

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR DERMATOLOGIE  
PROF. DR. MED. MARK BERNEBURG  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Photodynamische Inaktivierung von Mikroorganismen mittels  
Perinaphthenonderivaten – Einfluss einer LED405nm-Lampe

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der

Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Patrick Bauer

2016



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR DERMATOLOGIE  
PROF. DR. MED. MARK BERNEBURG  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Photodynamische Inaktivierung von Mikroorganismen mittels  
Perinaphthenonderivaten – Einfluss einer LED405nm-Lampe

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Patrick Bauer

2016

<b>Dekan:</b>	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
<b>1. Berichterstatter:</b>	Priv.-Doz. Dr. Tim Maisch
<b>2. Berichterstatter:</b>	Prof. Dr. Wolfgang Buchalla
<b>Tag der mündlichen Prüfung:</b>	23.09.2016

Meinen Eltern Christine und Hans Bauer  
aus Liebe und Dankbarkeit

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
1.1 Erkrankungen ausgelöst durch <i>Candida albicans</i> .....	5
1.2 Zellwandaufbau von <i>Candida albicans</i> .....	6
1.3 Geschichte der photodynamischen Therapie .....	8
1.4 Prinzip der antimikrobiellen photodynamischen Therapie .....	9
1.5 Klinische Anwendung der photodynamischen Therapie in der Zahnmedizin.....	11
<b>2 FRAGESTELLUNG</b> .....	<b>14</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1 Mikroorganismen</b> .....	<b>15</b>
3.1.1 <i>Candida albicans</i> -Stamm .....	15
3.1.2 Bakterienstämme .....	15
<b>3.2 Kulturmedien</b> .....	<b>15</b>
3.2.1 Sabouraud-Bouillon .....	15
3.2.2 Müller-Hinton-Bouillon.....	15
3.2.3 Sabouraud-Agar und Müller-Hinton-Agar .....	15
<b>3.3 Photosensibilisatoren</b> .....	<b>16</b>
<b>3.4 Lösungsmittel</b> .....	<b>20</b>
3.4.1 PBS.....	20

---

3.4.2 Ethanol.....	20
<b>3.5 Technische Geräte und Hilfsmittel.....</b>	<b>20</b>
3.5.1 Lichtquellen .....	20
3.5.1.1 Waldmann BlueV UV802L .....	20
3.5.1.2 LED405nm-Lampe.....	21
3.5.2 Zentrifugen .....	22
3.5.3 Spektralphotometer .....	22
3.5.4 Küvetten .....	22
3.5.5 Waage.....	22
3.5.6 Sterilbank.....	22
3.5.7 Neubauer-Zählkammer .....	23
3.5.8 GraphPad Prism® .....	23
<b>3.6 Herstellung der Photosensibilisatorlösungen.....</b>	<b>23</b>
<b>3.7 Kultivierungsverfahren für <i>C. albicans</i> und Bakterienstämme .....</b>	<b>23</b>
<b>3.8 Bestimmung der Bakterien-OD und Auszählen von <i>C. albicans</i> mit der Neubauer- Zählkammer.....</b>	<b>24</b>
<b>3.9 Phototoxizitätsversuche.....</b>	<b>25</b>
3.9.1 Phototoxizitätsversuche mit Bakterien .....	25
3.9.2 Phototoxizitätsversuche mit <i>C. albicans</i> .....	25
<b>3.10 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) .....</b>	<b>27</b>
<b>3.11 Datenanalyse .....</b>	<b>27</b>
<b>3.12 „Uptake“-Versuche .....</b>	<b>28</b>
<b>4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Photodynamische Inaktivierung von <i>C. albicans</i> mittels Perinaphthenonderivaten ...</b>	<b>29</b>

4.1.1	Phototoxizitätsversuche .....	29
4.1.1.1	<i>Candida albicans</i> und SAPyR .....	29
4.1.1.2	<i>Candida albicans</i> und SA-PN27 .....	36
4.1.1.3	<i>Candida albicans</i> und SA-PN02a.....	36
4.1.1.4	<i>Candida albicans</i> und SA-PN03 .....	37
4.1.1.5	<i>Candida albicans</i> und SA-PN04 .....	38
4.1.1.6	<i>Candida albicans</i> und SA-PN05 .....	43
4.1.1.7	Diskussion der Ergebnisse von SA-PN02a, SA-PN03, SA-PN04 und SA-PN05 ..	54
4.1.1.8	<i>C. albicans</i> und PN .....	60
4.1.1.9	<i>C. albicans</i> und PNS .....	61
4.1.2	„Uptake“-Versuche.....	62
<b>4.2</b>	<b>Effizienz der LED405nm-Lampe im Vergleich zur BlueV-Lampe am Beispiel der Inaktivierung von Bakterien .....</b>	<b>69</b>
4.2.1	Phototoxizitätsversuche mit <i>S. aureus</i> und SAPyR in Abhängigkeit der Lichtdosis .	70
4.2.2	Phototoxizitätsversuche mit <i>E. coli</i> und SAPyR in Abhängigkeit der Lichtdosis.....	72
4.2.3	Diskussion der Ergebnisse in Abhängigkeit der Lichtdosis .....	74
4.2.4	Diskussion der Ergebnisse in Abhängigkeit der Anzahl der absorbierten Photonen ... .....	76
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>81</b>
<b>ANHANG .....</b>	<b>.....</b>	<b>V</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>.....</b>	<b>XVII</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>.....</b>	<b>XIX</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>.....</b>	

**EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....**

# 1 Einleitung

## 1.1 Erkrankungen ausgelöst durch *Candida albicans*

*Candida albicans* ist der primäre Erreger von Candidiasis. Diese Krankheit kann beim Menschen von oberflächlichen Schleimhauterkrankungen bis hin zu lebensbedrohlichen systemischen Erkrankungen variieren [1]. Vor allem bei immunsupprimierten Patienten verursacht *Candida albicans* oberflächliche Haut- und Schleimhautentzündungen sowie invasive Mykosen, die zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität führen können [2].

*Candida albicans* besitzt die Fähigkeit bei den verschiedensten Umwelteinflüssen im Wirtsorganismus zu überleben, weshalb *Candida albicans* einer der am häufigsten vorkommenden Pathogene beim Menschen ist [3]. *Candida albicans* befindet sich bei über 40% der Bevölkerung in der gesunden Mundflora [4]. So kommt es durch verschiedene Faktoren, die zu einer Veränderung der Wirtsresistenz und des Abwehrmechanismus des Menschen führen, zu einem Anstieg von Erkrankungen, die von *Candida albicans* ausgelöst werden [5]. Überwiegend wird *Candida albicans* dann in entzündlichen Geweben vor allem in der Mundhöhle, bei vaginalen Infektionen und bei invasiven Blutkreislaufinfektionen nachgewiesen [6].

Betrachtet man die häufigsten Erkrankungen, die durch *Candida* im Oropharynx ausgelöst werden, so sind dies Mundsoor und Prothesenstomatitis. Auch eine orale Leukoplakie oder andere pathologische Erkrankungen wie Perleche, können mit *Candida* in Verbindung gebracht werden [7]. Dabei werden 70% dieser oralen Infektionen von *Candida albicans* ausgelöst [8]. *Candida albicans* ist somit die Spezies, die in den häufigsten Fällen Mundsoor auslöst [9]. Das klinische Bild, das sich bei Mundsoor zeigt, ist geprägt von weißlichen, diskreten Läsionen, die sich auf den Oberflächen der bukkalen Schleimhaut, des Rachens, der Zunge und der auskleidenden Mucosa befinden. Die Läsionen entwickeln sich zu Plaques, die abwischbar sind und unter denen sich gerötete und manchmal blutige Blasen befinden können [7]. Die am häufigsten betroffenen Stellen im Mundraum sind Zunge und Gaumen [10]. Oft sind Patienten mit Immunsuppression betroffen, beispielsweise durch AIDS- oder Krebserkrankung, Mukoviszidose oder nach Durchführung von Transplantationen [11]. Aber auch Patienten, die in ihrer Anamnese prädisponierende Faktoren, wie Malignome, das

Rauchen, eine Strahlentherapie oder lokale Irritationen aufweisen, sind eine Risikogruppe für Mundsoor [12].

Die Behandlung von *Candida*-Infektionen ist aufgrund der Ähnlichkeit in ihrer eukaryontischen Art zu den Wirtszellen des Menschen schwierig. Es gibt nur wenige antimykotische Medikamente, die im klinischen Gebrauch sind [13]. Zu diesen Medikamenten zählen die Azole, wie zum Beispiel Imidazol oder Miconazol. Manche *Candida*-Spezies zeigen jedoch gegenüber dieser Medikamentengruppe Resistenzen [14]. Zudem beeinträchtigt die weltweite Zunahme von resistenten Hefestämmen durch extensiven Gebrauch von antimykotischen Mitteln die Wirksamkeit konventioneller Therapien [15]. Eine neue Alternative stellt die antimikrobielle photodynamische Therapie (aPDT) dar (siehe auch 1.4). *Gonzales et al.* bestätigten bereits die Wirksamkeit dieser Methode für die Inaktivierung von *Candida albicans* mit dem Photosensibilisator TMPyP [16]. *Teichert et al.* zeigten, dass auch Azol-resistenter *Candida albicans* mit Hilfe von Methylenblau als Photosensibilisator bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  und einer Bestrahlung durch einen Laser mit einer Energiedosis von 275  $\text{J}/\text{cm}^2$  um 2,74  $\log_{10}$ -Stufen in einem Mausmodell reduziert werden kann [17]. Somit scheint die aPDT eine wirksame Alternative für die Inaktivierung von *Candida albicans* zu sein.

## **1.2 Zellwandaufbau von *Candida albicans***

Für die Adhäsion beziehungsweise Aufnahme von Photosensibilisatoren, die bei der photodynamischen Therapie verwendet werden, kann der Aufbau der Zellwand von *Candida albicans* ein wichtiger Aspekt hinsichtlich der chemischen Struktur der Photosensibilisatoren sein. Aus diesem Grund wird die Funktion der Zellwand und der Zellwandaufbau von *Candida albicans* näher beschrieben.

Zum einen dient die Zellwand von *Candida albicans* zum Erhalt der Zellform und zum anderen zur Herstellung des Kontaktes von *Candida albicans* zu seiner Umwelt. Diese beiden Funktionen sind wesentlich für die Pathogenese und Serodiagnostik von Candidiasis. *Candida albicans* besitzt die Fähigkeit seine Zellform zu ändern, was einen Einfluss auf die Virulenz haben kann. Einige Bestandteile der Zellwandoberfläche sind für die Adhäsion von *Candida albicans* an die Wirtszellen verantwortlich. Manche Antigene, die sich an der Oberfläche der

Zellwand befinden, dienen zudem für diagnostische Zwecke von Infektionen, welche durch *Candida albicans* ausgelöst werden [7].

Die Elektronenmikroskopie führte zu der Erkenntnis, dass *Candida albicans* eine mehrschichtige Zellwand besitzt, wobei die meisten Autoren von einer fünfschichtigen Zellwand ausgehen (siehe Abbildung 1) [18, 19]. Andere beschreiben auch sechs Zellwandschichten [20]. Die unterschiedliche Zahl der Zellwandschichten hängt vom Alter der Zellen und dem umgebenen Milieu ab [21]. Die einzelnen Schichten der Zellwand sind reich an Mannose-Polysacchariden, die bevorzugt in Zonen mit hoher Elektronendichte vorkommen [22]. In der innersten Schicht der Zellwand befindet sich hauptsächlich Chitin und  $\beta$ -1,6-Glucose [23]. Die äußerste Schicht der Zellwand von *Candida albicans* wird nur gebildet, wenn dieser auf einem Agar-Medium [24] oder beim Vorhandensein bestimmter Kohlenhydrate [25] wächst. Diese Zellwandschicht, die hauptsächlich aus Mannoproteinen besteht und 1-3  $\mu\text{m}$  langen Fimbriae [26] an der Oberfläche besitzt, ist wichtig für die Adhäsion der Zellen an menschliche Epithelien und für das Eindringen der Zellen in das Gewebe [24]. Letztendlich ist nach dem Eindringen der Zellen in das menschliche Gewebe die Permeabilität der Zellwand gegenüber den Zellen des humoralen Immunsystems und die Widerstandsfähigkeit der Zellen gegen das zelluläre Immunsystem für das Überleben des Parasiten entscheidend [24]. Aufgrund unterschiedlicher Wachstumsbedingungen, wie Medium, Alter der Zellen oder Umwelteinflüsse kommt es zu verschiedenen Variationen des Zellwandaufbaus von *Candida albicans* [24]. Diese Variationen des Zellwandaufbaus und auch die Permeabilität der Zellwand spielen eine wichtige Rolle für das Überleben und die Inaktivierung von *Candida albicans*. Dies kann auch einen wesentlichen Faktor für die Wirksamkeit der photodynamischen Therapie mit Hilfe von Photosensibilisatoren auf *Candida albicans* darstellen. Nachdem die Relevanz des Zellwandaufbaus von *C. albicans* für die photodynamische Inaktivierung dargestellt wurde, wird in den beiden nächsten Kapiteln näher auf die Geschichte und das Prinzip der Photodynamik eingegangen.

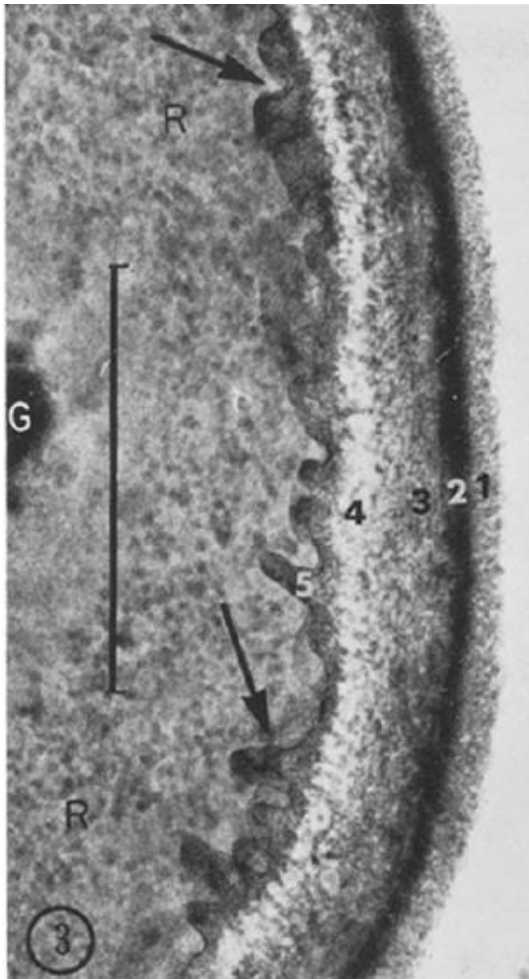


Abbildung 1: Darstellung des Zellwandaufbaus von *C. albicans* mit fünf verschiedenen Zellwandschichten (1-5). Das Bild wurde aus [19] entnommen.

### 1.3 Geschichte der photodynamischen Therapie

Das Prinzip der photodynamischen Inaktivierung wurde erstmals 1897/98 von *Oskar Raab*, einem deutschen Medizinstudenten, beobachtet. Dabei stellte er eine Inaktivierung von *Paramecium caudatum* (Pantoffeltierchen) nach der Einwirkung des Farbstoffes Acridin und anschließender Bestrahlung der Proben mit Sonnenlicht fest. *Raab et al.* erkannten einen Zusammenhang zwischen der toxischen Wirkung des Farbstoffes und dem einfallenden Licht auf die Proben, da es nicht möglich war, *Paramecium caudatum* im Dunkeln durch die Einwirkung des Farbstoffes zu inaktivieren [27]. Sein Doktorvater *Herman von Tappeiner* bezeichnete dieses Prinzip der Inaktivierung als „photodynamisch“, um es von photographischen Phänomenen abzugrenzen [28].

1942 zeigten *Hans Auler* und *Georg Banzer* mittels Fluoreszenz von Hämatorporphyrin, dass sich der Farbstoff im Tumorgewebe von Ratten anlagern konnte. Nach der Bestrahlung mit einer Quarzlampe wurde das Tumorgewebe nekrotisch und verkleinerte sich [29]. Insbesondere *Schwartz*, *Winkelmann* und *Lipson* beschäftigten sich in den 1960er Jahren mit der Lokalisation und Fluoreszenz von Porphyrin-Photosensibilisatoren in Tumoren [30]. *Lipson et al.* beschrieben 1966 die Verwendung von Hämatorporphyrin-Derivaten bei der Diagnostik von malignen Läsionen mittels Fluoreszenz des Farbstoffes bei Patienten, die an Tumoren im Bereich von Cervix und Vagina, Ösophagus, Trachea, Rectum, Peritonealhöhle, Ohrspeicheldrüse und Brust erkrankt waren [31]. Auch in den 1970er Jahren wurde die Behandlung von Tumoren in Mäusen und Ratten [32] und schließlich auch die erfolgreiche Behandlung von Tumoren bei Patienten [33] mittels photodynamischer Therapie erforscht. Nach diesen Ergebnissen stieg das Interesse an der photodynamischen Therapie von Tumoren und anderen Erkrankungen.

In der Dermatologie ist die photodynamische Therapie ein zugelassenes Verfahren für die Therapie von Basalzellkarzinomen und aktinischer Keratose [34]. In vielen Versuchen wurde allerdings gezeigt, dass die photodynamische Therapie (PDT) zusätzlich auch eine antimikrobielle Wirkung bei entsprechender Anwendung besitzt. Um diese antimikrobielle Wirkung der PDT gegenüber der Wirkung bei der Tumorthherapie klar abzugrenzen, wird diese antimikrobielle Wirkung als aPDT (antimikrobielle photodynamische Therapie) bezeichnet.

#### **1.4 Prinzip der antimikrobiellen photodynamischen Therapie**

Das Prinzip der aPDT beruht darauf, dass ein nicht-toxisches Molekül (Photosensibilisator) mit Licht bestrahlt wird, dadurch aktiviert wird und durch die Aktivierung des Photosensibilisators (PS) reaktive Sauerstoffspezies (ROS: „reactive oxygen species“) entstehen. Dabei sollte sich der Photosensibilisator in der Nähe beziehungsweise in der Zielzelle befinden. Die ROS können auf die Zielzellen oxidativen Stress ausüben, der zur Apoptose der Zellen führt.

Durch die Aktivierung des Photosensibilisators mit Licht wird dieser aus dem Singulett-Grundzustand in einen angeregten Singulett-Zustand gebracht. Der Photosensibilisator kann durch Energieabgabe in Form von strahlungsloser „internal conversion“ (IC) oder durch strahlender Fluoreszenz wieder in den Grundzustand zurückkehren. Eine weitere Möglichkeit

besteht darin, dass der Photosensibilisator mittels „intersystem crossing“ (ISC) in einen Triplett-Zustand übergeht. Über den Triplett-Zustand, der als Mediator fungiert, erfolgt die Ladungs- bzw. Energieübertragung auf Umgebungsmoleküle. Durch diesen Vorgang entstehen die reaktiven Sauerstoffspezies. Anschließend kann der Photosensibilisator aus diesem Triplett-Zustand mittels Phosphoreszenz wieder in den Grundzustand zurückkehren. Dabei gibt es zwei Reaktionsmechanismen, wie es zur Bildung von ROS kommt.

Bei der Typ-I-Reaktion wird auf sich in Lösung befindliche Sauerstoffmoleküle ein Elektron beziehungsweise ein Wasserstoffatom übertragen. Dadurch entstehen ROS wie Superoxide, Wasserstoffperoxide und freie Hydroxylradikale, welche ubiquitär im bakteriellen Leben auftreten. Aus diesem Grund haben einige Bakterien Verteidigungsmechanismen gegen diese Art von oxidativen Stress entwickelt. Dabei exprimieren Bakterien Superoxiddismutasen, Katalasen und Peroxidasen, die die ROS katalytisch in molekularen Sauerstoff und Wasser umwandeln. Es besteht daher auch die Möglichkeit, dass dieser Verteidigungsmechanismus der Bakterien gegenüber der durch den Typ-I-Mechanismus der aPDT vermittelten oxidativen Inaktivierung von Bakterien wirksam wird. *Karavolos et al.* zeigten eine Erhöhung der Expression der Superoxiddismutasen bei *S. aureus* nach der Behandlung mit Wirkstoffen, die oxidativen Stress induzieren [35].

Bei der Typ-II-Reaktion entsteht durch die direkte Übertragung der Energie (0,98 eV) des Photosensibilisators auf sich in der Lösung befindenden molekularen Sauerstoff dagegen hochreaktiver und selektiver Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ).

Das beschriebene Prinzip der aPDT wird in zahlreichen Publikationen ausführlich dargestellt [36-40]. Die toxische Wirksamkeit der beiden Reaktionsmechanismen (Typ I und Typ II) ist auf die Oxidation bestimmter Biomoleküle (v. a. Lipide und Proteine) durch die ROS zurückzuführen [41]. Welcher Reaktionsmechanismus abläuft ist abhängig von den photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften des Photosensibilisators, von dessen subzellulärer Lokalisation und dem Substrat- und Sauerstoffangebot in der Umgebung des lichtaktivierten Photosensibilisators [42-44]. Nach aktuellem Stand der Forschung wird aber angenommen, dass die Typ-II-Reaktion die wichtigere Rolle bei der aPDT spielt [41].

### 1.5 Klinische Anwendung der photodynamischen Therapie in der Zahnmedizin

In der Zahnmedizin gibt es mehrere Anwendungsgebiete, in denen die antimikrobielle photodynamische Therapie (aPDT) mittlerweile eingesetzt wird. Zu diesen Anwendungsgebieten zählen Parodontitis und Periimplantitis, Kariologie, Endodontie sowie Weichgewebs- und Knocheninfektionen. Eines der Systeme, das sich bereits am Markt befindet und in all diesen Bereichen angewendet werden kann, ist das Helbo-Verfahren. Bei diesem System wird der Photosensibilisator Helbo®Blue (Toluidinblau „0“) mit einem Diodenlaser bestrahlt. *Braun et al.* führten dazu eine Studie mit 20 Patienten durch, die an chronischer Parodontitis erkrankt waren [45]. Dabei wurde bei der Behandlung an allen betroffenen Zähnen ein „scaling and root planning“ und anschließend in zwei der vier Quadranten die aPDT mit dem „Helbo Photodynamic System“ durchgeführt (TBO als Photosensibilisator, Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 660 nm und Leistung von 100 mW, Inkubationszeit 3 min, Bestrahlungszeit 10 s an sechs Stellen pro Zahn). Nach sieben Tagen wurde die Sulkusfluidflussrate und der BOP (Bleeding on Probing Index) gemessen. Nach drei Monaten wurden diese beiden Indizes nochmals zusammen mit der Taschentiefe und dem Attachmentverlust bestimmt. Durch die aPDT konnte im Gegensatz zum alleinigen „scaling and root planning“ eine Verbesserung des Therapieerfolgs erzielt werden. Nach drei Monaten zeigte sich im Vergleich zur herkömmlichen Behandlung eine Verbesserung des Indexes der Taschentiefe um 0,1 mm im Mittel und ebenfalls eine Verbesserung des BOP-Indexes um fünf infizierte Taschen im Mittel [45]. So ist zwar eine Verbesserung in den Ergebnissen durch die aPDT zu erkennen, jedoch ist diese Verbesserung klinisch vernachlässigbar, da diese auch aufgrund eines Messfehlers beim BOP-Index oder der Taschentiefe zustande gekommen sein könnte. Die Ergebnisse sind daher eher kritisch zu betrachten.

Auf dem Markt befindet sich ein weiteres System, das auch die Behandlung von Parodontitis und Periimplantitis, Weichgewebsinfektionen, Wurzelkanal desinfektion und Karies mittels aPDT ermöglicht. Dabei handelt es sich um das System der Firma Cundente (PACT®300). Bei diesem System wird der Photosensibilisator Toloniumchlorid (Toluidinblau) mit rotem Licht (632 bis 644 nm) bestrahlt, das durch eine Laserdiode mit einer Leistung von 300 mW erzeugt wird. *Cappuyens et al.* führten dazu eine Studie an 32 Patienten durch, die an Parodontitis erkrankt waren, um die Wirksamkeit von aPDT mittels Toluidinblau im Vergleich zum „scaling and root planning“ und der „diod soft laser therapy“ bei Parodontitis zu testen. Auch sie

stellten eine Reduktion des BOP, der Taschentiefe und der Keimzahl bei allen drei Techniken fest. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Behandlungsmethoden beobachtet werden [46]. Es wurde aber bereits in mehreren in-vitro Studien sowohl beim Einsatz gegen Bakterien als auch gegen *C. albicans* gezeigt, dass Toluidinblau ein geeigneter Photosensibilisator für die Inaktivierung von Mikroorganismen mittels aPDT ist [47, 48].

Für die Behandlung von Parodontitis befindet sich ein drittes System der Firma elexxion GmbH namens „perio green®“ auf dem Markt. Bei diesem System wird der Photosensibilisator Indocyaningrün (ICG) appliziert und mit einem Diodenlaser (Wellenlänge von 808 nm, 500 mW) der Firma elexxion GmbH bestrahlt. *Fickweiler et al.* untersuchten das Wirkungsprinzip von Indocyaningrün [49]. Dafür wurden Keratinozyten (vom Typ HaCaT) mit verschiedenen Konzentrationen von Indocyaningrün (5, 10, 25 und 50  $\mu\text{M}$ ) für 24 h inkubiert und anschließend mit verschiedenen Energiedosen (0, 12, 24 und 48  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) mit einem CW-Diodenlaser (805 nm, 15 W) bestrahlt. Dabei stellten sie fest, dass bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  und einer Energiedosis von 48  $\text{J}/\text{cm}^2$  die beste photodynamische Wirkung von Indocyaningrün eintrat, da die Überlebensrate der Zellen <20% betrug. Um zu zeigen, dass es sich hierbei um eine photodynamische Wirkung handelt, wurden Experimente mit „sodium azide“, einem physikalischen „Quencher“ von Singulett-Sauerstoff, durchgeführt. Dabei wurden die Keratinozyten mit Indocyaningrün (50  $\mu\text{M}$ ) für 24 h inkubiert und 5 min vor der Bestrahlung mit 24  $\text{J}/\text{cm}^2$  wurde „sodium azide“ (10, 50 und 100 mM) zugegeben. *Fickweiler et al.* konnten dadurch zeigen, dass mit zunehmender Konzentration von „sodium azide“ die Zellüberlebensrate zunahm. Daraus schlossen sie, dass Singulett-Sauerstoff für die Abtötung der Keratinozyten verantwortlich ist und somit Indocyaningrün eine photoaktive Wirkung besitzt. Nach neueren Anwendungsbeobachtungen von Indocyaningrün im dentalen Bereich wird das Wirkungsprinzip des Photosensibilisators kontrovers diskutiert. *Engel et al.* gehen davon aus, dass nur ein geringer Teil der antimikrobiellen Wirkung von Indocyaningrün auf die aPDT und Fluoreszenz und der größte Teil auf den photothermischen Reaktionsmechanismus (aPTT) zurückzuführen ist. Die dabei entstehenden Sauerstoffradikale führen wahrscheinlich nur zu einer ICG-Molekül-Spaltung [50]. Bereits 1966 beschrieben *Baker et al.*, dass sich Indocyaningrün an  $\alpha$ 1-Lipoproteine, die in mikrobiellen Membranen vorkommen, anlagert [51]. Durch die Energieaufnahme des Photosensibilisators bei der anschließenden Bestrahlung

entsteht Wärme, die so hoch ist, dass die Membranen der Mikroorganismen denaturieren und es dadurch zur Apoptose kommt. Der Wirkungsmechanismus von Indocyaningrün ist allerdings bislang noch nicht eindeutig geklärt und wird kontrovers diskutiert.

Die Anzahl der Studien für die Anwendung von Indocyaningrün in der Zahnmedizin ist begrenzt und beschränkt sich zumeist auf in-vitro Studien. So zeigten *Boehm und Ciancio* eine erfolgreiche Inaktivierung von parodontalpathogenen Keimen mittels Indocyaningrün mittels in-vitro-Tests [52]. Es gibt allerdings noch keine umfassenden Patientenstudien. Diese sind gegenwärtig in Arbeit.

Es befinden sich somit also derzeit drei Systeme für zahnmedizinische Behandlungen auf dem Markt, die im Bereich der Parodontologie, Endodontie, Knochen- und Weichgewebsinfektionen und Kariologie eine Alternative zu konventionellen Therapieansätzen, wie Antibiotika, darstellen. Allerdings werden die Ergebnisse der bisher aufgeführten Studien kontrovers diskutiert [53-57].

## 2 Fragestellung

Aufgrund der Entwicklung von Resistenzen gegenüber konventionellen antimikrobiellen Verfahren ist es wichtig, sogenannte „multi target“-Prozesse zu entwickeln. Diese Prozesse wirken auf viele verschiedene mikrobielle Strukturen zeitgleich und unabhängig voneinander. Im Gegensatz zur Wirkungsweise von herkömmlichen Antimykotika, die sehr spezifisch nach dem so genannten Schlüssel-Loch-Prinzip wirken, stellt die Wirkungsweise der aPDT einen solchen „multi target“ Prozess dar. Diese Methode nutzt die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die durch die Bestrahlung der verwendeten Photosensibilisatoren mit sichtbarem Licht erzeugt werden. Diese ROS sorgen für die unselektive und oxidative Zerstörung von biologischen Strukturen [40], wodurch kein Selektionsdruck entsteht. Generell haben Bakterien Verteidigungsmechanismen gegen oxidativen Umweltstress entwickelt (siehe **1.4**).

Um den Abwehrmechanismen der Mikroorganismen gegenüber oxidativen Stress durch ROS - insbesondere Radikale - entgegenzuwirken, wurde der Photosensibilisator SAPyR mit einer Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute von 99% ( $\Phi_{\Delta} = 0,99 \pm 0,05$ ) entwickelt, d.h. hier entsteht nahezu ausschließlich Singulett-Sauerstoff nach dem Typ-II-Mechanismus [58].

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wird im ersten Teil untersucht, inwieweit verschiedene Derivate von SAPyR eine photodynamische Wirkung auf *Candida albicans* zeigen. In Abhängigkeit verschiedener Parameter wie Inkubationszeit, Konzentration der Photosensibilisatoren und Lichtdosis soll in Abhängigkeit chemisch-modifizierter Seitenketten von SAPyR eine Dosis-Wirkungsbeziehung abgeleitet werden. Diese Ergebnisse ermöglichen dann eine gezielte Optimierung von PS, um eine effektive Inaktivierung von *Candida albicans* zu erreichen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird untersucht, wie sich die photodynamische Inaktivierung von *S. aureus* und *E. coli* mit SAPyR bei der Verwendung zweier verschiedener Lichtquellen verhält. Dies soll einerseits aufgrund derselben applizierten Energiedosis und andererseits aufgrund der vom Photosensibilisator absorbierten Photonen verglichen werden.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Mikroorganismen**

#### **3.1.1 *Candida albicans*-Stamm**

Für die Versuche wurde der *Candida albicans*-Stamm ATCC MYA-273 (LGC Standards GmbH, Deutschland) benutzt.

#### **3.1.2 Bakterienstämme**

In den Versuchen des zweiten Teils dieser Arbeit wurden *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Escherichia coli* ATCC 25922 verwendet. Die Bakterien wurden in einer Müller-Hinton-Bouillon über Nacht bei 37°C kultiviert.

### **3.2 Kulturmedien**

#### **3.2.1 Sabouraud-Bouillon**

15 g des Sabouraud-Bouillon Pulvers (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) wurden in 1 Liter Millipore-Wasser aufgelöst und bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Das hergestellte Medium wurde bis zu seinem Gebrauch im Kühlschrank gelagert.

#### **3.2.2 Müller-Hinton-Bouillon**

21 g des pulverförmigen Müller-Hinton-Mediums (Merck KGaA, Deutschland) wurden zu 1 Liter Millipore-Wasser gegeben, eingerührt, bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert und kühl aufbewahrt.

#### **3.2.3 Sabouraud-Agar und Müller-Hinton-Agar**

Die Sabouraud-Agarplatten und Müller-Hinton-Agarplatten wurden vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg bezogen.

### 3.3 Photosensibilisatoren

Die Photosensibilisatoren **SAPyR** (1-((1-oxo-1H-phenalen-2-yl)methyl)pyridiniumchlorid), **SA-PN02a** (N,N,N-trimethyl-1-((1-oxo-1H-phenalen-2-yl)methyl)methanaminiumchlorid), **SA-PN03** (N,N-dimethyl-N-((1-oxo-1H-phenalen-2-yl)methyl)butan-1-aminiumchlorid), **SA-PN04** (N,N-dimethyl-N-((1-oxo-1H-phenalen-2-yl)methyl)octan-1-aminiumchlorid), **SA-PN05** (N,N-dimethyl-N-((1-oxo-1H-phenalen-2-yl)methyl)dodecan-1-aminiumchlorid) und **SA-PN27** (N-((1-oxo-1H-phenalen-2-yl)methyl)-N'-methyl-4,4'-bipyridiniumchlorid) wurden am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg von Herrn Dr. Andreas Späth synthetisiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Tabelle 1). Ihre Reinheit beträgt mehr als 98%. Ihre Absorptionsmaxima liegen bei 370–420 nm, das Emissionsspektrum erstreckt sich von 280 nm bis 490 nm. Exemplarisch für SAPyR und dessen Derivate wird in Abbildung 2 das Absorptionsspektrum von SAPyR bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  dargestellt.

