerstoff-Ausbeute, wodurch Endoperoxide deutlich weniger effizient gebildet werden können. Obwohl im Fall der Autoperoxidation die Diffusion des Singulett-Sauerstoffs eine geringere Rolle spielt, da er am Ort seiner Erzeugung auch das Endoperoxid bilden kann, tragen offenbar die höhere Triplett-Ausbeute des PPIX-DME und eine effizientere Peroxidation des 1,4-Dimethylnaphthalins (DMN) zu einer deutlich höheren Reduktionseffizienz des Systems PPIX-DME/DMN gegenüber dem Perylen-Diimid bei.

## *Ausblick*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Toxizität von Endoperoxid-dotierten Liposomen an Tumorzellen untersucht, deren Ursache auf die Freisetzung von Singulett-Sauerstoff zurückzuführen ist. Dabei konnte nach Applikation der Liposomen bei in vitro-Zellversuchen ein signifikanter zytotoxischer Effekt bzw. zytostatischer Effekt nachgewiesen werden. Des weiteren wurde für eine therapeutische Langzeittherapie eine Methode vorgestellt, mit der eine Stabilisierung der Endoperoxide und somit eine verzögerte Freisetzung von Singulett-Sauerstoff demonstriert werden konnte.

Bei einer möglichen Therapie wird in der Pharmazie vor allem die gezielte Freisetzung von Pharmazeutika angestrebt. Hierbei wird von Arzneiformen insbesondere erwartet, dass sie einen pharmakologisch aktiven Wirkstoff unter kontrollierten Bedingungen gezielt an seinen Wirkort im Körper bringen („Drug Targeting“) und dort unter definierten Bedingungen freisetzen („Controlled Release“). Nanopartikel stellen hierbei eine innovative Arzneiform dar, mit denen dieses Ziel erreicht werden kann. Dabei wird der Einsatz von Liposomen (siehe Abschnitt 4.4) ebenso diskutiert wie die Anwendung von wässrigen Polymerdispersionen aus Poly(methacrylate) zur Steuerung der Wirkstoffabgabe. Nach [74] ist es möglich auch sogenannte Antikörper an Liposomen zu binden. Solche Immuno-Liposomen können unter anderem dann zielgerichtet Leukämiezellen abtöten.

Ein weiteres Zielgebiet für die Anwendung von Nanopartikeln stellen Tumore im Gehirn dar. Es ist bereits möglich Arzneistoffe an mit Polysorbat 80 (Tween 80) überzogene Nanopartikel zu binden, die aus dem schnell abbaubaren Butylcyanoacrylat-Polymer bestehen und die Blut-Hirn-Schranke überwinden können [75], die für diese sonst unüberwindlich sind.

Die in dieser Arbeit untersuchte Freisetzung von Singulett-Sauerstoff aus Endoperoxiden in Liposomen ( $\varnothing=100\text{nm}$ ), sowie die verzögerte Freisetzung von Singulett-Sauerstoff der Endoperoxide im Polymer PVB zur Modellbetrachtung, sollen einen ersten Schritt für eine mögliche Weiterentwicklung in der pharmazeutischen Anwendung demonstrieren. Im Zusammenhang mit der Erhöhung der Stabilität der Endoperoxide in Polymeren sei darauf hingewiesen, dass für die Freisetzung herkömmlicher Pharmazeutika bereits Studien vorliegen, wonach die Freisetzung durch bioabbaubare Polymerimplantate erfolgt, die nach Applikation des Implantates von der Oberfläche her im Gewebe abgebaut werden („surface

erosion“) [6]. Dabei kann durch einen Vernetzungsprozess bestimmter Polymere das freie Volumen (vgl. Abschnitt 8.2) stark eingeschränkt werden und somit eventuell auch eine Langzeitstabilität von eingebauten Endoperoxiden erreicht werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ist die Verwendung von Ausgangsubstanzen mit vernachlässigbarer Toxizität. In der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem die Freisetzung von Singulett-Sauerstoff aus Endoperoxiden von Naphthalin-Derivaten untersucht. Es ist bekannt, dass das in dieser Arbeit unter anderem verwendete 1,4-Dimethylnaphthalin von der Toxizität als unbedenklich eingestuft werden kann, da es bereits in Lebensmitteln wie der Kartoffel enthalten ist. Des weiteren sind in diesem Zusammenhang eventuell auch Lebensmittelfarbstoffe aus geeigneten aromatischen Verbindungen denkbar, mit denen möglicherweise Endoperoxide gebildet werden können.