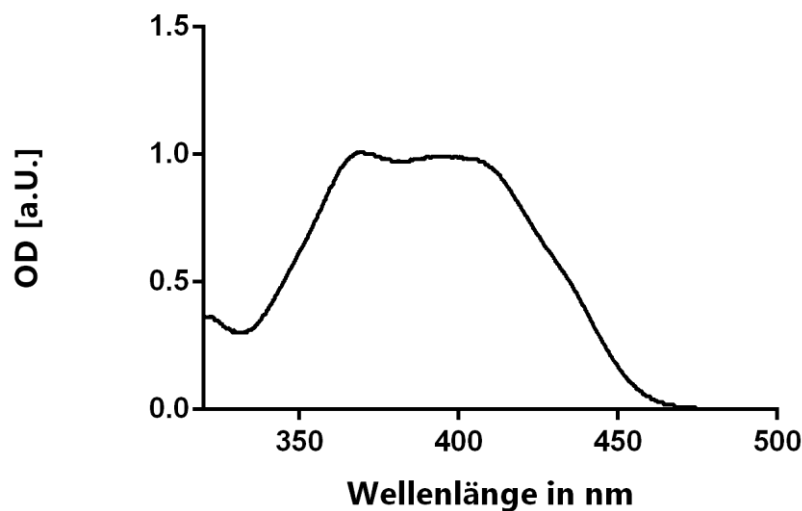
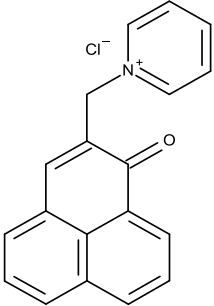
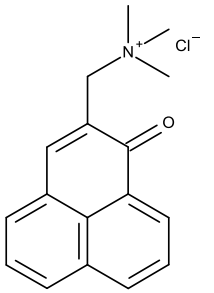
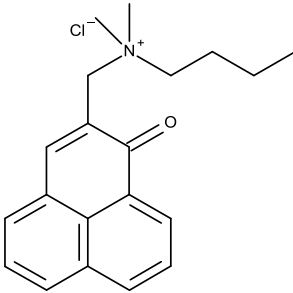
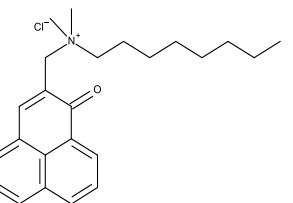


Abbildung 2: Darstellung des Spektrums von SAPyR (100  $\mu\text{M}$ )

Das wasserlösliche Perinaphthenon mit der Sulfonatgruppe (**PNS**) wurde von Frau Dr. Anita Gollmer (Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg) synthetisiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Das Absorptionsmaximum liegt bei 367 nm.

Der Photosensibilisator Perinaphthenon (**PN**) mit einer Reinheit von 97% wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) bezogen. Der Photosensibilisator besitzt sein Absorptionsmaximum bei 360-420 nm [59].

Bezeichnung	Struktur	Systemischer IUPAC Name	Molmasse und Summenformel
SAPyR		1-((1-oxo-1H-phenalen-2-yl)methyl)pyridiniumchlorid	$M = 307,75 \frac{g}{mol}$ $C_{19}H_{14}NOCl$
SA-PN02a		N,N,N-trimethyl-1-(-oxo-1H-phenalen-2-yl)methanaminiumchlorid	$M = 287,75 \frac{g}{mol}$ $C_{17}H_{18}NOCl$
SA-PN03		N,N-dimethyl-N-((1-oxo-1H-phenalen-2-yl)methyl)butan-1-aminiumchlorid	$M = 329,85 \frac{g}{mol}$ $C_{20}H_{24}NOCl$
SA-PN04		N,N-dimethyl-N-((1-oxo-1H-phenalen-2-yl)methyl)octan-1-aminiumchlorid	$M = 385,98 \frac{g}{mol}$ $C_{24}H_{32}NOCl$

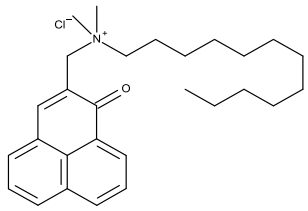
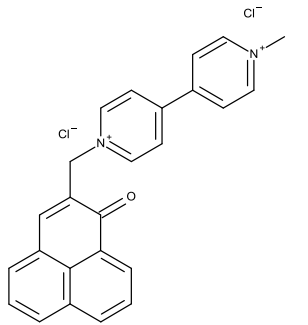
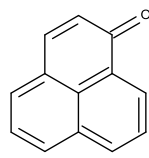
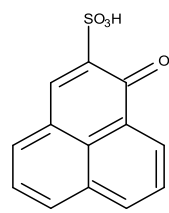
SA-PN05		N,N-dimethyl-N-((1-oxo-1H-phenalen-2-yl)methyl)dodecan-1-aminiumchlorid	$M = 442,09 \frac{g}{mol}$ $C_{28}H_{40}NOCl$
SA-PN27		N-((1-oxo-1H-phenalen-2-yl)methyl)-N'-methyl-4,4'-bipyridiniumchlorid	$M = 435,35 \frac{g}{mol}$ $C_{25}H_{20}N_2OCl_2$
PN		Perinaphthenon	$M = 180,21 \frac{g}{mol}$
PNS		Perinaphthenonsulfonat	$M = 260,27 \frac{g}{mol}$

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Photosensibilisatoren

Die Stabilität der Photosensibilisatoren nach der Bestrahlung, der Absorptionsbereich, der Sauerstoffverbrauch und das  $\Phi_{\Delta}$  von den Photosensibilisatoren SAPyR, SA-PN02a, SA-PN03, SA-PN04 und SA-PN05, sowie die Singulett-Sauerstoff-Stabilität der Photosensibilisatoren wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Johannes Regensburger (Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg) untersucht. In den folgenden Tabellen (Tabelle 2-5) sind die Eigenschaften dieser Photosensibilisatoren dargestellt.

Photosensibilisator	$\sigma$ [ $\times E^{-16} \text{ cm}^2$ ]	Bereich in nm
SAPyR	0,35-0,37	363-410
SA-PN02a	0,30-0,34	360-417
SA-PN03	0,30-0,32	364-413
SA-PN04	0,25-0,27	361-413
SA-PN05	0,30-0,35	360-418
SA-PN27	n. b.	n. b.

Tabelle 2: Maximale Absorptionswirkungsquerschnitte und Wellenlängenbereich

(n.b.: nicht bestimmt)

Photosensibilisator	Verlust in % bei 400 nm	Applizierte Energie nach 20 Minuten in Joule [J]
SAPyR	38	128
SA-PN02a	36	124
SA-PN03	89	125
SA-PN04	63	126
SA-PN05	74	122
SA-PN27	n. b.	n. b.

Tabelle 3: Stabilität der Photosensibilisatoren nach Bestrahlung (n.b.: nicht bestimmt)

Photosensibilisator	Verlust in % von $O_2$ in der Lösung	Verlust der Singulett-Sauerstoff-Gesamtmenge in % nach 20 Minuten Bestrahlung
SAPyR	20	45
SA-PN02a	24	44
SA-PN03	16	90
SA-PN04	23	73
SA-PN05	18	85
SA-PN27	n. b.	n. b.

Tabelle 4: Sauerstoffverbrauch und Singulett-Sauerstoff-Stabilität (n.b.: nicht bestimmt)

Photosensibilisator	$\Phi_{\Delta}$
SAPyR	$0,99 \pm 0,05$ *
SA-PN02a	1,03
SA-PN03	1,03
SA-PN04	n. b.
SA-PN05	1,06
SA-PN27	n. b.

Tabelle 5:  $\Phi_{\Delta}$  der Photosensibilisatoren (n.b.: nicht bestimmt), \*: [58]

### 3.4 Lösungsmittel

#### 3.4.1 PBS

Der verwendete phosphathaltige Puffer *Phosphate Buffered Saline* von der Firma Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland) beinhaltet KCl (0,2 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,2 g/L), NaCl (8,0 g/L) und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1,15 g/L).

#### 3.4.2 Ethanol

Damit der Photosensibilisator PN in Lösung gebracht werden konnte, wurde der Ethanol Rotipurano®  $\geq 99,8\%$  von der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

### 3.5 Technische Geräte und Hilfsmittel

#### 3.5.1 Lichtquellen

##### 3.5.1.1 Waldmann BlueV UV802L

Die Lichtquelle wurde von der Firma Waldmann Medizintechnik (Villingen-Schwenningen, Deutschland) als Prototyp im Rahmen der photodynamischen Projekte zur Inaktivierung von Mikroorganismen zu Verfügung gestellt. Das Emissionsspektrum der Lampe liegt bei 380-500 nm, die Flächenleistungsdichte beträgt  $20 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$ . Die Daten für das Lampenspektrum (siehe Abbildung 3) wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Johannes Regensburger (Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg) erhoben.

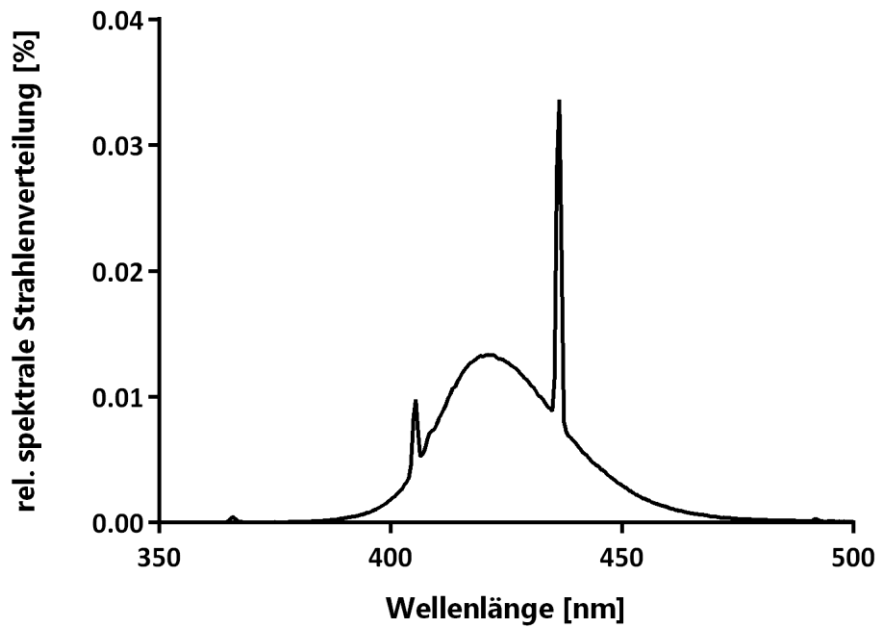


Abbildung 3: Emissionsspektrum BlueV UV802L

### 3.5.1.2 LED405nm-Lampe

Um eine höhere Energiedosis bei einigen Versuchen zu erreichen, wurde die LED405nm-Prototyp-Lampe von der Firma Asclepion Laser Technologies GmbH (Jena, Deutschland) verwendet. Die Flächenleistungsdichte wurde vor jedem Versuch mit einem Messgerät gemessen und über den Abstand von der Lichtquelle zu den Proben oder über die Leistung der Lampe auf  $200 \frac{mW}{cm^2}$  eingestellt. ihr Emissionsspektrum liegt zwischen 350 nm und 450 nm. Auch dieses Lampenspektrum (Abbildung 4) wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Johannes Regensburger (Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg) erstellt.

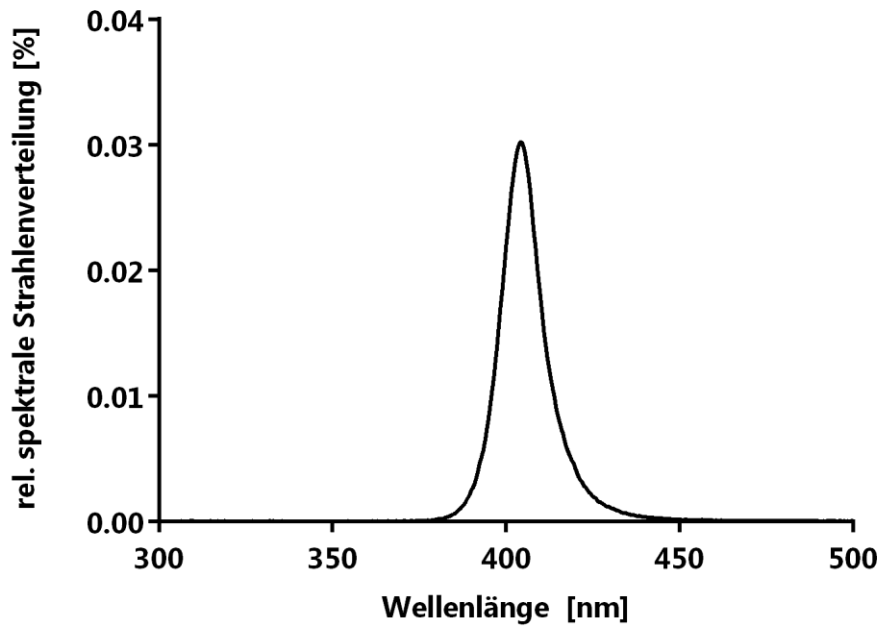


Abbildung 4: Emissionsspektrum LED405nm-Lampe

### 3.5.2 Zentrifugen

Megafuge 1.0 der Firma Heraeus Sepatech (Hanau, Deutschland)

Centrifuge 5415 R der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

### 3.5.3 Spektralphotometer

*Specord50 plus* der Firma Analytik Jena AG (Jena, Deutschland)

### 3.5.4 Küvetten

Für die „Uptake“-Versuche und für die Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Bakterienlösung wurden die Küvetten Acryl mit dem Volumen 1,8 mL der Firma Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland) verwendet.

### 3.5.5 Waage

CP225 D der Firma Sartorius (Göttingen, Deutschland)

### 3.5.6 Sterilbank

Laminaflow Hera Safe der Firma Kendro (Hanau, Deutschland)

### 3.5.7 Neubauer-Zählkammer

Für das Auszählen des *Candida albicans* wurde die Neubauer-Zählkammer Modell „improved“ der Firma Marienfeld GmbH & Co KG (Lauda-Königshofen, Deutschland) verwendet.

### 3.5.8 GraphPad Prism®

Für die Auswertung der Daten wurde das Programm Graph Pad Prism®6 der Firma Graph Pad Software (La Jolla, USA) verwendet.

## 3.6 Herstellung der Photosensibilisatorlösungen

Es wurde jeweils eine 10 mL-Lösung der Konzentration 1 mM für jeden verwendeten Photosensibilisator hergestellt. Dazu wurde das Photosensibilisator-Pulver mit Hilfe einer Feinwaage abgewogen und anschließend in ein 15 mL Falcon gegeben. Die Photosensibilisatoren SAPyR, SA-PN02a, SA-PN03, SA-PN04, SA-PN05, SA-PN27 und PNS wurden in Millipore-Wasser gelöst und bis zum vollständigen Lösen in das Ultraschallbad USR 30H (35 kHz, Merck Eurolab GmbH, Deutschland) bei Raumtemperatur gestellt. Danach wurde aus der Stammlösung (1 mM) eine Verdünnungsreihe in Millipore-Wasser hergestellt. Das wasserunlösliche PN wurde in Ethanol gelöst. Auch hier wurde eine Verdünnungsreihe des Photosensibilisators in Ethanol angefertigt. Für deren Herstellung wurde, anders als bei den anderen Photosensibilisatoren, eine 5 mM-Stammlösung hergestellt.

## 3.7 Kultivierungsverfahren für *C. albicans* und Bakterienstämme

Mit einer sterilen Öse wurden ein bis zwei Kolonien von *C. albicans*, *S. aureus* oder *E. coli* jeweils in ein Falcon mit 5 mL Müller-Hinton-Bouillon für Bakterien bzw. Sabouraud-Bouillon für Pilze gegeben. Anschließend wurden die angeimpften Proben zusammen mit einer Sterilkontrolle (nur Bouillon) auf einen Horizontalrüttler ( $180 \text{ min}^{-1}$ ) im Brutschrank ( $37^\circ\text{C}$ ) gestellt und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Übernachtskulturen bei  $3000 \frac{U}{min}$  für 10 min zentrifugiert (Megafuge 1.0). Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und die Mikroorganismen wieder in 5 mL Lösungsmittel resuspendiert. Dabei wurde für *E. coli* und *S. aureus* Millipore-Wasser, für *C. albicans* sowohl Millipore-Wasser als auch PBS verwendet.

### 3.8 Bestimmung der Bakterien-OD und Auszählen von *C.albicans* mit der Neubauer-Zählkammer

Mit Hilfe des Spektralphotometers wurde die optische Dichte (OD) der Bakterien-Lösungen bei 600 nm gemessen. Um auf die gewünschte Bakterien-OD von 0,6 zu kommen wurde folgender Verdünnungsfaktor (VF) verwendet:

$$VF = \frac{\text{gemessene OD}}{0,6}$$

Die Ausgangslösung wurde dann um den berechneten Faktor in Millipore-Wasser verdünnt. Die OD der erhaltenen Lösung wurde nochmal per Messung überprüft.

*Candida albicans* wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt (Abbildung 5). Hierfür wurden 10 µL der resuspendierten *Candida*-Lösung in die Zählkammer gegeben. Mit dem Mikroskop wurden nun zwei der kleinen Quadrate ausgezählt, der Mittelwert gebildet und mit  $1,25 \times 10^6$  multipliziert.

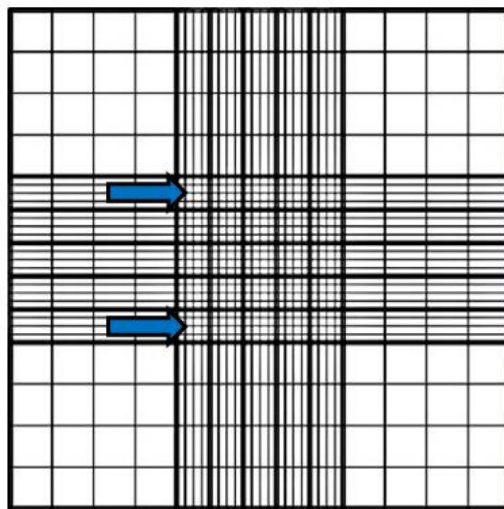


Abbildung 5: Die Abbildung zeigt das Zählraster einer Neubauer-Zählkammer. Die mit Pfeilen markierten Quadrate wurden ausgezählt.

### 3.9 Phototoxizitätsversuche

#### 3.9.1 Phototoxizitätsversuche mit Bakterien

Bei den Versuchen mit *S. aureus* wurden in einer sterilen 96-well Platte je 100  $\mu\text{L}$  der Bakterien-Lösung ( $\text{OD} = 0,6$ ) mit je 100  $\mu\text{L}$  SAPyR der Konzentrationen 3  $\mu\text{M}$  / 6  $\mu\text{M}$  / 12,5  $\mu\text{M}$  / 25  $\mu\text{M}$  / 50  $\mu\text{M}$  für 10 s inkubiert. Bei *E. coli* wurde zusätzlich eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  verwendet. Die Endkonzentrationen des Photosensibilisators betragen somit jeweils 1,5  $\mu\text{M}$  / 3  $\mu\text{M}$  / 6,25  $\mu\text{M}$  / 12,5  $\mu\text{M}$  / 25  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$  (nur bei *E. coli*). Anschließend wurden die Proben mit der BlueV UV802L für 60 s mit  $20 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$  beziehungsweise mit der LED405nm-Lampe für 6 s mit  $200 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$  und somit mit einer Energiedosis von  $1,2 \text{ J/cm}^2$  bestrahlt. Dabei wurde immer eine Lichtkontrolle (Bakterien ohne PS) durchgeführt. Für jede Photosensibilisatorkonzentration wurde zusätzlich eine Dunkelkontrolle (Bakterien + PS) angefertigt, die nicht bestrahlt wurde. Die Durchführung der Phototoxizitätsversuche ist in Abbildung 6 graphisch dargestellt.

#### 3.9.2 Phototoxizitätsversuche mit *C. albicans*

Auch bei diesen Versuchen wurden je 100  $\mu\text{L}$  der Übernachtskultur *C. albicans* entweder in Millipore-Wasser oder in PBS resuspendiert und je 100  $\mu\text{L}$  Photosensibilisator zusammengegeben. Als Photosensibilisator wurden hier SAPyR, SA-PN02a, SA-PN03, SA-PN04, SA-PN05, SA-PN27, PNS und PN verwendet. Dabei wurden verschiedene Inkubationszeiten, Photosensibilisatorkonzentrationen und Bestrahlungszeiten untersucht. Bestrahlt wurde sowohl mit der BlueV UV802L als auch mit der LED405nm-Lampe. Auch hier wurden Lichtkontrollen und Dunkelkontrollen durchgeführt. Die Proben wurden nach der Bestrahlung verdünnt. Die genauen Bedingungen der Versuche werden unter **4.1.1** beschrieben.

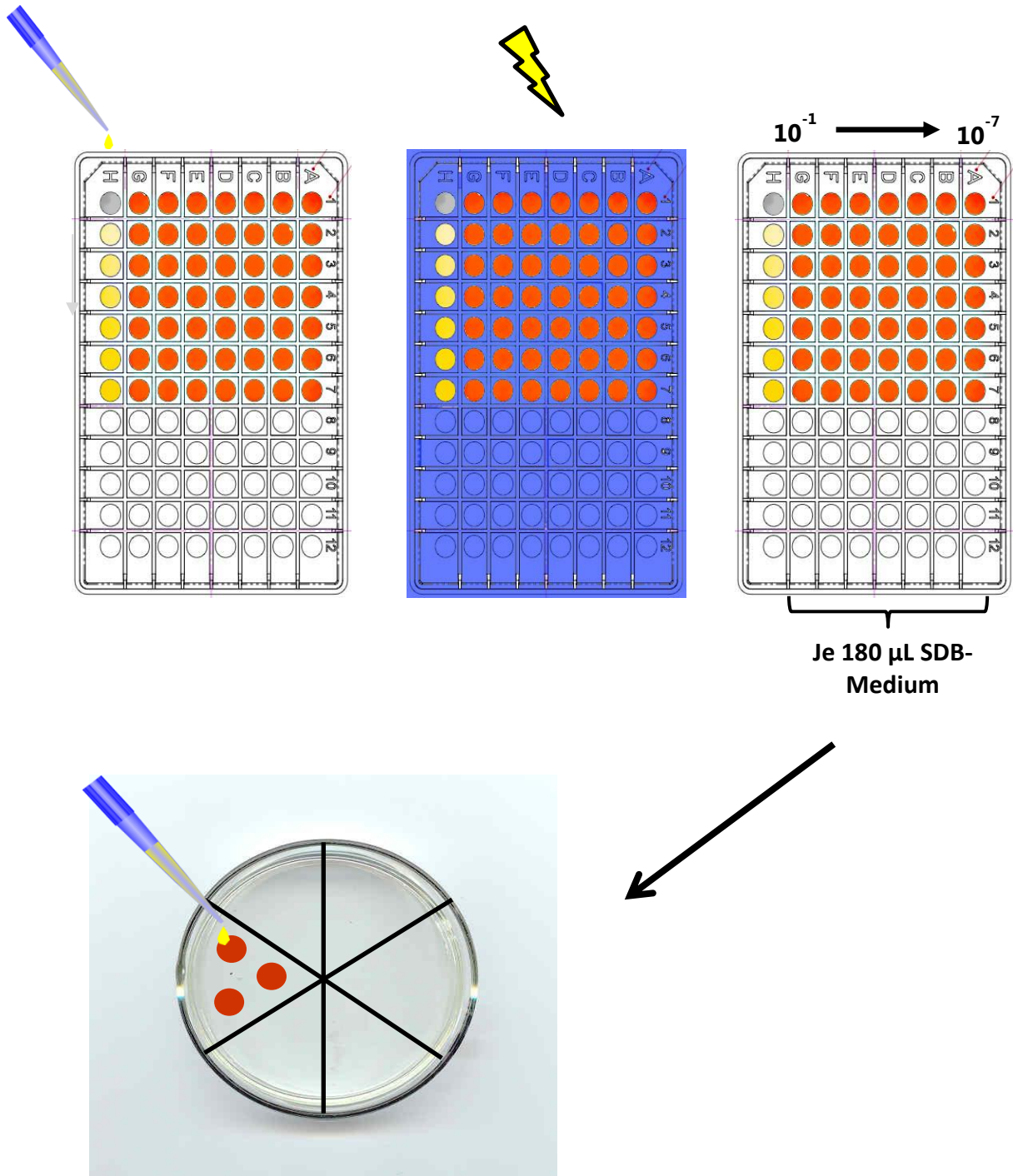


Abbildung 6: Die Abbildung zeigt den Aufbau eines Phototoxversuches. 100  $\mu\text{L}$  der Photosensibilisatorlösung mit zunehmender Konzentration (H2-H7) und Mikroorganismen (gelb) werden inkubiert und anschließend bestrahlt (blaue Platte). Je 20  $\mu\text{L}$  werden mit 180  $\mu\text{L}$  Medium (orange Felder in der Platte) verdünnt. Es erfolgt die Ausplattierung der Verdünnungsstufen auf eine Agar-Platte (3x 20  $\mu\text{L}$  pro Verdünnungsreihe).

### 3.10 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE)

Zur Bestimmung der KBE wurden die Proben nach Durchführung des Phototoxizitätsexperimentes verdünnt. Hierfür wurden für jede Konzentration 20 µL der jeweiligen Probe in 180 µL Medium pipettiert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis Verdünnungsstufen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-7}$  erreicht wurden. Nach Verdünnung der Proben wurde entsprechend der Methode nach *Miles, Misra und Irwin* ausplattiert [60]. Dabei wurden die Agar-Platten in sechs gleich große Flächen unterteilt. Für jede Verdünnungsstufe ( $10^{-2}$  bis  $10^{-7}$ ) wurden mit einer Pipette 60 µL Lösung aufgenommen und drei Tropfen à 20 µL auf einen Sextanten aufgebracht (Abbildung 6). Anschließend wurden die Platten über Nacht in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag wurden die Kolonien auf den Platten ausgezählt. Ab einer Anzahl von  $\geq 65$  KBE wurde die Zahl der Kolonien gleich unendlich gesetzt.

### 3.11 Datenanalyse

Die Ergebnisse der Phototoxizitätsversuche wurden mit dem Programm Graph Pad Prism®6 der Firma Graph Pad Software (La Jolla, USA) graphisch dargestellt. Dabei ist der Mittelwert mit dem Konfidenzintervall von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dargestellt. Kommt der Mittelwert auf oder unter der rot eingezeichneten horizontalen Linie zu liegen, so kann mit dem verwendeten Photosensibilisator eine Inaktivierung des *C. albicans* von  $\geq 99,9\%$  (3  $\log_{10}$ -Stufen) und somit eine antimikrobielle Wirkung erreicht werden.

Bei den Versuchen mit Bakterien ist zusätzlich eine blaue horizontale Linie eingezeichnet. Liegt der Mittelwert auf beziehungsweise unter dieser Linie, so ist eine Inaktivierung von  $\geq 99,999\%$  (5  $\log_{10}$ -Stufen) erreicht worden.

Die *Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)* definiert dabei eine antimikrobielle Wirkung als eine Reduktion um  $\geq 99,9\%$  (3  $\log_{10}$ -Stufen) und eine desinfizierende Wirkung als eine Reduktion um  $\geq 99,999\%$  (5  $\log_{10}$ -Stufen) [61].

### 3.12 „Uptake“-Versuche

Zur Bestimmung der Aufnahme/Anlagerung von Photosensibilisatoren wurden 750  $\mu\text{L}$  *Candida*-Lösung und 750  $\mu\text{L}$  Lösung der Photosensibilisatoren SAPyR, SA-PN02a, SA-PN03, SA-PN04, SA-PN05, SA-PN27, PNS und PN mit den Konzentrationen 200  $\mu\text{M}$  und 1 mM für 4 h in Reaktionsgefäße inkubiert. Die Endkonzentrationen betragen dabei jeweils 100  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ . Damit die Lösung mit einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  mit dem Spektralphotometer vermessen werden konnte, musste diese im Verhältnis 1:4 verdünnt werden. *C. albicans* war sowohl in PBS als auch in Millipore-Wasser resuspendiert. Das PN wurde in Ethanol gelöst, wobei in der 1500  $\mu\text{L}$ -Probe nur 10% Ethanol enthalten war. Nach der Inkubationszeit wurden die Reaktionsgefäße für 10 min bei  $13000 \frac{U}{min}$  zentrifugiert (Centrifuge 5415 R). Der Überstand wurde abgenommen und in eine Küvette überführt. Mit dem Spektralphotometer wurde die OD der Transmission des Überstandes gegen eine reine Photosensibilisatorlösung derselben Konzentration vermessen. Anschließend wurden die optischen Dichten der beiden Lösungen bestimmt und die dazugehörigen Spektren gezeigt. Ein Unterschied in den optischen Dichten der beiden Proben lässt dann Rückschlüsse auf die von *C. albicans* aufgenommene Menge des Photosensibilisators zu.

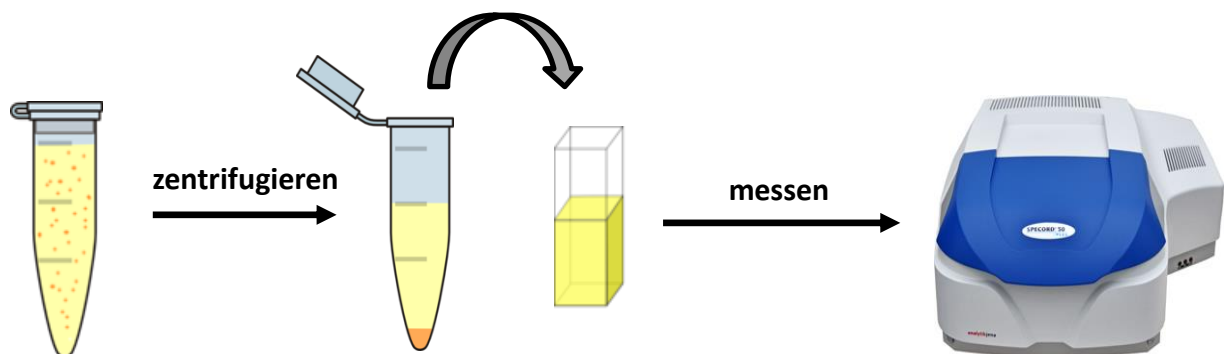


Abbildung 7: Darstellung eines Uptakeversuchs mit *Candida albicans*. Im ersten Reaktionsgefäß befindet sich *C. albicans* (orange Punkte) inkubiert für 4 h mit dem Photosensibilisator (gelbliche Lösung). Nach dem Zentrifugieren hat sich *C. albicans* mit aufgenommenen/angelagertem Photosensibilisator am Boden abgesetzt. Der Überstand (gelbliche Lösung) wird in eine Küvette überführt und mit dem Spektralphotometer vermessen.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Photodynamische Inaktivierung von *C. albicans* mittels Perinaphthenonderivaten

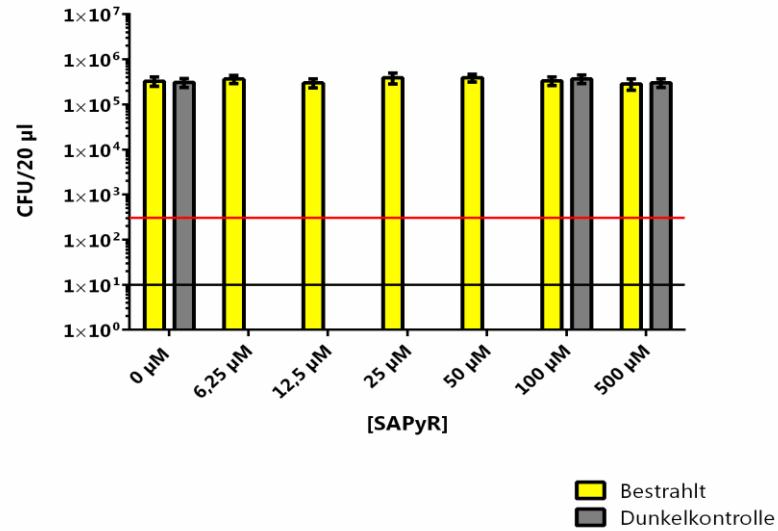
#### 4.1.1 Phototoxizitätsversuche

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse der photodynamischen Inaktivierung von *C. albicans* mittels lichtaktiviertem SAPyR, SA-PN27, SA-PN02a, SA-PN03, SA-PN04, SA-PN05, PN und PNS dargestellt. Als erfolgreiche Inaktivierung von *C. albicans* mit Hilfe von lichtaktivierten Photosensibilisatoren wird in dieser Arbeit eine Reduktion der KBE von *C. albicans* um  $\geq 99,9\%$  ( $3 \log_{10}$ -Stufen) definiert.

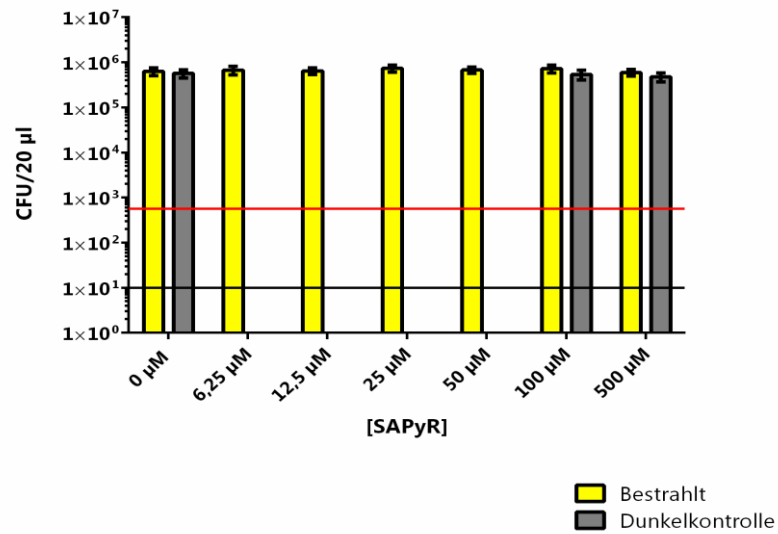
##### 4.1.1.1 *Candida albicans* und SAPyR

Vor Versuchsbeginn wurde eine Verdünnungsreihe des Photosensibilisators SAPyR mit Millipore-Wasser der Konzentrationen  $0 \mu\text{M}$  /  $12,5 \mu\text{M}$  /  $25 \mu\text{M}$  /  $50 \mu\text{M}$  /  $100 \mu\text{M}$  /  $200 \mu\text{M}$  und  $1 \text{ mM}$  hergestellt. Je  $100 \mu\text{L}$  dieser Konzentrationen des Photosensibilisators wurden anschließend zu je  $100 \mu\text{L}$  *C. albicans*-Suspension in eine 96-well-Platte gegeben. Die Endkonzentrationen des Photosensibilisators betragen somit  $0 \mu\text{M}$  /  $6,25 \mu\text{M}$  /  $12,5 \mu\text{M}$  /  $25 \mu\text{M}$  /  $50 \mu\text{M}$  /  $100 \mu\text{M}$  und  $500 \mu\text{M}$ . Als Inkubationszeiten wurden bei einer Versuchsreihe eine Stunde und bei einer weiteren Versuchsreihe vier Stunden gewählt. Bei den vierstündigen Versuchen wurde zusätzlich die Endkonzentration des Photosensibilisators von  $500 \mu\text{M}$  verwendet. *C. albicans* wurde bei beiden Versuchsreihen in PBS und in Millipore-Wasser resuspendiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben mit der BlueV UV802L für 10 Minuten mit der Energiedosis  $12 \text{ J/cm}^2$  bestrahlt. Für die Bedingungen mit den Photosensibilisatorendkonzentrationen  $0 \mu\text{M}$  /  $100 \mu\text{M}$  und  $500 \mu\text{M}$  wurden zusätzlich Dunkelkontrollen (*C. albicans* + PS) angefertigt, d. h. Proben, die nicht bestrahlt wurden.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Inaktivierungsversuche von *C. albicans* in Millipore-Wasser und PBS mittels SAPyR bei einer Inkubationszeit von vier Stunden dargestellt.



(a)



(b)

Abbildung 8: Dargestellt ist die Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser (a) und in PBS (b) mit SAPyR für 4 h und der Bestrahlungszeit von 10 min mit einer Energiedosis von 12 J/cm<sup>2</sup> (gelb) und die Dunkelkontrollen (grau). Es ist der Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen ± Konfidenzintervall dargestellt. (\_\_\_ Detektionsgrenze, \_\_\_ 3 log<sub>10</sub>-Reduktion)

Bei den Versuchen konnte keine Inaktivierung ( $\geq 99,9\%$ ) von *C. albicans* mit Hilfe von lichtaktiviertem SAPyR bei den verschiedenen Endkonzentrationen des Photosensibilisators nachgewiesen werden. Dies war sowohl unabhängig von der Inkubationszeit (1 h oder 4 h) als auch vom Lösungsmittel.

In der Lichtkontrolle, d. h. in der Probe, in der sich ausschließlich *C. albicans* und das jeweilige Lösungsmittel befand, wurde nach der Bestrahlung keine Inaktivierung von *C. albicans* beobachtet. Durch die Lichtkontrolle wurde die alleinige Wirkung des einstrahlenden Lichtes auf die Proben überprüft. Auch in den Dunkelkontrollen, d. h. in den Proben, die nicht bestrahlt wurden, wurde keine Reduktion der KBE von *C. albicans* nachgewiesen. Somit wurde gezeigt, dass weder das Licht noch der Photosensibilisator alleine einen Einfluss auf die Inaktivierung von *C. albicans* hatten.

Um im weiteren Verlauf der Arbeit eine Inaktivierung von *C. albicans* mit lichtaktiviertem SAPyR nachzuweisen, wurden die Bestrahlungszeit und die Inkubationszeit geändert. Dabei wurden je 100  $\mu\text{L}$  des in Millipore-Wasser resuspendierten *C. albicans* mit je 100  $\mu\text{L}$  Photosensibilisatorlösung der Konzentration 0  $\mu\text{M}$  / 12,5  $\mu\text{M}$  / 25  $\mu\text{M}$  / 50  $\mu\text{M}$  / 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  in eine 96-well-Platte pipettiert und für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit der BlueV UV802L für 20 Minuten mit der Energiedosis 24  $\text{J}/\text{cm}^2$  bestrahlt. Auch hier wurde eine Dunkelkontrolle mit den Photosensibilisatorkonzentrationen 0  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  durchgeführt.

Die Veränderung der Bestrahlungszeit und der Inkubationszeit führte zu keiner Inaktivierung ( $\geq 99,9\%$ ) von *C. albicans*.

Bei den weiteren Versuchen wurden wiederum die Modalitäten geändert. Die Inkubationszeit wurde dabei auf vier Stunden erhöht, die Endkonzentrationen der Photosensibilisatorlösungen betragen 0  $\mu\text{M}$  / 6,25  $\mu\text{M}$  / 12,5  $\mu\text{M}$  / 25  $\mu\text{M}$  / 50  $\mu\text{M}$  / 100  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  und *C. albicans* wurde in PBS resuspendiert. Je 100  $\mu\text{L}$  Photosensibilisatorlösung und *C. albicans* wurden für vier Stunden in ein Reaktionsgefäß gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben gewaschen. Hierfür wurden die Proben in der Centrifuge 5415 R für fünf Minuten bei  $13000 \frac{\text{U}}{\text{min}}$  zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet in 200  $\mu\text{L}$  PBS resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nach dem Waschen wurden dann jeweils 100  $\mu\text{L}$  der Suspension aus Photosensibilisator und *C. albicans* in eine 96-well-

Platte pipettiert und mit der BlueV UV802L für 10 Minuten mit der Energiedosis  $12 \text{ J/cm}^2$  bestrahlt. Eine Dunkelkontrolle wurde bei allen Photosensibilisatorkonzentrationen angefertigt.

Auch nach dem Waschen der Proben konnte wiederum keine Reduktion der KBE ( $\geq 99,9\%$ ) von *C. albicans* mit lichtaktiviertem SAPyR nachgewiesen werden, wie in Abbildung 9 dargestellt ist.

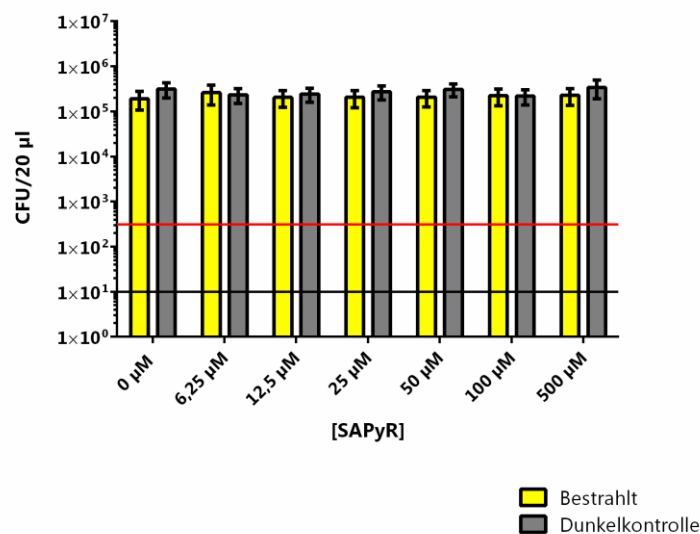


Abbildung 9: Gezeigt wird der Mittelwert von drei unabhängig durchgeführten Experimenten  $\pm$  Konfidenzintervall. Dargestellt ist die Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in PBS mit SAPyR für 4 h mit anschließenden zwei Waschvorgängen mit PBS und der Bestrahlungszeit von 10 min mit einer Energiedosis von  $12 \text{ J/cm}^2$  (gelb) und die Dunkelkontrollen (grau). (— Detektionsgrenze, — 3  $\log_{10}$ -Reduktion)

Zusammenfassend brachte die Verlängerung der Inkubationszeit von einer Stunde auf vier Stunden und die damit erhoffte mögliche Anlagerung beziehungsweise Aufnahme des Photosensibilisators von *C. albicans* keinen Erfolg für die Reduktion der KBE von *C. albicans*. Und auch die Verdopplung der Energiedosis von  $12$  auf  $24 \text{ J/cm}^2$  bei einer verkürzten Inkubationszeit von 15 Minuten hatte keinen Einfluss auf die antimikrobielle Wirkung von lichtaktiviertem SAPyR auf *C. albicans*.

Zusätzlich zeigte sich durch das Waschen der Proben mit PBS und damit der Entfernung des sich in Lösung befindenden Photosensibilisators, der sich nicht an *C. albicans* anlagerte

beziehungsweise aufgenommen wurde, kein Erfolg hinsichtlich der Inaktivierung ( $\geq 99,9\%$ ) von *C. albicans*. Das Waschen der Proben sollte eine Verbesserung der Inaktivierung von Mikroorganismen hervorrufen. Der Grund dafür liegt in der vollständigen Absorption der emittierten Photonen der Lichtquelle ausschließlich durch den angehefteten bzw. aufgenommenen Photosensibilisator. Somit sollte mehr Singulett-Sauerstoff im oder an der Oberfläche des Mikroorganismus entstehen und daraus eine Verbesserung der Inaktivierung folgen.

Auch die Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel (Millipore-Wasser und PBS) hatte keinen Einfluss auf die Inaktivierung von *C. albicans* mit lichtaktiviertem SAPyR.

Die Ergebnisse für die Versuche mit der Inkubationszeit von einer Stunde und die Ergebnisse für die Versuche mit der Verdopplung der Energiedosis sind im Anhang in Abbildung 27 graphisch dargestellt.

Nach der Durchführung der Versuche mit dem Ziel der photodynamischen Inaktivierung von *C. albicans* mit Hilfe von lichtaktiviertem SAPyR stellt sich nun die Frage, wieso dies nicht möglich war.

*Cieplik et al.* zeigten, dass SAPyR ein wirksamer Photosensibilisator für die Inaktivierung von Bakterien ist [58]. Dabei wurden Biofilme mit den Bakterien *E. faecalis*, *A. naeslundii* und *F. nucleatum* erfolgreich photodynamisch mit SAPyR inaktiviert. Der Photosensibilisator SAPyR wurde in Anlehnung an PN und PNS, die ein  $\Phi_{\Delta} \approx 1$  besitzen und somit ausschließlich dem Typ-II-Mechanismus bezüglich der aPDT folgen, konzipiert [58, 62]. Zusätzlich wurde eine positive Ladung in Form eines Pyridinium-Methylsubstituenten eingefügt [58]. Die gute Wirksamkeit von SAPyR ist daher einerseits auf das  $\Phi_{\Delta} = 0,99 \pm 0,05$  und der damit guten Singulett-sauerstoff-Ausbeute [58], andererseits auf eine bessere Bindung eines positiv geladenen Photosensibilisators an die Zellwände von Mikroorganismen zurückzuführen [63]. Trotz dieser vorteilhaften Eigenschaften von SAPyR gelang es nicht unter den hier durchgeführten Versuchsbedingungen *C. albicans* zu inaktivieren, d. h. eine mindestens 99,9%ige Reduktion der KBE zu erzielen. Insgesamt ist es schwieriger, Hefen mit Hilfe des photodynamischen Prozesses zu inaktivieren als Bakterien, wie auch *Zeina et al.* mit Methylblau zeigten [64]. Ein Grund dafür könnte in der Kernmembran liegen, die wie eine Barriere gegen

Photosensibilisatoren oder deren Reaktionsprodukte wirken kann. Ein weiterer Grund könnte die Zellgröße bzw. das Zellvolumen der Hefen darstellen, die 25-50 Mal größer sind als Bakterien. Damit werden mehr Moleküle des Photosensibilisators bzw. dessen Reaktionsprodukte benötigt, da sich mehr Angriffsziele ergeben [64]. Dennoch gelang es *Quiroga et al.*, planktonischen *C. albicans* mit TMPyP bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ , bei einer Inkubationszeit und Bestrahlungszeit von jeweils 30 Minuten mit einer Leistung von 90  $\text{mW}/\text{cm}^2$  um 5  $\log_{10}$ -Stufen zu reduzieren [65]. Auch *Gonzales et al.* konnten die Inaktivierung von planktonischen *C. albicans* mit TMPyP bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten und einer Bestrahlung mit blauem Licht mit der Energiedosis 12,1  $\text{J}/\text{cm}^2$  bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  um 6  $\log_{10}$ -Stufen zeigen. Weiterhin wiesen *Gonzales et al.* die Reduktion der KBE von biofilmbildenden *C. albicans* bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  (Inkubationszeit 4 h, Energiedosis 48,2  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) um 5  $\log_{10}$ -Stufen nach [16]. Wie bereits erwähnt, spielt die positive Ladung eine wichtige Rolle für die Anlagerung der Photosensibilisatoren an die Zelloberfläche. Dies könnte ein Grund für die Wirksamkeit von TMPyP im Gegensatz zu SAPyR (eine positive Ladung) sein, da TMPyP vier positive Ladungen trägt. Eine weitere Erklärung für die photodynamische Wirksamkeit von TMPyP auf *C. albicans* könnte das  $\Phi_{\Delta}$  von TMPyP sein, das im Bereich von 0,4 bis 0,8 liegt [66]. Ein Teil von TMPyP reagiert somit nach dem Typ-I-Mechanismus der aPDT, wobei hauptsächlich reaktive Sauerstoffmoleküle (Superoxide, Wasserstoffperoxide und freie Hydroxylradikale) entstehen. *Hwang et al.* zeigten, dass für die Inaktivierung von *C. albicans* die reaktiven Sauerstoffmoleküle, vor allem freie Hydroxylradikale, ein wichtiger Bestandteil sind [67]. Dabei wurde *C. albicans* mit synthetisierten antimikrobiellen Peptiden (Psacothasin) für 2 h inkubiert und anschließend die Menge intrazellulär entstehender Hydroxylradikale mittels Fluoreszenzfarbstoff gemessen. *Hwang et al.* stellten fest, dass eine Behandlung mit dem Peptid Psacothasin einen Anstieg der intrazellulär entstehenden Hydroxylradikale in *C. albicans* hervorrief. Außerdem vermuten *Hwang et al.*, dass dieser Anstieg der intrazellulären Hydroxylradikale eine maßgebliche Rolle für die erhöhte Apoptose von *C. albicans* durch Psacothasin spielen könnte.

Auch *Aerts et al.* beschreiben den Zusammenhang zwischen der Entstehung von endogenen ROS (Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale) durch die Einwirkung von antimikrobiellen Peptiden (RsAFP2 und HsAFP1), die aus Pflanzen gewonnen wurden, auf *C. albicans* und der

daraus folgenden Apoptose von *C. albicans* [68, 69]. Man geht auch davon aus, dass die fungizide Wirkung von Antimykotika, wie bei Miconazol, auf die Hochregulierung der Produktion von intrazellulären ROS (Superoxide und Hydroxylradikale) in *C. albicans* zurückzuführen ist [70].

Geht man davon aus, dass die reaktiven Sauerstoffspezies, wie Superoxide, Wasserstoffperoxide und Hydroxylradikale, wichtige Bestandteile für die Inaktivierung von *C. albicans* sind, so kann dies ein Grund dafür sein, dass TMPyP ( $\Phi_{\Delta}$  im Bereich von 0,4 bis 0,8) im Gegensatz zu SAPyR einen wirksamen Photosensibilisator gegen *C. albicans* darstellt.

Dagegen vermuten *Cormick et al.*, dass für die Inaktivierung von *C. albicans* mittels lichtaktiviertem TMPyP hauptsächlich der entstehende Singulett-Sauerstoff verantwortlich ist. *Cormick et al.* erwähnen aber auch, dass die anderen reaktiven Sauerstoffspezies (Superoxide, Wasserstoffperoxide und frei Hydroxylradikale) nicht vernachlässigt werden dürften [71]. Somit wird in der Literatur von den einzelnen Autoren kontrovers diskutiert, welche reaktiven Sauerstoffspezies für die Inaktivierung von *C. albicans* verantwortlich sind.

Ein weiteres Kriterium für die Wirksamkeit von Photosensibilisatoren könnte das Molekulargewicht und die daraus resultierende Größe der Moleküle der Photosensibilisatoren darstellen, um eine mögliche Aufnahme oder Anlagerung zu gewährleisten. *Thomas Voit* untersuchte im Rahmen seiner Doktorarbeit die Lokalisation von TMPyP in *C. albicans*. TMPyP hat eine molare Masse von  $M = 682,2$  g/mol. Damit ist die molare Masse von TMPyP doppelt so hoch, wie die von SAPyR mit  $M = 272,3$  g/mol [58]. Trotz dieser größeren molaren Masse von TMPyP konnte von *Thomas Voit* eine Lokalisation in *C. albicans* und auch die photodynamische Inaktivierung gezeigt werden (persönliche Mitteilung). Daraus ist zu schließen, dass die molare Masse von SAPyR keinen Einfluss auf die Aufnahme und Inaktivierung von *C. albicans* hat. Ansonsten hätte SAPyR aufgrund seiner geringeren molaren Masse eine bessere Wirksamkeit zeigen müssen.

Es ist noch unklar, warum SAPyR, trotz seiner Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute von  $\Phi_{\Delta} = 0,99 \pm 0,05$  und dem Vorhandensein einer positiven Ladung und geringem Molekulargewicht, keine antimikrobielle Wirkung auf *C. albicans* besitzt.

#### 4.1.1.2 *Candida albicans* und SA-PN27

Da lichtaktivierter SAPyR keine antimikrobielle Wirkung auf *C. albicans* zeigte und die positiven Ladungen von PS eine wichtige Rolle für die Aufnahme der PS und die Inaktivierung von Mikroorganismen spielen, wurde der PS SA-PN27 in Betracht gezogen. SA-PN27 besitzt im Gegensatz zu SAPyR zwei positive Ladungen (SAPyR nur eine), wodurch man sich einen Erfolg in der Inaktivierung von *C. albicans* erhoffte. Die Versuchsbedingungen für SA-PN27 waren dieselben wie bei den Versuchen mit SAPyR mit einer Inkubationszeit von vier Stunden und der Resuspendierung von *C. albicans* in PBS.

Die Verwendung des Photosensibilisators SA-PN27 führte jedoch nicht zu einer photodynamischen Inaktivierung von *C. albicans*. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 28 im Anhang dargestellt. Somit scheint auch das Vorhandensein einer größeren Anzahl positiver Ladungen bei der chemischen Klasse der Perinaphthenonen keinen Einfluss auf die Bindung und die Inaktivierung von *C. albicans* zu haben.

#### 4.1.1.3 *Candida albicans* und SA-PN02a

Reddi et al. zeigten eine positive Auswirkung von meso-substituierten Alkylketten an kationischen Porphyrine auf die photodynamische Inaktivierung von Mikroorganismen [72]. Auf die Ergebnisse von Reddi et al. wird in 4.1.1.7 genauer eingegangen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde nun auch bei den Perinaphthenonen die Möglichkeit der Verwendung von Photosensibilisatoren mit länger werdenden Alkylketten in Betracht gezogen, um eine Inaktivierung von *C. albicans* zu erreichen. Dafür wurden die Photosensibilisatoren SA-PN03, SA-PN04 und SA-PN05 mit jeweils 4-x, 8-x und 12-x CH<sub>2</sub>-Reste ausgewählt (siehe Tabelle 1). Da der Photosensibilisator SA-PN02a aus chemischer Sicht das Grundgerüst für diese drei Photosensibilisatoren bildet, wird im folgenden Abschnitt der Arbeit zuerst auf die Versuche mit dem Photosensibilisator SA-PN02a und *C. albicans* eingegangen. Auch für die Versuche mit lichtaktiviertem SA-PN02a wurde vor Versuchsbeginn eine Verdünnungsreihe des Photosensibilisators hergestellt. Anschließend wurden je 100 µL des Photosensibilisators der jeweiligen Konzentration mit je 100 µL *C. albicans* sowohl in Millipore-Wasser als auch in PBS resuspendiert in eine 96-well-Platte pipettiert. Die Endkonzentrationen des Photosensibilisators betragen 0 µM / 6,25 µM / 12,5 µM / 25 µM / 50 µM / 100 µM und 500

$\mu\text{M}$ . Die Inkubationszeit lag bei vier Stunden und die Bestrahlung mit der BlueV UV802L wurde mit der Energiedosis von  $12 \text{ J/cm}^2$  durchgeführt. Es wurden zusätzlich bei den Konzentrationen  $0 \mu\text{M}$  /  $100 \mu\text{M}$  und  $500 \mu\text{M}$  Dunkelkontrollen angefertigt.

Bei einer weiteren vierstündigen Versuchsreihe mit SA-PN02a der Endkonzentrationen  $0 \mu\text{M}$  /  $50 \mu\text{M}$  /  $100 \mu\text{M}$  /  $500 \mu\text{M}$  und *C. albicans* in PBS resuspendiert, wurden die Proben für 10 Minuten mit der LED405nm Lampe bestrahlt, um eine Energiedosis von  $120 \text{ J/cm}^2$  zu erreichen. Bei jeder Endkonzentration des Photosensibilisators wurde eine Dunkelkontrolle mitgeführt.

Wie mit lichtaktiviertem SAPyR und SA-PN27 war es auch mit dem lichtaktiviertem Photosensibilisator SA-PN02a nicht möglich *C. albicans* nach einer Inkubationszeit von vier Stunden zu inaktivieren. Ebenso erbrachte die Erhöhung der Energiedosis um das zehnfache keinen Erfolg. Die Versuchsergebnisse sind graphisch im Anhang in Abbildung 29 dargestellt.

#### **4.1.1.4 *Candida albicans* und SA-PN03**

Nachdem es mit dem lichtaktiviertem Photosensibilisator SA-PN02a, der das Grundgerüst für SA-PN03 bildet, nicht möglich war, *C. albicans* zu inaktivieren, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit Versuche mit dem Photosensibilisator SA-PN03 durchgeführt. SA-PN03 besitzt, wie bereits erwähnt, am Stickstoffatom im Gegensatz zu SA-PN02a eine Alkylkette mit 4-x  $\text{CH}_2$ -Resten. Um die Auswirkung dieser Alkylkette auf die Inaktivierung von *C. albicans* zu untersuchen, wurde mit SA-PN03 dieselbe Versuchsreihe (IZ: 4 h, Bestrahlung mit der BlueV UV802L mit  $12,0 \text{ J/cm}^2$ ) wie mit SA-PN02a und *C. albicans* in Millipore-Wasser und PBS resuspendiert durchgeführt.

Auch mit dem lichtaktivierten Photosensibilisator SA-PN03 konnte keine Inaktivierung von *C. albicans* nachgewiesen werden. Die Graphen für diese Versuche befinden sich im Anhang (Abbildung 30).

#### 4.1.1.5 *Candida albicans* und SA-PN04

Die Ergebnisse der Versuche mit lichtaktiviertem SA-PN03 und *C. albicans* zeigten, dass eine Alkylkette mit 4-x CH<sub>2</sub>-Resten keinen Einfluss auf die Inaktivierung von *C. albicans* hat. Aus diesem Grund wurden Versuche mit dem Photosensibilisator SA-PN04, der eine Alkylkette mit 8-x CH<sub>2</sub>-Resten besitzt, durchgeführt. Durch die Verlängerung der Alkylkette sollte sich ein positiver Einfluss auf die photodynamische Inaktivierung von *C. albicans* zeigen. Mit dem Photosensibilisator SA-PN04 wurden wiederum dieselben Versuche wie mit SA-PN02a mit der BlueV UV802L unter denselben Versuchsbedingungen (*C. albicans* in Millipore-Wasser und PBS resuspendiert, IZ: 4 h, Endkonzentrationen des Photosensibilisators und Dunkelkontrollen) durchgeführt.

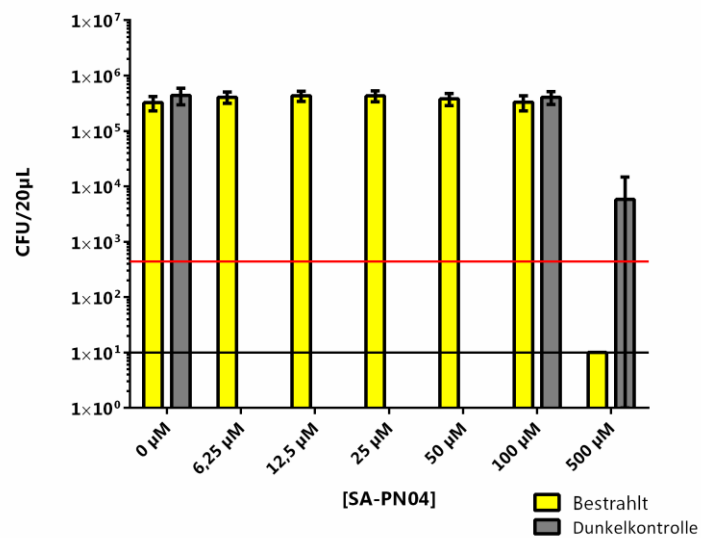
Bei diesen Versuchen konnte bei dem in Millipore-Wasser resuspendierten *C. albicans* bei einer Endkonzentration von 500 µM eine Reduktion der KBE von *C. albicans* mit dem lichtaktivierten Photosensibilisator SA-PN04 um ≥99,9% gezeigt werden. D. h. der Photosensibilisator SA-PN04 besitzt nach der Lichtaktivierung somit eine antimikrobielle Wirkung, da eine Reduktion um mindestens 3 log<sub>10</sub>-Stufen möglich war.

Im Gegensatz dazu erreichte der Photosensibilisator SA-PN04 nach der Lichtaktivierung bei einer Konzentration von 500 µM mit dem in PBS resuspendierten *C. albicans* keine Reduktion der KBE um 3 log<sub>10</sub>-Stufen.

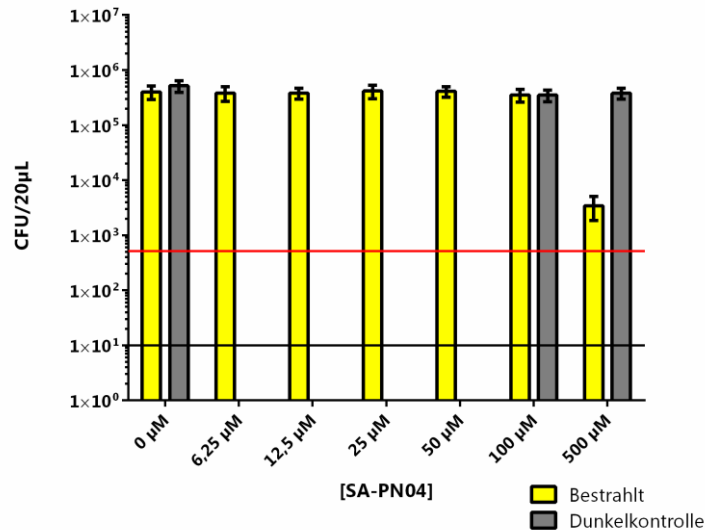
Auch in den Dunkelkontrollen, d. h. in den Proben, die nicht bestrahlt wurden, ist eine Reduktion der KBE bei dem in Millipore-Wasser resuspendierten *C. albicans* mit SA-PN04 bei einer Endkonzentration von 500 µM zu beobachten und bei dem in PBS nicht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 10 graphisch dargestellt.

In Abbildung 11 ist die effektive log<sub>10</sub>-Stufen-Reduktion der photodynamischen Effizienz von SA-PN04 auf *C. albicans* dargestellt. Dazu wird bei den Konzentrationen 0 µM, 100 µM und 500 µM das Verhältnis der log<sub>10</sub>-Stufen-Reduktion der bestrahlten Probe zu der dazugehörigen Dunkelkontrolle der jeweiligen Konzentration mit dem Konfidenzintervall dargestellt. Somit wird der reine photodynamische Effekt des Photosensibilisators SA-PN04 auf *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser und PBS dargestellt. Es zeigte sich, dass unabhängig vom Lösungsmittel mit SA-PN04 keine antimikrobielle Wirkung (≥99,9% Inaktivierungseffizienz) auf *C. albicans* durch einen reinen photodynamischen Effekt erzielt

werden konnte. Durch den photodynamischen Prozess konnte eine Reduktion  $\sim 2,8$  bzw.  $\sim 2,0$   $\log_{10}$ -Stufen erzielt werden (siehe Abbildung 11). Die antimikrobielle Wirkung tritt bei dem in Millipore-Wasser resuspendierten *C. albicans* nur im Zusammenhang mit der Dunkeltoxizität des Photosensibilisators bei der Konzentration von  $500 \mu\text{M}$  auf. Trotzdem scheint eine bessere Inaktivierung von *C. albicans* in Millipore-Wasser mit SA-PN04 möglich zu sein, als in einem Millipore-Wasser/PBS-Gemisch.

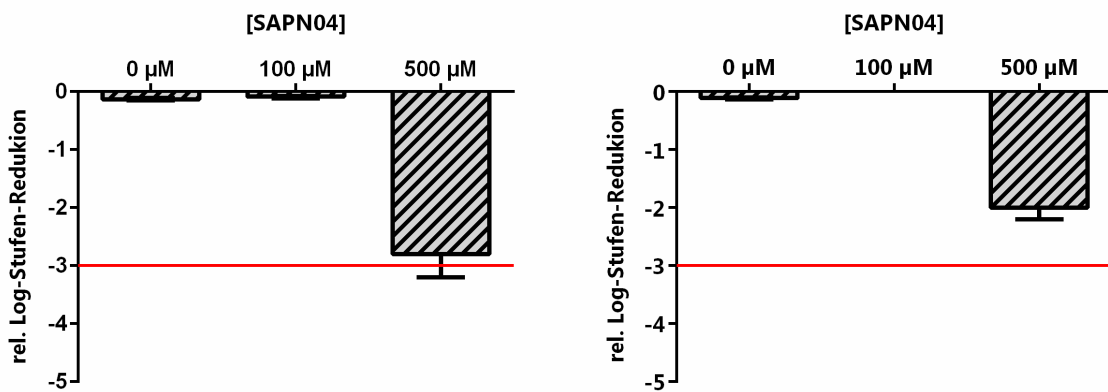


(a)



(b)

Abbildung 10: Dargestellt ist die Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser (a) und PBS (b) mit SA-PN04 von 4 h und einer anschließenden Bestrahlung mit der BlueV UV802L für 10 min mit einer Energiedosis von 12 J/cm<sup>2</sup> (gelb) und die dazugehörigen Dunkelkontrollen (grau). Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängig durchgeführten Experimenten ± Konfidenzintervall. (\_\_\_\_ Detektionslimit, \_\_\_\_\_ 3 log<sub>10</sub>-Reduktion)



(a)

(b)

Abbildung 11: Dargestellt ist die effektive log<sub>10</sub>-Stufen-Reduktion des photodynamischen Effektes von SA-PN04 auf *C. albicans*. Dazu wurde das Verhältnis der log<sub>10</sub>-Stufen-Reduktion der bestrahlten Proben zu den dazugehörigen Dunkelkontrollen der jeweiligen Konzentrationen 0 µM, 100 µM und 500 µM bei der Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser (a) und PBS (b) mit SA-PN04 für 4 h und einer Energiedosis von 12 J/cm<sup>2</sup> mit dem Konfidenzintervall dargestellt.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde auch mit dem Photosensibilisator SA-PN04 eine Reihe von Waschversuchen durchgeführt, um eine Steigerung des photodynamischen Effektes von SA-PN04 auf *C. albicans* zu erreichen. Dazu wurden dieselben Versuchsbedingungen wie mit SAPyR gewählt und auch dieselbe Versuchsdurchführung unternommen, wie in **4.1.1.1** beschrieben. Der Unterschied zu den mit SAPyR durchgeführten Versuchen war, dass die Endkonzentrationen des Photosensibilisators SA-PN04 0  $\mu\text{M}$  / 50  $\mu\text{M}$  / 100  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  betragen.

Durch das zweimalige Waschen der mit SA-PN04 inkubierten Proben konnte eine Reduktion der KBE von *C. albicans* resuspendiert in PBS mit Hilfe von lichtaktiviertem SA-PN04 um  $\geq 3$   $\log_{10}$ -Stufen bei einer Endkonzentration von 500  $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden. In keiner der Dunkelkontrollen fand eine Reduktion der KBE  $>1$   $\log_{10}$ -Stufe von *C. albicans* statt. Durch das Waschen der Proben konnte somit eine ähnliche photodynamische Wirkung von lichtaktiviertem SA-PN04 auf *C. albicans* resuspendiert in PBS erreicht werden, wie auf in Millipore-Wasser resuspendierten *C. albicans* ohne Waschen. Im Gegensatz dazu war es nicht möglich, ohne das Waschen der Proben den in PBS resuspendierten *C. albicans* mit Hilfe von lichtaktiviertem SA-PN04 bei einer Endkonzentration des Photosensibilisators von 500  $\mu\text{M}$  um  $\geq 3$   $\log_{10}$ -Stufen zu inaktivieren. Die Ergebnisse der Waschversuche sind in Abbildung 12 graphisch dargestellt.

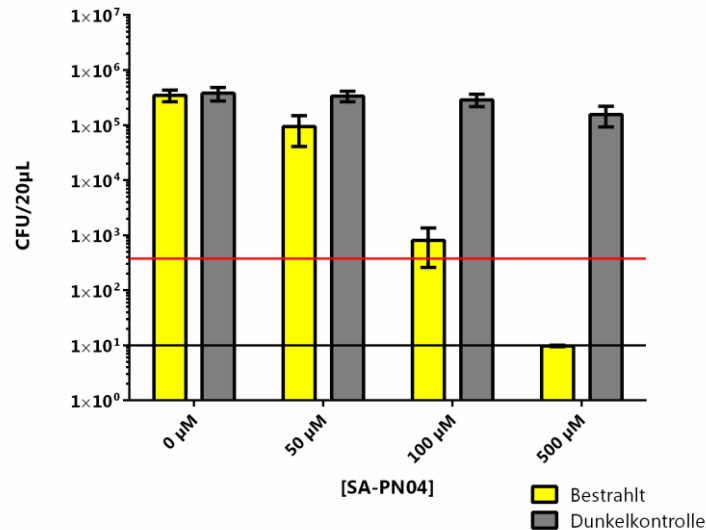


Abbildung 12: Gezeigt wird der Mittelwert von drei unabhängig durchgeführten Experimenten  $\pm$  Konfidenzintervall (\_\_\_\_ Detektionslimit, \_\_\_\_ 3  $\log_{10}$ -Reduktion). Dargestellt ist die Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in PBS mit SA-PN04 für 4 h mit zwei anschließenden Waschvorgängen mit PBS und der Bestrahlungszeit von 10 min mit einer Energiedosis von 12 J/cm<sup>2</sup> (gelb) und die Dunkelkontrollen (grau).