## 9 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein mögliches neuartiges Verfahren für die Tumorthherapie vorgestellt, dessen Wirkungsprinzip auf der verzögerten Freisetzung von Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) durch den thermisch induzierten Zerfall (Thermolyse) von aromatischen Endoperoxiden basiert. Dieses Verfahren unterscheidet sich somit von der Photodynamischen Therapie (PDT), bei der  $^1\text{O}_2$  während der Laserbestrahlung erzeugt wird. Die Synthese der aromatischen Endoperoxide kann durch Laseranregung eines Photosensibilisators (hier: ProtoporphyrinIX-Dimethylester, PPIX-DME) erfolgen, wodurch  $^1\text{O}_2$  generiert wird, der dann von einem geeigneten aromatischen Molekül eingefangen wird, wodurch ein spezielles Endoperoxid entsteht, das beim Zerfall  $^1\text{O}_2$  verzögert freisetzt, sodass es als Speichermolekül für  $^1\text{O}_2$  bezeichnet werden kann. Ebenso wurde ein geeignetes Perylen-Derivat untersucht, das selbst als Sensibilisator wirkt und durch Laserbestrahlung über Autoperoxidation (engl.: self-sensitized peroxidation) Endoperoxide bildet. Als Ausgangssubstanzen wurden die aromatischen Moleküle in ein pharmazeutisches Trägermaterial, wie z.B. Liposomen, eingebaut und anschließend durch Laserbestrahlung in Endoperoxide umgewandelt. Die Endoperoxidausbeute in der gewählten Matrix konnte jeweils durch die zeitlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität ermittelt werden, da die Endoperoxide bei der Detektionswellenlänge des entsprechend zu Grunde liegenden Aromaten nicht mehr fluoreszieren. Ebenso erlaubt das Wiederauftauchen der Fluoreszenzintensität des ursprünglichen aromatischen Moleküls quantitative Aussagen über den Zerfall der Endoperoxide. Im Falle der dotierten Liposomen bestehend aus kugelförmigen Doppelmembranschichten (in der Regel: 1,2-Dimyristoyl-L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine; DMPC) musste eine Beeinflussung der Fluoreszenzmessung, z.B. durch Fusion der Liposomen ausgeschlossen werden. Dazu wurden die wässrigen Liposomensuspensionen für genauere quantitative Fluoreszenzuntersuchungen in Methanol aufgelöst. Um den thermisch induzierten Zerfall der Endoperoxide von geeigneten Naphthalin-Derivaten nachzuweisen, wurde nach Auflösen der Liposomensuspension in Methanol die erzeugte Fluoreszenzrücksetzung in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Ein wichtiger Aspekt für die therapeutische Applikation ist die Zerfallszeit der Endoperoxide bei Körpertemperatur ( $T=37^\circ\text{C}$ ) und somit die Freisetzezeit des  $^1\text{O}_2$ , festgelegt durch den Einbau in die jeweilige supramolekulare Funktionseinheit, bestehend aus Endoperoxid und unmittelbarer Umgebung in der gewählten Matrix. Für 1,4-Dimethylnaphthalin (DMN) konnte in Polymeren im Vergleich zu Liposomen eine Verzögerung der Freisetzezeit von  $^1\text{O}_2$  um ca. einen Faktor 2 demonstriert werden.

Im Falle von Liposomen, die mit einem Naphthalin-Derivat und zusätzlich mit einem Photosensibilisator dotiert waren, konnte durch Mikroskopaufnahmen gezeigt werden, dass die laserbestrahlten Liposomen gegenüber den nicht bestrahlten Liposomen bei  $37^\circ\text{C}$  eine signifikante zytotoxische Wirkung an Mammakarzinomzellen (MDA-MB 231) haben. Dieser Nachweis erfolgte durch das Auszählen von lebenden und toten Tumorzellen. Anhand von

Liposomen, dotiert mit dem stark fluoreszierenden Perylen-Derivat (N,N'-Di-(2',6'-dimethyl-phenyl)-perylene-3.4.9.10-tetracarbonsäurediimid) konnte mit Hilfe eines Konfokalmikroskops gezeigt werden, dass die Farbstoff-dotierten Liposomen nach Applikation innerhalb von 24 Stunden vor allem im Zytoplasma bzw. in speziellen Zellorganellen, den Lysosomen der Tumorzellen angereichert sind. Durch Applikation von diesen dotierten und laserbestrahlten Liposomen, die durch Autoperoxidation des Perylen-Derivates, die entsprechenden Endoperoxide enthalten, konnte sowohl an den Mammakarzinomzellen als auch an Kolonkarzinomzellen (HT-29) eine zytostatische bzw. sogar eine zytocide Wirkung innerhalb von ca. 200 Stunden nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgte durch Wachstumskurven mit Hilfe des sogenannten Kristallviolett-Tests. Dabei wurde zur Kontrolle an beiden Tumorzellarten parallel das bekannte Zytostatikum Cisplatin appliziert.