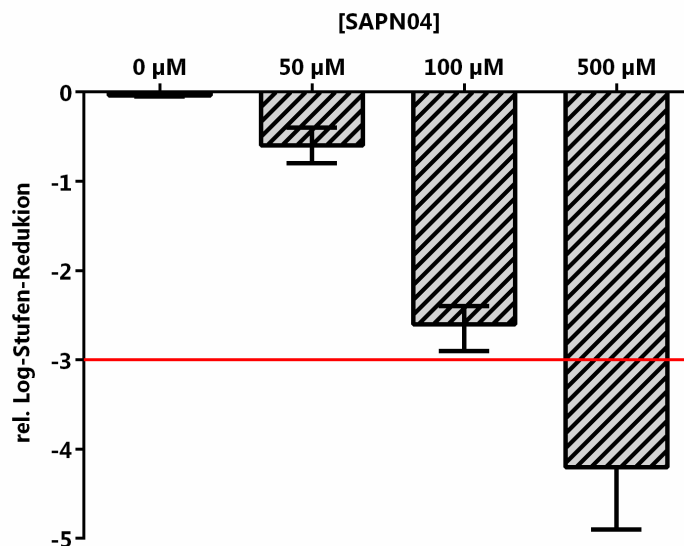


Abbildung 13: Dargestellt ist die effektive  $\log_{10}$ -Stufen-Reduktion des photodynamischen Effektes von SA-PN04 auf *C. albicans* nach dem Waschen der Proben. Dazu wurde das Verhältnis der  $\log_{10}$ -Stufen-Reduktion der bestrahlten Proben zu den dazugehörigen Dunkelkontrollen bei den jeweiligen Konzentrationen 0 µM, 50 µM, 100 µM und 500 µM bei einer Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in PBS mit SA-PN04 für 4 h und einer Energiedosis von 12 J/cm<sup>2</sup> mit dem Konfidenzintervall dargestellt.

In Abbildung 13 ist ebenfalls die effektive  $\log_{10}$ -Stufen-Reduktion der photodynamischen Effizienz von SA-PN04 auf *C. albicans* nach dem Waschen der Proben dargestellt. Dabei ist zu beobachten, dass *C. albicans* bei den Waschversuchen ausschließlich durch den photodynamischen Prozess inaktiviert wird, der durch die Lichtaktivierung des Photosensibilisators SA-PN04 ausgelöst wird. Die Dunkeltoxizität des Photosensibilisators bewirkt bei den Waschversuchen keine Reduktion ( $>1 \log_{10}$ -Stufe) von *C. albicans*.

Somit scheint neben der Verlängerung der Alkylkette auch das Waschen der Proben einen wichtigen Einfluss auf die photodynamische Inaktivierung von *C. albicans* zu haben.

#### **4.1.1.6 *Candida albicans* und SA-PN05**

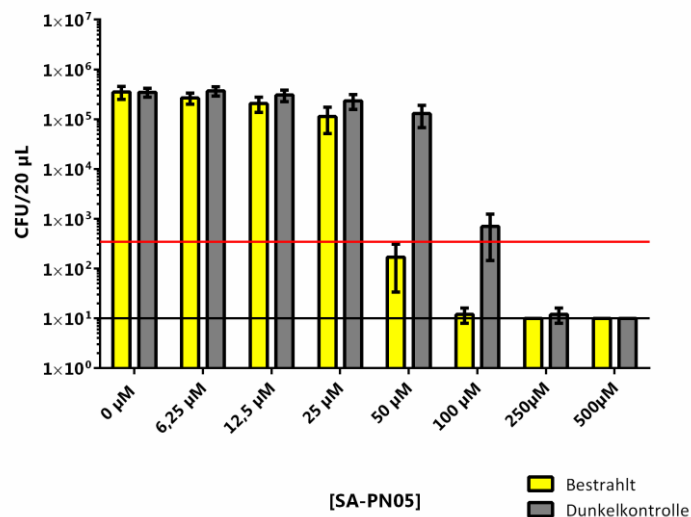
Nachdem es mit SA-PN04 nach der Lichtaktivierung möglich war, *C. albicans* zu inaktivieren und die Alkylkette ein wichtiger Aspekt für diese Wirksamkeit zu sein scheint, wird im Folgenden auf die Versuche mit dem Photosensibilisator SA-PN05 eingegangen.

Der Photosensibilisator SA-PN05 besitzt im Gegensatz zu SA-PN04 eine Alkylkette mit 12-x  $\text{CH}_2$ -Resten. Somit ist die Alkylkette um weitere vier C-Atome länger. Es soll nun überprüft werden, welchen Einfluss dies auf die photodynamische Inaktivierung von *C. albicans* hat. Die Versuchsdurchführungen erfolgten wie für den Photosensibilisator SA-PN04 in Punkt 4.1.1.5 beschrieben. Der einzige Unterschied bei den Versuchen mit SA-PN05 zu SA-PN04 war, dass bei den beiden Versuchsreihen mit *C. albicans* in PBS und in Millipore-Wasser resuspendiert ohne Waschen eine zusätzliche Endkonzentration des Photosensibilisators von 250  $\mu\text{M}$  verwendet wurde.

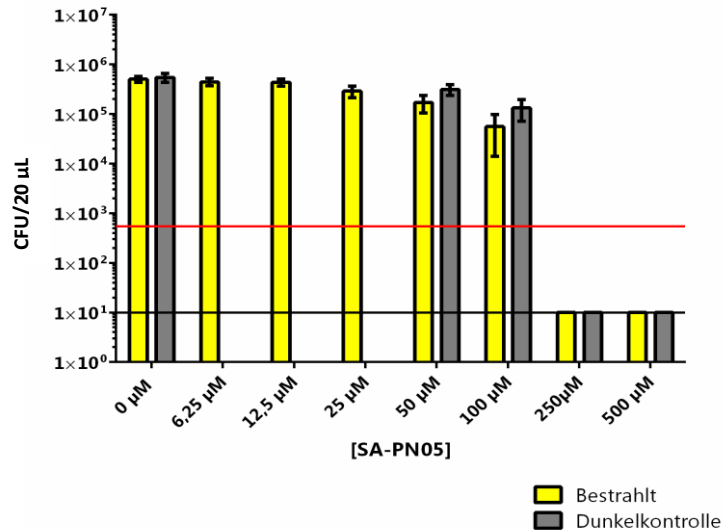
Wie Abbildung 14 zeigt, wird mit dem lichtaktiviertem Photosensibilisator SA-PN05 eine Reduktion der KBE von *C. albicans* um  $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen und somit eine antimikrobielle Wirkung bei einer Endkonzentration von 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  unabhängig vom Lösungsmittel erreicht. Bei dem in Millipore-Wasser resuspendierten *C. albicans* wird zusätzlich mit den Photosensibilisatorendkonzentrationen 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  eine antimikrobielle Wirkung erreicht, wobei dies bei dem in PBS resuspendierten *C. albicans* nicht der Fall ist.

Man konnte aber auch bei diesen Versuchen erkennen, dass mit zunehmender Länge der Kohlenstoffseitenkette nicht nur die Wirksamkeit des Photosensibilisators durch Belichtung

zunahm, sondern auch die Dunkeltoxizität der Photosensibilisatoren. Die Dunkeltoxizität des Photosensibilisators SA-PN05 bewirkte in diesen beiden Versuchsreihen unabhängig vom Lösungsmittel eine Inaktivierung von *C. albicans* um  $\geq 99,9\%$  bei den Endkonzentrationen von 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ . Bei der Dunkelkontrolle mit der Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  war bei dem in Millipore-Wasser resuspendierten *C. albicans* eine erhöhte Inaktivierung von 2  $\log_{10}$ -Stufen im Gegensatz zu der Dunkelkontrolle des in PBS resuspendierten *C. albicans* zu erkennen. Wie schon bei den Versuchen mit dem Photosensibilisator SA-PN04 gezeigt wurde, weist der lichtaktivierte Photosensibilisator SA-PN05 auf den in Millipore-Wasser gelösten *C. albicans* eine bessere Wirksamkeit auf als auf den in PBS gelösten *C. albicans*.



(a)



(b)

Abbildung 14: Dargestellt ist die Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser (a) und PBS (b) mit SA-PN05 von 4 h und einer anschließenden Bestrahlung mit der BlueV UV802L für 10 min mit einer Energiedosis von 12 J/cm<sup>2</sup> (gelb) und die dazugehörigen Dunkelkontrollen (grau). Dargestellt ist der Mittelwert von drei (a) und fünf (b) unabhängig durchgeführten Experimenten ± Konfidenzintervall. (\_\_\_\_ Detektionslimit, \_\_\_\_\_ 3 log<sub>10</sub>-Reduktion)

Für die Inaktivierung des in Millipore-Wasser resuspendierten *C. albicans* mit lichtaktiviertem SA-PN05 ist in Abbildung 15 die effektive log<sub>10</sub>-Stufen-Reduktion des photodynamischen Effektes dargestellt. Hier zeigt sich, dass mit dem Photosensibilisator SA-PN05 bis zu einer Endkonzentration von 50 µM die photodynamische Effizienz zunimmt, diese aber ab der Konzentration von 100 µM wieder abnimmt und bei 500 µM nicht mehr vorhanden ist. Die Abnahme der photodynamischen Effizienz ist auf die Zunahme der Dunkeltoxizität des Photosensibilisators ab der Konzentration von 100 µM zurückzuführen. Der größte photodynamische Effekt wird somit bei einer Konzentration von 50 µM erreicht. Die antimikrobielle Wirkung des Photosensibilisators SA-PN05 von ≥3 log<sub>10</sub>-Stufen wird aber auch bei dieser Konzentration nur zusammen mit der Dunkeltoxizität des Photosensibilisators erreicht.

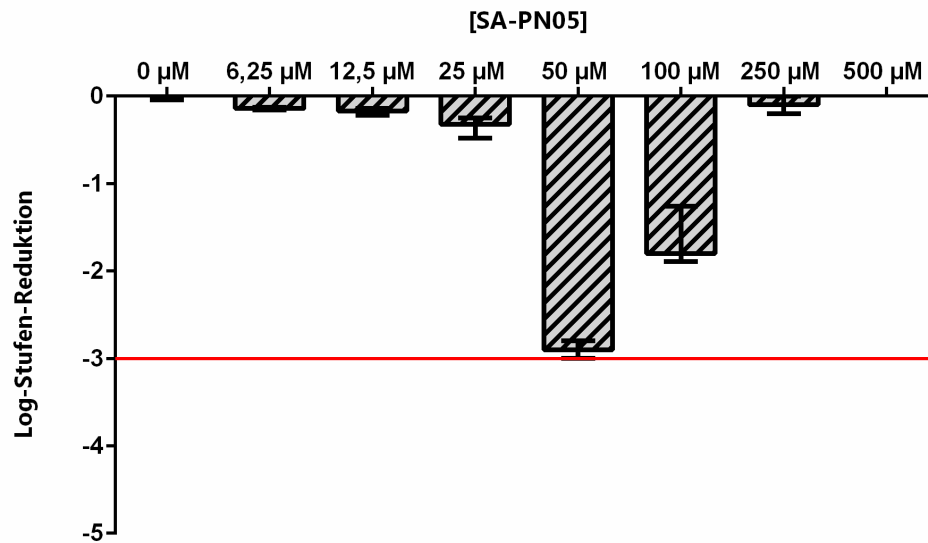


Abbildung 15: Dargestellt ist die effektive  $\log_{10}$ -Stufen-Reduktion des photodynamischen Effektes von SA-PN05 auf *C. albicans*. Dazu wurde das Verhältnis der  $\log_{10}$ -Stufen-Reduktion der bestrahlten Proben zu den dazugehörigen Dunkelkontrollen bei den jeweiligen Konzentrationen 0  $\mu\text{M}$ , 6,25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  mit dem Konfidenzintervall dargestellt. Dabei betrug die Inkubationszeit von *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser mit SA-PN05 4 h und die Bestrahlungszeit mit einer Energiedosis von 12  $\text{J}/\text{cm}^2$  10 min.

Auch mit dem Photosensibilisator SA-PN05 wurden die Waschversuche, welche bereits mit SAPyR und SA-PN04 angewandt wurden, durchgeführt, um eine Steigerung des photodynamischen Effektes von SA-PN05 auf *C. albicans* zu erzielen. Als Endkonzentrationen des Photosensibilisators wurden hier 0  $\mu\text{M}$  / 6,25  $\mu\text{M}$  / 12,5  $\mu\text{M}$  / 25  $\mu\text{M}$  / 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  gewählt. *C. albicans* wurde in PBS resuspendiert und die Versuchsbedingungen waren dieselben, wie mit den Photosensibilisatoren SAPyR und SA-PN04.

Abbildung 16 zeigt, dass bei den Waschversuchen eine Reduktion der KBE von *C. albicans* um  $\geq 3$   $\log_{10}$ -Stufen und somit eine antimikrobielle Wirkung des lichtaktivierten Photosensibilisators SA-PN05 ab einer Endkonzentration von 6,25  $\mu\text{M}$  möglich ist. Ab der Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  findet eine vollständige Abtötung des *C. albicans* bis zur Detektionsgrenze statt. Auch bei diesen Versuchen zeigte sich die Dunkeltoxizität des Photosensibilisators SA-PN05 ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ . Im Vergleich zu den Versuchen mit SA-PN05 und *C. albicans* resuspendiert in PBS ohne Waschen der Proben ist hier eine stärkere Dunkeltoxizität (um 3  $\log_{10}$ -Stufen) bei der Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$

zu beobachten. Dies kann man einerseits darauf zurückführen, dass bei den Waschvorgängen durch das Zentrifugieren und das anschließende Abnehmen des Überstandes ein gewisser Anteil an *C. albicans* verloren gehen kann, oder andererseits, dass bei diesem Versuch *C. albicans* anfälliger auf die Dunkeltoxizität des Photosensibilisators reagierte. Es zeigt sich allerdings eine Steigerung der photodynamischen Wirksamkeit des Photosensibilisators SA-PN05 nach dem Waschen der Proben auf *C. albicans*, wie auch schon mit dem Photosensibilisator SA-PN04.

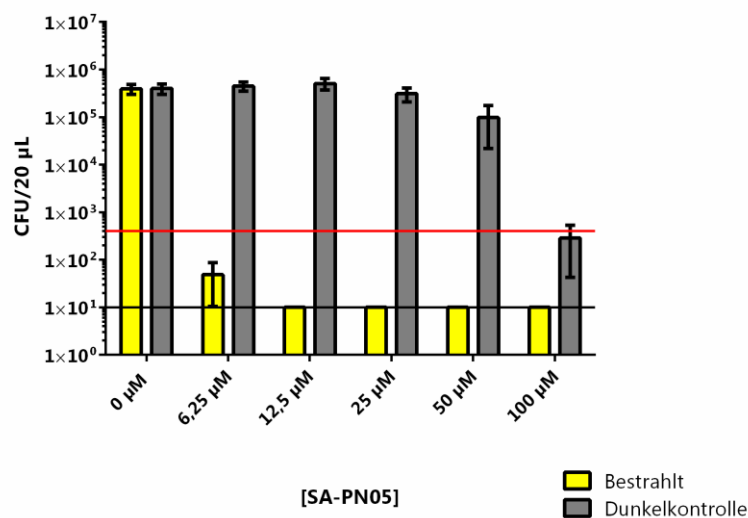


Abbildung 16: Gezeigt wird der Mittelwert von drei unabhängig durchgeführten Experimenten  $\pm$  Konfidenzintervall (\_\_\_\_ Detektionslimit, \_\_\_\_\_ 3 log<sub>10</sub>-Reduktion). Dargestellt ist die Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in PBS mit SA-PN05 für 4 h mit anschließenden zwei Waschvorgängen mit PBS und der Bestrahlungszeit von 10 min mit einer Energiedosis von 12 J/cm<sup>2</sup> (gelb) und die Dunkelkontrollen (grau).

In Abbildung 17 ist die effektive log<sub>10</sub>-Stufen-Reduktion des photodynamischen Effektes des Photosensibilisators SA-PN05 auf *C. albicans* resuspendiert in PBS nach dem Waschen dargestellt. Bei den Endkonzentrationen des Photosensibilisators ab 6,25 µM bis 50 µM beträgt der photodynamische Effekt von SA-PN05 auf *C. albicans*  $\geq 99,9\%$  und erreicht somit eine antimikrobielle Wirkung. Bei der Konzentration des Photosensibilisators von 100 µM nimmt der photodynamische Effekt wieder ab und liegt bei  $< 99,9\%$ , was wiederum auf die

Zunahme der Dunkeltoxizität des Photosensibilisators ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zurückzuführen ist. Somit zeigt Abbildung 17, dass durch das Waschen der Proben eine Zunahme des photodynamischen Effektes mit dem lichtaktivierten Photosensibilisator SA-PN05 auf *C. albicans* auch bei niedrigen Konzentrationen, d. h. ab 6,25  $\mu\text{M}$ , zu erzielen ist.

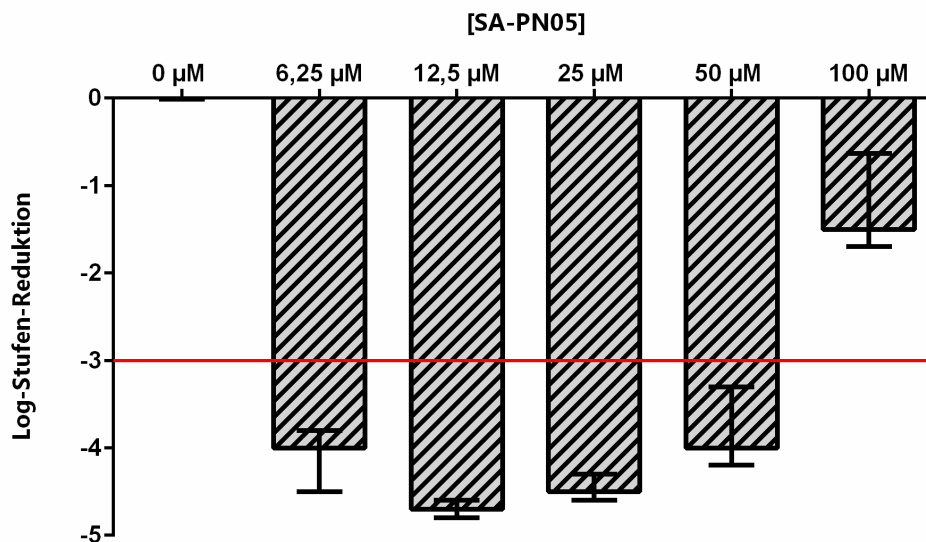


Abbildung 17: Dargestellt ist die effektive  $\log_{10}$ -Stufen-Reduktion des photodynamischen Effektes von SA-PN05 auf *C. albicans* nach dem Waschen der Proben. Dazu wurde das Verhältnis der  $\log_{10}$ -Stufen-Reduktion der bestrahlten Proben zu den dazugehörigen Dunkelkontrollen bei den jeweiligen Konzentrationen 0  $\mu\text{M}$ , 6,25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  mit dem Konfidenzintervall dargestellt. Die Inkubationszeit von *C. albicans* resuspendiert in PBS mit SA-PN05 betrug 4 h, anschließend wurden die Proben gewaschen und mit einer Energiedosis von 12  $\text{J}/\text{cm}^2$  für 10 min bestrahlt.

Um eine Erhöhung der photodynamischen Reduktion von *C. albicans* mit SA-PN05 ohne das Waschen der Proben zu erzielen, wurde bei einer weiteren Versuchsreihe eine Veränderung an den Versuchsbedingungen durchgeführt. Wie auch mit dem Photosensibilisator SA-PN02a wurde für die Bestrahlung des in PBS resuspendierten *C. albicans* die LED 405nm-Lampe verwendet und die Energiedosis auf 120  $\text{J}/\text{cm}^2$  erhöht. Ansonsten wurden die Versuche wie in **4.1.1.3** beschrieben, durchgeführt.

Durch die Erhöhung der Energiedosis wurde erreicht, dass die photodynamische Inaktivierung von *C. albicans* mit SA-PN05 bereits bei einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{M}$   $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen

betrug. Somit konnte durch die Verzehnfachung der Energiedosis eine antimikrobielle Wirkung bei einer Endkonzentration des Photosensibilisators von 50  $\mu\text{M}$  erzielt werden. Dies war auch ohne das Waschen der Proben und bei der Verwendung eines Millipore-Wasser/PBS-Gemisch als Lösungsmittel möglich. Auch in diesen Versuchen zeigte sich, dass die Dunkeltoxizität des Photosensibilisators SA-PN05 bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  auftritt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 graphisch dargestellt.

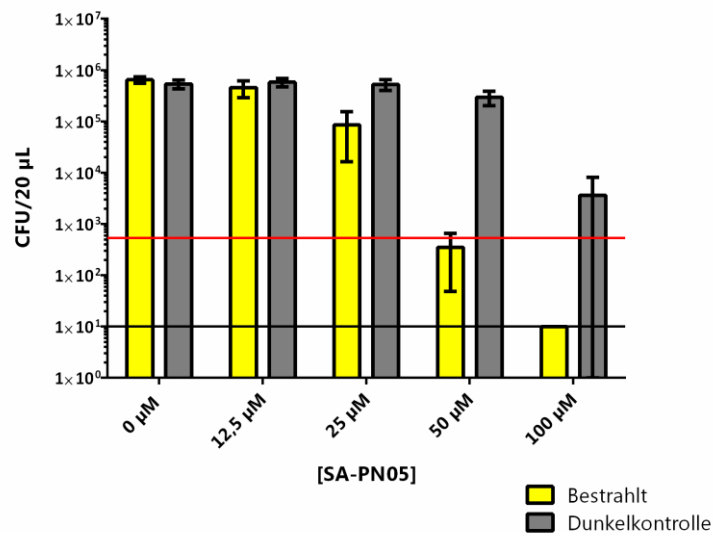


Abbildung 18: Dargestellt ist die Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in PBS mit SA-PN05 für 4 h mit verschiedenen Konzentrationen und anschließender Bestrahlung mit 120 J/cm<sup>2</sup> mit der LED405nm-Lampe (gelb) und die dazugehörigen Dunkelkontrollen (grau). Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängig durchgeführten Experimenten  $\pm$  Konfidenzintervall (\_\_\_\_ Detektionslimit, \_\_\_\_\_ 3 log<sub>10</sub>-Reduktion).

Für die Versuche mit der LED405nm-Lampe ist ebenfalls in Abbildung 19 die photodynamische Effektivität des Photosensibilisators SA-PN05 dargestellt. Auch hier kann man beobachten, dass die photodynamische Effektivität von SA-PN05 bis zur Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  zunimmt und bei 100  $\mu\text{M}$  wieder abnimmt. Diese Abnahme ist auf die Dunkeltoxizität des Photosensibilisators bei 100  $\mu\text{M}$  zurückzuführen.

Somit wird die antimikrobielle Wirkung des Photosensibilisators bei den Endkonzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  in Summe zusammen durch den photodynamischen Effekt und durch die Dunkeltoxizität des Photosensibilisators erzielt.

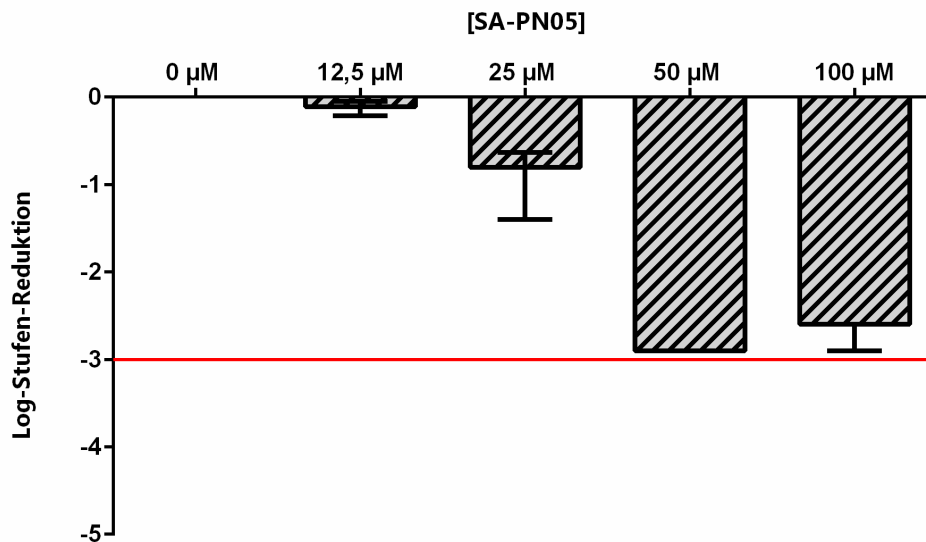


Abbildung 19: Dargestellt ist die effektive  $\log_{10}$ -Stufen-Reduktion des photodynamischen Effektes von SA-PN05 auf *C. albicans*. Dazu wurde das Verhältnis der  $\log_{10}$ -Stufen-Reduktion der bestrahlten Proben zu den dazugehörigen Dunkelkontrollen bei den jeweiligen Konzentrationen 0  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  mit dem Konfidenzintervall dargestellt. Die Inkubationszeit von *C. albicans* resuspendiert in PBS mit SA-PN05 betrug 4 h und die Bestrahlungszeit mit der LED405nm-Lampe mit einer Energiedosis von 120  $\text{J}/\text{cm}^2$  10 min.

Ausschlaggebend für die Inaktivierung von *C. albicans* mit dem Photosensibilisator SA-PN05 ist somit einerseits eine genügend hohe Energiedosis und andererseits das Waschen der Proben. Das daraus resultierende Ergebnis ist, dass genügend Photonen, die aus der Lichtquelle emittiert werden, den anhaftenden bzw. aufgenommenen Photosensibilisator erreichen. Zusätzlich ist bei den Versuchen mit SA-PN05 zu beobachten, dass die Verlängerung der Alkylkette einen positiven Einfluss auf die photodynamische Inaktivierung von *C. albicans* hat, aber auch einen Einfluss auf die Zunahme der Dunkeltoxizität des Photosensibilisators.

Da die Dunkeltoxizität des Photosensibilisators SA-PN05 auf *C. albicans* unabhängig vom Lösungsmittel auftrat, wird in folgenden Versuchen dieser Arbeit die Dunkeltoxizität nochmals

bei unterschiedlichen Endkonzentrationen in beiden Lösungsmitteln (Millipore-Wasser und PBS) untersucht. Dazu wurden Proben mit je 100  $\mu\text{L}$  *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser und PBS und je 100  $\mu\text{L}$  vom Photosensibilisator SA-PN05 mit den Endkonzentrationen von 0  $\mu\text{M}$  / 100  $\mu\text{M}$  / 150  $\mu\text{M}$  / 200  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  mit einer Inkubationszeit von vier Stunden ohne anschließender Bestrahlung angesetzt. Nach der vierstündigen Inkubationszeit erfolgte die Bestimmung der KBE, entsprechend der Methode nach *Miles, Misra und Irvin*.

Die in Abbildung 20 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der Photosensibilisator SA-PN05 eine beginnende Toxizität zwischen 100  $\mu\text{M}$  und 150  $\mu\text{M}$  ohne Bestrahlung aufweist. Die Ergebnisse von dem in Millipore-Wasser und in PBS resuspendierten *C. albicans* unterscheiden sich in ihrer  $\log_{10}$ -Stufen-Reduktion im Bereich von  $\pm 1 \log_{10}$ -Stufe. Dieser Unterschied liegt somit im Rahmen der Genauigkeit, welche bei der Bestimmung der KBE nach der *Miles, Misra und Irvin* Methode erreicht werden kann. Der Photosensibilisator SA-PN05 erreicht bei beiden *C. albicans*-Lösungen bei einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  eine antimikrobielle Wirkung und zugleich die Detektionsgrenze.

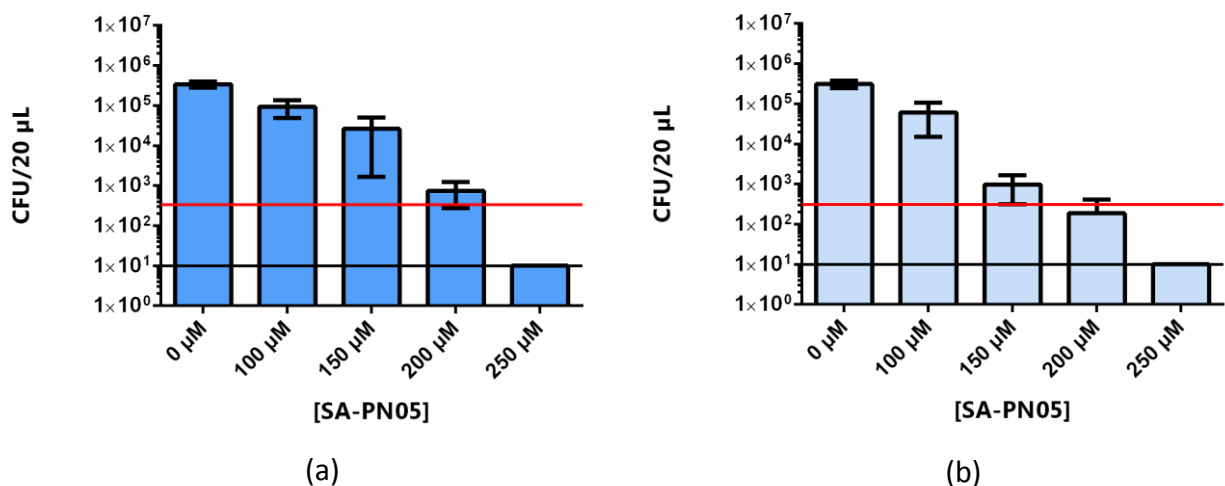


Abbildung 20: Dargestellt ist die Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser (a) und PBS (b) für 4 h mit verschiedenen Photosensibilisatorkonzentrationen von SA-PN05 und anschließendem Verdünnen und Ausplattieren der Proben. Die Abbildung zeigt den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Konfidenzintervall.

Die in den Abschnitten 4.1.1.1 bis 4.1.1.6 dargestellten Ergebnisse zur photodynamischen Inaktivierung von *C. albicans* unter Verwendung der verschiedenen PN-Derivate sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Tabelle 6 zeigt die benötigten PS-Konzentrationen, um in Abhängigkeit der applizierten Lichtdosis und Inkubationszeiten, eine Reduktion der KBE  $\geq 99,9\%$  zu erzielen.

Photo-sensibilisator	IZ	Lösungsmittel	Lampe	Bestrahlungsparameter	Konzentrationen	Reduktion $\geq 99,9\%$
SAPyR	15 min	PBS	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 24 J/cm <sup>2</sup> t = 20 min	0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 $\mu$ M	Nein
	60 min	PBS	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 12 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 $\mu$ M	Nein
	60 min	mH <sub>2</sub> O	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 12 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 $\mu$ M	Nein
	240 min	PBS	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 12 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 500 $\mu$ M	Nein
	240 min	mH <sub>2</sub> O	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 12 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 500 $\mu$ M	Nein
	240 min	PBS 2x waschen	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 12 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 500 $\mu$ M	Nein
SA-PN27	240 min	PBS	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 12 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 500 $\mu$ M	Nein
SA-PN02a	240 min	PBS	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 12 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 500 $\mu$ M	Nein
	240 min	mH <sub>2</sub> O	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 12 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 500 $\mu$ M	Nein
	240 min	PBS	LED405nm	200 mW/cm <sup>2</sup> 120 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 50, 100, 500 $\mu$ M	Nein

SA-PN03	240 min	PBS	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 12 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 500 µM	Nein
	240 min	mH <sub>2</sub> O	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 12 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 500 µM	Nein
SA-PN04	240 min	PBS	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 12 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 500 µM	Nein
	240 min	mH <sub>2</sub> O	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 12 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 500 µM	Ja (500 µM)
	240 min	PBS 2x waschen	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 12 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 50, 100, 500 µM	Ja (500 µM)
SA-PN05	240 min	PBS	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 12 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 500 µM	Ja (≥250 µM)
	240 min	mH <sub>2</sub> O	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 12 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 500 µM	Ja (≥50µM)
	240 min	PBS	LED405nm	200 mW/cm <sup>2</sup> 120 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 12,5, 25, 50, 100 µM	Ja (≥50 µM)
	240 min	PBS 2x waschen	BlueV	20 mW/cm <sup>2</sup> 12 J/cm <sup>2</sup> t = 10 min	0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 µM	Ja (≥6,25 µM)

Tabelle 6: Übersicht über die durchgeführten Versuche mit den Photosensibilisatoren SAPyR, SA-PN27, SA-PN02a, SA-PN03, SA-PN04 und SA-PN05 bei den verschiedenen Versuchsparametern. Dargestellt ist auch ob bzw. bei welcher Endkonzentration des Photosensibilisators eine Reduktion von *C. albicans* um ≥99,9% möglich war.

#### 4.1.1.7 Diskussion der Ergebnisse von SA-PN02a, SA-PN03, SA-PN04 und SA-PN05

Die Photosensibilisatoren SA-PN03, SA-PN04 und SA-PN05 sind Derivate des Photosensibilisators SAPyR. Sie besitzen das Grundgerüst des Photosensibilisators SA-PN02a mit jeweils einer länger werdenden Alkylkette von 4-x, 8-x und 12-x CH<sub>2</sub>-Resten. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass sich durch eine Verlängerung der Alkylkette einerseits die antimikrobielle photodynamische Wirksamkeit der Photosensibilisatoren auf *C. albicans* verbesserte und andererseits aber auch die Dunkeltoxizität der Photosensibilisatoren zunahm. Dies lässt sich bereits in den Versuchen mit den Photosensibilisatoren SA-PN04 und SA-PN05 mit einer Inkubationszeit von vier Stunden ohne Waschen und einer Bestrahlung mit einer Energiedosis von 12,0 J/cm<sup>2</sup> beobachten, unabhängig in welchem Lösungsmittel *C. albicans* resuspendiert wurde. Dieselben Versuchsbedingungen wurden auch bei den Experimenten mit SAPyR verwendet, wobei hier keine photodynamische Inaktivierung von *C. albicans* möglich war (<1 log<sub>10</sub>-Stufen-Reduktion der KBE).