Hinsichtlich der Präparation der Liposomen wurden zwei unterschiedliche Verfahren, die sich in der Größe und in der Größenverteilung der Liposomen unterscheiden, untersucht. Dabei zeigten Liposomen, die mit einem neu verwendeten Extrusionsverfahren hergestellt wurden und eine enge Größenverteilung um etwa 100 nm Durchmesser aufweisen, einen stärkeren Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Tumorzellen als solche, die durch die bisher verwendete Ultraschallmethode erzeugt wurden und eine sehr inhomogene Größenverteilung mit Durchmessern zwischen 100 nm und 1000 nm besitzen. Zellversuche an Mammakarzinomzellen ergaben, dass bei der Anwendung von Liposomen, die mit der Extrusionsmethode hergestellt wurden, eine dreifach geringere Konzentration an Wirksubstanz ausreicht, um den gleichen Effekt zu erzielen wie bei der Anwendung von solchen, die mit Ultraschall erzeugt wurden. Dieser Effekt wurde unter Heranziehung der Ergebnisse einer kürzlich erschienenen Untersuchung des endozytischen Verhaltens von Tumorzellen erklärt, nach der spezielle Polymer-Nanopartikel nur bis zu Durchmessern von etwa 200 nm von Zellen effektiv aufgenommen werden.

Neben Liposomen wurde das Polymer Polyvinylbutyral (PVB) als Modellmatrix für die Endoperoxide untersucht, das sich aufgrund seiner vollständig amorphen Struktur besonders für optische Untersuchungen eignet. Insbesondere wurde die Zerfallskinetik der Endoperoxide bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Dabei wurde an 1,4-Dimethylnaphthalin-Endoperoxiden in PVB bei 25 °C eine etwa doppelt so hohe Zerfallshalbwertszeit gemessen, wie sie in organischen Lösungsmitteln (z.B. Dioxan) ermittelt wurde. Da die Liposomen für die Endoperoxide eine sehr ähnliche lokale Umgebung wie in einem Lösungsmittel darstellen, kann mit der Wahl einer Polymermatrix somit eine Erhöhung der Stabilität der Endoperoxide und damit eine Verzögerung der Freisetzung des Singulett-Sauerstoffs erzielt werden. Die Erhöhung der Barriere für den thermolytischen Zerfall in PVB wurde auf  $1200 \text{ cm}^{-1}$  gegenüber dem Lösungsmittel quantifiziert. Diese Barrierenerhöhung wurde auf ein vermindertes des freies Volumen zurückgeführt, das für den Zerfall des Endoperoxids im Polymer gegenüber Lösung (bzw. gegenüber den Liposomen) zur Verfügung steht, wobei zu beachten ist, dass dieser Zerfall mit einem positiven Aktivierungsvolumen verbunden ist.



Für anwendungsorientierte Aspekte ist bei der laserinduzierten Synthese solcher Endoperoxide die photochemische Quantenausbeute, d.h. das Verhältnis aus der Zahl der produzierten Endoperoxide zur Zahl der absorbierten Photonen, wichtig. Diese Größe, die aus der Verringerung der Fluoreszenzintensität mit der Dauer der Lasereinstrahlung abgeschätzt wird, wird als Reduktionseffizienz  $\eta$  bezeichnet. Für das System PPIX-DME/DMN in Liposomen wurde  $\eta = 5 \cdot 10^{-3}$  gemessen, wobei die Konzentrationen bei  $c(\text{PPIX-DME}) = 2,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$  und  $c(\text{DMN}) = 2,9 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$  bezogen auf das Lipidmaterial lagen. In PVB wurde mit  $\eta = 7 \cdot 10^{-4}$  ein deutlich geringerer Wert bei ähnlichen Konzentrationen ( $c(\text{PPIX-DME}) = 2,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$  und  $c(\text{DMN}) = 5,2 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$ ) ermittelt. Eine weitere Abnahme der Reduktionseffizienz um etwa einen Faktor drei wurde bei dem Vergleich zwischen einem Polymerfilm mit einem Ethanolrestgehalt, und dem gleichen Polymerfilm, der einem zusätzlichen Trocknungsprozess durch Aufheizen ausgesetzt wurde, festgestellt. Im Vergleich zu den obigen Systemen wurde zur Ergänzung die Reduktionseffizienz bei der Autoperoxidation des Perylen-Derivates (das eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute hat) in Liposomen zu  $\eta = 2 \cdot 10^{-5}$  bestimmt.

In der Diskussion des Verfahrens zur verzögerten Freisetzung von Singulett-Sauerstoff aus Endoperoxiden in pharmazeutischen Trägermaterialien werden einige Aspekte bezüglich des Anwendungspotentials erörtert. Bezüglich der Liposomen wird hierbei besonders hervorgehoben, dass nach aktuellen Studien Liposomen gekoppelt an geeigneten Antikörpern direkt zum Tumor transportiert werden können (engl. targeting). Bezüglich der Anwendung von Polymeren als pharmazeutische Trägermaterialien ergibt sich neben dem Einsatz von bioabbaubaren Polymerimplantaten auch ein besonderes Entwicklungspotential im Zusammenhang mit den oben bereits erwähnten Polymer-Nanopartikeln.