Der Photosensibilisator SA-PN05 besitzt ein  $\Phi_{\Delta} = 1,06$  und reagiert somit ausschließlich nach dem Typ-II-Mechanismus der aPDT, sodass *C. albicans* durch die Entstehung von Singulett-Sauerstoff inaktiviert werden konnte. Dies haben auch *Cormick et al.* mit dem Photosensibilisator TMPyP bestätigt [71]. Somit scheint das  $\Phi_{\Delta}$  von SAPyR – wie in 4.1.1.1 kontrovers diskutiert wurde - nicht der Grund für die fehlende photodynamische Wirksamkeit von SAPyR auf *C. albicans* zu sein. Die Photosensibilisatoren SA-PN04 und SA-PN05 besitzen ebenso wie SAPyR nur eine positive Ladung. Dadurch kann die Anzahl der positiven Ladungen - wie in 4.1.1.1 im Vergleich zu TMPyP (vier positive Ladungen) vermutet - keinen Einfluss auf die Inaktivierung von *C. albicans* haben. Ein Grund für die Inaktivierung von *C. albicans* scheint also die Alkylkette zu sein. *Reddi et al.* zeigten den Einfluss von länger werdenden Alkylketten als Seitenketten an TMPyP auf die Inaktivierung von *S. aureus* und *E. coli* [72]. Die Mikroorganismen wurden mit TMPyP und den Derivaten von TMPyP, die als Reste Alkylketten mit 6-x, 10-x, 14-x, 18-x und 22-x CH<sub>2</sub>-Reste trugen, bei Konzentrationen von 0,4 - 8,3  $\mu\text{M}$  für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben fünf Minuten mit weißem Licht mit einer Flächenleistungsdichte von 150 mW/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Dabei zeigte sich, dass bei gleicher Photosensibilisatorkonzentration (0,8  $\mu\text{M}$ ) und länger werdender Alkylkette die Effektivität der Inaktivierung zunahm, wobei die größte photodynamische Inaktivierung auf *E. coli* bei einer Alkylkettenlänge von 10-x (96% Wachstumshemmung) beziehungsweise 14-x CH<sub>2</sub>-

Resten (100% Wachstumshemmung) erzielt wurde und die Inaktivierung mit 18-x beziehungsweise 22-x CH<sub>2</sub>-Resten wieder abnahm (58% bzw. 3% Wachstumshemmung). Somit war es durch die Verlängerung der Alkylketten an den Derivaten von TMPyP möglich, eine Reduktion der KBE durch den photodynamischen Effekt bei viel geringeren Konzentrationen (0,4 und 0,8 µM) wie mit TMPyP (8,3 µM) zu erzielen.

Gleichzeitig stellte diese Arbeitsgruppe aber auch fest, dass mit zunehmender Kettenlänge bis zu 18-x CH<sub>2</sub>-Resten bei der Inaktivierung von *S. aureus* und bis zu 14-x CH<sub>2</sub>-Resten bei der Inaktivierung von *E. coli* auch die Dunkeltoxizität der Photosensibilisatoren zunahm. Dazu wurde *S. aureus* und *E. coli* für fünf Minuten mit TMPyP und dessen Derivaten bei einer Konzentration von 0,8 µM und 8,3 µM inkubiert und anschließend die Wachstumshemmung ohne Bestrahlung untersucht [72]. Auch in dieser Arbeit zeigte sich bei den Experimenten das Problem mit einer auftretenden Dunkeltoxizität der Photosensibilisatoren SA-PN04 und SA-PN05 bei höheren Konzentrationen mit zunehmender Länge der Alkylketten. Mit dem Photosensibilisator SA-PN04 konnte eine antimikrobielle Wirkung auf den in Millipore-Wasser resuspendierten *C. albicans* bei 500 µM nachgewiesen werden. Der Anteil der Inaktivierung von 2 log<sub>10</sub>-Stufen war dabei aber auf die Dunkeltoxizität des Photosensibilisators SA-PN04 zurückzuführen. Auch beim Photosensibilisator SA-PN05 war die Inaktivierung von *C. albicans*, unabhängig in welchem Lösungsmittel dieser resuspendiert war, ab einer Konzentration von 250 µM ausschließlich der Dunkeltoxizität des Photosensibilisators geschuldet. So konnte mit Hilfe der Darstellung der photodynamischen Effektivität der Photosensibilisatoren SA-PN04 und SA-PN05 die Zunahme der Dunkeltoxizität bei höheren Konzentrationen durch die Kettenverlängerung gezeigt werden.

Das Phänomen der Dunkeltoxizität durch die Synthese von Alkylketten an Photosensibilisatoren zeigten auch *Gollmer et al.* bei Verwendung verschiedener Methyleneblau-Derivaten [73]. In dieser Studie wurde eine 5 log<sub>10</sub>-Stufen-Reduktion allein durch die Dunkeltoxizität nachgewiesen (*E. coli*, 100 µM Photosensibilisatorkonzentration, 10 bzw. 60 min Inkubationszeit).

Für *C. albicans* ist bekannt, dass Moleküle mit langen Alkylketten und einer positiven Ladung zu einer Destabilisierung der Zellmembran führen können. Dies geschieht durch Lokalisation der Moleküle in der Zellmembran und der daraus folgenden Polarisierung von dieser. Somit

kommt es zu einer Umkehr der Zelloberflächenladung von negativ zu positiv und zu einer Veränderung der Zelloberfläche. *Vieira et al.* postulierten diesen Mechanismus mit dem Molekül Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und *C. albicans* [74]. Das CTAB ist ein Molekül mit einer Alkylkette von 16-x CH<sub>2</sub>-Resten und einem quartären Ammoniumion. Auch *Ahlström et al.* zeigten, dass *C. albicans* mit CTAB inaktiviert werden konnte. Dabei wurde eine Inaktivierung von *C. albicans*  $\geq 99,9\%$  mit CTAB bei einer Konzentration von 130  $\mu\text{M}$  bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten erreicht [75]. Die Struktur der quartären Ammoniumionverbindungen mit unterschiedlich langen Alkylketten kommt auch in den chemischen Strukturformeln der Photosensibilisatoren SA-PN04 und SA-PN05 vor. Daher liegt es nahe, dass die Dunkeltoxizität der beiden Photosensibilisatoren bei sehr hohen Konzentrationen mit dem Mechanismus von CTAB erklärbar wäre. In Abbildung 21 sind die chemischen Strukturformeln der Photosensibilisatoren SA-PN04 und SA-PN05 sowie von CTAB dargestellt. Auch die gezeigte photodynamische Inaktivierung von *C. albicans* durch die Derivate SA-PN04 und SA-PN05 könnte somit durch eine mögliche Destabilisierung der Membran durch diese Photosensibilisatoren erklärt werden.

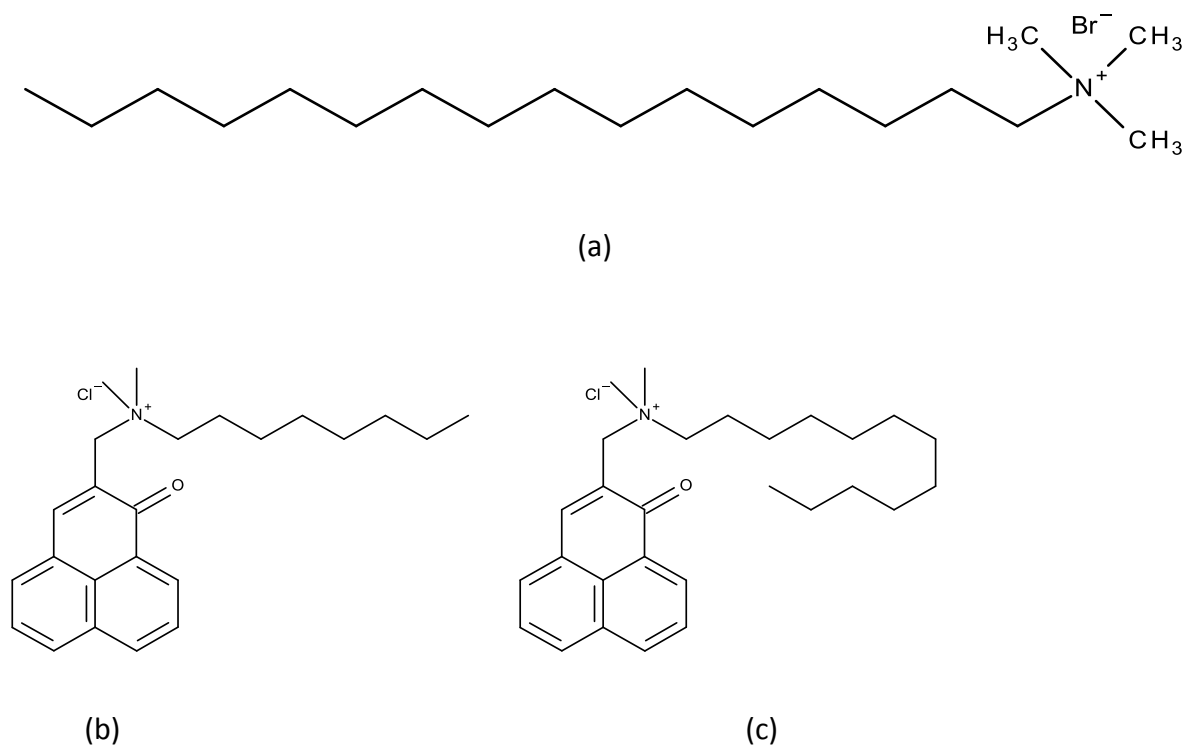


Abbildung 21: Dargestellt sind die Strukturformeln von CTAB (a), SA-PN04 (b) und SA-PN05 (c).

Da beim Photosensibilisator SA-PN05 eine stärkere Dunkeltoxizität aufgetreten ist als bei SA-PN04 wurde in weiteren Versuchen ein engerer Konzentrationsbereich zwischen 100 und 250  $\mu\text{M}$  gewählt, um den Beginn der Dunkeltoxizität genauer zu definieren. Der Photosensibilisator SA-PN05 zeigte dabei unabhängig vom Lösungsmittel in diesen Versuchen einen Beginn der Dunkeltoxizität ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ .

Um einen besseren photodynamischen Effekt von SA-PN05 auf *C. albicans* zu zeigen und nicht die Dunkeltoxizität des Photosensibilisators, wurden daher bei den Waschversuchen und bei den Versuchen mit der LED405nm-Lampe die Endkonzentrationen von SA-PN05 unter 100  $\mu\text{M}$  gewählt.

Außerdem war neben der Zunahme der Dunkeltoxizität bei diesen Versuchen zu beobachten, dass eine bessere Inaktivierung von *C. albicans* mit SA-PN04 und SA-PN05 möglich war, wenn *C. albicans* in Millipore-Wasser resuspendiert wurde. So war mit dem Photosensibilisator SA-PN05 bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  eine antimikrobielle Wirkung auf den in Millipore-Wasser resuspendierten *C. albicans* zu sehen, wobei dies mit dem in PBS resuspendierten *C. albicans* nicht möglich war. Bei SA-PN04 war dieser Unterschied bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  zu erkennen. Auch *Cormick et al.* stellten fest, dass TMPyP auf einen in Millipore-Wasser resuspendierten *C. albicans* eine besser photodynamische Wirksamkeit besitzt als auf einen in PBS resuspendierten *C. albicans* [71]. Ein Grund für die bessere Wirksamkeit der Photosensibilisatoren in Millipore-Wasser könnte sein, dass darin der Singulett-Sauerstoff eine längere Überlebensdauer besitzt [76]. Außerdem können möglicherweise positiv geladene Ionen aus dem PBS-Puffer eine Anlagerung der positiv geladenen Photosensibilisatoren (z.B. Methylenblau) abschirmen [77]. Kochsalzlösungen bieten nämlich eine geringere Sauerstoffverfügbarkeit als Wasser, wodurch das Monomer/Dimer-Verhältnis von Methylenblau in Kochsalzlösungen kleiner ist als in Wasser. Dadurch zeigt sich bei Methylenblau eine höhere Produktion von ROS in Wasser als in 0,9%igen Kochsalzlösungen.

Eine Verbesserung der Inaktivierung von *C. albicans* resuspendiert in PBS, sowohl mit SA-PN04 als auch mit SA-PN05, zeigte sich dann durch das zweimalige Waschen der Proben mit PBS und dem anschließenden Resuspendieren des *C. albicans* in PBS. Dabei wurde der überschüssige Photosensibilisator aus der Lösung entfernt und die eingestrahlte Energie der Lampe in Form von Photonen konnte so vollständig auf den aufgenommenen beziehungsweise anhaftenden

Photosensibilisator übertragen werden. Die Überlegung beim Waschversuch war, dass dadurch eine geringere Anzahl der emittierten Photonen durch den sich in der Lösung befindlichen Photosensibilisator absorbiert wird. So kann eine größere Ausbeute an Singulett-Sauerstoff durch die Absorption der Photonen des an *C. albicans* gebundenen Photosensibilisators erzielt werden, was zu einer Verbesserung der Inaktivierung von *C. albicans* führt. Diese Verbesserung der Inaktivierung konnte bei den Waschversuchen mit niedrigeren Endkonzentrationen (<100 µM) sowohl von SA-PN04 als auch von SA-PN05 erreicht werden. Durch das Waschen der Proben wurde auch gezeigt, dass, sobald der Photosensibilisator aufgenommen und der überschüssige sich in Lösung befindende Photosensibilisator entfernt wurde, das Lösungsmittel keinen Einfluss mehr auf die Inaktivierung von *C. albicans* durch lichtaktivierten SA-PN04 bzw. SA-PN05 hat. Somit konnte man durch das Waschen der Proben einen reinen photodynamischen Effekt der Photosensibilisatoren beobachten, wie die Diagramme der effektiven log<sub>10</sub>-Stufen-Reduktion zeigen (Abbildung 13 und Abbildung 17). D. h. bereits geringe Konzentrationen von SA-PN04 und SA-PN05 (<100 µM) bewirkten eine photodynamische Inaktivierung von *C. albicans*. Die Dunkeltoxizität des Photosensibilisators SA-PN05 zeigte sich nämlich erst ab einer Konzentration von ≥100 µM. Der Photosensibilisator SA-PN04 dagegen wirkt nur bei einer Konzentration von 500 µM dunkeltoxisch auf den in Millipore-Wasser resuspendierten *C. albicans*.

*Quiroga et al.* konnten durch Waschversuche zeigen, dass die Inaktivierung von *C. albicans* mit TMPyP nach einmaligen Waschen um ~ 1 log<sub>10</sub>-Stufe geringer war als bei nicht gewaschenen Proben mit einer Konzentration von 5 µM. Die Arbeitsgruppe führt dies auf das Herauswaschen von zu schwach gebundenen Photosensibilisatormolekülen an der Zellwand von *C. albicans* zurück [65]. Da bei den Versuchen mit SA-PN04 und SA-PN05 aber die Inaktivierung durch das Waschen zunimmt, könnte man daraus schließen, dass durch die Alkylketten eine stärkere Bindung der Photosensibilisatoren SA-PN04 und SA-PN05 an die Zellwand von *C. albicans* hervorgerufen wird als mit TMPyP und somit während der Bestrahlung eine antimikrobielle photodynamische Wirkung stattfindet.

Nicht nur durch das Waschen der Proben, sondern auch durch die Erhöhung der Energiedosis auf 120 J/cm<sup>2</sup> mit der LED405nm-Lampe konnte die effektive photodynamische Inaktivierung von *C. albicans* mit SA-PN05 bei Konzentrationen bis 100 µM verbessert werden.

Aufgrund der effektiven photodynamischen Inaktivierung der beiden Photosensibilisatoren SA-PN04 und SA-PN05 lässt sich bei den Waschversuchen zeigen, dass der Photosensibilisator SA-PN05 bei verwendeten Konzentrationen  $<100 \mu\text{M}$  effektiver ist als SA-PN04.

Ein großer Nachteil von SA-PN05 ist die vorhandene Dunkeltoxizität ab einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$ . So lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die Verlängerung der Alkylkette einen positiven Effekt auf die Verbesserung der photodynamischen Wirksamkeit auf *C. albicans* hat, aber auch die zunehmende Dunkeltoxizität von SA-PN05 beeinflusst. Trotz dieser Dunkeltoxizität von SA-PN05 bei den Endkonzentrationen  $\geq 100 \mu\text{M}$ , konnte gezeigt werden, dass SA-PN05 der effektivste Photosensibilisator in der Reihe der hier untersuchten PS-Derivate zur photodynamischen Inaktivierung von *C. albicans* ist. Der Grund dafür ist, dass mit SA-PN04 eine antimikrobielle Wirkung nach dem Waschen erst bei einer Konzentration von  $500 \mu\text{M}$  eintritt und bei SA-PN05 bereits bei einer Konzentration von  $6,25 \mu\text{M}$ . Außerdem ist der Photosensibilisator SA-PN05 bei Konzentrationen  $<100 \mu\text{M}$  ebenso wie SA-PN04 nicht dunkeltoxisch.

Die Destabilisierung der Zellmembran durch die Alkylketten und die benachbarte positive Ladung der Photosensibilisatoren ist ein wichtiger Aspekt für eine Optimierung der photodynamischen Wirkung von PS-Derivaten auf Basis der chemischen Struktur von SA-PN04 und SA-PN05 gegenüber *C. albicans*.

#### 4.1.1.8 *C. albicans* und PN

SAPyR und dessen Derivate liegen in Lösung als Kationen vor. Die Photosensibilisatoren SA-PN04 und SA-PN05, mit denen es möglich war *C. albicans* zu inaktivieren, besitzen aufgrund ihrer Alkylkette (8-x und 12-x CH<sub>2</sub>-Reste) einen hydrophoben Charakter. Auch der Photosensibilisator Perinaphtenon (PN) ist ein hydrophobes Molekül mit einem  $\Phi_{\Delta} = 0,97$  (in Methanol) [62]. Die chemischen Strukturen der Photosensibilisatoren SAPyR, SA-PN27, SA-PN02a, SA-PN03, SA-PN04 und SA-PN05 basieren auf der Struktur von PN. PN besitzt jedoch keine positive Ladung. Wegen dem hydrophoben Charakter von PN und dessen chemischer Ähnlichkeit zu den Derivaten von SAPyR wurde PN als möglicher Photosensibilisator für die Inaktivierung von *C. albicans* ausgewählt. PN wurde für die Versuche mit Ethanol in Lösung gebracht. Die Versuchsbedingungen mit PN und *C. albicans* in Millipore-Wasser und PBS resuspendiert wurden analog, wie bei den Experimenten mit SAPyR, bei einer Inkubationszeit von vier Stunden und anschließender Bestrahlung mit der Blue V UV802L, durchgeführt. Die Endkonzentrationen des Photosensibilisators waren dieselben, wobei die Verdünnungsreihe nicht mit Ethanol, sondern mit Millipore-Wasser hergestellt wurde, sodass in der 200  $\mu$ L Probe 10% Ethanol enthalten war und so eine Inaktivierung von *C. albicans* durch Ethanol ausgeschlossen werden konnte. Dies konnte durch die entsprechende unbehandelte Kontrolle (*Candida*, ohne Licht, ohne PS) bestätigt werden, d.h. es fand keine Reduktion der KBE statt. Bei den Endkonzentrationen des Photosensibilisators von 0  $\mu$ M / 50  $\mu$ M / 100  $\mu$ M und 500  $\mu$ M wurden die Dunkelkontrollen mitgeführt.

Es konnte jedoch weder bei dem in Millipore-Wasser noch bei dem in PBS resuspendierten *C. albicans* mit PN eine Inaktivierung erreicht werden, d.h. keine Reduktion der KBE um  $>1 \log_{10}$ -Stufe (siehe Anhang, Abbildung 31). Somit scheint der hydrophobe Charakter von SA-PN04 und SA-PN05 nicht ausschlaggebend für eine Inaktivierung von *C. albicans* zu sein, da ansonsten auch mit PN eine Inaktivierung hätte möglich sein müssen. Es scheint daher wahrscheinlicher, dass das Vorhandensein einer positiven Ladung neben einer langen Alkylkette ein wichtiger Bestandteil für die Wirksamkeit der Photosensibilisatoren SA-PN04 und SA-PN05 ist.

#### 4.1.1.9 *C. albicans* und PNS

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde nun untersucht, inwieweit die Ladung einen Einfluss auf die photodynamische Inaktivierungseffizienz gegenüber *Candida albicans* hatte. Hierzu wurde nun der Photosensibilisator PNS, der die wasserlösliche Form von PN mit einem  $\Phi_{\Delta} = 1,03 \pm 0,1$  [62] darstellt, verwendet. PNS besitzt eine negative Ladung, während PN ungeladen ist bzw. SAPyR eine positive Ladung hat. Auch mit diesem Photosensibilisator wurden die entsprechenden Versuche wie mit PN durchgeführt. Die Inkubationszeit, die Endkonzentrationen des Photosensibilisators und die Lampe, mit der bestrahlt wurde, waren identisch.

Auch mit einem negativ geladenen Molekül war es nicht möglich *C. albicans* zu inaktivieren. Diese Ergebnisse sind ebenfalls im Anhang in der Abbildung 32 graphisch dargestellt.

#### 4.1.2 „Uptake“-Versuche

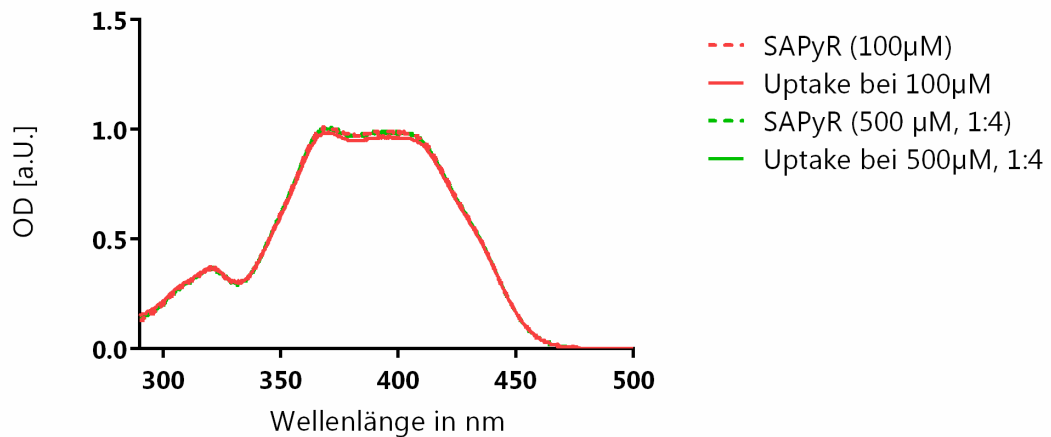
Nach den Experimenten *C. albicans* photodynamisch zu inaktivieren stellte sich die Frage, wieso es mit den Derivaten von SAPyR, die eine ausreichend lange Alkylkette besitzen, möglich war *C. albicans* zu inaktivieren, während dies mit SAPyR, SA-PN27, SA-PN02a, SA-PN03, PN und PNS nicht möglich war. Eine Überlegung war, dass sich, wie bereits erwähnt, die Photosensibilisatoren mit den Alkylketten und somit mit einem hydrophoben Charakter an die Oberfläche von *C. albicans* anlagern könnten oder vielleicht sogar von *C. albicans* aufgenommen werden könnten. Somit wäre der entstandene Singulett-Sauerstoff in direkter räumlicher Nähe von *C. albicans* und könnte eine größere oxidative Schädigung der Zellen hervorrufen und zu einer Inaktivierung führen. Auch *Demidova* und *Hamblin* haben nachgewiesen, dass für eine Verbesserung der Inaktivierung von Mikroorganismen die gebundene Menge an Photosensibilisator entscheidend ist [78]. Um einen Überblick über die mögliche Aufnahme oder Anlagerung eines Photosensibilisators an die Oberfläche des *C. albicans* zu erhalten, wurden sogenannte „Uptake“-Versuche durchgeführt. Die Annahme, dass sich die verschiedenen Photosensibilisatoren an die Oberfläche des *C. albicans* angelagert haben beziehungsweise aufgenommen wurden, wurde mittels Spektroskopie untersucht. Die Maxima der optischen Dichte von Molekülen sind abhängig von der eingesetzten Konzentration/Menge. D. h. Unterschiede in den Maxima der optischen Dichte in den Spektren der untersuchten Photosensibilisatoren, inkubiert mit und ohne *C. albicans*, geben einen Hinweis, ob eine Aufnahme/Anlagerung stattgefunden hat oder nicht. Erhält man bei der Messung des Überstandes der Lösung mit Photosensibilisator und mit *C. albicans* eine niedrigere OD im Spektrum als bei der Messung der Lösung desselben Photosensibilisators ohne *C. albicans*, so ist davon auszugehen, dass im Überstand eine geringere Konzentration an Photosensibilisator vorhanden ist. Diese Differenz der Konzentration wurde somit vom *C. albicans* aufgenommen beziehungsweise hat sich an die Oberfläche des *C. albicans* angelagert.

Die Differenz zwischen den gemessenen optischen Dichten bei der jeweiligen Photosensibilisatorlösung mit und ohne *C. albicans* von  $\geq 20\%$  wurde in dieser Arbeit als erfolgreiche Anlagerung beziehungsweise erfolgreiche Aufnahme des Photosensibilisators von *C. albicans* definiert. Diese Differenz von 20% wurde qualitativ anhand der OD-Werte in den Diagrammen abgelesen.

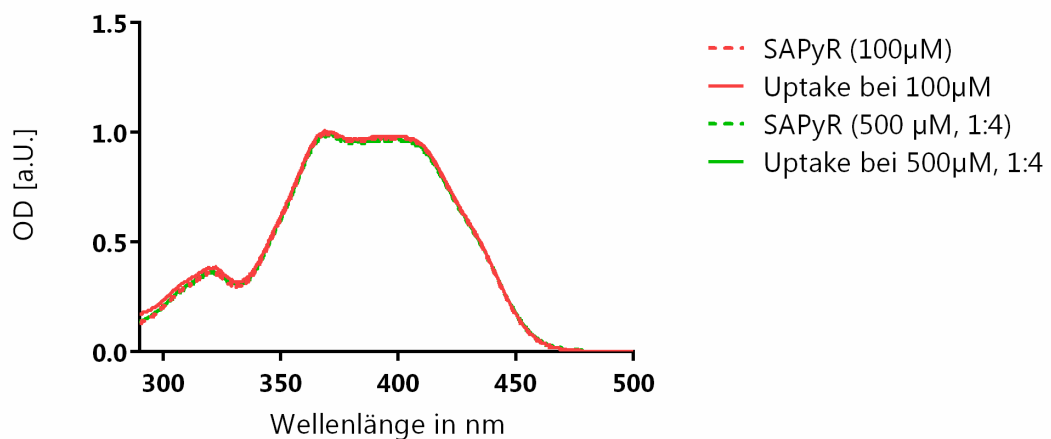
Bei den „Uptake“-Versuchen mit den Photosensibilisatoren SAPyR, SA-PN27, PN, PNS und SA-PN02a und *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser und PBS konnten beim Messen der Überstände bei den Konzentrationen 100  $\mu$ M und 500  $\mu$ M keine Unterschiede in der Höhe der OD-Werte festgestellt werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Phototoxizitätsversuche, da mit diesen Photosensibilisatoren bei den verschiedenen Versuchsbedingungen keine Inaktivierung von *C. albicans* möglich war. Exemplarisch für die „Uptake“-Versuche mit diesen Photosensibilisatoren sind die Spektren von SAPyR in Abbildung 22 dargestellt. Die Graphen für die anderen Photosensibilisatoren sind im Anhang (Abbildungen 33, 34, 37 und 38) zu finden. Insgesamt zeigte sich, dass weder allein die Art der Ladung (positiv oder negativ), noch die Anzahl der Ladungen der Photosensibilisatoren, noch allein der hydrophobe Charakter von PN ausschlaggebend für die Aufnahme bzw. Anlagerung der Photosensibilisatoren an *C. albicans* verantwortlich ist.

Dagegen zeigten *Caminos et al.*, dass mit Erhöhung der positiven Ladungen an Porphyrinen die Bindung der Photosensibilisatoren an Bakterien (hier: *E. coli*) zunimmt [79]. Dies konnte bisher im Rahmen dieser Arbeit für Perinaphthenone und *C. albicans* nicht gezeigt werden.

Für *C. albicans* und Methylenblau zeigten *Prates et al.* den Einfluss von Proteinen in der Zellwand von *C. albicans*, die sogenannten „multi-drug“-Pumpen, die den Photosensibilisator (hier: MB) aus der Zelle entfernen beziehungsweise in die Zelle pumpen können. Dabei spielt die positive Ladung des Photosensibilisators eine wichtige Rolle für dessen Aufnahme in die Zellen beziehungsweise für das Entfernen aus den Zellen über diese Pumpen [80]. Bei den Perinaphthenonen ist das alleinige Vorhandensein einer positiven Ladung nicht für die Aufnahme beziehungsweise Anlagerung des Photosensibilisators an *C. albicans* ausreichend.



(a)



(b)

Abbildung 22: Dargestellt ist der „Uptake“-Versuch mit *C. albicans* in Millipore-Wasser (a) und PBS (b) resuspendiert mit SAPyR bei einer Inkubationszeit von 4 h. Nach dem Zentrifugieren der Proben wurden die Überstände der Photosensibilisatorkonzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ , die nochmals im Verhältnis 1:4 verdünnt wurden, mit und ohne *C. albicans* mit dem Spektrometer vermessen. Dargestellt ist die OD der gemessenen Proben. (gestrichelte Linie: reine PS-Lsg; durchgehende Linie: *Candida* + PS)

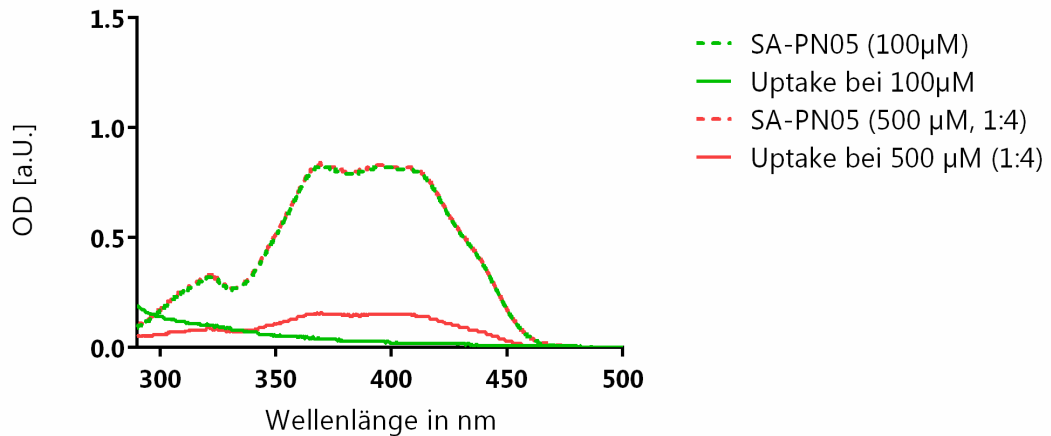
Viel wichtiger als die positive Ladung der Perinaphthenone scheint hier bei diesen Photosensibilisatoren das Vorhandensein einer meso-substituierten Alkylkette am Stickstoffatom. Dies ist daraus zu schließen, dass mit diesen Photosensibilisatoren bei den gemessenen optischen Dichten ein Unterschied in den Maxima zu erkennen war und somit

eine Anlagerung beziehungsweise Aufnahme stattgefunden hat (siehe Abbildung 23, Abbildung 35 im Anhang und Abbildung 36 im Anhang). Wie sich schon nach der Durchführung der Phototoxizitätsversuche zeigte, spielt die Länge der Alkylkette, die am Stickstoffatom der Photosensibilisatoren gekoppelt ist, eine wichtige Rolle bei der Anlagerung beziehungsweise Aufnahme des Photosensibilisators von *C. albicans*.

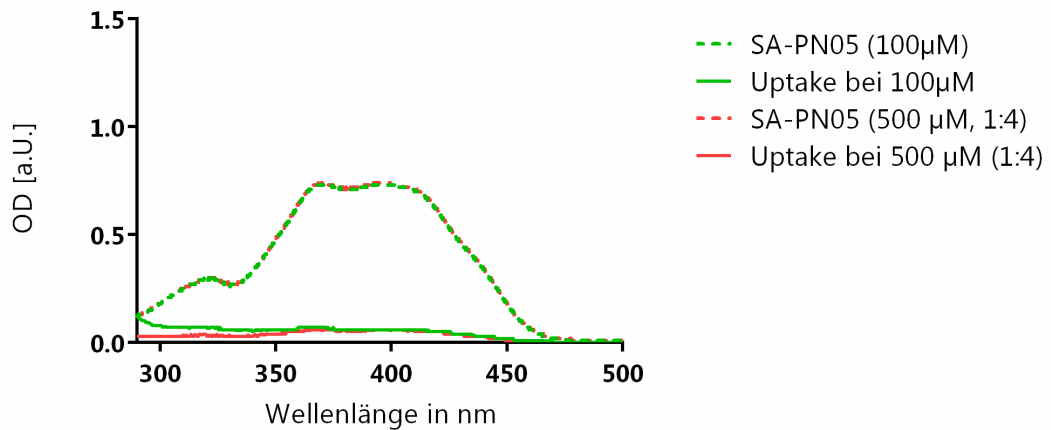
So konnte mit SA-PN02a, der das chemische Grundgerüst für die Photosensibilisatoren SA-PN03, SA-PN04 und SA-PN05 bildet, noch keine Veränderung in der Höhe der Maxima der optischen Dichten nachgewiesen werden. Auch mit dem Photosensibilisator SA-PN03, der die kürzeste Alkylkette mit 4-x CH<sub>2</sub>-Resten besitzt, war dies nicht möglich. Erst mit dem Photosensibilisator SA-PN04, der eine Alkylkette mit 8-x CH<sub>2</sub>-Resten am Stickstoffatom besitzt, konnte man eine Aufnahme beziehungsweise Anlagerung des Photosensibilisators bei einer Konzentration von 100 µM und 500 µM, durch eine Abnahme der OD im Überstand, erkennen (siehe Abbildung 36 im Anhang). Dies war sowohl bei dem in Millipore-Wasser als auch in PBS resuspendierten *C. albicans* zu beobachten. Die Anlagerung beziehungsweise Aufnahme des Photosensibilisators in Millipore-Wasser war allerdings größer als in PBS. Auch bei den photodynamischen Versuchen mit dem Photosensibilisator SA-PN04 war eine Inaktivierung von *C. albicans* bei diesen beiden Konzentrationen möglich. Mit der Verlängerung der Alkylkette auf 12-x CH<sub>2</sub>-Reste, wie es bei SA-PN05 der Fall ist, wurde der Photosensibilisator fast vollständig vom *C. albicans* aufgenommen beziehungsweise hat sich an der Oberfläche des *C. albicans* angelagert (Abbildung 23). Dies ist im Graphen qualitativ daran zu erkennen, dass beim Messen des Überstandes der Lösung mit dem Photosensibilisator und *C. albicans* in PBS und in Millipore-Wasser sowohl bei einer Konzentration von 100 µM als auch bei 500 µM eine OD < 0,2 gemessen werden konnte (siehe Abbildung 23). So konnte qualitativ der größte Unterschied in der OD mit dem Photosensibilisator SA-PN05 und *C. albicans* festgestellt werden. Diese Ergebnisse bestätigen auch die Versuchsergebnisse, die bei der photodynamischen Inaktivierung von *C. albicans* mit dem lichtaktivierten Photosensibilisator SA-PN05 nachgewiesen wurden, da auch hier SA-PN05 am wirksamsten war.