## Anhang: Betrachtung zur Erklärung der unterschiedlichen Reduktionseffizienzen durch Diffusion von $^1\text{O}_2$

Im folgenden werden die Beiträge zur Reduktionseffizienz von 1,4-Dimethylnaphthalin bei Anregung des Sensitizers in unterschiedlichen Systemen diskutiert, wobei besonders auf den Beitrag der Diffusion von Singulett-Sauerstoff eingegangen wird. Bei den Messungen in Abschnitt 7.8 ist eine unterschiedliche Reduktionseffizienz aufgrund der Endoperoxidbildung von 1,4-Dimethylnaphthalin in PVB bei unterschiedlichem Ethanolgehalt erkennbar. Nach 1000 Sekunden Anregung des Sensibilisators PPIX-DME mit dem Argon-Ionen-Laser ( $\lambda_{\text{ex}}=514 \text{ nm}$ ;  $P/A=320 \text{ mW/cm}^2$ ) konnte eine deutliche Fluoreszenzreduktion des Naphthalin-Derivates demonstriert werden. Durch das anschließende 5 min. Aufheizen des Polymers auf  $80^\circ\text{C}$  und erneutes Abkühlen auf  $25^\circ\text{C}$  konnte nahezu wieder die Ausgangsfluoreszenzintensität erreicht werden (Abb. 7.17 B). Somit kann auf den nahezu vollständigen Zerfall der gebildeten Endoperoxide in das zugrundeliegende Naphthalin-Derivat und  $^1\text{O}_2$  geschlossen werden. Eine erneute Laseranregung des dotierten Polymers mit gleicher Leistungsdichte wie in A nach reduziertem Ethanolgehalt liefert jedoch eine deutlich geringere Reduktionseffizienz als in A (siehe Abb. 7.17 C).

Es gibt einige Gründe, die für die unterschiedliche Reduktionseffizienz denkbar sind, wie z.B. unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen in PVB vor bzw. nach dem Erwärmen. Andererseits könnten auch ein unterschiedliches Diffusionsverhalten von Sauerstoff diese unterschiedliche Reduktionseffizienz erklären. Für eine quantitative Analyse beider möglichen Beiträge liegen leider nicht ausreichende Stoffdaten vor. Im folgenden wird exemplarisch der Beitrag der Sauerstoffdiffusion näher analysiert und die Konsequenzen näher erläutert:

Aufgrund des Heizvorganges auf  $80^\circ\text{C}$ , kann davon ausgegangen werden, dass das Polymer durch einen zusätzlichen Trocknungsprozess weniger Ethanolgehalt besitzt. Dies kann dann bei erneuter Laseranregung des PPIX-DME und der darauffolgenden Freisetzung von  $^1\text{O}_2$  folgendes bewirken: Zum einen ist es denkbar, dass die Naphthalin-Derivate in ihrer Bewegungsfreiheit stärker eingeschränkt sind, zum anderen kann dadurch auch der Diffusionsradius von  $^1\text{O}_2$  erheblich reduziert sein und somit die Endoperoxidbildung weniger effizient sein. In Abbildung A.1 wird schematisch die Diffusion von Singulett-Sauerstoff in einer Matrix dargestellt. Entscheidend ist dabei der Diffusionsradius von Singulett-Sauerstoff. Je größer der Diffusionsradius bzw. die durchschnittliche Weglänge des Singulett-Sauerstoffs, umso effizienter ist auch die Endoperoxidbildung, da die Singulett-Sauerstoff-Moleküle mehr umgebende Speichermoleküle (1,4-Dimethylnaphthalin) erreichen und damit mit ihnen reagieren können.

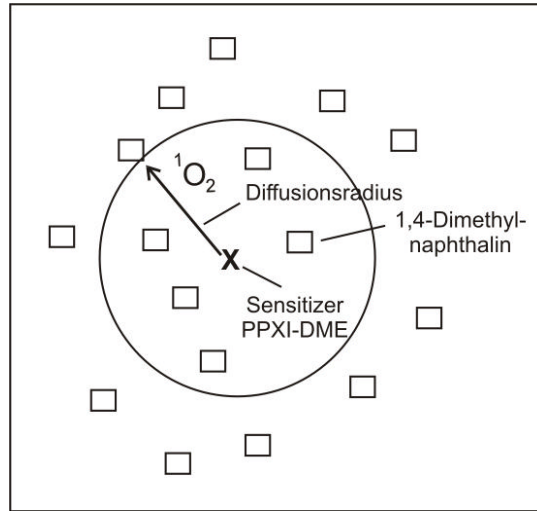


Abbildung A.1: Schematische Darstellung der Diffusion von Singulett-Sauerstoff in einer Matrix. Entscheidend für die Effizienz der Endoperoxidbildung ist dabei der Diffusionsradius von Singulett-Sauerstoff nach erfolgter Sensitizeranregung. Je größer der Diffusionsradius umso größer ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass ein Singulett-Sauerstoff-Molekül mit einem 1,4-Dimethylnaphthalin reagiert und somit ein Endoperoxid entsteht.

Nach [83] gilt für die durchschnittliche Weglänge  $l$ , die ein Sauerstoff-Molekül in der Zeit  $t$  zurücklegt:

$$l = \sqrt{6D_0t} \quad (\text{A.1})$$

Mit  $D_0$  der Diffusionskonstante von Sauerstoff im jeweiligen Medium und  $t$  der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff. Das Polymer, das noch einen gewissen Anteil an Ethanol enthält, hat eine höhere Diffusionskonstante. So wird z.B. die mittlere Diffusionskonstante von Sauerstoff in nicht näher spezifizierten Flüssigkeiten als  $3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  [78] angegeben, während sie im getrockneten Polymer Polystyrol zu  $2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  [79] gemessen wurde. Für die Berechnung der mittleren freien Weglänge in dem verwendeten Polymer PVB lagen leider keine Daten vor. Aus diesem Grund wurde für die Modellbetrachtung Polystyrol herangezogen. Für die Ermittlung der durchschnittlichen Weglänge  $l$  wird als Zeit  $t$ , die Lebensdauer  $\tau$  von Singulett-Sauerstoff im jeweiligen Medium verwendet. In der Flüssigkeit Ethanol beträgt die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff nach [80]  $\tau = 14 \text{ } \mu\text{s}$  während sie z.B. im getrockneten Polystyrol zu  $\tau = 20 \text{ } \mu\text{s}$  [81] angegeben wird. Somit lässt sich im Falle des getrockneten Polymers und dem Polymer mit einem restlichen Ethanolgehalt eine mittlere Weglänge nach Gleichung A.1 gegenüberstellen:

$$l_{\text{EtOH}} = 0,5 \text{ } \mu\text{m} \quad \text{bzw.} \quad l_{\text{trock}} = 0,05 \text{ } \mu\text{m}$$

Mit  $l_{EtOH}$  für die maximale mittlere freie Weglänge von Singulett-Sauerstoff im reinen Ethanol und  $l_{trock}$  für die mittlere freie Weglänge von Singulett-Sauerstoff im getrockneten Polymer. Somit bewegt sich die mittlere freie Weglänge von Singulett-Sauerstoff im Polymer mit Restethanol-Gehalt zwischen diesen beiden Werten, und es können je nach Ethanolgehalt im Polymer mehr oder weniger effizient Endoperoxide gebildet werden.

Neben der qualitativen Erklärung einer höheren Reduktionseffizienz bei einem Polymer mit höheren Rest-Ethanolgehalt, kann auch der Unterschied von  $\eta$  zwischen PVB und Liposomen unter dem Aspekt der Diffusion von Singulett-Sauerstoff betrachtet werden (vgl. Abschnitt 8.3). Nach Baier [82] wurde der Diffusionskoeffizient für Sauerstoff in Phosphatidylcholinen (verwendetes Liposomenmaterial) zu  $D=1,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  abgeschätzt, mit einer Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff von  $\tau=8 \text{ }\mu\text{s}$ . Nach Gl. (A.1) errechnet sich dann die mittlere freie Weglänge von Singulett-Sauerstoff in den Liposomen zu  $l=0,3 \text{ }\mu\text{m}$ . Dieser Wert stimmt mit der mittleren freien Weglänge von Singulett-Sauerstoff in Zellen [33] überein. Für die Berechnung der mittleren freien Weglänge in dem verwendeten Polymer PVB lagen wie bereits oben erwähnt leider keine Daten vor. Aus diesem Grund wird für diese Modellbetrachtung wiederum Polystyrol herangezogen. Dabei beträgt die Diffusionskonstante in Polystyrol  $2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  [79] bei einer Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff von  $20 \mu\text{s}$  [81]. Analog errechnet sich dann nach Gl. (A.1) die mittlere freie Weglänge des Singulett-Sauerstoffes im Polymer zu  $l=0,05 \text{ }\mu\text{m}$ . Sie ist somit um den Faktor 6 kürzer als in Liposomen. Dadurch kann auch der Singulett-Sauerstoff im Polymer aufgrund der kürzeren freien Weglänge weniger effizient von 1,4-Dimethylnaphthalin eingefangen werden als in Liposomen. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass auch die Diffusion von Triplet-Sauerstoff zum Sensitizermolekül in PVB gegenüber Liposomen eingeschränkt ist und somit in PVB auch weniger effizient Singulett-Sauerstoff produziert wird, was wiederum eine Abnahme der Reduktionseffizienz bedeutet. Zur Vervollständigung muss jedoch hinzugefügt werden, dass bei Berechnung der mittleren freien Weglänge des Singulett-Sauerstoffes in Liposomen hier der Wert das dreifache des Durchmessers der Liposomen erreicht, sodass sich das Modell eher auf Liposomen mit einem Durchmesser ab 300 nm statt 100 nm anwenden lässt.