*Reddi et al.* zeigten ebenfalls, dass mit Zunahme der Alkylkettenlänge bis zu 10-x bzw. 14-x CH<sub>2</sub>-Resten, die an TMPyP gebunden waren, die Menge an aufgenommenen Photosensibilisator durch *S. aureus* und *E. coli* zunahm. Eine Verlängerung der Alkylkette mit mehr als 14-x CH<sub>2</sub>-Resten erbrachte keine weitere Verbesserung in der Aufnahme von PS bei

diesen Bakterien [72]. Exemplarisch für die „Uptake“-Versuche mit SA-PN03, SA-PN04 und SA-PN05 ist, wie bereits erwähnt, in Abbildung 23 der Versuch mit SA-PN05 graphisch dargestellt. Die anderen beiden Diagramme befinden sich im Anhang (Abbildung 35 und Abbildung 36).



(a)



(b)

Abbildung 23: Dargestellt ist der „Uptake“-Versuch mit *C. albicans* in Millipore-Wasser (a) und PBS (b) resuspendiert mit SA-PN05 bei einer Inkubationszeit von 4 h. Nach dem Zentrifugieren der Proben wurden die Überstände der Photosensibilisatorkonzentrationen von 100 µM und 500 µM, die nochmals im Verhältnis 1:4 verdünnt wurden, mit und ohne *C. albicans* mit dem Spektrometer vermessen. Dargestellt ist die OD der gemessenen Proben. (gestrichelte Linie: reine PS-Lsg; durchgehende Linie: *Candida* + PS)

Die spektroskopischen Untersuchungen geben keinen direkten Hinweis, ob der Photosensibilisator aufgenommen wurde oder sich nur an der Oberfläche der Zellwand von *C. albicans* anlagerte. Um eine intrazelluläre Aufnahme zu bestätigen, müsste ein weiteres Experiment durchgeführt werden. Bei diesem Experiment muss die Zellwand von *C. albicans*, nach Inkubation mit dem Photosensibilisator, lysiert werden, damit der intrazelluläre Photosensibilisator wieder komplett in Lösung gebracht wird. Anschließend muss die Probe mit der Lösung des wieder frei werdenden Photosensibilisators nochmals mit dem Spektroskop vermessen werden. Somit kann die Menge an Photosensibilisator bestimmt werden, welche tatsächlich aufgenommen wurde. Dies erfolgt durch den Vergleich der beiden Absorptionsspektren von der Probe des Photosensibilisators ohne *C. albicans* und der Probe des wieder frei werden Photosensibilisators. Solch ein Versuch wurde von *Quiroga et al.* mit *C. albicans* und TMPyP durchgeführt. Dabei wurde der *C. albicans* mit TMPyP (5 µM) für verschiedene Zeiten inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und die Überstände abgenommen und unterschiedlich oft gewaschen. Die *C. albicans*-Pellets wurden in zweiprozentiger Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) resuspendiert, über Nacht inkubiert und mit dem Spektroskop vermessen [65]. Diese Modifikationen des Versuches (mehrmaliges Waschen und die Inkubation in SDS) erlauben es zu unterscheiden, ob der Photosensibilisator von *C. albicans* aufgenommen wurde oder ob sich der Photosensibilisator nur an der Oberfläche anlagerte. Auch eine Aussage über die Stärke der Bindung des Photosensibilisators an die Mikroorganismen ist damit möglich.

Aus zeitlichen Gründen wurde in dieser Arbeit nur eine vereinfachte Form des „Uptake“-Versuches durchgeführt. Es sollte gezeigt werden, dass die Alkylketten einen positiven Einfluss auf die Anlagerung beziehungsweise Anheftung der Photosensibilisatoren an *C. albicans* und somit auch auf die Inaktivierung von *C. albicans* haben. Die Alkylkette soll die Lokalisation der Photosensibilisatoren in der Zellmembran des *C. albicans* erleichtern. Auch *Ahlstrom et al.* zeigten, dass Moleküle mit quartären Ammoniumgruppen und unterschiedlich langen Alkylketten an die Zellmembran von *C. albicans* binden. Die Menge an Molekülen, die an die Membran bindet, ist abhängig von der Kettenlänge [75]. Dies konnte auch im Rahmen dieser Doktorarbeit bestätigt werden. Da auch die beiden Photosensibilisatoren SA-PN04 und SA-PN05 quartäre Ammoniumgruppen mit unterschiedlich langen Alkylketten besitzen, ist hier

der von *Ahlstrom et al.* und *Vieira et al.* postulierte Mechanismus, der in **4.1.1.7** näher beschrieben wurde, als mögliche Erklärung zu nennen.

Inwiefern diese Anlagerung beziehungsweise die Aufnahme der Photosensibilisatoren die Inaktivierung von *C. albicans* beeinflusst, konnte abschließend nicht geklärt werden. Es konnte nur gezeigt werden, dass durch die Zunahme der Alkylkettenlänge eine bessere Anlagerung beziehungsweise Aufnahme des Photosensibilisators und dadurch auch eine verbesserte photodynamische Inaktivierung erreicht wurde. Parallel dazu nahm aber auch die Dunkeltoxizität zu.

In Tabelle 7 ist zusammenfassend der Nachweis der „Uptake“-Versuche mit den verschiedenen Photosensibilisatoren bei den Konzentrationen 100  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  dargestellt.

	<i>C. albicans</i> resuspendiert in Millipore-Wasser	<i>C. albicans</i> resuspendiert in PBS
SAPyR (100 $\mu\text{M}$ und 500 $\mu\text{M}$ )	✗	✗
SA-PN27 (100 $\mu\text{M}$ und 500 $\mu\text{M}$ )	✗	✗
SA-PN02a (100 $\mu\text{M}$ und 500 $\mu\text{M}$ )	✗	✗
SA-PN03 (100 $\mu\text{M}$ und 500 $\mu\text{M}$ )	✗	✗
SA-PN04 (100 $\mu\text{M}$ und 500 $\mu\text{M}$ )	✓	✓
SA-PN05 (100 $\mu\text{M}$ und 500 $\mu\text{M}$ )	✓	✓
PN (100 $\mu\text{M}$ und 500 $\mu\text{M}$ )	✗	✗
PNS (100 $\mu\text{M}$ und 500 $\mu\text{M}$ )	✗	✗

Tabelle 7: Dargestellt ist der positive Nachweis der „Uptake“-Versuche mit den verschiedenen Photosensibilisatoren bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  mit *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser und PBS. (✗ = kein „Uptake“; ✓ = „Uptake“ erfolgt)

#### 4.2 Effizienz der LED405nm-Lampe im Vergleich zur BlueV-Lampe am Beispiel der Inaktivierung von Bakterien

In der Zahnmedizin können Erkrankungen, die von Bakterien ausgelöst werden, wie Endodontitis, Parodontitis, kariösen Läsionen und Weichgewebsentzündungen mit Hilfe der photodynamischen Therapie behandelt werden [46, 55, 56]. Dazu sind bereits Systeme von den Firmen Helbo, Cumdente und elexxion GmbH auf dem Markt, welche in der Einleitung genauer beschrieben wurden. Die Firma elexxion GmbH verwendet bei ihrem System den Wirkstoff Indocyaningrün. Bei dem System der Firma Helbo wird der „HELBO® Blue Photosensitizer“ und bei der Firma Cumdente der „PACT® Photosensitizer“ in Form eines Gels auf die zu behandelnden Stellen aufgebracht und anschließend mit einem Laser für 10 s bestrahlt.

Eine kurze Bestrahlungszeit der Proben und eine daraus folgende effektive photodynamische Inaktivierung von Mikroorganismen sind für den bestrahlenden Zahnarzt von Vorteil. Bisher wurde die photodynamische Effizienz von SAPyR unter der Verwendung der BlueV UV802L als Lichtquelle untersucht. Um mit dem Photosensibilisator SAPyR und einer Lichtquelle, die blaues Licht emittiert, auch solch ein System zu entwickeln, das in Zukunft in der Zahnmedizin oder auch in der Dermatologie am Patienten mit einer kurzen Bestrahlungszeit eingesetzt werden kann, wird eine neue Lichtquelle benötigt. Dazu wurden nun im Rahmen dieser Arbeit Versuche mit einer neuen Prototyp-Lampe (LED405nm-Lampe), bei der im Vergleich zur BlueV UV802L (Flächenleistungsdichte von  $20 \frac{mW}{cm^2}$ ) eine Flächenleistungsdichte von  $200 \frac{mW}{cm^2}$  eingestellt werden kann, durchgeführt. Durch diese hohe Flächenleistungsdichte kann eine kürzere Bestrahlungszeit der Proben erreicht werden. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit nun untersucht werden, inwiefern sich die LED405nm-Lampe im Vergleich zur BlueV UV802L auf die Effektivität der photodynamischen Inaktivierung von Bakterien auswirkt. Somit wird auch überprüft, ob die LED405nm-Lampe eine geeignete Lichtquelle für zukünftige Anwendungen darstellt.

#### 4.2.1 Phototoxizitätsversuche mit *S. aureus* und SAPyR in Abhängigkeit der Lichtdosis

Es konnte in vorherigen Arbeiten gezeigt werden, dass die BlueV UV802L eine geeignete Lichtquelle für die Inaktivierung von Mikroorganismen mit SAPyR ist [81]. Mit der BlueV UV802L sind jedoch aufgrund der geringeren Flächenleistungsdichte längere Bestrahlungszeiten der Proben notwendig. Da dies, wie in 4.2 erwähnt, mit der LED405nm-Lampe nicht der Fall ist, soll nun in den folgenden Versuchen die Effektivität der LED405nm-Lampe gegenüber der BlueV UV802L mit *S. aureus* und SAPyR als Photosensibilisator in Abhängigkeit der Lichtdosis getestet werden. Die Versuche mit *C. albicans* und lichtaktiviertem SA-PN05 in dieser Arbeit, die in 4.1.1.6 beschrieben wurden, zeigten, dass auch die LED405nm-Lampe für die Reduktion von Mikroorganismen eine Alternative darstellt. So stellte sich nun die Frage, ob mit der LED405nm-Lampe aufgrund ihres Emissionsspektrums, das ein Maximum bei 405 nm zeigt und somit eine bessere Überlappung mit dem Absorptionsspektrum des Photosensibilisators SAPyR im Gegensatz zur BlueV UV802L besitzt, eine bessere Inaktivierung von Mikroorganismen erreicht werden kann. In Zusammenarbeit mit Dr. Johannes Regensburger (Klinik und Poliklinik für Dermatologie, UKR) wurden die einzelnen Absorptions- und Emissionsspektren von Photosensibilisator und Lampen gemessen. In Abbildung 24 sind die Emissionsspektren der beiden Lampen und das Absorptionsspektrum des Photosensibilisators SAPyR graphisch dargestellt. Um die Effektivität beider Lampen zu vergleichen, wurde die Bestrahlungszeit der einzelnen Lampen so angeglichen, dass mit beiden Lampen eine Energiedosis von  $1,2 \text{ J/cm}^2$  auf die Proben abgegeben wurde. Dafür wurden die Proben mit der BlueV UV802L für 60s mit  $20 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$  und mit der LED405nm-Lampe für 6s mit  $200 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$  bestrahlt. Die verwendeten Konzentrationen des Photosensibilisators und die Durchführung des Versuches wurden bereits in 3.9.1 beschrieben.

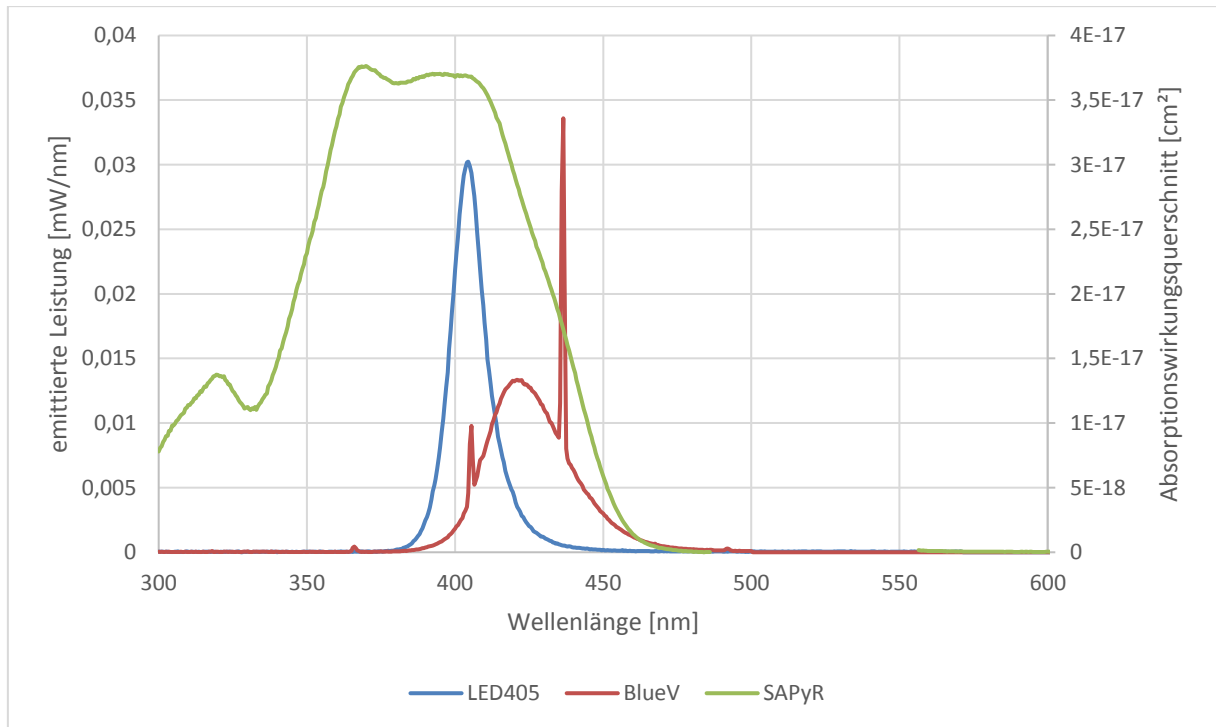


Abbildung 24: Darstellung der Emissionsspektren der beiden Lampen BlueV UV802L und LED405nm sowie des Absorptionsspektrums von SAPyR.

Wie in Abbildung 25 gezeigt wird, ist mit beiden Lichtquellen eine Reduktion um  $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen bei einer Konzentration von  $6,25 \mu\text{M}$  und eine Reduktion um  $\geq 5 \log_{10}$ -Stufen bei einer Konzentration von  $12,5 \mu\text{M}$  erreichbar. Die LED405nm-Lampe ist bei den Konzentrationen  $3,0 \mu\text{M}$  und  $6,25 \mu\text{M}$  um etwa eine  $\log_{10}$ -Stufe effektiver als die BlueV UV802L. Der Photosensibilisator weist keine Dunkeltoxizität auf. Die Ergebnisse, die mit den beiden Lampen erzielt wurden, geben keinen eindeutigen Hinweis darauf, dass aufgrund des unterschiedlichen Maximums des Emissionsspektrums der Lampen eine bessere Effektivität mit einer der Lampen möglich ist. Es wäre zu erwarten gewesen, dass die LED405nm-Lampe aufgrund der besseren Überlappung des Emissionsspektrums mit dem Absorptionsspektrum von SAPyR eine bessere photodynamische Inaktivierung von *S. aureus* zeigt als die BlueV UV802L. Der Unterschied der Effektivität der beiden Lampen liegt aber im Bereich einer  $\log_{10}$ -Stufe und ist damit im Rahmen der Genauigkeit, welche bei der Bestimmung der KBE nach der *Miles, Misra und Irvin* Methode erreicht werden kann. Somit konnte im Zusammenhang mit der angelegten Energiedosis von  $1,2 \text{ J/cm}^2$ , die von beiden Lampen eingestrahlt wird, kein Unterschied in der Effektivität der beiden Lampen gezeigt werden.

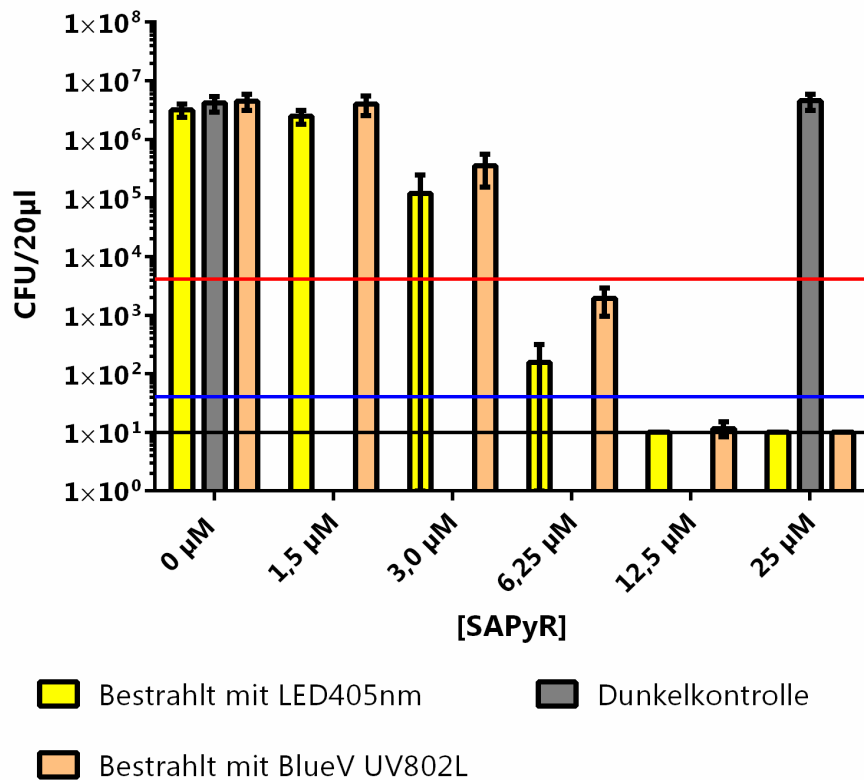


Abbildung 25: Dargestellt ist die Inkubation von *S. aureus* mit SAPyR für 10 s und anschließender Bestrahlung mit einer Energiedosis von 1,2 J/cm<sup>2</sup> mit der BlueV UV802L (orange) und mit der LED405nm-Lampe (gelb) und die dazugehörigen Dunkelkontrollen (grau). Es ist der Mittelwert von drei unabhängig durchgeführten Experimenten ± Konfidenzintervall dargestellt. (\_\_\_\_ Detektionsgrenze, \_\_\_\_\_ 3 log<sub>10</sub>-Reduktion, \_\_\_\_\_ 5 log<sub>10</sub>-Reduktion)

#### 4.2.2 Phototoxizitätsversuche mit *E. coli* und SAPyR in Abhängigkeit der Lichtdosis

Mit *E. coli* und SAPyR wurden dieselben Versuche durchgeführt wie mit *S. aureus*, um die Effektivität der beiden Lampen auch mit einem weiteren Keim zu überprüfen. Bei diesen Versuchen wurde eine weitere Endkonzentration von SAPyR (50 µM) verwendet.

Auch bei diesen Versuchen konnte man eine Reduktion der KBE von *E. coli* um ≥3 log<sub>10</sub>-Stufen bei einer Konzentration von 12,5 µM und eine Reduktion um ≥5 log<sub>10</sub>-Stufen bei einer Konzentration von 25 µM mit der LED405nm-Lampe beobachten. Mit der BlueV UV802L war bereits eine Reduktion um ≥5 log<sub>10</sub>-Stufen bei der Konzentration von 12,5 µM zu sehen. Jedoch ist der Unterschied der Effektivität der beiden Lichtquellen wie bereits im Versuch mit

*S. aureus* und SAPyR im Bereich von einer  $\log_{10}$ -Stufe, die als Fehlertoleranz angenommen werden kann, hier allerdings zu Gunsten der BlueV UV802L. Auch bei diesen Experimenten konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden, welche Lampe bei einer angelegten Energiedosis von  $1,2 \text{ J/cm}^2$  effektiver ist. Allerdings ist es mit beiden Lampen möglich Mikroorganismen effizient um  $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen zu inaktivieren.

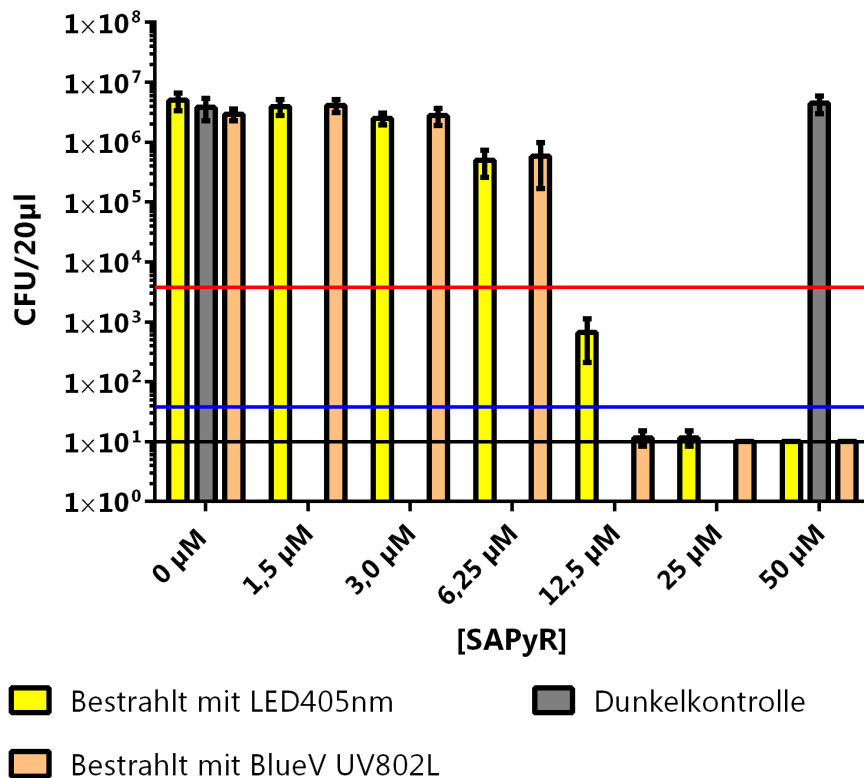


Abbildung 26: Dargestellt ist die Inkubation von *E. coli* mit SAPyR für 10 s und anschließender Bestrahlung mit einer Energiedosis von  $1,2 \text{ J/cm}^2$  mit der BlueV UV802L (orange) und mit der LED405nm-Lampe (gelb) und die dazugehörigen Dunkelkontrollen (grau). Es ist der Mittelwert von drei unabhängig durchgeführten Experimenten  $\pm$  Konfidenzintervall dargestellt. (\_\_\_\_\_ Detektionsgrenze, \_\_\_\_\_ 3  $\log_{10}$ -Reduktion, \_\_\_\_\_ 5  $\log_{10}$ -Reduktion)

### 4.2.3 Diskussion der Ergebnisse in Abhängigkeit der Lichtdosis

Die Unterschiede bei der Inaktivierung sowohl von *S. aureus* als auch von *E. coli* mit den Konzentrationen 6,25  $\mu\text{M}$  und 12,5  $\mu\text{M}$  des Photosensibilisators SAPyR liegen mit den beiden Lampen im Bereich von einer  $\log_{10}$ -Stufe. Somit zeigen die Ergebnisse keinen eindeutigen Beleg dafür, dass eine der beiden Lampen bei angeglicherener Energiedosis aufgrund des unterschiedlichen Emissionsspektrums effektiver ist. Bei der photodynamischen Inaktivierung von *S. aureus* mit SAPyR schneidet somit die LED405nm-Lampe und bei *E. coli* die BlueV UV802L besser ab. Diese Unterschiede könnten dem Verfahren geschuldet sein, beispielsweise beim Verdünnen der einzelnen Photosensibilisatorreihen oder beim Ausplattieren. Sie liegen aber, wie bereits erwähnt, im Rahmen des Fehlertoleranzbereichs und können daher vernachlässigt werden. Somit weisen beide Lampen eine vergleichbare Effektivität bei einer Energiedosis von 1,2  $\text{J}/\text{cm}^2$  auf.

Der Unterschied zwischen den beiden Lichtquellen ist aber, dass mit der LED405nm-Lampe eine kürzere Bestrahlungszeit der Proben von nur sechs Sekunden notwendig ist, um eine effektive Reduktion der KBE zu erreichen. Zum Vergleich ist mit der BlueV UV802L eine Bestrahlungszeit von 60 Sekunden notwendig, um dieselbe effektive Reduktion der KBE zu erreichen. Die Flächenleistungsdichte der LED405nm-Lampe ist zehnfach so hoch wie die der BlueV UV802L, was eine Reduktion der Bestrahlungszeit um 1/10 bedeutet. Auch *Maisch et al.* zeigten, dass es mit einer Impulslampe (IPL-Lampe) möglich ist Mikroorganismen mit einer Bestrahlungszeit von 100 ms zu inaktivieren. Dabei wurden auch *S. aureus* (*MSSA*) und *E. coli* mit verschiedenen Konzentrationen von TMPyP für 10 Sekunden inkubiert und anschließend mit der Blitzlichtlampe bestrahlt. Die Energiedosis, die dabei appliziert wurde, lag zwischen 10 und 80  $\text{J}/\text{cm}^2$ , wobei ein Blitzlicht (100 ms) eine Energiedosis von 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  bedeutete. Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  TMPyP war es möglich *E. coli* um 3  $\log_{10}$ -Stufen mit nur einem Blitzlicht und um 5  $\log_{10}$ -Stufen mit zwei Blitzlichtern zu reduzieren. *MSSA* konnte mit nur einem Blitzlicht bei derselben Konzentration bereits um 5  $\log_{10}$ -Stufen reduziert werden [82]. Auch mit der LED405nm-Lampe ist es so möglich sowohl *E. coli* als auch *S. aureus* innerhalb von nur sechs Sekunden nach einer Inkubationszeit von 10 Sekunden mit SAPyR bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  um  $\geq 99,999\%$  zu inaktivieren. Im Vergleich zu der Bestrahlungszeit von nur wenigen Sekunden mit der LED405nm-Lampe, mit der eine desinfizierende Wirkung gegen *E. coli* und *S. aureus* erzeugt werden kann, benötigen andere Lampensysteme längere

Bestrahlungszeiten. Diese Tatsache ist auf eine geringere Flächenleistungsdichte der Lampen zurückzuführen. So benötigten andere Autoren um mittels aPDT eine desinfizierende Wirkung von Photosensibilisatoren auf Mikroorganismen nachzuweisen eine längere Bestrahlungszeit, da die dabei verwendeten Lampen eine geringere Intensität besaßen [83, 84]. Neben der Inkubationszeit und der Bestrahlungszeit für eine effektive aPDT ist somit auch die Intensität einer Lampe von großer Bedeutung.

Insgesamt konnte bei der Inaktivierung von *S. aureus* und *E. coli* mit lichtaktiviertem SAPyR beobachtet werden, dass die Effektivität der photodynamischen Wirkung bei gleicher Endkonzentration von SAPyR und gleicher Energiedosis sowohl mit der BlueV UV802L als auch mit der LED405nm-Lampe auf *E. coli* geringer war als auf *S. aureus*. So konnte mit beiden Lampen eine Reduktion von *S. aureus* mit SAPyR bei einer Konzentration von 6,25 µM um 3 log<sub>10</sub>-Stufen erreicht werden, bei einer Inkubationszeit von 10 Sekunden und einer Energiedosis von 1,2 J/cm<sup>2</sup>. Bei *E. coli* war dies nicht der Fall. Auch *Eichner et al.* stellten fest, dass es schwieriger ist *E. coli* zu inaktivieren als *S. aureus* [85]. Bei gleicher Konzentration TMPyP von 1 µM war eine sechsfach höhere Bestrahlungszeit notwendig, um den gleichen antibakteriellen Effekt (5 log<sub>10</sub>-Stufen-Reduktion) gegenüber *E. coli* im Vergleich zu *S. aureus* zu erzielen. Als Grund für die geringere Wirksamkeit von Photosensibilisatoren gegenüber gram-negativen Keimen wird gegenwärtig der unterschiedliche Aufbau der Zellwand von gram-positiven bzw. gram-negativen Bakterien diskutiert. Die gram-negativen Keime besitzen eine zusätzliche äußere Membran mit Lipopolysacchariden, die außerhalb der Peptidoglykanschicht lokalisiert ist [86]. Bei genügend hoher Konzentration des Photosensibilisators SAPyR ist es jedoch trotzdem möglich, eine Reduktion von *E. coli* um ≥99,999% zu erreichen.

Zudem konnten auch *Eichner et al.* zeigen, dass mit einer Lampe, die eine genügend hohe Intensität von 50 mW/cm<sup>2</sup> aufweist, eine relativ kurze Bestrahlungszeit von nur 10 Sekunden notwendig ist, um *S. aureus* bei einer Konzentration von 1 µM TMPyP um 5 log<sub>10</sub>-Stufen zu reduzieren. Die gleiche Wirkung konnte bei *E. coli* bei einer Bestrahlungszeit von 10 Sekunden mit einer Photosensibilisatorkonzentration von 10 µM erreicht werden [85].

Mit der LED405nm-Lampe ist eine Reduktion um 5 log<sub>10</sub>-Stufen mit nur sechs Sekunden Bestrahlungszeit möglich, wobei für *S. aureus* eine Konzentration von 12,5 µM SAPyR und für

*E. coli* von 25  $\mu\text{M}$  notwendig ist. Somit konnte gezeigt werden, dass mit einer Bestrahlungszeit von nur 6 s mit der LED405nm-Lampe eine desinfizierende Wirkung des Photosensibilisators SAPyR auf Mikroorganismen erreicht werden kann.

#### 4.2.4 Diskussion der Ergebnisse in Abhängigkeit der Anzahl der absorbierten Photonen

Um eine genauere Aussage über die Effektivität in Hinblick auf die unterschiedlichen Emissionsspektren der BlueV UV802L und der LED405nm-Lampe zu treffen, wurden in Zusammenarbeit mit dem Physiker Dr. Johannes Regensburger (Klinik und Poliklinik für Dermatologie, UKR) die vom Photosensibilisator absorbierten Photonen der jeweiligen Lichtquelle bei den verwendeten Photosensibilisatorkonzentrationen bestimmt. Auf diese Weise kann überprüft werden, ob bei diesen beiden Lampen ausschließlich die Intensität und dadurch die kürzere Bestrahlungsdauer ausschlaggebend ist oder die unterschiedlichen Emissionsspektren in Hinblick auf die emittierten Photonen, die vom Photosensibilisator absorbiert werden. Denn nur die absorbierten Photonen haben einen direkten Einfluss auf die Effektivität, da nur diese zur Anregung der Photosensibilisatoren beitragen und damit auch zur Generierung von Singulett-Sauerstoff. So beschrieben *Cieplik et al.*, dass es für den Vergleich der Effektivität zweier Systeme bestehend aus PS und Lichtquelle nicht reicht, die Energiedosis der Lampen anzupassen. Es spielen vielmehr zusätzliche Parameter eine Rolle, um die Effektivität zweier Systeme zu vergleichen. Daher wurde durch die Arbeitsgruppe eine Formel entwickelt, mit der es nun möglich ist, die Effektivität der verschiedenen PS und der dazugehörigen Lampensystemen zu vergleichen [87].

Die Anzahl der Photonen wurden mit folgender Formel bestimmt [87]:

$$\text{Absorbierte Photonen/ Sekunde} = \sum_{\lambda} (1 - 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d}) \cdot P_{em}(\lambda) \cdot \frac{\lambda}{c_0 \cdot h}$$

Um die LED405nm-Lampe mit der BlueV UV802L zu vergleichen, sind die Bedingungen der durchgeführten Versuche und die dazu berechneten absorbierten Photonen in Tabelle 8 dargestellt. In Tabelle 9 ist das Verhältnis von den absorbierten Photonen mit der LED405nm-Lampe und der BlueV UV802L unter Verwendung der Formel berechnet und dargestellt. Dieses Verhältnis zeigt, dass vom Photosensibilisator SAPyR bei der Bestrahlung mit der LED405nm-Lampe bei gleicher emittierter Energie von  $1,2 \text{ J/cm}^2$  etwa 1,4 mal so viele Photonen absorbiert werden als bei der Bestrahlung mit BlueV UV802L. Durch die LED405nm-Lampe werden dadurch 1,4 mal so viele PS-Moleküle aktiviert als mit der BlueV UV802L, unter der Voraussetzung, dass ein Photon ein PS-Molekül anregt. Somit kann die photodynamische Effektivität anhand der aktivierten PS-Moleküle verglichen werden [87]. Dieser Berechnung zu Folge besitzt die LED405nm-Lampe eine theoretisch bessere photodynamische Effektivität bezüglich der Inaktivierung von Mikroorganismen mit dem PS SAPyR als die BlueV UV 802L, da 1,4 mal so viele PS-Moleküle aktiviert werden.

Dies ist auch bei der Inaktivierung von *S. aureus* mit SAPyR in geringem Maße bei der Bestrahlung mit der LED405nm-Lampe zu beobachten, denn mit der LED405nm-Lampe ist bei einer Endkonzentration des Photosensibilisators von  $6,25 \mu\text{M}$  eine bessere Inaktivierung von *S. aureus* im Bereich von 1  $\log_{10}$ -Stufe zu beobachten. Da der Unterschied aber nur eine  $\log_{10}$ -Stufe beträgt und bei den Versuchen mit *E. coli*, wie bereits in **4.2.3** erwähnt, die BlueV UV802L eine bessere photodynamische Inaktivierung (1  $\log_{10}$ -Stufe) zeigte, kann dieser Unterschied vernachlässigt werden, zumal dieser Unterschied auch im Rahmen der Genauigkeit der KBE-Methode liegt.