Wie oben demonstriert kann mit Hilfe der unterschiedlichen Diffusion von Singulett-Sauerstoff in verschiedenen Matrizen die unterschiedliche Reduktionseffizienz bzw. die Produktionseffizienz der Endoperoxide qualitativ erklärt werden. Leider liegen wie bereits erwähnt zu wenig Daten vor allem bezüglich des Polymers PVB vor. Bei entsprechend ausreichender Datensammlung kann dann mit Hilfe der Fickschen Differentialgleichung [72][73] noch eine genauere Problemanalyse der Diffusion vollzogen werden.

## Literaturverzeichnis

- [1] U. Bogner, "Electric Field Effects on Persistent Spectral Holes and Applications in Electro-Optics and Photonics", in: *Molecular Electronics: Properties, Dynamics, and Applications*. Eds. M. Schreiber, V. May and G. Mahler (Marcel Dekker, Inc., New York, 1996), chapter 12, pp. 233-255.
- [2] U. Bogner, Phys. Rev. Lett., **37** (1976) 909
- [3] R. Bauer, W. Kagermeier, U. Bogner; *Laserinduzierte spektrale Veränderungen: Anwendungen in der Informationstechnik; Abschlussbericht FOROB I*, Bayerischer Forschungsverbund für Oberflächen-, Schicht und Trocknungstechnik, Herausgeber S. M. Rosiwal, und R. Singer; Bayerische Forschungstiftung; München; 1998; 253-267
- [4] N. J. Turro, M.-F. Chow, J. Rigaudy, J. Am. Chem. Soc. **103** (1981) 7218
- [5] N. J. Turro; *Modern Molecular Photochemistry*; (University Science Books, Mill Valley, 1991) SS603-605
- [6] Vogelhuber, P. Rotunno, E. Magni, A. Gazzaniga, T. Spruss, G. Bernhardt, A. Buschauer, A. Göpferich, J. Controlled Release **73** (2001) 75
- [7] Seite 584ff in [5]
- [8] L. Salem, *Pure Appl. Chem.*, **33** (1973) 317
- [9] D. Wöhrle, M. W. Tausch, W.-D. Stohrer, *Photochemie*, (Wiley-VCH, Weinheim, 1998) S138-153
- [10] R.V. Bensasson, E.J. Land, T.G. Truscott, *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Kap. 2, Oxford, New York, Tokio (1993)
- [11] B.M. Aveline, *Primary Processes in photosensitization mechanisms*, in: P. Calzavara-Pinton, R.-M. Szeimies, B. Ortel (Edts.), *Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology*, Kap. 2, Elsevier, Amsterdam (2001)
- [12] D.L. Dexter, J. Chem. Phys. **21** (1953) 836
- [13] T. Förster, Ann. Physik **2** (1948) 55

- [14] T. Förster, *Disc. Faraday Soc.* **27** (1959) 7
- [15] Mascio, D.P., Sies H., *J. Am. Chem. Soc.*, **111** (1989) 2909-2914
- [16] Jürgen Falbe, Manfred Regnitz, *Römpf Chemie Lexikon*, Band 2, Seite 956, Georg Thieme Verlag (1990)
- [17] Peter C. Vollhardt, *Organische Chemie*, Seite 599ff., VCH Weinheim (1990)
- [18] K. Müller, K. Ziereis, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **326** (1993) 369-371
- [19] C.H. DePuy, O.L. Chapman, *Molekül-Reaktionen und Photochemie*, (Verlag Chemie, Weinheim, 1977) 37-49
- [20] J.D. Coyle, *Introduction to Organic Photochemistry*, (John Wiley & Sons, New York, 1992) S231-247
- [21] A. Harriman, *Photosensitisation in Photodynamic Therapy*, in: "CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology", Ed. W.M. Horspool (CRC Press, Boca Raton, 1995) 1374-1378
- [22] R. Schmidt and H.-D. Brauer, **38** (1983) 527-531
- [23] W.E. Moerner, A.R. Chraplyvy, A.J. Sievers, R.H. Silsbee, *Phys. Rev. B* **28** (1983) 7244
- [24] R. Bauer, *Einfluss der Festkörpermatrix auf E-Feldinduzierte Veränderungen stabiler spektraler Löcher*, Diplomarbeit, Universität Regensburg (1992)
- [25] H. Kneitschel, *Laserinduzierte Fluoreszenzreduktion in Matrizen*, Zulassungsarbeit, Universität Regensburg (1988)
- [26] C. Ell, R. Baumgartner, L. Gosser, K. Häußinger, H. Iro, D. Jocham, R.-M. Szeimies, *Dt. Ärztebl.* **97** (2000) A3337
- [27] R.-M. Szeimies, M. Landthaler, *Blick in die Wissenschaft* **5** (1994) 22
- [28] F.-F. Liu, B.C. Wilson, *Hyperthermia and Photodynamic Therapy*, in: *The Basic Science of Oncology*, 3. Auflage", Eds. I.F. Tannock, R.P. Hill (McGraw-Hill, New York, 1998) 443-465

- [29] K.I.R. Weishaupt, C.J. Gomer, T.J. Dougherty, *Cancer Res.* **36** (1976) 2326
- [30] A.A. Girotti, *Photodynamic Lipid Peroxidation in Biological Systems*, *Photochem. Photobiol.* **51** (1990) 497
- [31] M.J. Peak, J.G. Peak, *Photosensitized Reactions of DNA*, in: "CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology", Ed. W.M. Horspool (CRC Press, Boca Taton, 1995) 1318-1325
- [32] M. Ochser, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* **39** (1997) 1
- [33] E. Skovsen, J. W. Snyder, J. D. C. Lambert, P. R. Ogilby, *J. Phys. Chem. B*, **109** (2005) 8570
- [34] T.J. Dougherty, C.J. Gmer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, *J. Natl. Cancer. Inst.* **90** (1998) 889
- [35] L. Styrer, *Biochemie*, 4. Auflage, (Spektrum Verlag, Heidelberg, 1996) 300-310
- [36] R.H. Müller, G.E. Hildebrand, *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*, (Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 1997) 167-185
- [37] G. Cevc, *Phospholipids Handbook*, (Marcel Dekker Inc., New York, 1993) S. 884ff
- [38] R.R.C.New, *Introduction* in: "Liposomes a practical approach", Ed. R.R.C. New (IRL Press, Oxford, 1990) 1-32
- [39] D. Voet, J.G. Voet, *Biochemie*, (VCH, Weinheim, 1992) 274-278
- [40] S. Mabrey-Gaud, *Differential scanning calorimetry of liposomes*, in: "liposomes: from physical structure to therapeutic applications" Ed. C.G. Knight (Elsevier, Amsterdam, 1981) 105-138
- [41] R.E. Pagano, A.J. Schroit, D.K. Struck, *Interactions of phospholipid vesicles with mammalian cells in vitro: Studies of mechanism*, in: "liposomes: from physical structure to therapeutic applications", Ed. C.G. Knight (Elsevier, Amsterdam, 1981) 323-348
- [42] B. Ablerts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Auflage, (VCH, Weinheim, 1995) 729-735

- [43] R.D. Issels et al., J. Clin. Oncol., **8** (1990)1818-1829
- [44] G. Gregoriadis, D.E. Neerunjun, Eur. J. Biochem. **47** (1974) 179-185
- [45] S.L. Fossheim et al., Acad Radiol **7** (2000) 1107
- [46] G. Storm, Daan J.A. Crommelin, *Liposomes: quo vadis?*, PSTT Vol. 1 No. 1 April 1998
- [47] R. Gluck, Pharm. Biotechnol. **6** (1995) 325
- [48] G. Kong, M.W. Dewhirst, Hyperthermia and liposomes, Int. J. Hyperthermia **15** (1999) 345
- [49] L.H. Lindner, R. Issels, Dtsch. Med. Wochenschr., **128** (2003) 2020
- [50] D.D. Lasic, *Liposomes from Physics to Applications*, (Elsevier, Amsterdam, 1993) 63-107
- [51] 33-103 in [38]
- [52] M. Nirschl, *Laserinduzierte reversible Fluoreszenzreduktion in verschiedenartigen Materialien*, Diplomarbeit, Universität Regensburg (1994)
- [53] T. Wilson, A.U. Khan, M.M. Mehrotra, Photochem. Photobiol. **43** (1986) 661
- [54] S. Jockusch et al., J. Am. Chem. Soc. **126** (2004) 4646
- [55] G. Michl, Zulassungsarbeit, Universität Regensburg (1994)
- [56] Yasser Kanaan, *Stabiles spektrales Lochbrennen: Elektrische Effekte*, Diplomarbeit, Universität Regensburg (1990)
- [57] F. Thomann, *Grundlegende Versuche zur Anwendung stabilisierter Farbstoffendoperoxide für die Tumorthherapie*, Diplomarbeit, Universität Regensburg (2002)
- [58] A. Goetzberger, *Solarenergieumwandlung auf der Basis von Fluoreszenzkollektoren*, Bundesministerium für Forschung und Technologie, Forschungsbericht T 84-193 (1984)