Aufgrund des geringen Unterschiedes in der Anzahl der absorbierten Photonen und der daraus folgenden Aktivierung von PS konnte kein eindeutiger Unterschied in der photodynamischen Effektivität beider Lampen festgestellt werden.

Photo-sensibilisator	Konzentration	Lampe	Energie-dosis	Schichtstärke	Absorbierte Photonen
SAPyR	1,5 $\mu\text{M}$	LED405nm	1,2 J/cm <sup>2</sup>	200 $\mu\text{L}$	3,95E+16
	3,0 $\mu\text{M}$				7,84E+16
	6,25 $\mu\text{M}$				1,60E+17
	12,5 $\mu\text{M}$				3,10E+17
	25 $\mu\text{M}$				5,80E+17
SAPyR	1,5 $\mu\text{M}$	BlueV UV802L	1,2 J/cm <sup>2</sup>	200 $\mu\text{L}$	2,83E+16
	3,0 $\mu\text{M}$				5,61E+16
	6,25 $\mu\text{M}$				1,15E+17
	12,5 $\mu\text{M}$				2,25E+17
	25 $\mu\text{M}$				4,26E+17

Tabelle 8: Absorbierte Photonen in Abhängigkeit von Photosensibilisator, Konzentration, Lampe, Energiedosis und Schichtstärke

Photosensibilisatorkonzentration	Verhältnis der absorbierten Photonen durch LED405nm-Lampe zur BlueV
1,5 $\mu\text{M}$	1,4
3,0 $\mu\text{M}$	1,4
6,25 $\mu\text{M}$	1,4
12,5 $\mu\text{M}$	1,4
25 $\mu\text{M}$	1,4

Tabelle 9: Verhältnis der absorbierten Photonen vom Photosensibilisator SAPyR bei den verschiedenen Konzentrationen bei der Bestrahlung von der LED405nm-Lampe zur BlueV UV802L.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass theoretisch die LED405nm-Lampe eine bessere photodynamische Effektivität mit dem PS SAPyR aufweisen müsste als die BlueV UV802L. Da aber der Unterschied des Verhältnisses der Anzahl der absorbierten Photonen so gering ist, konnte in den Versuchen kein eindeutiger Unterschied in der photodynamischen Effektivität festgestellt werden. Trotz allem besitzt die LED405nm-Lampe in puncto verkürzter Bestrahlungszeit der Proben große Vorteile gegenüber der BlueV UV802L.

## 5 Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Doktorarbeit wurde untersucht, inwieweit verschiedene neue Derivate von SAPyR eine photodynamische Wirkung auf *Candida albicans* zeigen. Dazu wurden verschiedene Versuche mit *C. albicans* und den Derivaten von SAPyR in Abhängigkeit verschiedener Parameter wie Inkubationszeit, Konzentration der Photosensibilisatoren, Lösungsmittel und Lichtdosis sowie durch das Waschen der Proben durchgeführt. Mit den Photosensibilisatoren SAPyR, SA-PN27, SA-PN02a und SA-PN03 war es nicht möglich, *C. albicans* unter den verschiedensten Versuchsbedingungen zu inaktivieren ( $<1 \log_{10}$ -Stufen-Reduktion der KBE). Erst durch die Modifikation des Photosensibilisators SA-PN02a mit einer länger werdenden Alkylkette (8x- und 12x-CH<sub>2</sub>-Reste) gelang die Inaktivierung von *C. albicans* mittels Photodynamik bzw. photodynamischem Prozess ( $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen-Reduktion der KBE). Mit dem Photosensibilisator SA-PN04 wurde eine Inaktivierung von *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser um  $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen bei einer Endkonzentration von 500  $\mu\text{M}$ , einer Inkubationszeit von 4 h und einer Energiedosis von 12 J/cm<sup>2</sup> erreicht. Mit dem in PBS resuspendierten *C. albicans* war die Inaktivierung um  $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen erst durch das Waschen der Proben unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen möglich. Mit dem PS SA-PN05 wurde dieses Ergebnis bei Millipore-Wasser als Lösungsmittel, ohne Waschen der Proben, ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  und bei PBS als Lösungsmittel ab 250  $\mu\text{M}$  erreicht. Bei den Waschversuchen reichte eine Konzentration von 6,25  $\mu\text{M}$  von SA-PN05 aus, um *C. albicans* um  $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen zu reduzieren. So konnte erstmals gezeigt werden, dass es bei den Perinaphthenon-Derivaten mit zunehmender Kettenlänge eine Zunahme der photodynamischen Inaktivierung von *C. albicans* gab. Außerdem wurde beobachtet, dass die Photosensibilisatoren in Millipore-Wasser eine bessere Wirksamkeit zeigten als in PBS und dass das Waschen der Proben einen Einfluss auf die photodynamische Wirkung der Photosensibilisatoren hatte. Ein Problem, das bei den Phototoxizitätsexperimenten auftrat, war die Zunahme der Dunkeltoxizität mit länger werdender Alkylkette bei hohen Photosensibilisatorkonzentrationen, unabhängig vom Lösungsmittel. Neben den neuen Derivaten von SAPyR wurde auch mit dem wasserunlöslichen PN bzw. dem wasserlöslichen PNS versucht *C. albicans* zu inaktivieren. Auch diese beiden Photosensibilisatoren zeigten keine antimikrobielle Wirksamkeit. Mittels der „Uptake“-Versuche wurde untersucht, inwiefern die Alkylketten der Photosensibilisatoren einen Einfluss auf die Anlagerung bzw. die

Aufnahme der Photosensibilisatoren durch *C. albicans* und somit auf die photodynamische Inaktivierung hatten. Mit den Photosensibilisatoren SAPyR, SA-PN27, SA-PN02a, SA-PN03, PN und PNS konnte keine Anlagerung bzw. Aufnahme der Photosensibilisatoren nachgewiesen werden, wodurch auch die fehlende photodynamische Wirkung erklärt werden kann. Durch die Verlängerung der Alkylkette auf 8x- und 12x-CH<sub>2</sub>-Reste konnte eine Anlagerung bzw. Aufnahme der Photosensibilisatoren nachgewiesen werden, wobei die Anlagerung bzw. Aufnahme mit der Verlängerung der Alkylkette zunahm. Somit zeigte der Photosensibilisator SA-PN05 die beste Anlagerung bzw. Aufnahme durch *C. albicans* und die beste photodynamische Inaktivierung von *C. albicans*, aber auch die höchste Dunkeltoxizität.

Im zweiten Teil der Doktorarbeit wurde der Einfluss einer LED405nm-Lampe auf die photodynamische Inaktivierung von *S. aureus* und *E. coli* mit dem Photosensibilisator SAPyR im Vergleich zur BlueV UV802L untersucht. Dazu wurden die Mikroorganismen mit verschiedenen Photosensibilisatorkonzentrationen für 10 s inkubiert und anschließend für 60 s mit der BlueV UV802L bei einer Flächenleistungsdichte von  $20 \frac{mW}{cm^2}$  und mit der LED405nm-Lampe für 6 s bei einer Flächenleistungsdichte von  $200 \frac{mW}{cm^2}$  bestrahlt. Anschließend wurde die photodynamische Inaktivierung der Bakterien im Hinblick auf die gleiche applizierte Energiedosis von  $1,2 \text{ J/cm}^2$  untersucht. Um einen besseren Vergleich der beiden Lampen zu erhalten, wurden die absorbierten Photonen berechnet und verglichen. Bei der photodynamischen Inaktivierung der Bakterien konnte kein Unterschied bei der Verwendung der beiden Lampen beobachtet werden, wobei jedoch mit der LED405nm-Lampe 1,4 mal so viele Photonen von SAPyR absorbiert werden können als mit der BlueV UV802L. Der große Vorteil der LED405nm-Lampe ist jedoch die mit nur 6 s kurze Bestrahlungszeit der Proben, d. h. die gesamte Prozesszeit kann deutlich verkürzt werden, um eine antimikrobielle photodynamische Inaktivierung zu erreichen.

## 6 Ausblick

Um in Zukunft eine Verbesserung der photodynamischen Inaktivierung und somit eine Alternative zu konventionellen Therapien von *C. albicans* mit dem Photosensibilisator SAPyR und dessen Derivaten zu erzielen, müssen die Eigenschaften der verwendeten Photosensibilisatoren optimiert werden. Dies beinhaltet einerseits die Dunkeltoxizität der Photosensibilisatoren SA-PN04 und SA-PN05, andererseits eine Verkürzung der Inkubationszeit von 4 h, sowie der Bestrahlungszeit von 10 min. Außerdem muss untersucht werden, welchen Einfluss die Verlängerung der Alkylkette auf die Anheftung bzw. die Aufnahme der Photosensibilisatoren durch *C. albicans* hat. Im Hinblick auf die Entwicklung möglicher Abwehrmechanismen mittels Hochregulierungen von Enzymen mancher *C. albicans*-Stämme gegen den oxidativen Stress, ausgelöst durch ROS, muss auf regulatorischer Ebene untersucht werden, welche Faktoren einen Einfluss auf die Abtötung von *C. albicans* haben. Es muss auch geklärt werden, wieso mit dem Photosensibilisator SAPyR, welcher eine sehr gute Wirksamkeit gegen Bakterien zeigt, keine photodynamische Inaktivierung von *C. albicans* möglich ist.

Insgesamt konnte erstmals mittels aPDT gezeigt werden, dass eine Inaktivierung von *C. albicans* mit den Photosensibilisatoren SA-PN04 und SA-PN05 möglich ist, was einen vielversprechenden Forschungsansatz darstellt. Mit Hilfe dieser Ergebnisse kann eine gezielte Optimierung der Photosensibilisatoren vorgenommen werden, um eine effektive Inaktivierung von *Candida albicans* zu erzielen.

Mit Hilfe der Ergebnisse aus dem zweiten Teil der Doktorarbeit konnte die photodynamische Inaktivierung von Bakterien bei einer Inkubationszeit von 10 s mit SAPyR und einer Bestrahlungszeit von nur 6 s mit blauem Licht von einer LED405nm-Lampe gezeigt werden. Die Verkürzung der photodynamischen Behandlungszeit in vitro, bestehend aus dem Photosensibilisator SAPyR und einer LED-Lampe, kann als Vorteil für eine zukünftige Anwendung im zahnmedizinischen Bereich angesehen werden, vor allem dann, wenn mehrere Zähne einer photodynamischen Therapie unterzogen werden müssen. Um ein solches System aus Photosensibilisator und Lichtquelle in der Zahnmedizin zu etablieren, bedarf es jedoch noch weiterer Studien. So muss zum Beispiel untersucht werden, wie der Photosensibilisator appliziert werden kann oder auch welcher Erfolg mit solch einem System

bei in-vivo-Studien erzielt werden kann. Die Kombination aus dem Photosensibilisator SAPyR und einer LED-Lampe zur Inaktivierung von Mikroorganismen mittels aPDT stellt jedenfalls einen vielversprechenden Forschungsansatz dar.

Nicht nur in der Zahnmedizin, sondern auch in anderen Bereichen der Medizin wird die photodynamische Inaktivierung von Mikroorganismen in den nächsten Jahren eine wichtige Rolle bei der Behandlung von durch Mikroorganismen ausgelösten Krankheiten spielen. Da es durch die Zunahme der resistenten Keime immer schwieriger wird diese mit konventionellen Therapien zu inaktivieren, ist es wichtig, die antimikrobielle photodynamische Therapie im klinischen Alltag zu etablieren.

## Anhang

## Diagramme der Phototoxizitätsversuche

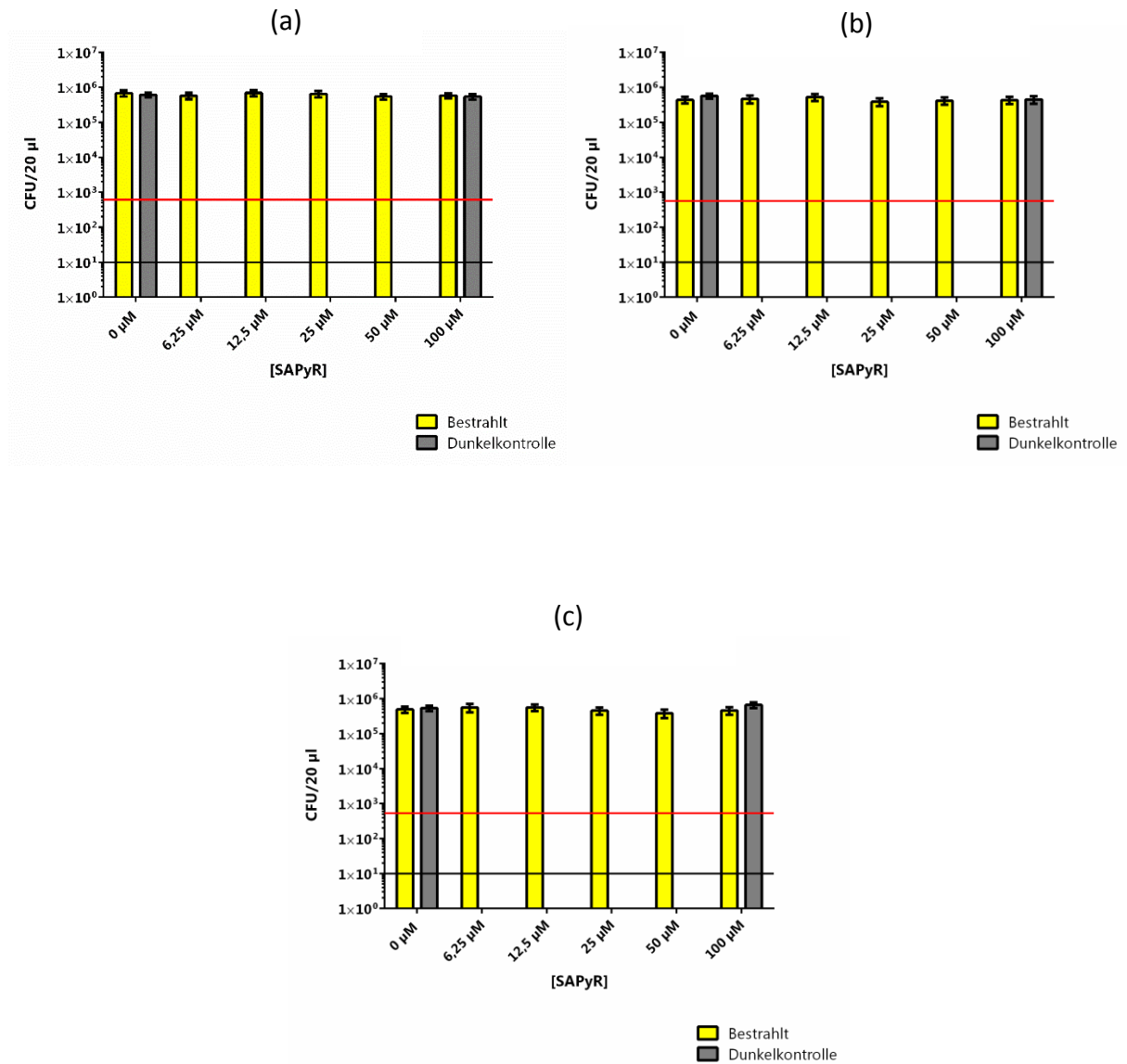


Abbildung 27: Dargestellt ist die Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser (a) und in PBS (b) mit SAPyR für 1 h und der Bestrahlungszeit von 10 min mit einer Energiedosis von 12 J/cm<sup>2</sup> (gelb) und die Dunkelkontrollen (grau). Zusätzlich wird in (c) die Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser mit SAPyR für 15 min und der Bestrahlungszeit von 20 min mit einer Energiedosis von 24 J/cm<sup>2</sup> gezeigt. Es ist der Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen ± Konfidenzintervall dargestellt (\_\_\_ Detektionsgrenze, \_\_\_ 3 log<sub>10</sub>-Reduktion).

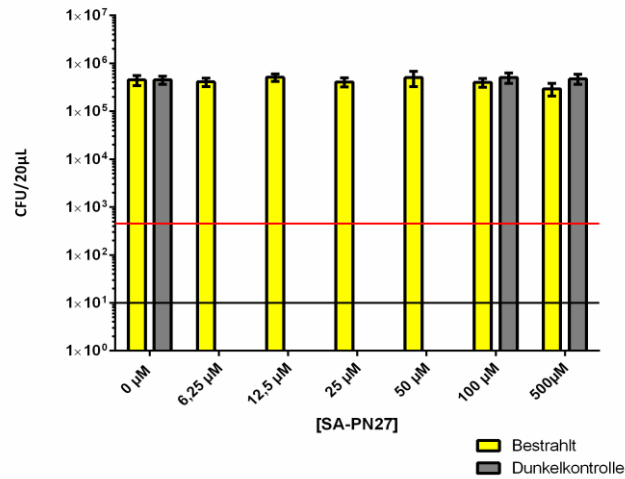
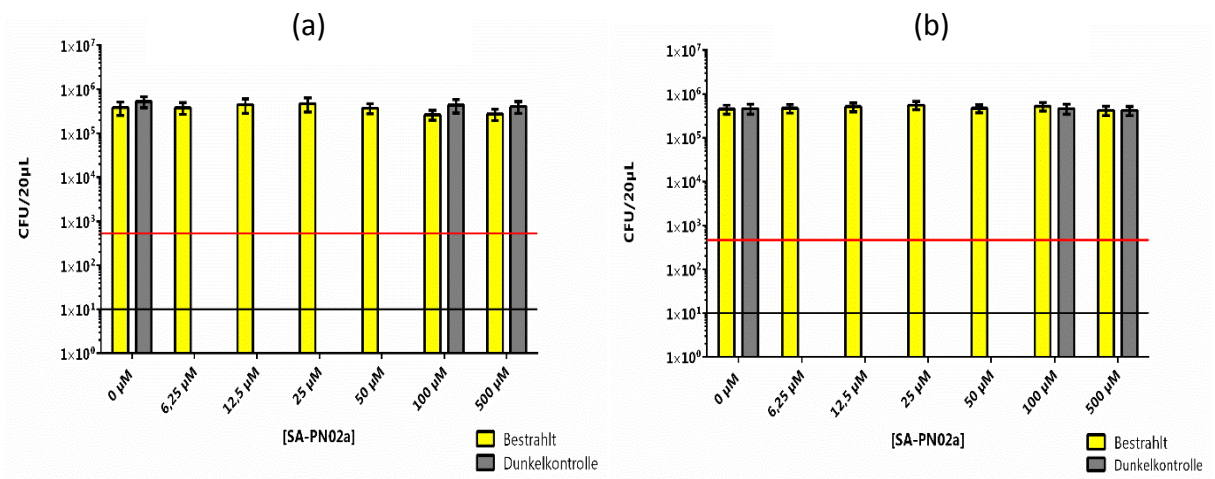


Abbildung 28: Dargestellt ist die Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in PBS mit SA-PN27 für 4 h und der Bestrahlungszeit von 10 min mit einer Energiedosis von 12 J/cm<sup>2</sup> (gelb) und die Dunkelkontrollen (grau). Es ist der Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen ± Konfidenzintervall dargestellt (\_\_\_ Detektionsgrenze, \_\_\_ 3 log<sub>10</sub>-Reduktion).



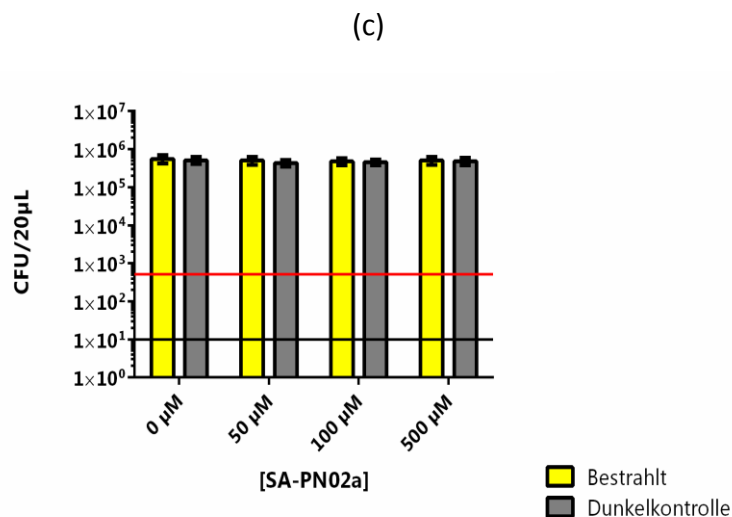


Abbildung 29: Dargestellt ist die Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser (a) und in PBS (b) mit SA-PN02a für 4 h und der Bestrahlungszeit von 10 min mit einer Energiedosis von 12 J/cm<sup>2</sup> (gelb) und die Dunkelkontrollen (grau). Zusätzlich wird in (c) die Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in PBS mit SA-PN02a für 4 h und der Bestrahlungszeit von 10 min mit einer Energiedosis von 120 J/cm<sup>2</sup> mit der LED405nm-Lampe gezeigt. Es ist der Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen ± Konfidenzintervall dargestellt (\_\_\_ Detektionsgrenze, \_\_\_ 3 log<sub>10</sub>-Reduktion).

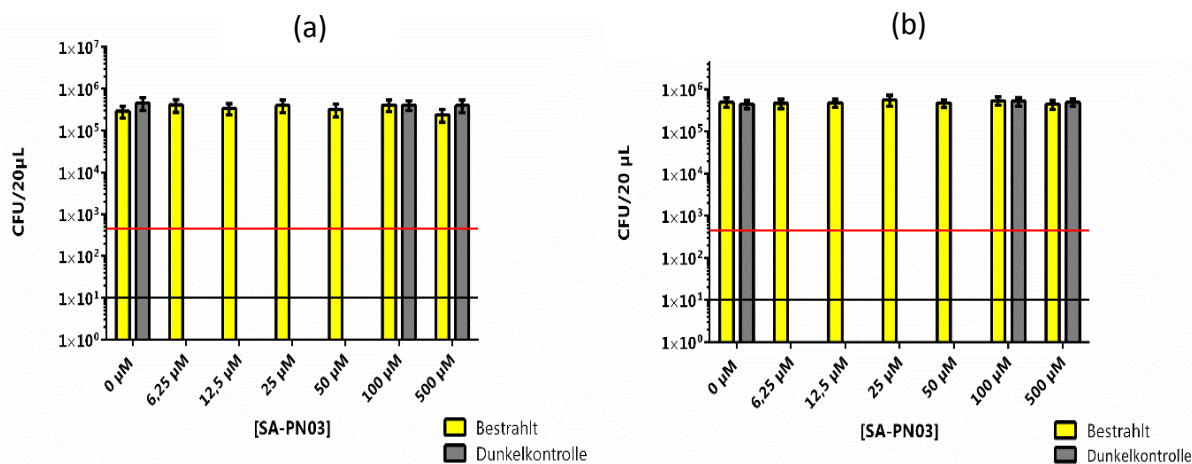


Abbildung 30: Dargestellt ist die Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser (a) und in PBS (b) mit SA-PN03 für 4 h und der Bestrahlungszeit von 10 min mit einer Energiedosis von 12 J/cm<sup>2</sup> (gelb) und die Dunkelkontrollen (grau). Es ist der Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen ± Konfidenzintervall dargestellt (\_\_\_ Detektionsgrenze, \_\_\_ 3 log<sub>10</sub>-Reduktion).

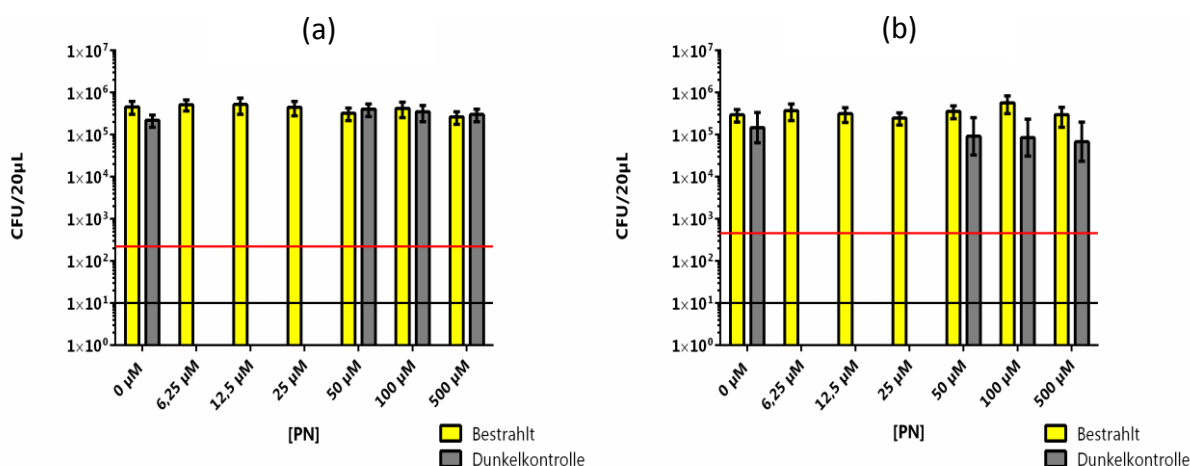


Abbildung 31: Dargestellt ist die Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser (a) und in PBS (b) mit PN für 4 h und der Bestrahlungszeit von 10 min mit einer Energiedosis von  $12 \text{ J/cm}^2$  (gelb) und die Dunkelkontrollen (grau). Es ist der Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  Konfidenzintervall dargestellt (\_\_\_ Detektionsgrenze, \_\_\_  $3 \log_{10}$ -Reduktion).

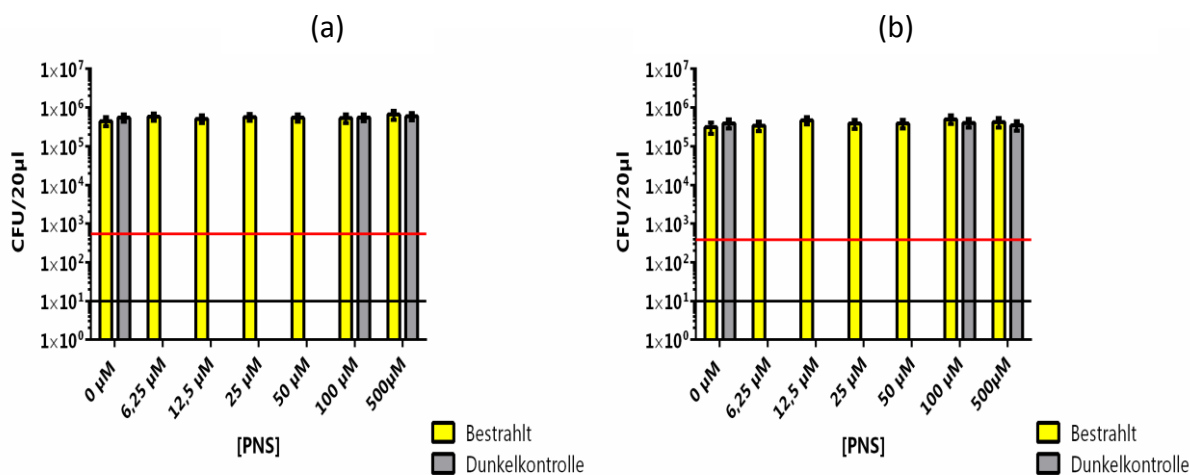


Abbildung 32: Dargestellt ist die Inkubation von *C. albicans* resuspendiert in Millipore-Wasser (a) und in PBS (b) mit PNS für 4 h und der Bestrahlungszeit von 10 min mit einer Energiedosis von  $12 \text{ J/cm}^2$  (gelb) und die Dunkelkontrollen (grau). Es ist der Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  Konfidenzintervall dargestellt (\_\_\_ Detektionsgrenze, \_\_\_  $3 \log_{10}$ -Reduktion).

## Diagramme der Uptakeversuche

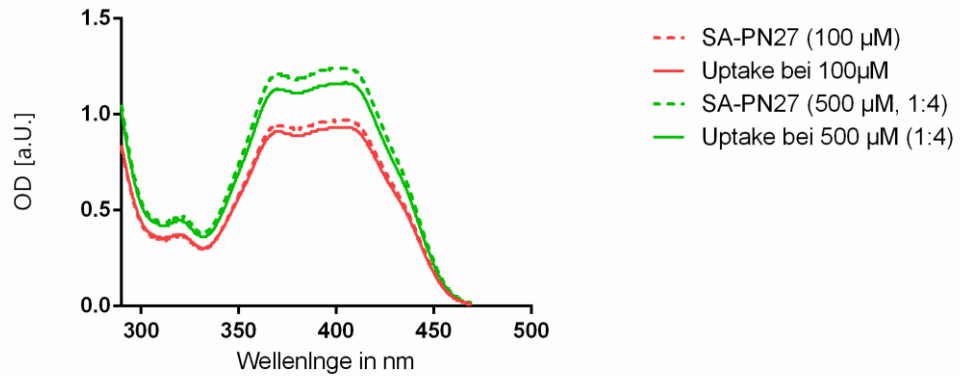


Abbildung 33: Dargestellt ist der „Uptake“-Versuch mit *C. albicans* resuspendiert in PBS mit SA-PN27 bei einer Inkubationszeit von 4 h. Nach dem Zentrifugieren der Proben wurden die Überstände der Photosensibilisatorkonzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ , die nochmals im Verhältnis 1:4 verdünnt wurden, mit und ohne *C. albicans* mit dem Spektrometer vermessen. Dargestellt ist die OD der gemessenen Proben. (gestrichelte Linie: reine PS-Lsg; durchgehende Linie: *Candida* + PS)

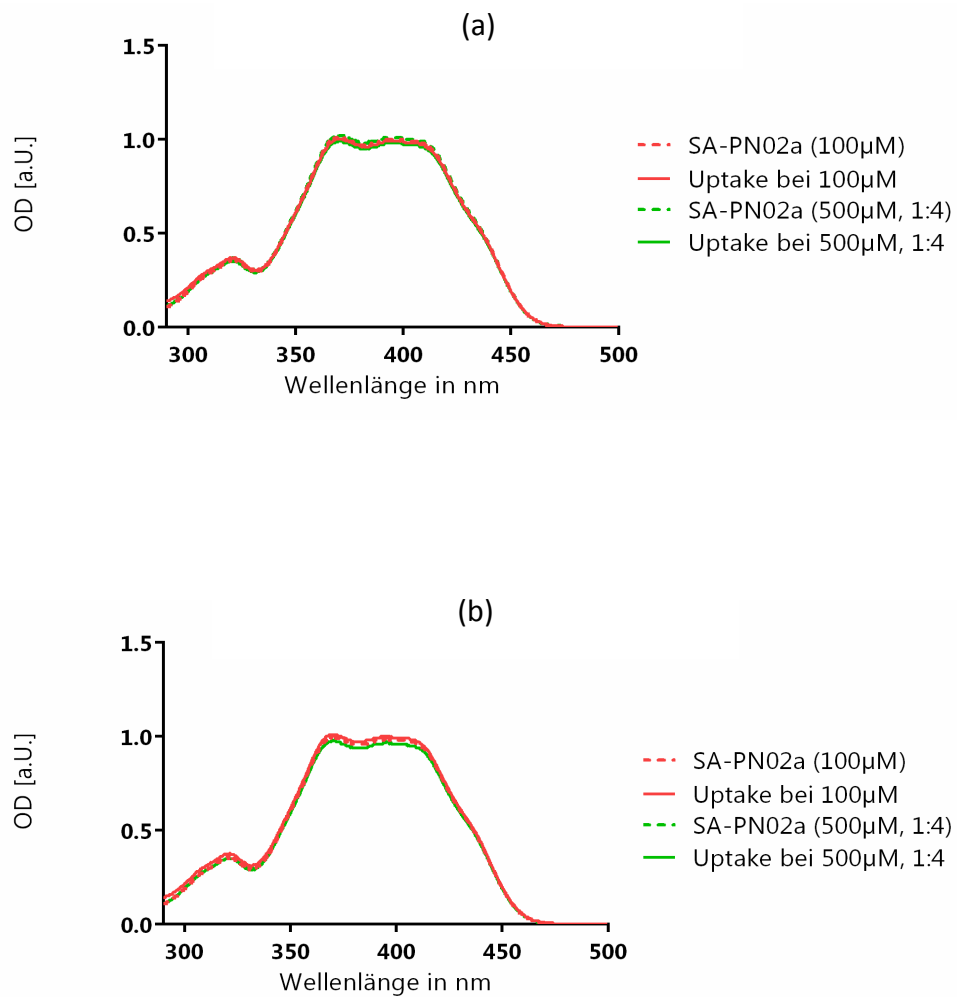


Abbildung 34: Dargestellt ist der „Uptake“-Versuch mit *C. albicans* in Millipore-Wasser (a) und PBS (b) resuspendiert mit SA-PN02a bei einer Inkubationszeit von 4 h. Nach dem Zentrifugieren der Proben wurden die Überstände der Photosensibilisatorkonzentrationen von 100 µM und 500 µM, die nochmals im Verhältnis 1:4 verdünnt wurden, mit und ohne *C. albicans* mit dem Spektrometer vermessen. Dargestellt ist die OD der gemessenen Proben. (gestrichelte Linie: reine PS-Lsg; durchgehende Linie: *Candida* + PS)