- [59] L.C. Junqueira, J. Carneiro, T.H. Schiebler, *Histologie*, (Sprinter, Berlin, 1996) 43-84
- [60] A. Faller, M. Schünke, *Der Körper des Menschen*, (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1999) 4-10
- [61] Sigma Aldrich, *Produktdatenbank*, (Stand Juni 2002)
- [62] H. Reile, *Entwicklung von Testkonzepten zur Untersuchung der Wirkung isomerer 1,2-Bis(fluorphenyl)ethylen-diaminplatin(II) Komplexe am menschlichen Mamma- und Ovarialkarzinom*, Dissertation, Universität Regensburg, (1991)
- [63] J.R. Gillies, N. Didier, M. Denton, *Anal. Biochem.*, **159** (1986) 109
- [64] F. Geneser, *Histologie*, (Dt. Ärzte-Verl., Köln, 1990) 39
- [65] T. Spruß, G. Bernhardt, E. Schickaneder, H. Schönenberger, *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **117** (1991) 435
- [66] G. Bernhardt, H. Reile, H. Birnböck, T. Spruß, H. Schönenberger, *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **118** (1992) 35
- [67] K. Müller, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **325** (1992) 219-223
- [68] F. Käsermann, C. Kempf, *Antiviral Research*, **38** (1998) 55-62
- [69] Wayne E. Wentworth, S. Jules Ladner, *Fundamentals of Physical Chemistry*, (Wadsworth Publishing Company Inc., Belmont, 1972)
- [70] R. Engl, *Dissertation*, Universität Regensburg, 2003
- [71] R.S. Sinclair, D. Tait, T.G. Truscott, *J. C. S. Faraday I*, **76** (1980) 417
- [72] Crack, J., *The Mathematics of Diffusion*, 2nd ed.; Oxford Press: Oxford, 1975
- [73] Arfken, G.B.; Weber, H.J. *Mathematical Methods for Physicists*, 4. Auflage: Academic Press: San Diego, CA, 1995
- [74] H. Schott, D. v. Cunow, H. Langhals, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1110** (1992) 151

- [75] J. Kreuter, R. N. Alyautdin, D. A. Kharkevich, A.A. Ivanov, Brain Res. **674** (1995) 171
- [76] Private Mitteilung von PD Dr. Günther, Institut für Pharmazie (Lst. Prof. Dr. A. Buschauer)
- [77] J. Rejman, V. Oberle, I. S. Zuhorn, D. Hoekstra, Biochem. J. **337** (2004) 159
- [78] M. Tsushima et.al, T. Anal. Chem. **66** (1994) 4551
- [79] Y. Gao, A. M. Baca, B. Wang, P.R. Ogilby, Macromolecules, **27** (1994) 7041
- [80] J.M. Aubry et. al, J. Am. Chem. Soc., **117** (1995) 9159
- [81] R. L. Clough, M.P. Dillon, K.-K. Iu, P. R. Ogilby, Macromolecules **22** (1989) 3620
- [82] J. Baier, *Dissertation*, Universität Regensburg (2006)
- [83] C. Schweitzer, R. Schmidt, Chem. Rev. **103** (2003) 1685
- [84] T. Maisch, C. Bosl, R.-M. Szeimies, N. Lehn, C. Abels, Antimicrob Agents Chemother. **49** (2005) 1542

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. Max Maier (Institut für Experimentelle und Angewandte Physik der Universität Regensburg) für die freundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Udo Bogner für die gute Zusammenarbeit, die vielen lehrreichen Diskussionen, sowie die Anregungen zu Theorie und Experiment, die ich durch ihn erfahren habe.

Herrn Prof. Dr. P. Hegemann danke ich für die Aufnahme ins DFG-Graduiertenkolleg „Sensorische Photorezeptoren in natürlichen und künstlichen Systemen“, das wesentlich zum Verständnis biologischer und chemischer Sichtweisen beitrug. In diesem Zusammenhang möchte ich vor allem die interdisziplinäre Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. C. Steinem und ihren Mitarbeitern hervorheben, die für mich bei der Liposomenpräparation sehr hilfreich war.

Für eine weitere interdisziplinäre Unterstützung möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. G. Bernhard, Institut für Pharmazie (Lst. Prof. Dr. A. Buschauer) herzlich bedanken, insbesondere für die Unterstützung in allen pharmazeutischen und biologischen Fragen. Herrn Dietmar Gross danke ich für seine Geduld bei den Untersuchungen am Konfokalmikroskop. Frau S. Bollwein gilt ebenfalls mein besonderer Dank für die Durchführung der umfangreichen Zellversuche.

Für die im Labor und Büro freundschaftliche Unterstützung bedanke ich mich auch bei Herrn Dr. R. Bauer, Herrn Dipl.-Phys. M. König und Herrn S. Minke, der als Studentische Hilfskraft tätig war.

Herrn Prof. Dr. A. Kurtz danke ich für die Möglichkeit der Nutzung von Brutschrank, Gefrierschrank sowie Messwaage während der ganzen Dauer meiner Arbeit.

Ich möchte mich auch beider technischen Abteilung und der Werkstatt für die sorgfältige und rasche Erledigung der erteilten Aufträge bedanken.

Großer Dank gebührt auch allen ungenannten Kollegen und Mitarbeitern am Lehrstuhl und Fachbereich, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