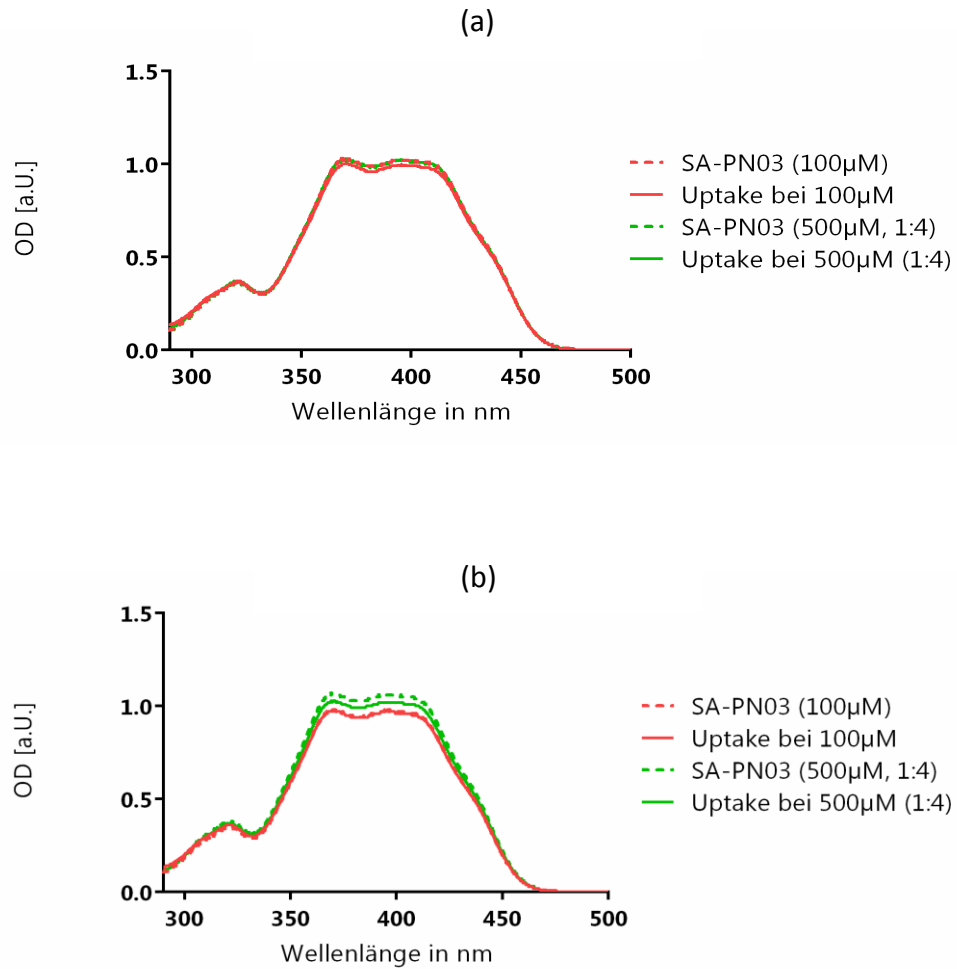


Abbildung 35: Dargestellt ist der „Uptake“-Versuch mit *C. albicans* in Millipore-Wasser (a) und PBS (b) resuspendiert mit SA-PN03 bei einer Inkubationszeit von 4 h. Nach dem Zentrifugieren der Proben wurden die Überstände der Photosensibilisatorkonzentrationen von 100 µM und 500 µM, die nochmals im Verhältnis 1:4 verdünnt wurden, mit und ohne *C. albicans* mit dem Spektrometer vermessen. Dargestellt ist die OD der gemessenen Proben. (gestrichelte Linie: reine PS-Lsg; durchgehende Linie: *Candida* + PS)

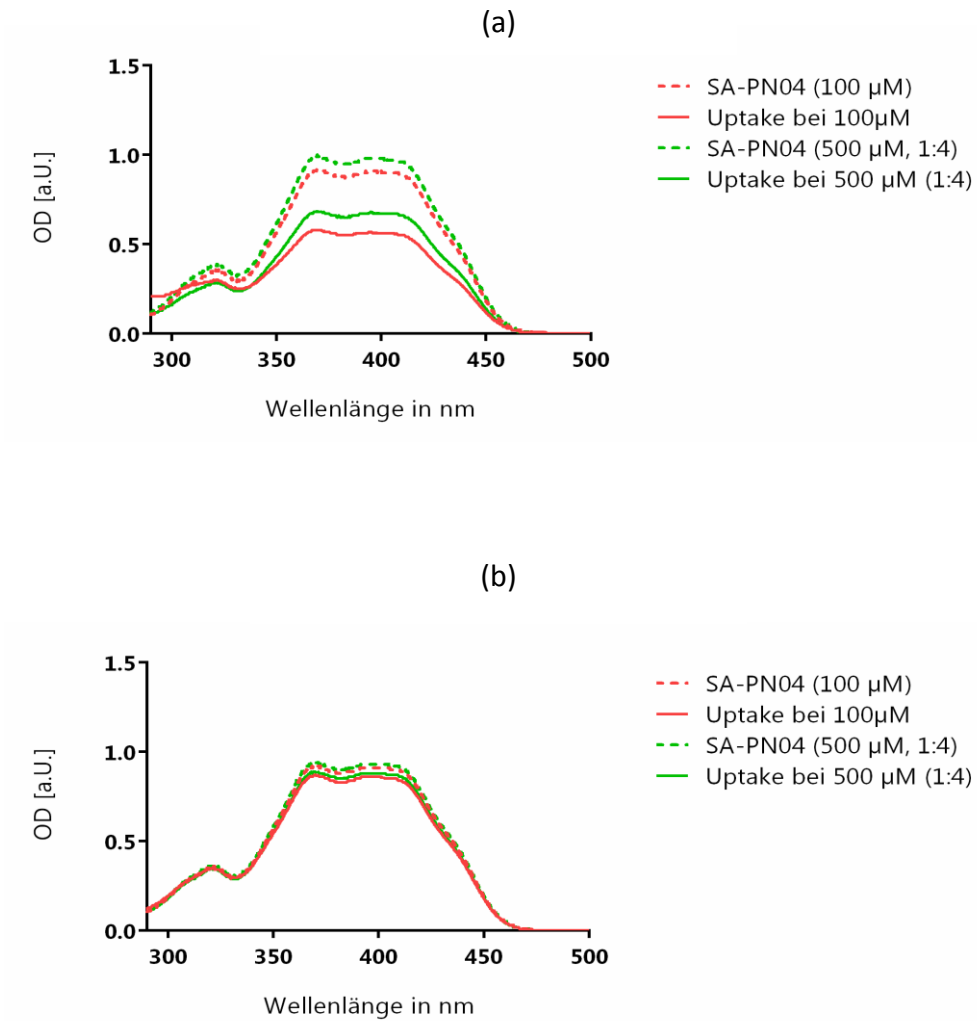


Abbildung 36: Dargestellt ist der „Uptake“-Versuch mit *C. albicans* in Millipore-Wasser (a) und PBS (b) resuspendiert mit SA-PN04 bei einer Inkubationszeit von 4 h. Nach dem Zentrifugieren der Proben wurden die Überstände der Photosensibilisatorkonzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ , die nochmals im Verhältnis 1:4 verdünnt wurden, mit und ohne *C. albicans* mit dem Spektrometer vermessen. Dargestellt ist die OD der gemessenen Proben. (gestrichelte Linie: reine PS-Lsg; durchgehende Linie: *Candida* + PS)

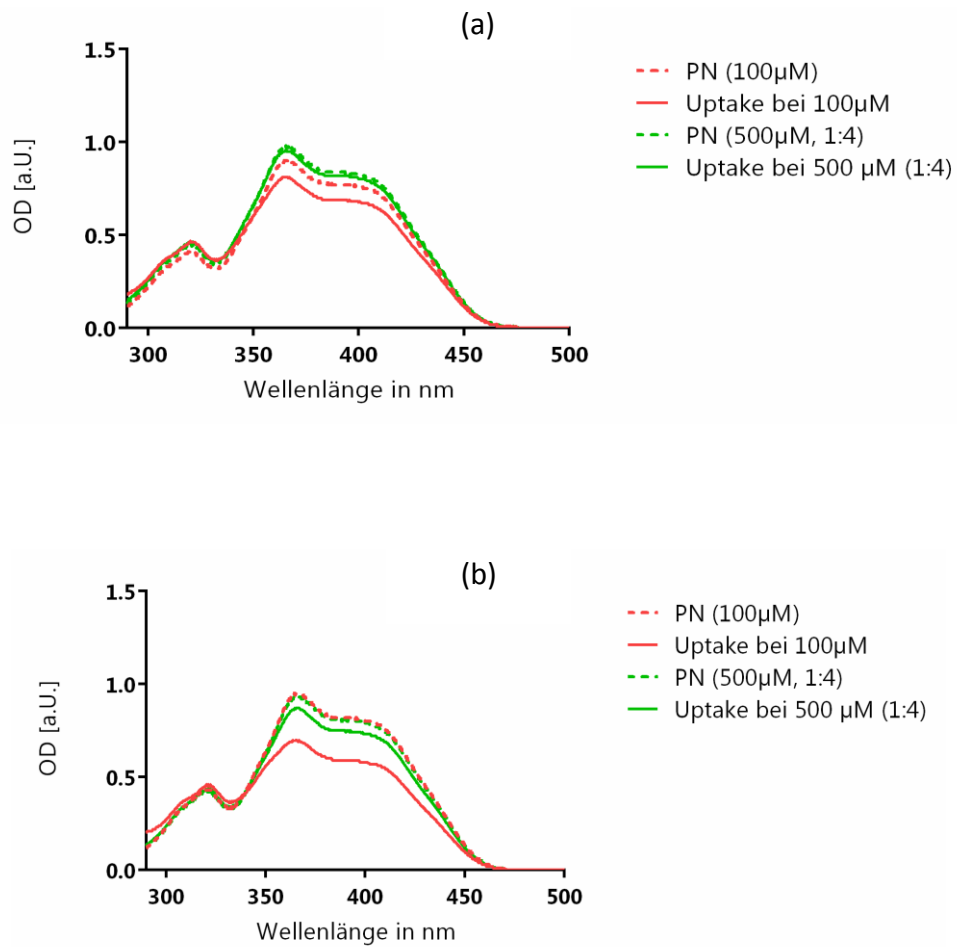


Abbildung 37: Dargestellt ist der „Uptake“-Versuch mit *C. albicans* in Millipore-Wasser (a) und PBS (b) resuspendiert mit PN bei einer Inkubationszeit von 4 h. Nach dem Zentrifugieren der Proben wurden die Überstände der Photosensibilisatorkonzentrationen von 100 µM und 500 µM, die nochmals im Verhältnis 1:4 verdünnt wurden, mit und ohne *C. albicans* mit dem Spektrometer vermessen. Dargestellt ist die OD der gemessenen Proben. (gestrichelte Linie: reine PS-Lsg; durchgehende Linie: *Candida* + PS)

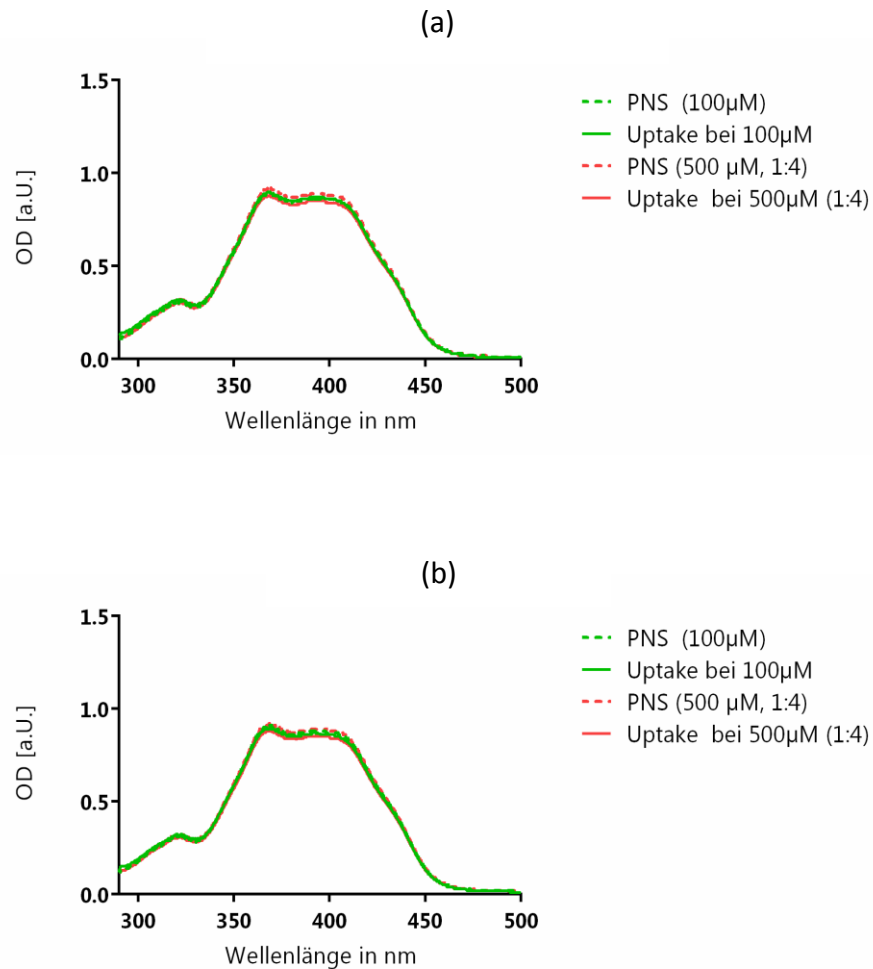


Abbildung 38: Dargestellt ist der „Uptake“-Versuch mit *C. albicans* in Millipore-Wasser (a) und PBS (b) resuspendiert mit PNS bei einer Inkubationszeit von 4 h. Nach dem Zentrifugieren der Proben wurden die Überstände der Photosensibilisatorkonzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ , die nochmals im Verhältnis 1:4 verdünnt wurden, mit und ohne *C. albicans* mit dem Spektrometer vermessen. Dargestellt ist die OD der gemessenen Proben. (gestrichelte Linie: reine PS-Lsg; durchgehende Linie: *Candida* + PS)

**Berechnung der effektiven log<sub>10</sub>-Stufen-Reduktion**

Versuch: SA-PN04 und *C. albicans* in Millipore-Wasser resuspendiert (IZ: 4 h, Energiedosis: 12,0 J/cm<sup>2</sup>)

	0 µM	100 µM	500 µM
Mittelwert	0,13	0,087	2,8
Fehlerobergrenze	0,15	0,12	3,2
Fehleruntergrenze	0,11	0,071	-

Versuch: SA-PN04 und *C. albicans* in PBS gresuspendiert (IZ: 4 h, Energiedosis: 12,0 J/cm<sup>2</sup>)

	0 µM	100 µM	500 µM
Mittelwert	0,11	0,0	2,0
Fehlerobergrenze	0,10	0,0	2,2
Fehleruntergrenze	0,13	0,0	2,0

Waschversuch: SA-PN04 und *C. albicans* in PBS resuspendiert (IZ: 4 h, Energiedosis: 12,0 J/cm<sup>2</sup>)

	0 µM	50 µM	100 µM	500 µM
Mittelwert	0,04	0,55	2,55	4,21
Fehlerobergrenze	0,05	0,81	2,92	5,97
Fehleruntergrenze	0,01	0,44	2,42	-

Versuch: SA-PN05 und *C. albicans* in Millipore-Wasser resuspendiert (IZ: 4 h, Energiedosis: 12,0 J/cm<sup>2</sup>)

	0 µM	6,25 µM	12,5 µM	25 µM	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM
Mittelwert	0	0,14	0,17	0,32	2,90	1,80	0,10	0
Fehlerobergrenze	0,04	0,16	0,22	0,48	3,00	1,89	0,20	0
Fehleruntergrenze	0	0,13	0,14	0,25	2,80	1,26	0	0

Versuch: SA-PN05 und *C. albicans* in PBS resuspendiert (IZ: 4 h, Energiedosis: 12,0 J/cm<sup>2</sup>)

	0 µM	50 µM	100 µM	250 µM	500 µM
Mittelwert	0,03	0,27	0,38	0	0
Fehlerobergrenze	0,58	0,36	0,71	0	0
Fehleruntergrenze	0	0,22	0,30	0	0

Waschversuch: SA-PN05 und *C. albicans* in PBS resuspendiert (IZ: 4 h, Energiedosis: 12,0 J/cm<sup>2</sup>)

	0 µM	6,25 µM	12,5 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Mittelwert	0	4,0	4,7	4,7	4,0	1,5
Fehlerobergrenze	0,01	4,5	4,8	4,8	4,2	1,7
Fehleruntergrenze	0	3,8	4,6	4,5	3,3	0,63

Versuch: SA-PN05 und *C. albicans* in PBS resuspendiert (IZ: 4 h, Energiedosis: 120,0 J/cm<sup>2</sup>, LED405nm)

	0 µM	12,5 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Mittelwert	0	0,11	0,80	2,9	2,6
Fehlerobergrenze	0	0,21	1,4	0	2,9
Fehleruntergrenze	0	0,05	0,63	0	-

## Abkürzungsverzeichnis

$\Phi_{\Delta}$	Quantenausbeute (erzeugte $^1\text{O}_2$ -Moleküle pro vom PS absorbierten Photon)
$\sigma$	Absorptionswirkungsquerschnitt
$^1\text{O}_2$	Sauerstoff im Singulettzustand; Singulett-Sauerstoff
$\text{O}_2$	Sauerstoff
aPDT	antimikrobielle Photodynamische Therapie
aPTT	antimikrobielle Photothermische Therapie
CFU	colony-forming unit; Kolonie bildende Einheit
$\text{cm}^2$	Quadratcentimeter
DK	Dunkelkontrolle
g	Gramm
h	Stunde
ICG	Indocyaningrün
IZ	Inkubationszeit
J	Joule; $1 \text{ J} = 1 \text{ kg m}^2 \text{ s}^{-2}$
KBE	Kolonie bildende Einheit
kg	Kilogramm
L	Liter
$\mu\text{L}$	$10^{-6}$ Liter
$\mu\text{m}$	$10^{-6}$ Meter
$\mu\text{M}$	$10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
M	$\text{mol L}^{-1}$
m	Meter

MB	Methylenblau
mH <sub>2</sub> O	Millipore-Wasser
min	Minute
mL	10 <sup>-3</sup> Liter
mm	10 <sup>-3</sup> Meter
mM	10 <sup>-3</sup> mol
mol	1 mol $\cong$ 6,022 x 10 <sup>23</sup> Teilchen
mW	10 <sup>-3</sup> Watt
n. b.	nicht bestimmt
nm	10 <sup>-9</sup> Meter
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Salin
PDT	Photodynamische Therapie
PS	Photosensibilisator
ROS	reactive oxygene species; reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunde
t	Zeit
TMPyP	5,10,15,20-Tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin
U/min	Umdrehungen pro Minute
VF	Verdünnungsfaktor
W	Watt

---

## Literaturverzeichnis

1. Cutler, J.E., *Putative virulence factors of Candida albicans*. Annual Review of Microbiology, 1991. **45**: p. 187-218.
2. Espinel-Ingroff, A., *Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009)*. Rev Iberoam Micol, 2009. **26**(1): p. 15-22.
3. Kim, S.Y., O.J. Kwon, and J.W. Park, *Inactivation of catalase and superoxide dismutase by singlet oxygen derived from photoactivated dye*. Biochimie, 2001. **83**(5): p. 437-444.
4. Bartels, H.A. and H. Blechman, *A survey of the yeast population in saliva and an evaluation of some procedures for identification of Candida albicans*. Jour Dent Res, 1962. **41**((6)): p. 1386-1390.
5. Howlett, J.A., *Candidal infection of oral-mucosa - invitro model* Proceedings of the Royal Society of Medicine-London, 1976. **69**(10): p. 766-770.
6. ten Cate, J.M., et al., *Molecular and Cellular Mechanisms That Lead to Candida Biofilm Formation*. Journal of Dental Research, 2009. **88**(2): p. 105-115.
7. ODDS, F.C., *Candida and Candidosis*, 1988.
8. Ahmad, A., et al., *Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against Candida*. Microbial Pathogenesis, 2010. **48**(1): p. 35-41.
9. Kolnick, J.R., *Oral candidosis. Report of a case implicating Candida parapsilosis as a pathogen*. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics, 1980. **50**(5): p. 411-415.
10. Arendorf, T.M. and D.M. Walker, *The prevalence and intra-oral distribution of Candida albicans in man*. Archives of Oral Biology, 1980. **25**(1): p. 1-10.
11. Schwenzler, N. and M. Ehrenfeld, *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde Chirurgische Grundlagen*, 2008.
12. Vandeputte, P., S. Ferrari, and A.T. Coste, *Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections*. International journal of microbiology, 2012. **2012**: p. 713687.
13. Quiroga, E.D., et al., *Mechanistic aspects of the photodynamic inactivation of Candida albicans induced by cationic porphyrin derivatives*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2012. **58**: p. 332-339.
14. Denning, D.W., G.G. Baily, and S.V. Hood, *Azole resistance in Candida*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 1997. **16**(4): p. 261-280.
15. Brion, L.P., S.E. Uko, and D.L. Goldman, *Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: Systematic review*. Journal of Infection, 2007. **54**(6): p. 521-529.
16. Gonzales, F.P., et al., *Fungicidal photodynamic effect of a twofold positively charged porphyrin against Candida albicans planktonic cells and biofilms*. Future Microbiology, 2013. **8**(6): p. 785-797.

17. Teichert, M.C., et al., *Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model*. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics, 2002. **93**(2): p. 155-160.
18. Cassone, A., Simonett.N, and Strippol.V, *Ultrastructural changes in the wall during germ-tube formation from blastospores of Candida albicans*. Journal of General Microbiology, 1973. **77**(AUG): p. 417-426.
19. Djaczenk.W and A. Cassone, *Visulization of new ultrastructural components in the cell wall of Candida albicans with fixatives containing TAPO*. Journal of Cell Biology, 1972. **52**(1): p. 186-&.
20. Persi, M.A. and J.C. Burnham, *Use of tannic acid as a fixative-mordant to improve the ultrastructural appearance of Candida albicans blastospores*. Sabouraudia-Journal of Medical and Veterinary Mycology, 1981. **19**(1): p. 1-8.
21. Cassone, A., D. Kerridge, and E.F. Gale, *Ultrastructural changes in the cell wall of Candida albicans following cessation of growth and their possible relationship to the development of polyene resistance*. Journal of General Microbiology, 1979. **110**(FEB): p. 339-349.
22. Cassone, A., E. Mattia, and L. Boldrini, *Agglutination of blastospores of Candida albicans by concanavalin A and its relationship with the distribution of mannan polymers and the ultrastructure of the cell wall*. Journal of General Microbiology, 1978. **105**(APR): p. 263-273.
23. Evron, R. and J.A. Drewe, *Demonstration of the polysaccharides in the cell wall of Candida albicans blastospores, using silver methenamine staining and a sequence of extraction procedures*. Mycopathologia, 1984. **84**(2-3): p. 141-149.
24. Poulain, D., V. Hopwood, and A. Vernes, *Antigenic variability of Candida albicans*. Crc Critical Reviews in Microbiology, 1985. **12**(3): p. 223-270.
25. McCourtie, J. and L.J. Douglas, *Relationship between cell surface composition of Candida albicans and adherence to acrylic after growth on different carbon sources*. Infection and Immunity, 1981. **32**(3): p. 1234-1241.
26. Gardiner, R., C. Podgorski, and A.W. Day, *Serological studies on the fimbriae of yeasts and yeastlike species* Botanical Gazette, 1982. **143**(4): p. 534-541.
27. Raab, O., *Ueber die Wirkung fluoescirender Stoffe auf Infusorien*. Z Biol, 1900. **39**: p. 524-526.
28. von Tappeiner, H., *Über die Wirkung der photodynamischen (fluorescierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme*. Arch Klin Med, 1904. **80**: p. 427-487.
29. Auler, H. and G. Banzer, *Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren*. Z. Krebsforsch, 1942. **53**: p. 65-68.
30. Spikes, J.D., *Photodynamic action: From paramecium to photochemotherapy*. Photochemistry and Photobiology, 1997. **65**(SPEC. ISSUE): p. 142S-147S.
31. Lipson, R.L., E.J. Baldes, and M.J. Gray, *Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer*. Cancer, 1967. **20**(12): p. 2255-2257.

32. Dougherty, T.J., et al., *Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light*. Journal of the National Cancer Institute, 1975. **55**(1): p. 115-121.
33. Dougherty, T.J., et al., *Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors*. Cancer Research, 1978. **38**(8): p. 2628-2635.
34. Braathen, L.R., et al., *Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: An international consensus*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2007. **56**(1): p. 125-143.
35. Karavolos, M.H., et al., *Role and regulation of the superoxide dismutases of Staphylococcus aureus*. Microbiology-Sgm, 2003. **149**: p. 2749-2758.
36. Dougherty, T.J., et al., *Photodynamic therapy*. Journal of the National Cancer Institute, 1998. **90**(12): p. 889-905.
37. Wainwright, M., *Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1998. **42**(1): p. 13-28.
38. Hamblin, M.R. and T. Hasan, *Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?* Photochemical & Photobiological Sciences, 2004. **3**(5): p. 436-450.
39. Maisch, T., et al., *Antibacterial photodynamic therapy in dermatology*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2004. **3**(10): p. 907-917.
40. Gonzales, F.P. and T. Maisch, *Photodynamic inactivation of microorganisms as an innovative approach to kill mucocutaneous and skin microorganisms*. Giornale Italiano Di Dermatologia E Venereologia, 2010. **145**(4): p. 477-489.
41. Maisch, P.D.r.n.T., et al., *Antibakterielle Photodynamische Therapie*. Hautarzt, 2005. **56**(11): p. 1048-55.
42. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, *Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy*. Lancet, 1984. **1**(8391): p. 1396-1397.
43. Jones, L.R. and L.I. Grossweiner, *Singlet oxygen generation by Photofrin(R) in homogeneous and light-scattering media*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1994. **26**(3): p. 249-256.
44. Szeimies, R.M., et al., *9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycene (ATMPn) a novel photosensitizer for photodynamic therapy: Uptake kinetics and intracellular localization*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1996. **34**(1): p. 67-72.
45. Braun, A., et al., *Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial*. Journal of Clinical Periodontology, 2008. **35**(10): p. 877-884.
46. Cappuyns, I., et al., *Treatment of residual pockets with photodynamic therapy, diode laser, or deep scaling. A randomized, split-mouth controlled clinical trial*. Lasers in Medical Science, 2012. **27**(5): p. 979-986.

47. Wilson, M., et al., *Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer*. Journal of Applied Bacteriology, 1995. **78**(5): p. 569-574.
48. Wilson, M. and N. Mia, *Sensitisation of Candida albicans to killing by low-power laser light*. Journal of Oral Pathology & Medicine, 1993. **22**(8): p. 354-357.
49. Fickweiler, S., et al., *Indocyanine green: Intracellular uptake and phototherapeutic effects in vitro*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1997. **38**(2-3): p. 178-183.
50. Engel, E., et al., *Light-induced decomposition of indocyanine green*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2008. **49**(5): p. 1777-1783.
51. Baker, K.J., *Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium and indocyanine green (ICG) by plasma alpha-1 lipoproteins*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1966. **122**(4): p. 957-&.
52. Boehm, T.K. and S.G. Ciancio, *Diode laser activated indocyanine green selectively kills bacteria*. Journal of the International Academy of Periodontology, 2011. **13**(2): p. 58-63.
53. Souza, E., et al., *Antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis*. Lasers in Medical Science, 2016. **31**(1): p. 187-196.
54. Trindade, A.C., et al., *Photodynamic Therapy in Endodontics: A Literature Review*. Photomedicine and Laser Surgery, 2015. **33**(3): p. 175-182.
55. Siddiqui, S.H., K.H. Awan, and F. Javed, *Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against Enterococcus faecalis in infected root canals: A systematic literature review*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2013. **10**(4): p. 632-643.
56. Mellado-Valero, A., et al., *Decontamination of dental implant surface in peri-implantitis treatment: A literature review*. Medicina Oral Patologia Oral Y Cirugia Bucal, 2013. **18**(6): p. E869-E876.
57. Vohra, F., et al., *Role of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of aggressive periodontitis: A systematic review*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2016. **13**: p. 139-147.
58. Cieplik, F., et al., *Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR-An exclusive singlet oxygen photosensitizer*. Free Radical Biology and Medicine, 2013. **65**: p. 477-487.
59. Driemel, H., *Untersuchungen zur Phototoxizität des wasserlöslichen Photosensibilisators Perinaphtenon (PNS) in Zellkulturen humaner dermaler Fibroblasten (NHDF)*, in Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsklinikum Regensburg 2011, Universität Regensburg. p. 107.
60. Miles, A.A., S.S. Misra, and J.O. Irwin, *The estimation of the bactericidal power of the blood*. The Journal of hygiene, 1938. **38**(6): p. 732-49.
61. DGHM, D.-K.d., *Anforderungskatalog für die Aufnahme von chemischen Desinfektionsverfahren in die Desinfektionsmittel-Liste der DGHM*. hp-Verlag GmbH: Wiesbaden, 2002.

62. Nonell, S., M. Gonzalez, and F.R. Trull, *1H-Phenalen-1-one-2-sulfonic acid - an extremely efficient singlet molecular oxygen sensitizer for aqueous media*. *Afinidad*, 1993. **50**(448): p. 445-450.
63. Alves, E., et al., *Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins*. *Bmc Microbiology*, 2009. **9**.
64. Zeina, B., et al., *Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy*. *British Journal of Dermatology*, 2001. **144**(2): p. 274-278.
65. Quiroga, E.D., M.G. Alvarez, and E.N. Durantini, *Susceptibility of Candida albicans to photodynamic action of 5,10,15,20-tetra(4-N-methylpyridyl)porphyrin in different media*. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 2010. **60**(2): p. 123-131.
66. Wilkinson, F., W.P. Helman, and A.B. Ross, *Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet-state of molecular-oxygen in solution* *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 1993. **22**(1): p. 113-262.
67. Hwang, B., et al., *The antimicrobial peptide, psacothecin induces reactive oxygen species and triggers apoptosis in Candida albicans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011. **405**(2): p. 267-271.
68. Aerts, A.M., et al., *The antifungal plant defensin HsAFP1 from Heuchera sanguinea induces apoptosis in Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology*, 2011. **2**.
69. Aerts, A.M., et al., *The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from Raphanus sativus, involves the induction of reactive oxygen species in Candida albicans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2007. **13**(4): p. 243-247.
70. Kobayashi, D., et al., *Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002. **46**(10): p. 3113-3117.
71. Cormick, M.P., et al., *Mechanistic insight of the photodynamic effect induced by tri- and tetra-cationic porphyrins on Candida albicans cells*. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2011. **10**(10): p. 1556-1561.
72. Reddi, E., et al., *Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins*. *Photochemistry and Photobiology*, 2002. **75**(5): p. 462-470.
73. Gollmer, A., et al., *A novel set of symmetric methylene blue derivatives exhibits effective bacteria photokilling - a structure-response study*. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2015. **14**(2): p. 335-351.
74. Vieira, D.B. and A.M. Carmona-Ribeiro, *Cationic lipids and surfactants as antifungal agents: mode of action*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006. **58**(4): p. 760-767.
75. Ahlstrom, B., et al., *Submicellar complexes may initiate the fungicidal effects of cationic amphiphilic compounds on Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997. **41**(3): p. 544-550.
76. Wilkinson, F., W.P. Helman, and A.B. Ross, *Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet-state of molecular-oxygen in solution- an*

- expanded and revised compilation* Journal of Physical and Chemical Reference Data, 1995. **24**(2): p. 663-1021.
77. Nunez, S.C., et al., *Effects of ionic strength on the antimicrobial photodynamic efficiency of methylene blue*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2014. **13**(3): p. 595-602.
78. Demidova, T.N. and M.R. Hamblin, *Effect of cell-photo sensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. **49**(6): p. 2329-2335.
79. Caminos, D.A., M.B. Spesia, and E.N. Durantini, *Photodynamic inactivation of Escherichia coli by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-trimethylammoniumpropoxy)phenyl and 4-(trifluoromethyl)phenyl groups*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2006. **5**(1): p. 56-65.
80. Prates, R.A., et al., *Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of Candida albicans*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011. **66**(7): p. 1525-1532.
81. Tabenski I, C.F., Tabenski L, Regensburger J, Hiller KA, Buchalla W, Maisch T, Späth A., *The impact of cationic substituents in phenalen-1-one photosensitizers on antimicrobial photodynamic efficacy*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2015.
82. Maisch, T., et al., *Fast and effective: intense pulse light photodynamic inactivation of bacteria*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012. **39**(7): p. 1013-1021.
83. Maisch, T., et al., *Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. **49**(4): p. 1542-1552.
84. Sharma, M., et al., *Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008. **52**(1): p. 299-305.
85. Eichner, A., et al., *Dirty hands: photodynamic killing of human pathogens like EHEC, MRSA and Candida within seconds*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2013. **12**(1): p. 135-147.
86. Malik, Z., H. Ladan, and Y. Nitzan, *Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions*. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1992. **14**(3): p. 262-266.
87. Cieplik, F., et al., *The impact of absorbed photons on antimicrobial photodynamic efficacy*. Frontiers in Microbiology, 2015. **6**.

## Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit wurde an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universitätsklinik Regensburg erstellt. Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Durchführung der Experimente und dem Verfassen der Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank geht an Prof. Dr. Wolfgang Bäumler und besonders an meinen Doktorvater PD Dr. Tim Maisch für die Ermöglichung und Betreuung dieser Arbeit. Während der gesamten Labor- und Bearbeitungszeit hatte er stets ein offenes Ohr für meine Fragen und stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Es war unter seiner Leitung immer sehr angenehm in der Arbeitsgruppe bei einem sehr freundlichen und herzlichen Umgang miteinander zu arbeiten. Ich hätte mir keinen besseren Doktorvater vorstellen können.

Ich möchte mich auch sehr herzlich bei dem kompletten Forschungsteam der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universitätsklinik Regensburg bedanken. Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Anita Gollmer für die Unterstützung in physikalischen und allen anderen Belangen und an Herrn Dr. Johannes Regensburger für die Kooperation in physikalischen Fragestellungen und der Ausarbeitung dieser in der Arbeit. Auch an Dr. Andreas Späth geht ein Dank für die Bereitstellung der Photosensibilisatoren und für die Unterstützung in chemischen Belangen. Des Weiteren möchte ich mich beim gesamten Laborteam (Anja Eichner, Ariane Felgenträger, Tatjana Schifferstein, Petra Unger, Eva Peterhof, Ewa Kowalewski, Sara Wennige und Lydia Künzel) für die Zusammenarbeit im Labor und den freundlichen Umgang bedanken. Es hat mir viel Spaß bereitet mit euch zusammenzuarbeiten.

Ein weiterer Dank geht an Thomas Voit, der zur selben Zeit im Labor an seiner Doktorarbeit gearbeitet hat und mir in Hinblick auf IT-Fragen immer freundlich und aufgeschlossen mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch bei den Korrekturlesern Georg Schwimbeck und meiner Freundin Carolina Steinberger möchte ich mich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine geliebten Eltern und Großeltern. Ohne eure Unterstützung während des Studiums und auch im Verlauf dieser Arbeit wäre es mir nicht möglich gewesen, dies zu bewältigen. Danke, dass ihr mich immer unterstützt habt und hinter mir gestanden seid.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 11.05.16

Patrick Bauer